

UCH-FC
MA6-B
B.423
C.1



**ROL DE LAS CÉLULAS DEL NEUROMASTO EN LA ESTABILIDAD NEURONAL Y
REGENERACIÓN DEL NERVIOS DE LA LINEA LATERAL POSTERIOR EN LARVAS DE PEZ
CEBRA.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al Grado de

MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Por

Natalia Belén Beiza Canelo

Junio 2014

Santiago, Chile

Director de Tesis: Dr. Miguel Allende C.

Co-director de Tesis: Dra. María Laura Ceci

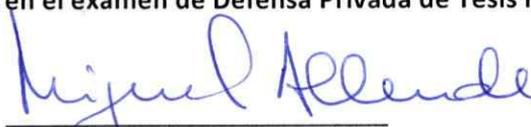
**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER**

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

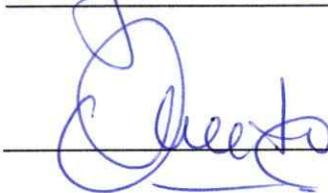
NATALIA BELÉN BEIZA CANELO

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

Dr. Miguel Allende Connelly
Director Tesis



Dra. María Laura Ceci
Co-Directora



Comisión de Evaluación

Dr. Álvaro Glavic
Presidente Comisión



Dr. Alejandro Roth
Corrector



Santiago de Chile, Junio 2014

A mis abuelos: Eliana, Oscar, Elvira e Ismael

*"There's a part of every living thing that wants to become itself:
the tadpole into the frog, the chrysalis into the butterfly,
a damaged human being into a whole one."*

ELLEN BASS

*"If there were no regeneration, there could be no life.
If everything regenerated there would be no death"*

RICHARD J. GOSS

*"Hay una parte de cada ser vivo que desea convertirse en sí misma,
el renacuajo en rana, la crisálida en mariposa,
el ser humano herido en ser humano sano"*

*"Si no hubiera regeneración, no podría haber vida.
Si todo regenerara, no habría muerte"*



Nací un caluroso 15 de febrero del año 1989, en la ciudad de Santiago, un año de grandes cambios en Chile y el mundo, también sólo un día después del día de los enamorados, lo cual hasta el día de hoy opaca siempre mi cumpleaños. Durante mi infancia tuve que acompañar a mis padres viviendo en diferentes ciudades a lo largo de Chile, no por mi voluntad, sino por el trabajo que mi padre tenía en ese entonces. Así, desde pequeña aprendí a moverme y a no estar nunca quieta, y desde muy niña sentí la necesidad de viajar constantemente. Y he aquí una de las razones por las que elegí mi carrera. La otra razón es aun más infantil y sencilla, y es el simple hecho que desde muy pequeña me intrigó profundamente el saber por qué las cosas eran como eran. Así, agoté a mis padres con incesantes preguntas a las cuales ellos no pudieron dar respuesta, y en la incansante búsqueda de estas, me topé en mi camino con la ciencia, particularmente con la Biología, que desde que tengo uso de razón, fue mi ciencia favorita, porque era la que se encargaba del estudio de la vida. De esta manera, todo este pasado fue construyendo mi presente y seguirá construyendo mi futuro como investigadora científica y como Bióloga.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que durante este proceso fueron mis maestros.

En primer lugar, un agradecimiento general a TODOS los que confiaron en mí más que yo misma.

A mis Padres, por su apoyo incondicional y sus constantes arengas. A mi Madre: Eliana, por todas sus oraciones para que me fuera bien y por sus enseñanzas de valor y ética, por su luz violeta que siempre me acompaña. A mi Papá: Julio, por quererme como soy, por haber querido a la niña y adolescente que fui.

Al Kaleu, mi pollo, por darme alegría incluso en los momentos de más estrés, por hacerme reír y por hacerme quererlo y adorarlo.

A Cecilia, Camila, Geraldine y Sayaka, por enseñarme el valor de ser mujer y a ayudarme a apreciar el lado femenino de las cosas. A Camila en particular, por ser mi amiga del alma, casi alma gemela, la única que puede meterse en mi cabeza y descifrarme, por su apoyo y consejos para terminar esta tesis.

A Felipe y a Francisco por haberme dado fuego y coraje, por mostrarme el *yang*.

A Felipe, por ser el Sol

A mis compañeros de la U, mis compañeros de carrera, de carrete, de la vida: a la Pachy, la Lili, al Fabi, a la Geri, a Connie, al Pollo, al Lucho (Doña Luisa), a todos un agradecimiento general y a cada uno un agradecimiento particular, por sus enseñanzas, conversaciones, consejos y buenos momentos y por siempre apoyarme y darme confianza. En particular a Connie, por ser

un ejemplo y por sus consejos, por darme fuerza para avanzar en este trabajo. A la Geri por haberme acompañado emocionalmente y ser mi roca.

A mis compañeros de laboratorio, por sus consejos y su infinita paciencia para responder a mis preguntas e inquietudes; a Lau, Mario, Oscar, Undu, Marjorie y Rosario; gracias por saber más que yo y enseñarme, gracias por su tiempo. A la Javi Pez y la Merry por haberme recibido y enseñado lo que sabían y por enseñarme a querer al pez zebra. Un agradecimiento especial a Lau, por su tiempo y paciencia, pero sobre todo por esperarme aunque fuera a "mi ritmo". Al Mauro, por odiar al mundo juntos y patear la perra. Y a la Tami, que si bien no alcanzó a traspasarme mucho sus conocimientos, fue un apoyo moral y emocional importante durante el desarrollo de este trabajo.

Gracias a la gente del lab que están siempre ahí. Gracias a Florencio, Catalina, Juanito y Don Víctor. A Catalina en especial por haber mantenido a los peces lindos y sanos para que pusieran muchos huevos para los experimentos.

And last but not least, al Dr. Allende, que me recibió en su laboratorio y me permitió desarrollar mi trabajo ahí. Gracias por su ejemplo como académico y como persona.

Ah! Y obvio, al pez cebra, por ser pequeño y transparente y permitirme haber realizado todo este trabajo.

INDICE DE CONTENIDOS

Indice de Tablas	vi
Indice de Figuras	vii
Lista de siglas y abreviaturas	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
1. Introducción	1
1.1 Regeneración en el SNP	1
1.2 Relaciones tróficas en los sistemas sensoriales	3
1.3 El sistema de la línea lateral posterior del pez cebra	6
1.4 Planteamiento del problema	12
2. Hipótesis y Objetivos	14
2.1 Hipótesis	14
2.2 Objetivos	14
3. Materiales y Métodos	16
3.1 Material Biológico	14
3.2 Reactivos	17
3.3 Eliminación de las células del neuromasto con CuSO ₄	18
3.3.1 Eliminación de células ciliadas	18
3.3.2 Eliminación de otras células	19
3.4 Microinyección de DNA	19
3.5 Electroablación del nervio de la línea lateral posterior y de los neuromastos	20

3.6 Inmunohistoquímica y ensayo TUNEL	21
3.7 Adquisición y procesamiento de imágenes	22
3. 8 Análisis Estadístico	23
4. Resultados	24
4.1 La eliminación de las células ciliadas produce una desorganización de la inervación aferente	24
4.2 La ausencia prolongada de las células del neuromasto produce la retracción de las raíces aferentes del nervio de la línea lateral posterior	31
4.3 La eliminación de las células del neuromasto no produce muerte neuronal ni degeneración axonal en el nervio de la línea lateral posterior	36
4.4 La ausencia de las células ciliadas no afecta la regeneración de la rama principal del nervio de la línea lateral posterior, pero si la emisión de raíces aferentes	39
4.5 La electroablación de un neuromasto tiene múltiples resultados sobre la innervación asociada a éste	42
5. Discusión	47
5.1 Las células ciliadas, en estadios tempranos de desarrollo, son independientes de la innervación	47
5.2 Estudios sobre el nervio de la línea lateral posterior durante la eliminación de las células ciliadas	48
5.3 Ventajas del modelo de la línea lateral posterior	48
5.3.1 Ventajas para estudios en dinámica neuronal	48
5.3.2 Ventajas para el estudio de eliminación de blancos sinápticos	49
5.4 Rol de las células ciliadas en la estabilidad de los terminales nerviosos del nervio de la LLp	50
5.5 Posibles tipos celulares involucrados en la llegada y mantención de la innervación en el sitio del neuromasto	51

5.5.1 Células de soporte y progenitores de las células ciliadas	51
5.5.2 Células interneuromásticas	52
6. Conclusiones	54
7. Bibliografía	55
8. Anexos	62

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Listado de las líneas de peces transgénicas y mutantes utilizadas en este trabajo.	17
---	-----------

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacciones tróficas en los sistemas sensoriales. Modificado de Varon y Bunge, 1978.....	5
Figura 2. La línea lateral posterior primaria en la larva del pez cebra. Panel A: Modificado de Dambly-Chaudière et. al, 2003. Panel B: Modificado de Ma y Raible, 2009.....	8
Figura 3. Estructura del neuromasto y de su inervación. Panel A: Modificado de Metcalfe, et al 1985; Panel A': Tomado de Ma y Raible, 2009; Paneles B-E: Modificado de Nagiel et al., 2008.....	10
Figura 4. Esquema de la nomenclatura usada en este trabajo para denominar a los neuromastos y su inervación.....	11
Figura 5. Esquema del montaje experimental del sistema de electroablación (Tomado de Moya-Díaz et al., 2014)	21
Figura 6. Desorganización de la inervación de neuronas aferentes tras la eliminación de las células blanco.	25
Figura 7. Cuantificación del número de raíces secundarias en ausencia de células ciliadas (HC).	26
Figura 8. Cuantificación del área de la inervación en ausencia de células ciliadas (HC).	28
Figura 9. Alteraciones del nervio de la línea lateral posterior tras la eliminación prolongada de los blancos sinápticos	30
Figura 10. Alteraciones del nervio de la línea lateral posterior tras la eliminación de los blancos sinápticos en mutantes <i>Phoenix</i>	31
Figura 11. Retracción de las aferencias del nervio de la línea lateral posterior tras 24 hpt (4 dpf)	33
Figura 12. Retracción de las aferencias del nervio de la línea lateral posterior a las 72 hpt (6 dpf)	34
Figura 13. Número de raíces aferentes del nervio de la línea lateral posterior en ausencia prolongada de células del neuromasto	35

Figura 14. Cambio en la morfología observado durante incubación en sulfato de cobre 50 μ M a nivel de neurona única.....	37
Figura 15. Evaluación de muerte neuronal asociada a la privación de blancos sinápticos.....	38
Figura 16. Regeneración del nervio de la línea lateral posterior en ausencia de células ciliadas y otras células del neuromasto.....	41
Figura 17. Retracción de la inervación durante la eliminación de un neuromasto.....	44
Figura 18. Inervación de neuromastos posteriores después de la eliminación de un neuromasto específico.....	45

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ANOVA	<i>analysis of variance</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Di-Asp	<i>4-(4-diethylaminostyryl)-N-methylpyridinium iodide</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dpf	días post fertilización
dpt	días post tratamiento
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gLLP	ganglio del nervio de la línea lateral posterior
HC	<i>hair cells</i> (células ciliadas)
hpa	horas post axotomía
hpd	horas post daño
hpf	horas post fertilización
hpi	horas post inicio de incubación
hpt	horas post tratamiento
LLa	línea lateral anterior
LLp	línea lateral posterior
LMP	<i>low melting point</i> (bajo punto de fusión)

nLLp	nervio de la línea lateral posterior
PBS-T	Buffer fosfato salino-Tween 0,1%
PFA	Paraformaldehído
<i>pho</i>	Mutante <i>Phoenix</i>
r.a	raíces aferentes
r.s	raíces secundarias
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico

RESUMEN

El sistema mecanosensorial de la línea lateral posterior de los peces corresponde a un órgano sensorial de gran importancia para la inetracción de éstos y su entorno, y en larvas de pez cebra ofrece una serie de ventajas para estudios de regeneración nerviosa. Este sistema presenta una gran homología con el sistema auditivo de los mamíferos, por tanto constituye un excelente modelo para el estudio de la regeneración de sistemas sensoriales de vertebrados. En los peces, este sistema está formado básicamente por pequeños órganos sensoriales denominados neuromastos, que contienen a las células ciliadas. Estas células mecanosensoriales excitables están inervadas por un nervio periférico: el nervio de la línea lateral posterior, cuyos somas se encuentran en el ganglio de la línea lateral posterior. Durante el desarrollo de este sistema, en estadios embrionarios tempranos, existe una estrecha relación entre las células del neuromasto y el axón de la neurona sensorial que las va a contactar. Después de una lesión, la correcta re-conexión entre ambos componentes es de suma importancia para la regeneración funcional del sistema. En estudios anteriores se ha demostrado que tanto el nervio, como las células ciliadas, son capaces de regenerar tras un daño. Sin embargo, no se ha observado en detalle qué es lo que ocurre con un componente cuando el otro es removido y tampoco se ha evaluado si la presencia de uno de los componentes es dispensable para la regeneración del otro. En este trabajo se analizaron algunos aspectos desconocidos relativos al proceso de degeneración/regeneración axonal en relación con las interacciones existentes entre el nervio y sus células blanco. Nuestros resultados demuestran que la regeneración del nervio, la reinervación de los órganos sensoriales y la mantención de la inervación no depende de la presencia de las células ciliadas,

pero sí es dependiente de la presencia de otros tipos celulares del neuromasto. Sin embargo, la ausencia prolongada de las células ciliadas desestabiliza las inervaciones hacia el neuromasto provocando la desorganización del terminal nervioso y alteraciones en la reectividad de las neuronas aferentes del ganglio de la línea lateral.

ABSTRACT

The mechanosensory posterior lateral line system of fishes is a sensory organ essential for their interaction with the environment, and in zebrafish larvae it also provides several advantages for nerve regeneration studies. This system shows several homologies with the auditory system of mammals, and for this, constitutes an excellent model for studying the regeneration of sensory systems in vertebrates. In fishes, this system is formed basically by discrete sensory organs called neuromasts, where the hair cells are located. These cells are excitable mechanosensory cells and are innervated by a peripheral nerve: the posterior lateral line nerve, whose somas are located in the posterior lateral line ganglion. During the development of this system, at early embryonic stages, a tight relation exists between the neuromast cells and the axon of the sensory neuron that innervates them. After inflicting an injury, the re-connection process between these components is vital for the functional regeneration of the system. Previous studies have shown that both the nerve and the hair cells are capable of regeneration after ablation. However, there is no detailed evidence of neither what happens with one component when the other is removed nor the dependence on the presence of one component for the regeneration of the other one. The present work analyzed some unknown issues related to the axonal degeneration/regeneration processes according to the interaction between the nerve and its target cells. Our results evidence that the regeneration of the nerve, the reinnervation of the target organs and the maintenance of the innervation do not depend on the hair cells but on the presence of other cell types of the neuromast. However, sustained absence of the hair cells destabilizes the innervation towards

the neuromasts causing disruption of the nerve terminal and alterations on the re-connection of the afferent neurons on the neuromasts.

1. INTRODUCCION

En el sistema nervioso periférico, más específicamente en los sistemas sensoriales, existe una estrecha relación entre las células sensoriales receptoras y las neuronas que las inervan (Jacobson y cols., 1997). Durante mucho tiempo ha sido motivo de estudio entender las relaciones que existen entre ambos componentes del sistema durante procesos como el desarrollo, y también en procesos que involucran daño o remoción de algún elemento, especialmente cuando estos tienen la capacidad de regenerar posteriormente. En el presente trabajo se abordaron las relaciones de dependencia entre dos componentes de un sistema sensorial utilizando como modelo la línea lateral posterior de la larva del pez cebra.

1.1 Regeneración en el Sistema Nervioso Periférico

La palabra *regeneración* tiene múltiples significados. De acuerdo al diccionario médico de Stedman, regeneración es “la reproducción o reconstrucción de una parte dañada o pérdida” (Carlson, 2011). Según Yannas (2001), la regeneración es uno de los posibles finales del proceso curativo que se gatilla posterior a una lesión, en ella se restablece la continuidad interrumpida mediante la síntesis de la masa perdida en el sitio anatómico original, recuperando así la estructura y función normales del órgano u organismo. El desafío del proceso regenerativo radica en recuperar la funcionalidad de un sistema u órgano en un contexto que, generalmente, no recapitula el desarrollo de la estructura dañada.

Enfocándonos directamente en el sistema nervioso, es bien sabido que la regeneración de las conexiones nerviosas dañadas representa un logro complejo, ya que muchos procesos celulares deben ocurrir de manera coordinada para que los elementos del sistema que han sido

dañados sean eliminados y reemplazados por nuevos componentes funcionales que deben integrarse exitosamente en una compleja red de conexiones que está previamente establecida (King y Newmark, 2012). Tras numerosos estudios se sabe, en la actualidad, que esta capacidad regenerativa depende del ambiente celular, de la edad, sexo y estado fisiológico del individuo, y varía entre los distintos grupos animales (Bely y Nyberg , 2010; Bonfanti 2011; Graciarena y cols., 2014; Verdú y cols., 2008). Así, mientras que los vertebrados inferiores pueden regenerar nervios u órganos completos tras una lesión, ya sea a nivel periférico o central, los mamíferos superiores presentan muchas restricciones en su capacidad regenerativa (Bonfanti, 2011; Tanaka 2009).

De hecho, la capacidad regenerativa de un axón depende fundamentalmente del contexto o ambiente celular que lo rodea (Rev. en Chen y cols., 2007; Wang y Jin, 2010). Se ha demostrado que en mamíferos, existe una gran diferencia en la capacidad regenerativa entre el sistema nervioso periférico y central (Richardson y cols., 1980). Mientras que el SNP presenta un ambiente más favorable o permisivo, la regeneración en el SNC es muy lenta o inexistente (Chen y cols., 2007; Gaudet y cols., 2011). Esta diferencia se debe a la presencia de moléculas inhibitorias derivadas de la mielina (Caroni y cols., 1988a, 1988b), y las cicatrices gliales inducidas por los macrófagos tras la axotomía (McKerracher y cols., 1994; Fawcett y Asher, 1999; Rev. en Vargas y Barres, 2007).

Tras numerosos estudios, se ha demostrado que cuando un nervio periférico es desconectado del soma neuronal sufre un proceso denominado degeneración Walleriana (Waller, 1850; Perry y cols., 1987), que se caracteriza por una fase "lag", en donde el fragmento de axón denervado permanece intacto por un corto tiempo y es seguido de una fase rápida y simultánea de degeneración axonal (Raff y cols., 2002; Gaudet y cols., 2011).

Luego de la degeneración producida por una lesión del nervio periférico, sobreviene la regeneración de éste. Durante el proceso regenerativo los axones responden selectivamente a señales tróficas (Gu y cols., 1995) y vuelven a crecer preferencialmente hacia el órgano blanco al cual inervaban originalmente, aunque los mecanismos que regulan esta especificidad no han sido comprendidos totalmente (Stoll y Müller, 1999).

1.2 Regeneración de los sistemas sensoriales: relación trófica entre neuronas aferentes y células sensoriales

Un componente importante del SNP son los sistemas sensoriales. En general, los individuos se adaptan y responden a las señales del medioambiente a través de diferentes sistemas sensoriales especializados (Endler, 1993). Como regla general, estos sistemas están conformados por órganos sensoriales localizados estratégicamente; por intermediarios aferentes que transmiten la información detectada por los receptores sensoriales hacia el sistema nervioso central (Adrian, 1941) , y por centros superiores del procesamiento de la información en donde confluye la información generada a partir del estímulo ambiental y se elabora y modula la respuesta a dicho estímulo (Lestienne, 2001).

Por tanto, la capacidad de los individuos para regenerar sus sistemas sensoriales es fundamental y representa un enorme desafío. Fallos en la regeneración de estos sistemas pueden provocar una pérdida total de la integridad estructural del sistema sensorial, afectando severamente el restablecimiento de la precepción de alguna característica del ambiente externo (Gutmann, 1964). En algunos casos, esto puede afectar notablemente la sobrevivencia del individuo.

La relación que existe entre los somas neuronales, sus axones y los blancos sinápticos es perturbada durante la sección del nervio, pero es capaz de restablecerse durante el proceso

de regeneración (Gutmann, 1964). Y es durante este proceso que se evidencia la estrecha relación metabólica y trófica que existe entre ambos componentes, ya que las células periféricas son importantes fuentes de factores neurotróficos durante procesos tanto de desarrollo en la embriogénesis (Rev. en Aloe, 2004) como durante el proceso regenerativo en etapas post-embrionarias (Rev. en Terenghi, 1999).

Durante el desarrollo del sistema nervioso la formación de los contactos sinápticos entre los axones en crecimiento y sus blancos sinápticos denotan el principio de una nueva etapa. Una vez que los contactos sinápticos han sido establecidos, las neuronas se vuelven en cierto grado dependientes de la presencia de sus blancos para su sobrevivencia. En ausencia de blancos sinápticos, los axones y dendritas de estas neuronas se atrofian y las células nerviosas podrían incluso morir. Esta dependencia a largo plazo entre neuronas y sus blancos se denomina interacción trófica (Purves, 2001).

En los sistemas sensoriales, la estabilización y mantención de la sinapsis entre una neurona y su célula blanco son críticas para su correcto funcionamiento, sin embargo se sabe muy poco sobre el detalle de los mecanismos moleculares implicados en la re-conexión del sistema y en la mantención de las conexiones nerviosas (Dunaevsky y Connor, 1998).

Se ha observado que la mantención de las células aferentes depende del aporte trófico de los distintos elementos celulares que componen el sistema sensorial, tal y como se grafica en la Figura 1 (Rev. en Varon y Bunge, 1978).

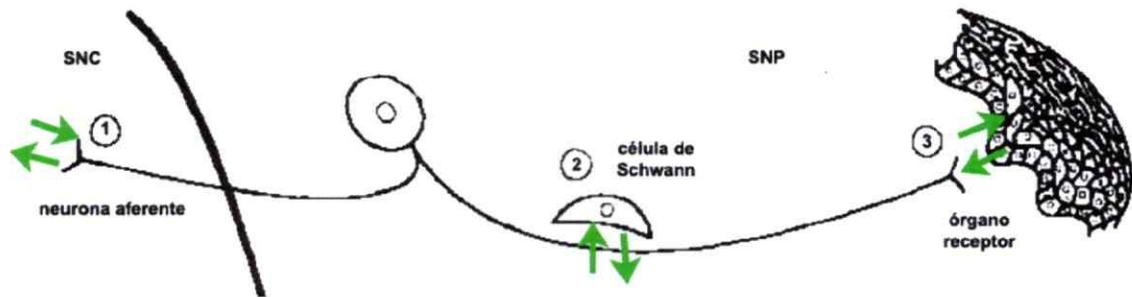


Figura 1. Interacciones tróficas en los sistemas sensoriales (Modificado de Varon y Bunge, 1978). El esquema muestra los muchos sitios en los que pueden ocurrir interacciones tróficas en un nervio sensorial del SNP. Se muestran los componentes del sistema: neurona ganglionar, sus células gliales, células sensoriales. Los números indican los sitios en donde ocurren estas interacciones (flechas verdes).

Muchos estudios han mostrado que la estabilidad y sobrevivencia de las neuronas de estos sistemas dependen en gran medida de la presencia de sus células blanco y de otros tejidos y tipos celulares que secreten señales tróficas de mantención de estas neuronas en los sitios de sinapsis a lo largo de la vida del individuo adulto (Carroll, 1998; Chen y cols., 1999), una vez que estos contactos se han establecido durante el desarrollo temprano (Rev. en Luo y O'Leary, 2005). Por ejemplo, en mamíferos se ha visto, que posterior a una ablación de las células ciliadas internas de la cóclea ocurren una serie de eventos que resultan, en primer lugar, en una retracción de los procesos periféricos del nervio auditivo, y posteriormente dentro del curso de semanas o meses (según la especie), en la pérdida de somas neuronales en el ganglio espiral (Ylikoski y cols., 1974; Spöndlin, 1975). Esto se debe a que cuando las células ciliadas del oído mamífero sufren un daño, son incapaces de regenerar. Aunque se ha visto que incluso cuando hay un daño severo o una ausencia importante de estas células, existe un grupo de neuronas que sobrevive denervadas. Esto se debe a que las células de soporte presentes en el órgano de Corti tienen características de células gliales y son capaces liberar factores

neurotróficos que permiten la supervivencia de algunas neuronas (Anniko y cols., 1986; Pack y Slepecky, 1995; Rio y cols., 2002).

Lamentablemente, la inaccesibilidad de los sistemas sensoriales en mamíferos obligan a restringir la experimentación a sistemas *in vitro* o a observaciones de cortes histológicos, donde no se puede estudiar bien la dinámica de estos procesos. Es así como la incapacidad de realizar investigaciones *in vivo* en el sistema auditivo de mamíferos nos ha llevado a proponer el sistema de la línea lateral de la larva del pez cebra como un modelo apropiado para estudiar las relaciones tróficas entre neuronas sensoriales y las células receptoras asociadas a ellas durante procesos regenerativos, debido a su homología evolutiva con el anterior (Pichon y Ghysen, 2004).

1.3 El sistema de la línea lateral posterior del pez cebra

El sistema de la línea lateral es un sistema sensorial que se encuentra superficialmente en los peces teleosteos y elasmobranquios y algunos anfibios (Uchiyama y cols., 1991). Es un sistema mecanosensorial cuya función es detectar el movimiento y la vibración en el agua circundante y está involucrado en la percepción de movimientos en torno a la superficie corporal (Webb, 1989) e implicado en comportamientos como escape de predadores, captura de presas, cortejo y nado en cardumen (Dambly-Chaudière y cols., 2003).

En el pez cebra, al igual que en el resto de los peces y anfibios, este sistema sensorial está compuesto de órganos sensoriales individuales, llamados neuromastos, que contienen pequeñas agrupaciones discretas de células ciliadas (Metcalf y cols., 1985) además de otras células de soporte (Balak y cols., 1990). Los neuromastos sobre la cabeza forman el llamado sistema de la línea lateral anterior (LLa), cuyo ganglio se encuentra entre la vesícula ótica y el

ojo del embrión, mientras que los neuromastos sobre el tronco y la cola forman la denominada línea lateral posterior (LLp), cuyo ganglio se encuentra justo detrás de la vesícula ótica (Ghysen y Dambly Chaudière, 2004).

En el desarrollo de la LLp, tanto su organización estructural, como las aferencias neuronales que recibe se establecen tempranamente en el embrión, desde aproximadamente las 20 horas post-fertilización (hpf) (Metcalfe, 1985). En esta etapa, un grupo de células, derivadas de placodas cefálicas (Ghysen, 2004), se divide en dos y genera, por un lado, un grupo de 20 células que permanecen estáticas y conforman el ganglio de la LLp, mientras que el resto de las células derivadas de la placoda forman un primordio migratorio que se desplaza en sentido caudal por el miosepto horizontal (Kimmel y cols., 1995). En su trayecto, este primordio migratorio deposita entre siete a ocho grupos de células en un patrón regular a lo largo del cuerpo. Estas agrupaciones celulares depositadas por el primordio migratorio formarán los futuros neuromastos funcionales de la línea lateral primaria. Los neuromastos del tronco se denominan, por convención: L1 a L5 y los tres neuromastos terminales: "ter" (Gompel y cols., 2001; Ghysen y Dambly-Chaudière, 2007). A las 32 hpf se observa la formación de un nuevo primordio migratorio, denominado primordio II (primII). Este segundo primordio migra desde la vesícula ótica hacia el ano y deposita tres o cuatro neuromastos de la línea lateral secundaria, denominados comúnmente LII.1 a LII.4 (Núñez y cols., 2009). Hacia el final de la embriogénesis, a las 48 hpf, la LLp primaria se encuentra completa (Metcalfe, 1985) mientras que la secundaria está en plena formación, que culmina a los 6 dpf (Sapède y cols., 2002). Finalmente, a lo largo de la vida adulta del pez, la LLp se va completando progresivamente, a través de un proceso de *budding* o yemación de los neuromastos existentes (Ledent, 2002).

Los neuromastos al estar expuestos en la superficie del cuerpo, son fácilmente visibles

con microscopía de Nomarski y con tinciones fluorescentes como el marcador vital 2-Di-4-Asp (Collazo y cols. 1994), y las tinciones FM1-43 (Nishikawa y Sasaki, 1996) y FM4-64 (López-Schier y Hudspeth, 2006), los que se acumulan específicamente en células ciliadas funcionales (Gale y cols. 2001).

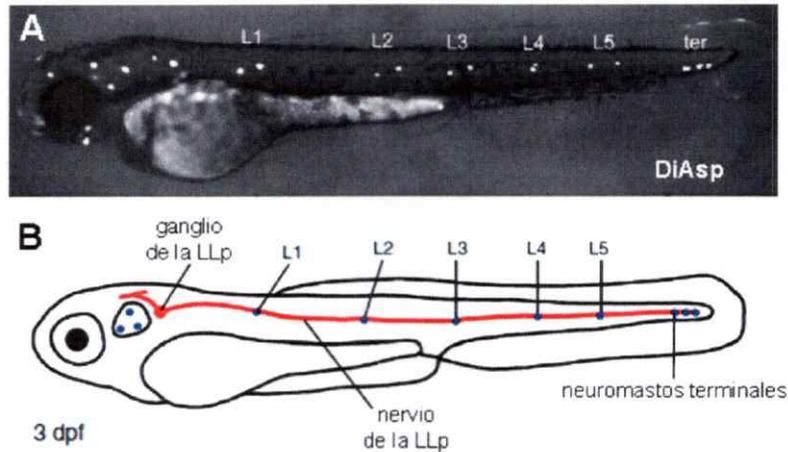


Figura 2. La línea lateral posterior primaria en la larva del pez cebra. (A: Modificado de Dambly-Chaudière et. al, 2003) se muestran los neuromastos de la LLp primaria de una larva de 3 dpf con la tinción vital 2-Di-4-Asp. (B: Modificado de Ma y Raible, 2009) esquema del sistema de la LLp donde se muestran sus dos componentes: en rojo el nervio de la LLp (nLLp) y en azul los neuromatos (L1-L5, ter).

Por otra parte, durante este proceso migratorio, las neuronas sensoriales ubicadas en el ganglio de la línea lateral se diferencian y proyectan sus axones periféricos hacia el primordio (Sapède, 2002). Esta estrecha relación permite que los conos de crecimiento axonal sean arrastrados por esta estructura migratoria durante todo su trayecto (Metcalf, 1985; Gilmour, 2004; Schuster, 2010). Los axones que co-migraron con el primordio inervan a las células ciliadas y sirven de guía para la migración de células gliales, lo que a su vez mantiene una correcta fasciculación del nervio de la línea lateral (Gilmour, 2002). Por otro lado, estas neuronas aferentes, al mismo tiempo que inervan los neuromastos depositados, proyectan los

axones centrales hacia el rombencéfalo

A los 3dpf, la LLp primaria se encuentra completamente desarrollada y funcional, y morfológicamente, incluye todos los componentes presentes en el sistema adulto (Metcalf y cols., 1985). En este estadio, la inervación de un neuromasto consiste en una raíz del nervio principal (nLLp) constituido por neuronas eferentes (Fig. 4B,C) y aferentes (Fig. 4D,E). Los axones eferentes de esta inervación son finos y presentan terminales en forma de bulbos, mientras que las fibras aferentes forman una densa red entramada (Nagiel y cols., 2008).

Por la superficialidad de la línea lateral posterior, la fácil manipulación y mantenimiento de los peces en los diferentes estadios del desarrollo del pez cebra así como la disponibilidad de líneas transgénicas que marcan los diferentes componentes, este sistema ha sido un modelo muy utilizado en el campo de la regeneración (Harris y cols., 2003; Murakami y cols., 2003, Dufourcq y cols., 2006).

Dada su homología con el sistema auditivo de los mamíferos, muchos grupos han centrado su interés en comprender los mecanismos que controlan la regeneración de las células ciliadas tras un daño y los procesos que regulan la homeostasis tisular (Ou y cols., 2007, 2009; Owens y cols., 2009; Rev. de Brignull y cols., 2009). De la misma manera, se ha utilizado a este sistema como modelo para el estudio de la regeneración axonal en el SNP (Villegas y cols., 2012; Graciarena y cols., 2014).

Se ha demostrado que cada neuromasto depositado se diferencia en dos grupos de células ciliadas polarizadas en sentidos opuestos, es decir, estas células están ubicadas de tal manera en el neuromasto que la mitad de ellas se despolarizarán ante el movimiento de agua en dirección antero-posterior, mientras que la otra mitad de estas células sensitivas responderán a movimientos de agua en el sentido postero-anterior (López-Schier y cols., 2004).

Además, estas células están rodeadas por al menos tres tipos de células accesorias: las células del manto, las células de soporte y un grupo poco definido de células progenitoras, localizadas en la base y periferia del neuromasto (Balak y cols., 1990; Behra y cols., 2012; Undurraga y Allende, resultados no publicados). Este último tipo celular es muy importante, ya que permite la regeneración de este órgano (Williams y Holder, 2000).

Por otro lado, cada neurona aferente establece contactos específicos con células ciliadas de la misma polaridad ciliar en uno o varios neuromastos (Obholzer y cols., 2008; Nagiel y cols., 2008). Se sabe que la especificidad de este patrón, observado durante el desarrollo, es retomado después de una ablación y regeneración de las células ciliadas (Nagiel y cols., 2008, 2009; Faucherre y cols., 2009, 2010).

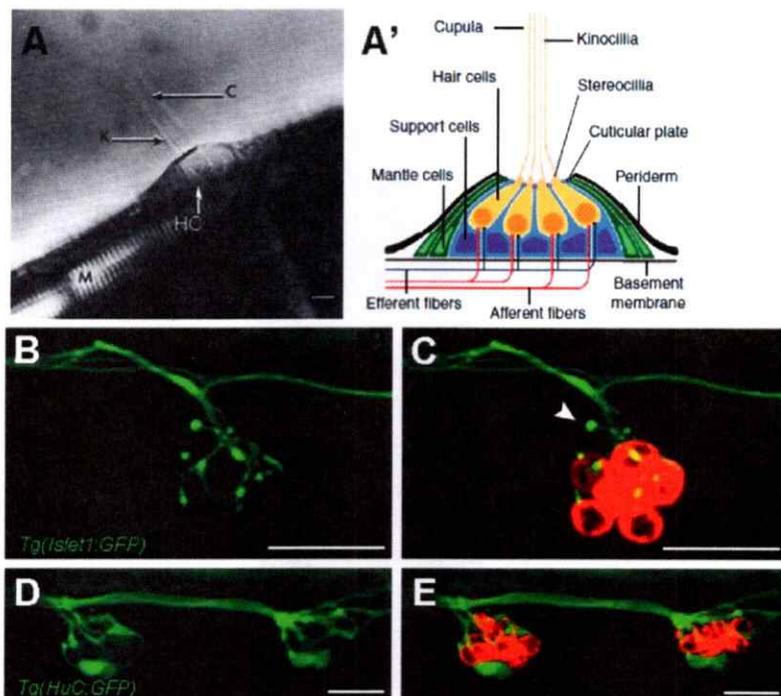


Figura 3. Estructura del neuromasto y de su inervación. (A: Modificado de Metcalfe, y cols. 1985) Neuromasto de una larva viva de pez cebra. C: cúpula, K: kinocilios, HC: células ciliadas. Óptica de

Nomarski. Escala 10 μm . (A': Tomado de Ma y Raible, 2009) Esquema del corte transversal de un neuromasto (B-E: Modificado de Nagiel y cols., 2008). Larva *Tg(Islet1:GFP)* de 6 dpf expresa GFP en las neuronas eferentes del nLLp. (C) Tinción con FM4-64, la flecha blanca muestra el espacio donde se encuentra una célula ciliada no madura, pero aun así invadida. (D) Larva *Tg(HuC:GFP)* de 2 dpf expresa GFP en neuronas aferentes del nervio. (E) Tinción con FM4-64. Microscopía confocal. Escala 20 μm .

Debido a la escala en la que se analizó el nervio de la LLp en este trabajo y para una mejor comprensión de la redacción de los resultados, éste fue dividido en secciones que fueron denominadas de distinta manera para poder explicar mejor a qué parte de la estructura se está haciendo referencia (Fig. 4).

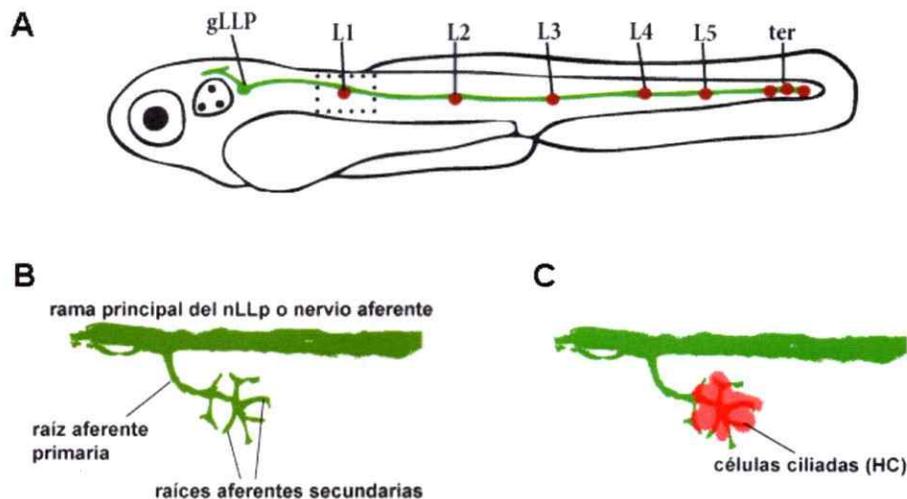


Figura 4. Esquema de la nomenclatura usada en este trabajo para denominar a los neuromastos y su innervación. (A) Larva de 3dpf, se grafica la línea lateral primaria, en verde se señala el ganglio del nervio (gLLp) y el nervio aferente. En rojo se señalan los neuromastos primarios del tronco (L1-L5) y terminales (ter). (B) Esquema en donde se muestra ampliado el recuadro punteado en (A) con los nombres utilizados durante este trabajo para referirse a la innervación del sistema. (C) Se muestran una superposición con las células ciliadas (rojo) sobre las cuales proyecta la innervación del nLLp.

Finalmente, datos previos publicados por nuestro laboratorio han demostrado que, en larvas de pez cebra, la regeneración del nervio de la LLp o de las células ciliadas de los neuromastos después de un daño, son procesos independientes entre sí. Así, la rama principal del nervio es capaz de regenerar en ausencia de células blanco guiado únicamente por las células de Schwann, mientras la generación de nuevas células ciliadas no depende de la llegada de terminales aferentes (Villegas y cols., 2012).

1.4 Planteamiento del problema

Si bien se ha estudiado en profundidad la regeneración de los principales componentes de la línea lateral, no se ha evaluado en detalle qué ocurre con las raíces aferentes del nervio cuando el axón es el elemento que regenera. Sorprendentemente tampoco existen trabajos que describan si existen alteraciones en el nicho celular del ganglio de la línea lateral en ausencia de sus células blanco. Por tanto son innumerables las preguntas que aún faltan por responder.

Además, debido a la similitud funcional y estructural entre las células ciliadas de la línea lateral y del oído interno de mamíferos (Pichon y Ghysen, 2004), se ha considerado importante realizar estudios de este tipo, ya que pueden dar luces sobre enfermedades que afectan el oído de los mamíferos. Por ejemplo se ha visto que una de las principales causas de sordera es la ausencia de regeneración de las células sensoriales (Izumikawa y cols., 2005) y/o fallos en la inervación de las neuronas (degeneración del nervio auditivo)(Nardol, 1997).

En este trabajo, decidimos abordar la interrogante sobre la interdependencia entre el nervio y las células del neuromasto a través de diferentes tipos de daño. Mediante la aplicación

de sulfato de cobre a diferentes concentraciones es posible hacer un daño generalizado de las células ciliadas o de todas las células del neuromasto (Hernández y cols., 2007).

Además, en el laboratorio contamos con una técnica que permite, mediante la aplicación de un pulso eléctrico, dañar localmente un órgano blanco de la inervación de una neurona aferente y estudiar el comportamiento de esta célula deprivada de su blanco sináptico (Moya-Díaz y cols., 2014).

Creemos que nuestros resultados podrán aportar algunos datos desconocidos hasta ahora respecto al comportamiento de las neuronas aferentes y su relación con las células blanco de la inervación.



2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La estabilidad de los terminales nerviosos del sistema de la línea lateral posterior, así como la formación de éstos durante la regeneración del nervio, depende de la presencia de células ciliadas y además de otros tipos celulares presentes en el neuromasto

2.2 Objetivos

Objetivo General

Caracterizar la innervación del neuromasto en un contexto regenerativo, atendiendo a los distintos tipos celulares presentes en el neuromasto.

Objetivos Específicos

1 Estudiar el comportamiento de la innervación tras la ablación selectiva de las células ciliadas

1.1 Observar si existe un fenómeno degenerativo del nervio de la línea lateral asociado a la ablación de células ciliadas por un período de tiempo prolongado.

1.2 Determinar si los somas de las neuronas sobreviven al ser desprovistas de sus células blanco.

1.3 Determinar si la eliminación de las células ciliadas afecta el patrón de regeneración post-axotomía del nervio de la línea lateral.

2. Analizar el comportamiento axonal tras la eliminación selectiva de un único neuromasto. Determinar si en estas circunstancias existen fenómenos de plasticidad y reordenamiento de las proyecciones neuronales.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Material Biológico

En este trabajo se utilizaron como modelo experimental larvas de pez cebra (*Danio rerio*), obtenidas mediante cruces naturales de peces adultos.

Los peces fueron mantenidos en el vivero del Edificio Milenio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en acuarios con flujo constante de agua, en condiciones de pH y conductividad controladas dentro de los rangos 7-7,3 para pH y 400-600 μ S para conductividad, a una temperatura de 28 °C, con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Las condiciones de cuidado y alimentación fueron realizadas de acuerdo a lo descrito por Westerfield (1994).

Los embriones obtenidos de los cruces fueron incubados en placas Petri en 20 mL de medio E3 (NaCl 5 mM; KCl 0,17 mM; CaCl₂ 0,13 mM; MgSO₄ 0,33 mM; 0,1% azul de metileno) a 28 °C con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los estadios de desarrollo embrionarios y larvales fueron identificados de acuerdo a lo descrito previamente (Kimmel, 1995) y son expresados en horas post fertilización (hpf) y días post fertilización (dpf) respectivamente.

Para la realización de los experimentos se utilizaron las siguientes líneas de peces:

TAB5 (silvestre), *Tg(Brn3c:gap43-GFP)*, *Tg(neuroD:EGFP)*, *Tg(HGn39D:GFP)*, *Tg(atho1:TdTomato)*, *Tg(sqEt20:GFP)* y además el mutante *phoenix* (Tabla I).

Tabla I. Listado de las líneas de peces transgénicas y mutantes utilizadas en este trabajo.

Nombre de la línea	Fenotipo de interés	Referencia
<i>Tg(brn3c:gap43-GFP)</i>	Expresa GFP en membrana de células ciliadas	Xiao y cols., 2005
<i>Tg(neuroD:EGFP)</i>	Expresa EGFP en nervio de la LLp	Obholzer y cols., 2008
<i>Tg(ato1a:dTomato)</i>	Expresa dTomato (fluorescencia roja) en las células precursoras de las células ciliadas y en células ciliadas tempranas	Wada y cols., 2010
<i>Tg(HGn39D:GFP)</i>	Expresa GFP en las neuronas aferentes de nervio de la LLp	Faucherre y cols., 2009
<i>Tg(sqet20ET:EGFP)</i>	Expresa GFP en las células del manto e interneuromásticas	Pistocchi y cols., 2009
<i>pho^{hi43Tg}</i>	Presenta deficiencias en la regeneración de las HC después de un tratamiento con cobre o neomicina	Berha y cols., 2009

Finalmente, para la obtención de los plásmidos utilizados se utilizaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen).

3.2 Reactivos

CuSO₄ (sulfato de cobre II anhidro, Merck), MS - 222 (tricaína; A5040; Sigma), BSA, DMSO (BM-0660, Winkler), PBS 10X (BM-1340, Winkler), Tween-20 (BM-2031, Winkler), Triton X-100 (BM- 2020, Winkler), Etanol (Merck), Metanol (Merck), Paraformaldehído (Merck), Agarosa LMP (BM-0130, Winkler), Acetona (Merck), Agua bidestilada (Sanderson), DiOC6, Solución de Bloqueo (1g BSA, 2mL goat serum, 1mL DMSO, 100 μ L Triton X-100 en 100 mL PBS)

3.3 Eliminación de las células del neuromasto con CuSO₄

Se utilizaron larvas dobles transgénicas nacidas a partir de los cruces entre *Tg(brn3c:gap43-GFP)* con peces *Tg(neuro:EGFP)* o, en su defecto; larvas dobles transgénicas provenientes de los cruces de *Tg(brn3c:gap43-GFP)* con peces *Tg(HGn39D:GFP)*. En ambos casos, las larvas expresan la proteína fluorescente verde en las células ciliadas de los neuromastos y en el nervio de la LLp.

A los 3 dpf, estas larvas fueron incubadas en una solución de CuSO₄, un compuesto tóxico para las células ciliadas que mantienen un íntimo contacto con el medio exterior (Hernández y cols., 2006). La concentración de sulfato de cobre utilizada dependía de la magnitud del daño que se pretendía realizar (Hernández y cols., 2007). Estas concentraciones finales se obtenían a partir de una solución stock de sulfato de cobre preparada antes de cada experimento en agua bidestilada a una concentración de 10 mM para luego ser diluida en E3.

3.3.1 Eliminación de células ciliadas

Para eliminar las HC (*hair cells*: células ciliadas) por un corto periodo de tiempo, las larvas se incubaron durante 2 horas en 20 mL de una solución 10 µM de sulfato de cobre disuelto en E3. Una vez finalizada la incubación, las larvas fueron lavadas 3 veces con E3.

Por otro lado, para eliminar de manera prolongada las HC, las larvas se incubaron permanentemente en placas Petri conteniendo 20 mL de E3 + CuSO₄ a una concentración de 3 µM. Esta solución fue renovada diariamente hasta los 6 dpf. Esta concentración subletal de cobre no daña a las larvas, y las larvas tratadas son indistinguibles de los controles en cuanto a su morfología y letalidad (Hernández y cols., 2006, 2011). Además se observó que la incubación en esta concentración de cobre no genera malformaciones en las larvas y se observa de

manera general que las características morfológicas y fisiológicas no difieren entre el control y las tratadas (Datos no mostrados).

3.3.2 Eliminación de otras células del neuromasto

Para eliminar todas las células del neuromasto se incubaron larvas en una concentración de 50 μM de sulfato de cobre durante 2 horas. Una vez finalizado el tratamiento, las larvas fueron lavadas 3 veces con E3 e incubadas finalmente en este medio. Posteriormente, a los 4, 5 y 6 dpf las larvas fueron anestesiadas con tricaina y montadas en agarosa LMP (*Low Melting Point*: de bajo punto de fusión) 0,75% disuelta en E3 en un placa con fondo de vidrio (Catálogo.: p35G-1.0-14-C, MatTek Co.) para ser observadas en el microscopio de fluorescencia y confocal.

3.4 Microinyección de DNA

Las microinyecciones se realizaron usando una placa de Petri en la que los embriones en estadio de una célula fueron ordenados en filas paralelas en el borde de un portaobjeto. Así, los embriones obtenidos a partir de los cruces entre *Tg(brn3c:gap43-GFP)* con peces *Tg(neuroD:EGFP)* o embriones obtenidos por cruce de peces *Tg(sqet20ET:EGFP)* fueron inyectados con 5 nL de una solución de DNA que codifica la proteína memTdTomato bajo el control transcripcional del promotor neuronal HuC (cedido generosamente por el laboratorio de Dr. Hernán López-Schier) disuelto en agua bidestilada, usando un inyector de presión de nitrógeno (Narishige).

En todos los experimentos, los embriones fueron inyectados en el estadio de una célula con una concentración de HuC:memdTomato de 20 ng/ μL . Esta inyección permite marcar

aleatoriamente una neurona única del ganglio de la línea lateral posterior, en donde la proteína fluorescente se visualiza en toda la neurona incluyendo el soma y el axón (Faucherre y cols., 2009). Posteriormente, a los 3dpf se seleccionaron las larvas que expresaban fluorescencia en una neurona del ganglio de la LLp.

3.5 Electroablación del nervio de la LLp y del neuromasto

Larvas dobles transgénicas *Tg(neuroD:EGFP);(brn3c:gap43-GFP)* fueron anestesiadas y montadas en agarosa LMP a una concentración de 0,75% en placas de acrílico rectangulares (10.7 cm x 7 cm) con un agujero ovalado al centro, cubierto por un cubreobjetos largo. Para llevar a cabo la axotomía se ha diseñado en el laboratorio un sistema de electroablación (Moya-Díaz y cols. 2014) conformado por un microscopio de fluorescencia (Leica, modelo: DMLA) que permite visualizar los peces y controlar el punto de daño, y un microelectrodo de tungsteno (Catálogo: UEWMGGSEBN1M, FHC), el cual es puesto en un micromanipulador de 4 ejes. Este microelectrodo se encuentra acoplado a una fuente de poder (Digital Midgard, Catálogo: 51595, Stoelting Co.) capaz de generar pulsos de corriente con intensidad y duración variables.

Para lesionar el nervio de la LLp, 10 a 20 larvas fueron montadas en las placas mencionadas anteriormente en agarosa conteniendo el anestésico tricafna. Mediante manejo del manipulador, la punta del electrodo se presiona en la zona comprendida entre el ganglio y el primer neuromasto de la LLp (denominado L1), evitando penetrar en el tejido. Una vez posicionado, se aplicó un pulso de corriente de 17 μ A durante 1,5 segundos (Fig. 5).

Modificando la intensidad de corriente y la duración y número de pulsos, esta técnica permite, además, realizar otro tipo de daños tisulares.

En este trabajo, se utilizó esta técnica para eliminar también neuromastos de la línea

a -20 °C. Al momento de ser utilizadas, las larvas fueron rehidratadas en lavados de metanol decreciente (100%-75%-50%-25%) y finalmente se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PBS-T. Posteriormente fueron incubadas por 45 minutos en proteinasa K (10 µg/mL). A continuación, las larvas fueron fijadas con PFA 4% por 40 minutos a temperatura ambiente e incubadas en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se desechó la solución de bloqueo, se agregó el anticuerpo primario (anti-GFP, ratón) disuelto en solución de bloqueo y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. A continuación, se desechó la solución con anticuerpo primario y se realizaron 4 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno. Luego se agregó el anticuerpo secundario (Alexa 488 anti-ratón) disuelto en solución de bloqueo y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave en oscuridad. Posteriormente se realizaron 4 lavados de 20 minutos en PBS-T, para finalmente realizar la adquisición de imágenes en el microscopio.

Para realizar el ensayo TUNEL se utilizó el kit *TUNEL Apoptosis Detection Kit-Millipore* y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se realizó un protocolo similar al de inmunofluorescencia, a excepción de que todos los lavados fueron realizados con PBS-Triton X-100, 0,3%.

Todos los ensayos TUNEL realizados en este trabajo se realizaron en conjunto con la inmunofluorescencia anti GFP. Al finalizar la incubación con el anticuerpo secundario fue añadida la tinción nuclear TO-PRO 3 a una concentración de 0,005% en PBS-T.

3.7 Adquisición y procesamiento de imágenes

Para la obtención de imágenes *in vivo* se utilizó un microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS, modelo: IX81) y un microscopio confocal (Zeiss, modelo: LSM 510 META). En ambos

casos las larvas fueron anestesiadas con triclaína (MS-222, Sigma) y montadas en agarosa LMP 0,75 % disuelta en E3.

En los experimentos de microscopía *time-lapse* se utilizó el microscopio confocal. Las larvas fueron anestesiadas y montadas en agarosa LMP 1 % disuelta en E3. Un *stack* de imágenes de la zona de interés fue obtenido con un objetivo de 20X ó 40X. Dependiendo del objetivo utilizado, las imágenes se tomaron con un espaciamiento de 2,7 μm y 1 μm respectivamente. Cada *stack* fue tomado cada 5 minutos durante un tiempo total de 2 horas.

Al finalizar la adquisición de las imágenes, se generó la proyección en z de cada *stack* con el programa *ImageJ*, obteniendo así una única foto por tiempo. Los desplazamientos y movimientos de la larva durante el *time-lapse* se corrigieron usando el plugin *stackreg* de *ImageJ*. Al finalizar el procesamiento, esta secuencia se grabó con formato de video. Para la obtención de imágenes de larvas fijadas se utilizaron ambos microscopios. Las larvas fueron montadas en agarosa LMP 1% disuelta en PBS.

Todas las imágenes fueron procesadas y analizadas usando el programa *ImageJ 1.47* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>)

3. 8 Análisis Estadístico

Para todos los análisis estadísticos realizados en este trabajo se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.0b para Mac OS X (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Para analizar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, con una probabilidad de error $p < 0,05$. Los datos analizados que cumplieron con el supuesto de normalidad fueron analizados mediante test de Student paramétrico o ANOVA según fuera el caso. Para el análisis a posteriori del ANOVA se utilizó el

post-test de Bonferroni.

Las datos que no cumplieron con el supuesto de normalidad fueron analizados mediante el test de Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

4.1 Desorganización de la inervación aferente de los neuromastos tras la eliminación de las células ciliadas.

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de los axones periféricos de las neuronas sensoriales del ganglio de la línea lateral posterior cuando son desprovistos de sus células blanco, se incubaron larvas transgénicas dobles *HGn39D:GFP x Atoh1a:dTomato* de 3 dpf en una solución de CuSO_4 10 μM por 2 horas. Durante esta incubación, se observó *in vivo*, mediante microscopía confocal *timelapse*, el comportamiento de los axones de las neuronas aferentes que inervan el primer neuromasto de la línea lateral primaria (L1) (Ver video adjunto 1).

Durante la incubación en sulfato de cobre 10 μM las células ciliadas comienzan a desaparecer después de 7 minutos y se pierden totalmente a los 30 minutos una vez iniciada la incubación (Hernández y cols., 2007). En paralelo, se observa una desorganización de los terminales sinápticos que inervan este neuromasto. Este fenómeno se hace evidente una vez que estas últimas han desaparecido, cuando los terminales nerviosos comienzan a presentar una conducta exploratoria, volviéndose más dinámicos que al comienzo de la incubación cuando aun hay células ciliadas (Video 1, Fig. 3).

Además, se realizó un *timelapse* de la inervación del neuromasto en condiciones normales. Al comparar los videos se observa un aumento de la dinámica de la inervación a medida que van desapareciendo las células ciliadas (rojo), mientras que en la condición control

(HC⁺) y cuando éstas son eliminadas (HC⁻). Se compararon los promedios con un test de Student no pareado, $p < 0,001$; N=16. Microscopía confocal 40X. Escala 25 μm .

En segundo lugar, para analizar el mismo conjunto de imágenes, se utilizó la herramienta *Analyze particles* del programa *ImageJ* que permite cuantificar el área asociada a una estructura de interés. En este caso se evaluó el área de la inervación (considerando la estructura desde la base de la raíz aferente primaria) en peces controles y tratados con sulfato de cobre de forma más automatizada.

De la misma manera que en el caso anterior, esta cuantificación muestra cambios significativos en el área de inervación, resultando un área menor de ésta cuando las larvas son privadas de las células ciliadas (Fig. 8C).

desorganización de la inervación y un incremento del dinamismo de los axones una vez que las células han desaparecido por completo.

Es importante destacar que a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en peces y anfibios, las células ciliadas son capaces de regenerar después de una daño (Rev. en Warchol, 2011) y en el pez cebra, éstas lo hacen unas pocas horas después de retirar el sulfato de cobre (Hernández y cols., 2007). Tras la regeneración de estas células, las neuronas sensoriales reinervan sus blancos sinápticos, tal y como se ha descrito en publicaciones previas (Faucherre y cols., 2009; Nagiel y cols., 2008). Dado que este proceso es relativamente rápido, no hemos observado muerte de las neuronas sensoriales (dato no mostrado).

Por tanto, para simular mejor el contexto que se da en mamíferos, cuyas células ciliadas son incapaces de regenerar, se decidió modificar el protocolo de manera tal de obtener, mediante diferentes metodologías, una ausencia prolongada de células ciliadas.

Para esto se utilizó un protocolo de exposición constante a sulfato de cobre de concentración subletal, en el que las larvas tratadas no presentaban diferencias morfológicas respecto de los controles (Hernández y cols., 2011) (ver métodos 3.3.1)

Por otro lado, en nuestro laboratorio contamos con un mutante para el gen *phoenix*, que es necesario para la regeneración de las células ciliadas. Se ha demostrado que tras una única exposición a una solución de 10 μM de sulfato de cobre por 2 horas, las células ciliadas de estos mutantes presentan una regeneración retardada (Behra y cols., 2009). El gen *phoenix* se expresa sólo en las células de soporte del neuromasto, las cuales son de importancia fundamental para la regeneración de las células ciliadas. En este trabajo se analizó si es que el mutante *phoenix* presentaba alteraciones en la regeneración del nervio de la LLp, además del retraso en la regeneración de las células ciliadas. Esto se realizó axotomizando larvas obtenidas

axones centrales hacia el rombencéfalo

A los 3dpf, la LLp primaria se encuentra completamente desarrollada y funcional, y morfológicamente, incluye todos los componentes presentes en el sistema adulto (Metcalf y cols., 1985). En este estadio, la inervación de un neuromasto consiste en una raíz del nervio principal (nLLp) constituido por neuronas eferentes (Fig. 4B,C) y aferentes (Fig. 4D,E). Los axones eferentes de esta inervación son finos y presentan terminales en forma de bulbos, mientras que las fibras aferentes forman una densa red entramada (Nagiel y cols., 2008).

Por la superficialidad de la línea lateral posterior, la fácil manipulación y mantenimiento de los peces en los diferentes estadios del desarrollo del pez cebra así como la disponibilidad de líneas transgénicas que marcan los diferentes componentes, este sistema ha sido un modelo muy utilizado en el campo de la regeneración (Harris y cols., 2003; Murakami y cols., 2003; Dufourcq y cols., 2006).

Dada su homología con el sistema auditivo de los mamíferos, muchos grupos han centrado su interés en comprender los mecanismos que controlan la regeneración de las células ciliadas tras un daño y los procesos que regulan la homeostasis tisular (Ou y cols., 2007, 2009; Owens y cols., 2009; Rev. de Brignull y cols., 2009). De la misma manera, se ha utilizado a este sistema como modelo para el estudio de la regeneración axonal en el SNP (Villegas y cols., 2012; Graciarena y cols., 2014).

Se ha demostrado que cada neuromasto depositado se diferencia en dos grupos de células ciliadas polarizadas en sentidos opuestos, es decir, estas células están ubicadas de tal manera en el neuromasto que la mitad de ellas se despolarizarán ante el movimiento de agua en dirección antero-posterior, mientras que la otra mitad de estas células sensitivas responderán a movimientos de agua en el sentido postero-anterior (López-Schier y cols., 2004).

Finalmente, datos previos publicados por nuestro laboratorio han demostrado que, en larvas de pez cebra, la regeneración del nervio de la LLp o de las células ciliadas de los neuromastos después de un daño, son procesos independientes entre sí. Así, la rama principal del nervio es capaz de regenerar en ausencia de células blanco guiado únicamente por las células de Schwann, mientras la generación de nuevas células ciliadas no depende de la llegada de terminales aferentes (Villegas y cols., 2012).

1.4 Planteamiento del problema

Si bien se ha estudiado en profundidad la regeneración de los principales componentes de la línea lateral, no se ha evaluado en detalle qué ocurre con las raíces aferentes del nervio cuando el axón es el elemento que regenera. Sorprendentemente tampoco existen trabajos que describan si existen alteraciones en el nicho celular del ganglio de la línea lateral en ausencia de sus células blanco. Por tanto son innumerables las preguntas que aún faltan por responder.

Además, debido a la similitud funcional y estructural entre las células ciliadas de la línea lateral y del oído interno de mamíferos (Pichon y Ghysen, 2004), se ha considerado importante realizar estudios de este tipo, ya que pueden dar luces sobre enfermedades que afectan el oído de los mamíferos. Por ejemplo se ha visto que una de las principales causas de sordera es la ausencia de regeneración de las células sensoriales (Izumikawa y cols., 2005) y/o fallos en la inervación de las neuronas (degeneración del nervio auditivo)(Nardol, 1997).

En este trabajo, decidimos abordar la interrogante sobre la interdependencia entre el nervio y las células del neuromasto a través de diferentes tipos de daño. Mediante la aplicación

de sulfato de cobre a diferentes concentraciones es posible hacer un daño generalizado de las células ciliadas o de todas las células del neuromasto (Hernández y cols., 2007).

Además, en el laboratorio contamos con una técnica que permite, mediante la aplicación de un pulso eléctrico, dañar localmente un órgano blanco de la inervación de una neurona aferente y estudiar el comportamiento de esta célula deprivada de su blanco sináptico (Moya-Díaz y cols., 2014).

Creemos que nuestros resultados podrán aportar algunos datos desconocidos hasta ahora respecto al comportamiento de las neuronas aferentes y su relación con las células blanco de la inervación.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La estabilidad de los terminales nerviosos del sistema de la línea lateral posterior, así como la formación de éstos durante la regeneración del nervio, depende de la presencia de células ciliadas y además de otros tipos celulares presentes en el neuromasto

2.2 Objetivos

Objetivo General

Caracterizar la inervación del neuromasto en un contexto regenerativo, atendiendo a los distintos tipos celulares presentes en el neuromasto.

Objetivos Específicos

1 Estudiar el comportamiento de la inervación tras la ablación selectiva de las células ciliadas

1.1 Observar si existe un fenómeno degenerativo del nervio de la línea lateral asociado a la ablación de células ciliadas por un período de tiempo prolongado.

1.2 Determinar si los somas de las neuronas sobreviven al ser desprovistas de sus células blanco.

1.3 Determinar si la eliminación de las células ciliadas afecta el patrón de regeneración post-axotomía del nervio de la línea lateral.

2. Analizar el comportamiento axonal tras la eliminación selectiva de un único neuromasto.
Determinar si en estas circunstancias existen fenómenos de plasticidad y reordenamiento de las proyecciones neuronales.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Material Biológico

En este trabajo se utilizaron como modelo experimental larvas de pez cebra (*Danio rerio*), obtenidas mediante cruces naturales de peces adultos.

Los peces fueron mantenidos en el vivero del Edificio Milenio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en acuarios con flujo constante de agua, en condiciones de pH y conductividad controladas dentro de los rangos 7-7,3 para pH y 400-600 μ S para conductividad, a una temperatura de 28 °C, con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Las condiciones de cuidado y alimentación fueron realizadas de acuerdo a lo descrito por Westerfield (1994).

Los embriones obtenidos de los cruces fueron incubados en placas Petri en 20 mL de medio E3 (NaCl 5 mM; KCl 0,17 mM; CaCl₂ 0,13 mM; MgSO₄ 0,33 mM; 0,1% azul de metileno) a 28 °C con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los estadios de desarrollo embrionarios y larvales fueron identificados de acuerdo a lo descrito previamente (Kimmel, 1995) y son expresados en horas post fertilización (hpf) y días post fertilización (dpf) respectivamente.

Para la realización de los experimentos se utilizaron las siguientes líneas de peces:

TAB5 (silvestre), *Tg(Brn3c:gap43-GFP)*, *Tg(neuroD:EGFP)*, *Tg(HGn39D:GFP)*, *Tg(atho1:TdTomato)*, *Tg(sqEt20:GFP)* y además el mutante *phoenix* (Tabla I).

Tabla I. Listado de las líneas de peces transgénicas y mutantes utilizadas en este trabajo.

Nombre de la línea	Fenotipo de interés	Referencia
<i>Tg(brn3c:gap43-GFP)</i>	Expresa GFP en membrana de células ciliadas	Xiao y cols., 2005
<i>Tg(neuroD:EGFP)</i>	Expresa EGFP en nervio de la LLp	Obholzer y cols., 2008
<i>Tg(atoh1a:dTomato)</i>	Expresa dTomato (fluorescencia roja) en las células precursoras de las células ciliadas y en células ciliadas tempranas	Wada y cols., 2010
<i>Tg(HGn39D:GFP)</i>	Expresa GFP en las neuronas aferentes de nervio de la LLp	Faucherre y cols., 2009
<i>Tg(sqet20ET:EGFP)</i>	Expresa GFP en las células del manto e interneuromásticas	Pistocchi y cols., 2009
<i>pho^{hi43Tg}</i>	Presenta deficiencias en la regeneración de las HC después de un tratamiento con cobre o neomicina	Berha y cols., 2009

Finalmente, para la obtención de los plásmidos utilizados se utilizaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen).

3.2 Reactivos

CuSO₄ (sulfato de cobre II anhidro, Merck), MS - 222 (tricaína; A5040; Sigma), BSA, DMSO (BM-0660, Winkler), PBS 10X (BM-1340, Winkler), Tween-20 (BM-2031, Winkler), Triton X-100 (BM- 2020, Winkler), Etanol (Merck), Metanol (Merck), Paraformaldehído (Merck), Agarosa LMP (BM-0130, Winkler), Acetona (Merck), Agua bidestilada (Sanderson), DiOC6, Solución de Bloqueo (1g BSA, 2mL goat serum, 1mL DMSO, 100 μ L Triton X-100 en 100 mL PBS)

3.3 Eliminación de las células del neuromasto con CuSO₄

Se utilizaron larvas dobles transgénicas nacidas a partir de los cruces entre *Tg(brn3c:gap43-GFP)* con peces *Tg(neuro:EGFP)* o, en su defecto; larvas dobles transgénicas provenientes de los cruces de *Tg(brn3c:gap43-GFP)* con peces *Tg(HGn39D:GFP)*. En ambos casos, las larvas expresan la proteína fluorescente verde en las células ciliadas de los neuromastos y en el nervio de la LLp.

A los 3 dpf, estas larvas fueron incubadas en una solución de CuSO₄, un compuesto tóxico para las células ciliadas que mantienen un íntimo contacto con el medio exterior (Hernández y cols., 2006). La concentración de sulfato de cobre utilizada dependía de la magnitud del daño que se pretendía realizar (Hernández y cols., 2007). Estas concentraciones finales se obtenían a partir de una solución stock de sulfato de cobre preparada antes de cada experimento en agua bidestilada a una concentración de 10 mM para luego ser diluida en E3.

3.3.1 Eliminación de células ciliadas

Para eliminar las HC (*hair cells*: células ciliadas) por un corto periodo de tiempo, las larvas se incubaron durante 2 horas en 20 mL de una solución 10 µM de sulfato de cobre disuelto en E3. Una vez finalizada la incubación, las larvas fueron lavadas 3 veces con E3.

Por otro lado, para eliminar de manera prolongada las HC, las larvas se incubaron permanentemente en placas Petri conteniendo 20 mL de E3 + CuSO₄ a una concentración de 3 µM. Esta solución fue renovada diariamente hasta los 6 dpf. Esta concentración subletal de cobre no daña a las larvas, y las larvas tratadas son indistinguibles de los controles en cuanto a su morfología y letalidad (Hernández y cols., 2006, 2011). Además se observó que la incubación en esta concentración de cobre no genera malformaciones en las larvas y se observa de

manera general que las características morfológicas y fisiológicas no difieren entre el control y las tratadas (Datos no mostrados).

3.3.2 Eliminación de otras células del neuromasto

Para eliminar todas las células del neuromasto se incubaron larvas en una concentración de 50 μ M de sulfato de cobre durante 2 horas. Una vez finalizado el tratamiento, las larvas fueron lavadas 3 veces con E3 e incubadas finalmente en este medio. Posteriormente, a los 4, 5 y 6 dpf las larvas fueron anestesiadas con triclaína y montadas en agarosa LMP (*Low Melting Point*: de bajo punto de fusión) 0,75% disuelta en E3 en un placa con fondo de vidrio (Catálogo.: p35G-1.0-14-C, MatTek Co.) para ser observadas en el microscopio de fluorescencia y confocal.

3.4 Microinyección de DNA

Las microinyecciones se realizaron usando una placa de Petri en la que los embriones en estadio de una célula fueron ordenados en filas paralelas en el borde de un portaobjeto. Así, los embriones obtenidos a partir de los cruces entre *Tg(brn3c:gap43-GFP)* con peces *Tg(neuroD:EGFP)* o embriones obtenidos por cruce de peces *Tg(sqet20ET:EGFP)* fueron inyectados con 5 nL de una solución de DNA que codifica la proteína memTdTomato bajo el control transcripcional del promotor neuronal HuC (cedido generosamente por el laboratorio de Dr. Hernán López-Schier) disuelto en agua bidestilada, usando un inyector de presión de nitrógeno (Narishige).

En todos los experimentos, los embriones fueron inyectados en el estadio de una célula con una concentración de HuC:memdTomato de 20 ng/ μ L. Esta inyección permite marcar

aleatoriamente una neurona única del ganglio de la línea lateral posterior, en donde la proteína fluorescente se visualiza en toda la neurona incluyendo el soma y el axón (Faucherre y cols., 2009). Posteriormente, a los 3dpf se seleccionaron las larvas que expresaban fluorescencia en una neurona del ganglio de la LLp.

3.5 Electroablación del nervio de la LLp y del neuromasto

Larvas dobles transgénicas *Tg(neuroD:EGFP);(brn3c:gap43-GFP)* fueron anestesiadas y montadas en agarosa LMP a una concentración de 0,75% en placas de acrílico rectangulares (10.7 cm x 7 cm) con un agujero ovalado al centro, cubierto por un cubreobjetos largo. Para llevar a cabo la axotomía se ha diseñado en el laboratorio un sistema de electroablación (Moya-Díaz y cols. 2014) conformado por un microscopio de fluorescencia (Leica, modelo: DMLA) que permite visualizar los peces y controlar el punto de daño, y un microelectrodo de tungsteno (Catálogo: UEWMGGSEBN1M, FHC), el cual es puesto en un micromanipulador de 4 ejes. Este microelectrodo se encuentra acoplado a una fuente de poder (Digital Midgard, Catálogo: 51595, Stoelting Co.) capaz de generar pulsos de corriente con intensidad y duración variables.

Para lesionar el nervio de la LLp, 10 a 20 larvas fueron montadas en las placas mencionadas anteriormente en agarosa conteniendo el anestésico triclaína. Mediante manejo del manipulador, la punta del electrodo se presiona en la zona comprendida entre el ganglio y el primer neuromasto de la LLp (denominado L1), evitando penetrar en el tejido. Una vez posicionado, se aplicó un pulso de corriente de 17 μ A durante 1,5 segundos (Fig. 5).

Modificando la intensidad de corriente y la duración y número de pulsos, esta técnica permite, además, realizar otro tipo de daños tisulares.

En este trabajo, se utilizó esta técnica para eliminar también neuromastos de la línea



lateral. De igual manera a lo descrito en el párrafo anterior, el electrodo fue posicionado sobre el neuromasto de interés y mediante la aplicación de dos pulsos de 8 μ A de 2 segundos cada uno se dañó esta estructura.

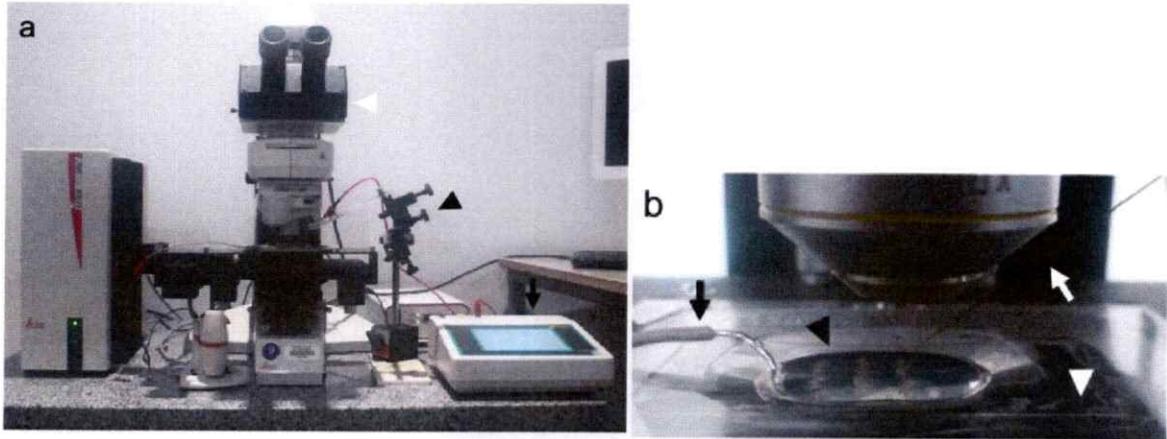


Figura 5. Esquema del montaje experimental del sistema de electroablación (Tomado de Moya-Díaz y cols., 2014). (a) Los pulsos de corriente son generados por una fuente de poder (flecha negra), la cual se conecta con el electrodo y el medio líquido presente en la muestra. El microelectrodo es sostenido por un micromanipulador (punta de flecha negra) y las larvas son visualizadas con un microscopio de fluorescencia (punta de flecha blanca). (b) Vista en primer plano del montaje experimental. El microelectrodo (flecha blanca) entra en la agarosa por un lado, y un cable a tierra es conectado por el otro lado (flecha negra). Las larvas son montadas en agarosa (punta de flecha negra), en una placa de acrílico con un calado central (punta de flecha blanca).

3.6 Inmunohistoquímica y ensayo TUNEL

Las larvas fueron fijadas con PFA 4% disuelto en PBS por 2 horas a temperatura ambiente, y posteriormente lavadas 4 veces en PBS-T (PBS-Tween 0,1%) por 5 minutos para luego ser deshidratadas en concentraciones crecientes de metanol disuelto en PBS-T (25%-50%-75%-100%).

Una vez en metanol 100% las larvas pueden permanecer entre 1 noche y varios meses

a -20 °C. Al momento de ser utilizadas, las larvas fueron rehidratadas en lavados de metanol decreciente (100%-75%-50%-25%) y finalmente se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PBS-T. Posteriormente fueron incubadas por 45 minutos en proteinasa K (10 µg/mL). A continuación, las larvas fueron fijadas con PFA 4% por 40 minutos a temperatura ambiente e incubadas en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se desechó la solución de bloqueo, se agregó el anticuerpo primario (anti-GFP, ratón) disuelto en solución de bloqueo y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. A continuación, se desechó la solución con anticuerpo primario y se realizaron 4 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno. Luego se agregó el anticuerpo secundario (Alexa 488 anti-ratón) disuelto en solución de bloqueo y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave en oscuridad. Posteriormente se realizaron 4 lavados de 20 minutos en PBS-T, para finalmente realizar la adquisición de imágenes en el microscopio.

Para realizar el ensayo TUNEL se utilizó el kit *TUNEL Apoptosis Detection Kit-Millipore* y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se realizó un protocolo similar al de inmunofluorescencia, a excepción de que todos los lavados fueron realizados con PBS-Triton X-100, 0,3%.

Todos los ensayos TUNEL realizados en este trabajo se realizaron en conjunto con la inmunofluorescencia anti GFP. Al finalizar la incubación con el anticuerpo secundario fue añadida la tinción nuclear TO-PRO 3 a una concentración de 0,005% en PBS-T.

3.7 Adquisición y procesamiento de imágenes

Para la obtención de imágenes *in vivo* se utilizó un microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS, modelo: IX81) y un microscopio confocal (Zeiss, modelo: LSM 510 META). En ambos

casos las larvas fueron anestesiadas con tricaína (MS-222, Sigma) y montadas en agarosa LMP 0,75 % disuelta en E3.

En los experimentos de microscopía *time-lapse* se utilizó el microscopio confocal. Las larvas fueron anestesiadas y montadas en agarosa LMP 1 % disuelta en E3. Un *stack* de imágenes de la zona de interés fue obtenido con un objetivo de 20X ó 40X. Dependiendo del objetivo utilizado, las imágenes se tomaron con un espaciamiento de 2,7 μm y 1 μm respectivamente. Cada *stack* fue tomado cada 5 minutos durante un tiempo total de 2 horas.

Al finalizar la adquisición de las imágenes, se generó la proyección en *z* de cada *stack* con el programa *ImageJ*, obteniendo así una única foto por tiempo. Los desplazamientos y movimientos de la larva durante el *time-lapse* se corrigieron usando el plugin *stackreg* de *ImageJ*. Al finalizar el procesamiento, esta secuencia se grabó con formato de video. Para la obtención de imágenes de larvas fijadas se utilizaron ambos microscopios. Las larvas fueron montadas en agarosa LMP 1% disuelta en PBS.

Todas las imágenes fueron procesadas y analizadas usando el programa *ImageJ 1.47* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>)

3. 8 Análisis Estadístico

Para todos los análisis estadísticos realizados en este trabajo se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.0b para Mac OS X (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Para analizar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, con una probabilidad de error $p < 0,05$. Los datos analizados que cumplieron con el supuesto de normalidad fueron analizados mediante test de Student paramétrico o ANOVA según fuera el caso. Para el análisis a posteriori del ANOVA se utilizó el

post-test de Bonferroni.

Las datos que no cumplieron con el supuesto de normalidad fueron analizados mediante el test de Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

4.1 Desorganización de la innervación aferente de los neuromastos tras la eliminación de las células ciliadas.

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de los axones periféricos de las neuronas sensoriales del ganglio de la línea lateral posterior cuando son desprovistos de sus células blanco, se incubaron larvas transgénicas dobles *HGn39D:GFP x Atoh1a:dTomato* de 3 dpf en una solución de CuSO_4 10 μM por 2 horas. Durante esta incubación, se observó *in vivo*, mediante microscopía confocal *timelapse*, el comportamiento de los axones de las neuronas aferentes que inervan el primer neuromasto de la línea lateral primaria (L1) (Ver video adjunto 1).

Durante la incubación en sulfato de cobre 10 μM las células ciliadas comienzan a desaparecer después de 7 minutos y se pierden totalmente a los 30 minutos una vez iniciada la incubación (Hernández y cols., 2007). En paralelo, se observa una desorganización de los terminales sinápticos que inervan este neuromasto. Este fenómeno se hace evidente una vez que estas últimas han desaparecido, cuando los terminales nerviosos comienzan a presentar una conducta exploratoria, volviéndose más dinámicos que al comienzo de la incubación cuando aun hay células ciliadas (Video 1, Fig. 3).

Además, se realizó un *timelapse* de la innervación del neuromasto en condiciones normales. Al comparar los videos se observa un aumento de la dinámica de la innervación a medida que van desapareciendo las células ciliadas (rojo), mientras que en la condición control

la estructura de la inervación no presenta grandes cambios en su morfología y permanece más bien estable en el tiempo.

Por otro lado, cuando las larvas son expuestas a la solución de sulfato de cobre dentro de un incubador a 28°C, lavadas y luego observadas en el microscopio, en general ocurre que la raíz aferente primaria pierde sus múltiples ramificaciones secundarias, finalmente tomando la forma de una raíz aferente con sólo una o dos raíces secundarias (Fig. 4).

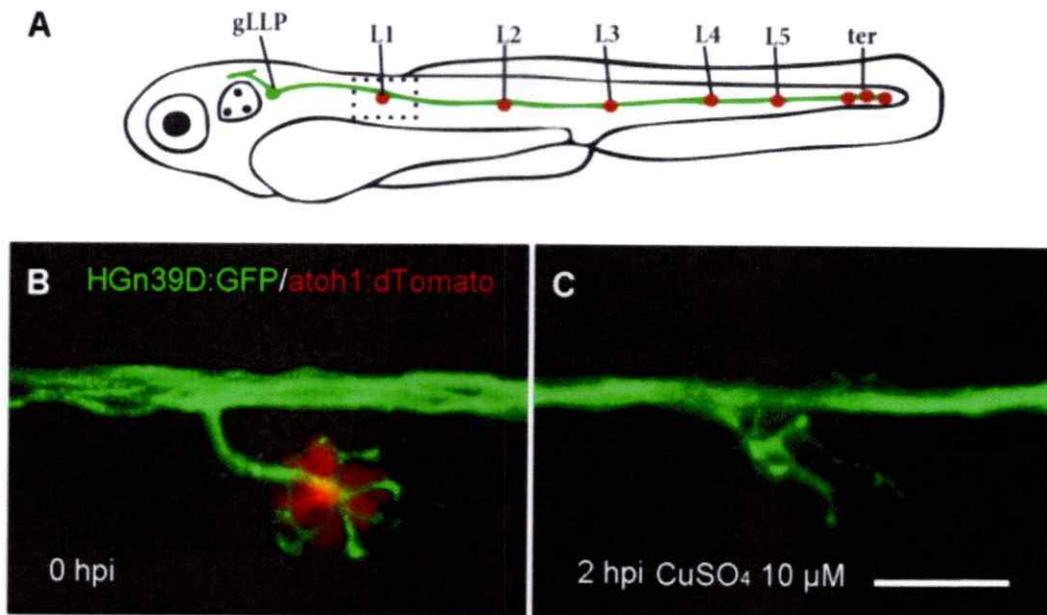
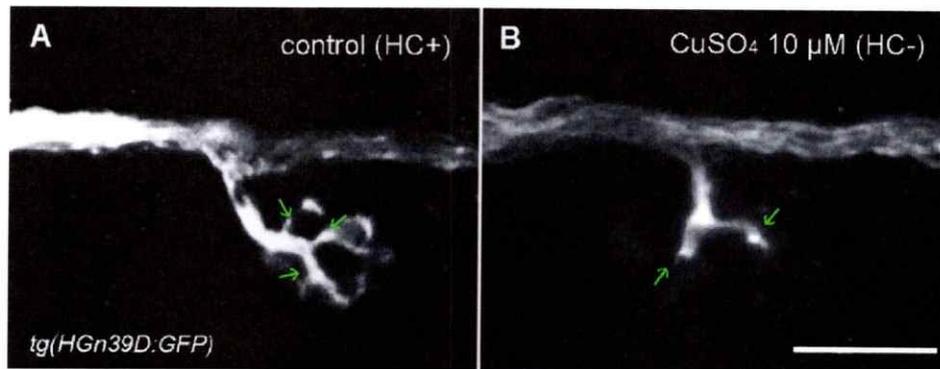


Figura 6. Desorganización de la inervación de neuronas aferentes tras la eliminación de las células blanco. (A): Esquema de una larva de 3 dpf. El recuadro punteado muestra el área enfocada en los paneles B y C. (B,C): Larva doble transgénica *Tg(HGn39D:GFP);(Atoh1:TdTomato)* de 3dpf. En verde se observa el nervio de la línea lateral y en rojo, las células ciliadas antes del tratamiento con cobre (B) y al final de la incubación durante 2 horas (C). Microscopía confocal 40X. Escala 25 μm.

Para cuantificar este fenómeno, un grupo de larvas transgénicas *HGn39D:GFP* de 3dpf fueron tratadas con sulfato de cobre 10 μM por 2 horas. Al finalizar este tratamiento, las larvas fueron fijadas con PFA al 4% para realizar posteriormente una inmunofluorescencia contra GFP

(Fig. 7B). En paralelo, se fijaron un grupo de larvas control no tratadas del mismo estadio de desarrollo (Fig. 7A).

Las imágenes obtenidas en microscopía confocal fueron analizadas utilizando el programa *ImageJ*. En primer lugar se contabilizaron de manera manual el número de raíces aferentes secundarias. En todos los peces analizados, el tratamiento con sulfato de cobre 10 μM produjo una disminución significativa en el número de estas estructuras ($p = 0,0002$) (Fig. 7C).



C

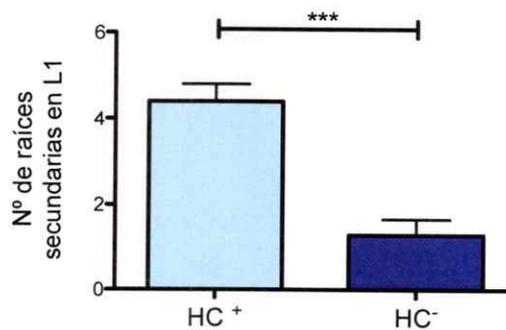
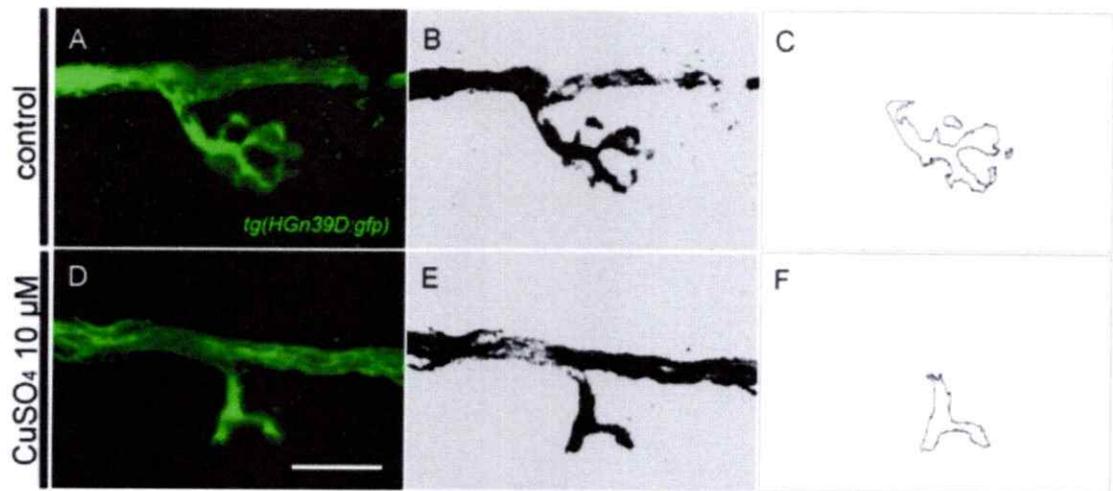


Figura 7. Cuantificación del número de raíces secundarias en ausencia de células ciliadas (HC). (A) Inervación del neuromasto L1 del lado derecho en larvas transgénicas *HGn39D:GFP*, se muestra una larva control y una larva tratada. Las flechas verdes indican las raíces secundarias que fueron contabilizadas. (B) Se muestra el promedio \pm el error estándar de raíces secundarias en presencia de células ciliadas

(HC⁺) y cuando éstas son eliminadas (HC⁻). Se compararon los promedios con un test de Student no pareado, $p < 0,001$; N=16. Microscopia confocal 40X. Escala 25 μm .

En segundo lugar, para analizar el mismo conjunto de imágenes, se utilizó la herramienta *Analyze particles* del programa *ImageJ* que permite cuantificar el área asociada a una estructura de interés. En este caso se evaluó el área de la inervación (considerando la estructura desde la base de la raíz aferente primaria) en peces controles y tratados con sulfato de cobre de forma más automatizada.

De la misma manera que en el caso anterior, esta cuantificación muestra cambios significativos en el área de inervación, resultando un área menor de ésta cuando las larvas son privadas de las células ciliadas (Fig. 8C).



G

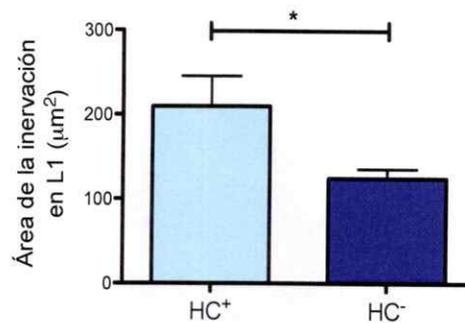


Figura 8. Cuantificación del área de la inervación en ausencia de células ciliadas (HC). (A-F) Esquema del proceso de cuantificación del área de la inervación en el programa *ImageJ*. (A,D) Sección analizada, las terminales aferentes expresan GFP. Microscopía confocal 20X. Escala 25 μm. (B,E) Ajuste del umbral y conversión a imagen binaria. (C,F) Selección del área de la inervación y cuantificación de ésta a través de la herramienta *Analyze particles*. (G) Se muestra el promedio ± el error estándar del área de la inervación en presencia de células ciliadas (HC⁺) y cuando éstas son eliminadas (HC⁻). Se compararon los promedios con un test de Student no pareado, $p < 0,001$; N=16.

Esto sugiere que las células ciliadas de los neuromastos estabilizarían los terminales nerviosos de las neuronas aferentes del nervio de la LLp, ya que su eliminación produce una

desorganización de la inervación y un incremento del dinamismo de los axones una vez que las células han desaparecido por completo.

Es importante destacar que a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en peces y anfibios, las células ciliadas son capaces de regenerar después de una daño (Rev. en Warchol, 2011) y en el pez cebra, éstas lo hacen unas pocas horas después de retirar el sulfato de cobre (Hernández y cols., 2007). Tras la regeneración de estas células, las neuronas sensoriales reinervan sus blancos sinápticos, tal y como se ha descrito en publicaciones previas (Faucherre y cols., 2009; Nagiel y cols., 2008). Dado que este proceso es relativamente rápido, no hemos observado muerte de las neuronas sensoriales (dato no mostrado).

Por tanto, para simular mejor el contexto que se da en mamíferos, cuyas células ciliadas son incapaces de regenerar, se decidió modificar el protocolo de manera tal de obtener, mediante diferentes metodologías, una ausencia prolongada de células ciliadas.

Para esto se utilizó un protocolo de exposición constante a sulfato de cobre de concentración subletal, en el que las larvas tratadas no presentaban diferencias morfológicas respecto de los controles (Hernández y cols., 2011) (ver métodos 3.3.1)

Por otro lado, en nuestro laboratorio contamos con un mutante para el gen *phoenix*, que es necesario para la regeneración de las células ciliadas. Se ha demostrado que tras una única exposición a una solución de 10 μ M de sulfato de cobre por 2 horas, las células ciliadas de estos mutantes presentan una regeneración retardada (Behra y cols., 2009). El gen *phoenix* se expresa sólo en las células de soporte del neuromasto, las cuales son de importancia fundamental para la regeneración de las células ciliadas. En este trabajo se analizó si es que el mutante *phoenix* presentaba alteraciones en la regeneración del nervio de la LLp, además del retraso en la regeneración de las células ciliadas. Esto se realizó axotomizando larvas obtenidas

de un cruce entre dos peces adultos portadores de la mutación, obteniendo así una progenie de peces mutantes y peces silvestres. Ambos grupos tratados presentaron igual velocidad de regeneración, presentando cerca de las 48 hpa un nervio totalmente regenerado (Datos no mostrados).

Tanto en la condición de exposición a sulfato de cobre como en las larvas mutantes, se observó que se mantenía la inervación hacia los neuromastos (raíz aferente primaria), sin embargo las raíces secundarias se desorganizaron por completo al igual que lo descrito previamente. Las Figuras 9 y 10 muestran estos resultados.

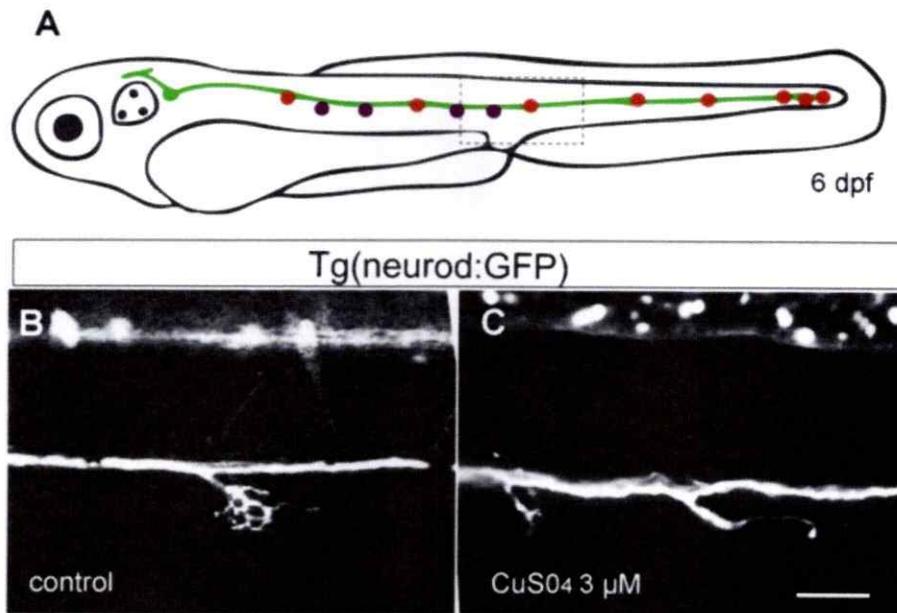


Figura 9. Alteraciones del nervio de la Lp tras la eliminación prolongada de los blancos sinápticos. (A) Esquema de larva de 6 dpf. Los neuromastos primarios se muestran en rojo, mientras que los neuromastos secundarios se muestran en morado. El recuadro punteado señala la zona que se muestra en las imágenes subsiguientes. (B) Se muestra la inervación aferente del tercer neuromasto primario (L3) a los 6 dpf en condiciones control y después de 3 días de privación de sus células blanco (C). Microscopía confocal 20X. Escala 50 μm .

En los mutantes *Phoenix*, al cabo de 3 días post tratamiento (dpt), pocos neuromastos tenían nuevamente células ciliadas, y se observaron severas defasciculaciones del nervio a nivel de la inervación, además de una prolongación exacerbada de las aferencias del nervio hacia regiones fuera de la zona del neuromasto carente de células ciliadas (Fig. 10B).

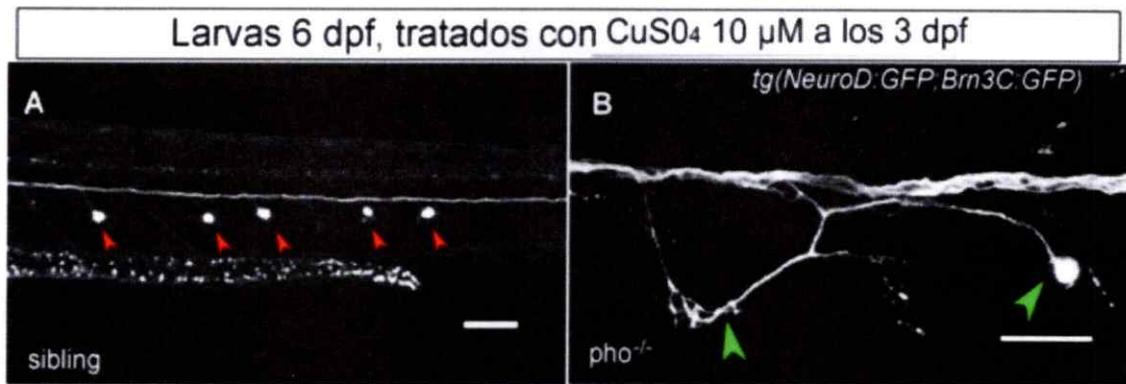


Figura 10. Alteraciones del nervio de la LLp tras la eliminación de los blancos sinápticos en mutantes *Phoenix*. Larvas mutantes *Pho* doble transgénicas *Tg(neuroD:EGFP); (brn3c:gap43-GFP)* que fueron expuestas a una solución de 10 μ M por dos horas a los 3dpf. (A) Las larvas transgénicas no mutantes (*sibling*) han regenerado sus células ciliadas tras 3dpt (flechas rojas), mientras que los mutantes, (B) incapaces de regenerar sus células ciliadas, presentan severas alteraciones del nervio. Las raíces aferentes del nervio se prolongan hacia otros neuromastos vecinos (flechas verdes). Microscopía confocal (A) 10X y (B) 20X. Escala 100 μ m y 50 μ m respectivamente.

Estos resultados nos permitieron demostrar que si bien las células ciliadas estabilizan los terminales nerviosos de las neuronas aferentes, no son necesarias para la mantención de la inervación de las neuronas hacia los neuromastos, ya que su ausencia, incluso tras largos períodos de tiempo, no produce la retracción de la raíz aferente primaria de la zona.

4.2 La invasión de los neuromastos depende de la presencia de otros tipos celulares presentes en éste y no de las células ciliadas.

Debido a que la ausencia de las células ciliadas, tanto en el corto como el largo plazo resultó no generar la retracción de la invasión de los neuromastos, se evaluó el impacto que tiene la ausencia de otros tipos celulares presentes en el neuromasto en las neuronas aferentes del ganglio de la línea lateral posterior.

Para esto se utilizó un protocolo de incubación en CuSO_4 que elimina las células ciliadas y los demás tipos celulares del neuromasto, inhibiendo así la capacidad regenerativa de éstos (Hernández y cols., 2007) (Ver métodos 3.3.2).

Con el fin de evaluar el efecto de la ausencia de los neuromastos completos sobre el sistema, se usaron larvas transgénicas *HGn39D:GFP*. Con éstas se comparó el efecto de dos tratamientos que eliminan de manera diferencial las células de éstos órganos.

Para ello se incubaron larvas transgénicas *HGn39D:GFP* en una solución de CuSO_4 50 μM disuelta en E3 durante 2 h. Este protocolo elimina las células ciliadas y los demás tipos celulares del neuromasto, inhibiendo así la capacidad regenerativa de éstos. Paralelamente y, con el objetivo de comparar el comportamiento axonal, se incubaron larvas transgénicas *HGn39D:GFP* en una solución de CuSO_4 10 μM disuelta en E3 durante 2 h y en una solución control de sólo E3.

Las larvas tratadas fueron observadas vivas por microscopía de fluorescencia 24, 48 y 72 horas después de que el cobre fue removido del medio (Fig. 11, Fig. 12).

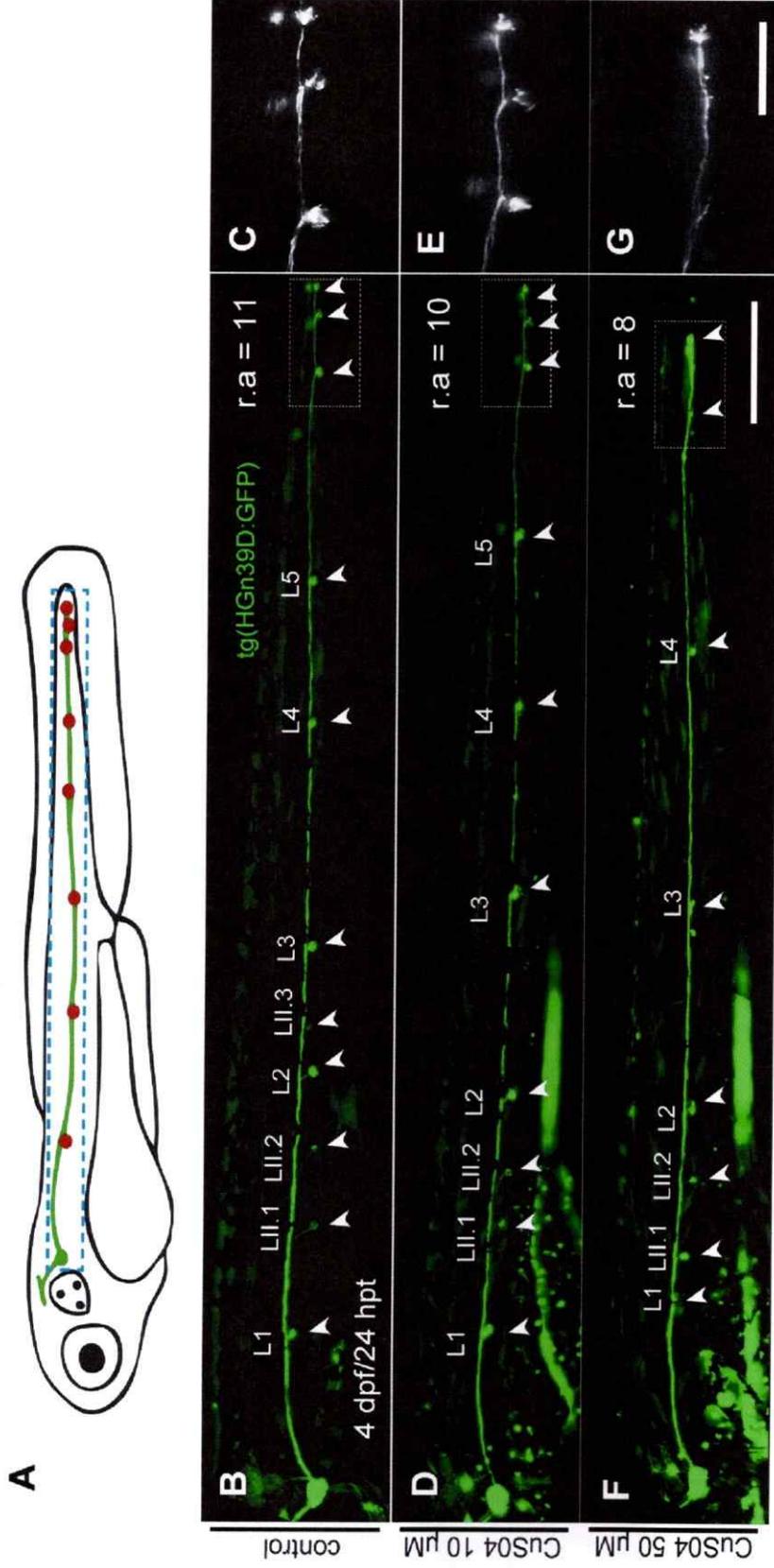


Figura 11. Retración de las aferencias del nLLp tras 24 hpt (4 dpf). A lo largo del miosepto se observa el nervio y sus raíces aferentes que inervan a los neuromastos primarios y a los secundarios que ya han comenzado a aparecer. Las flechas blancas indican los lugares en donde se encuentran las raíces aferentes (r.a). En el panel superior se muestra una larva control, el panel del medio muestra una larva que ha perdido las células ciliadas pero que ha comenzado a regenerarlas y el panel inferior muestra una larva que ha perdido todas las células de sus neuromastos primarios. Microscopía de fluorescencia 10X. Escala 300 μm , inset 100 μm .

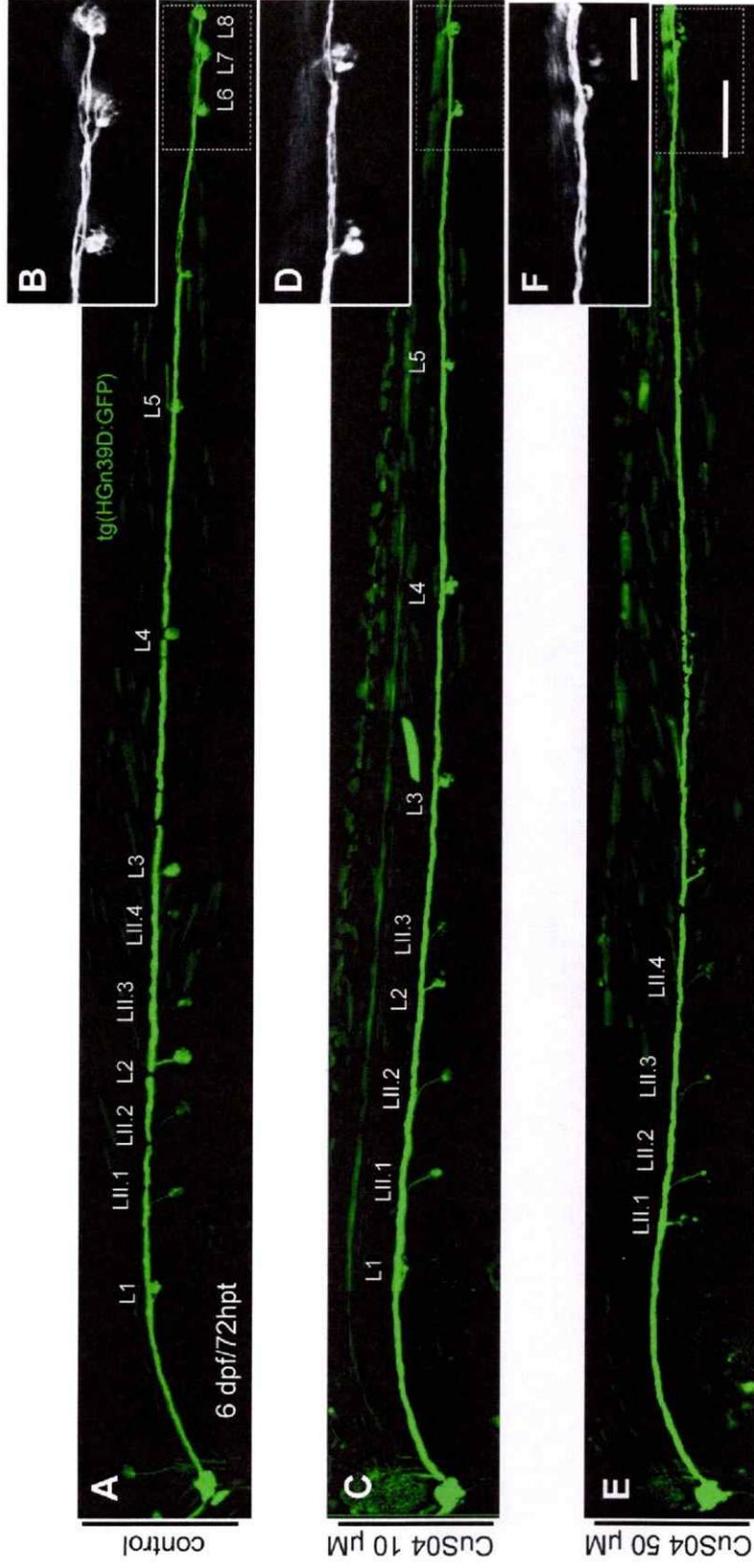


Figura 12. Retración de las aferencias del nLLp a las 72 hpt (6 dpf). Los neuromastos primarios (L1-L5) sólo están presentes en las condiciones control y tras el tratamiento con sulfato de cobre 10 μM (A,C). (E) Las raíces que inervan a los neuromastos primarios han desaparecido y sólo se puede observar la invasión que corresponde a la de los neuromastos secundarios (LII.1-LII.4). Los neuromastos secundarios en este estadio sólo se encuentran hasta la posición del L3, por lo que después de esta región no se observan ramificaciones del nervio. (B,D,F) Muestran una imagen ampliada de la región encerrada en el recuadro punteado. En la condición se ausencia total de las células de los neuromastos primarios, no se observan raíces aferentes en esta región. Microscopía de fluorescencia 10X. Escala 250 μm , inset 100 μm .

Para evaluar alteraciones en la inervación hacia los neuromastos, se cuantificó el número de raíces aferentes totales que había en el lado derecho de los peces expuestos a los diferentes tratamientos. Las cuantificaciones obtenidas se muestran en la Figura 13. En promedio, en todo los tiempos, el número de raíces aferentes es significativamente menor en el tratamiento de CuSO_4 50 μM , en el que los blancos sinápticos y sus células de soporte son removidos de manera prolongada ($p < 0,001$). Mientras que el tratamiento CuSO_4 10 μM , que elimina únicamente las células ciliadas por un período de tiempo acotado, el número de aferencias promedio no difiere significativamente de los controles, donde estas células no son removidas (Fig. 13).

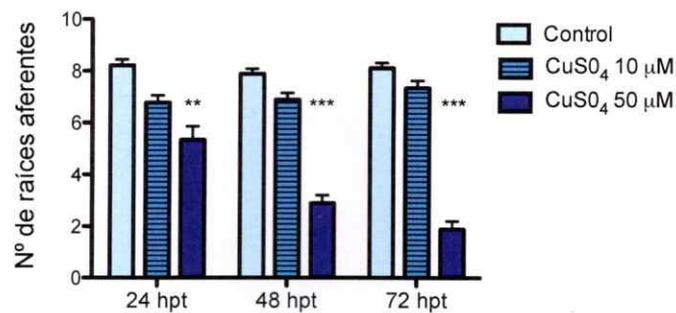


Figura 13. Número de raíces aferentes de los neuromastos primarios del nervio de la LLp en ausencia prolongada de células del neuromasto. Se muestran los promedios \pm el error estándar para cada tratamiento y controles en los distintos tiempos en que se cuantificaron las raíces aferentes. Los contraste entre tratamientos se realizaron con un ANOVA de una vía, en el que se comparó el promedio del número de aferencias para cada tratamiento en cada tiempo y luego se utilizó un test *a posteriori* de Bonferroni para contrastar los tratamientos con el control. El promedio de aferencias al tratar con 50 μM es significativamente menor para cada tiempo, $p < 0,001$, $N=27$.

4.3 La eliminación de las células del neuromasto no produce muerte neuronal ni degeneración en el nervio de la línea lateral posterior.

Para descartar que la pérdida de las inervaciones en los tratamientos mas severos con sulfato de cobre sean producto de muerte de las neuronas sensoriales del ganglio, se inyectaron embriones *Tg(Sqet20:GFP)* en estadio de una célula con el constructo de cDNA *HuC:memTdTomato*. A los 3 dpf, se seleccionaron las larvas que expresen la proteína fluorescente roja en una única neurona del ganglio y se evaluó, mediante microscopía confocal *time-lapse* el comportamiento axonal.

A los 3 dpf se seleccionaron las larvas que poseía una sola neurona marcada, y se eligió una larva cuya neurona inervaba el L3. Luego ésta fue incubada en CuSO_4 50 μM por dos horas, tiempo durante el cual se realizó un *time-lapse* (Video adjunto 2).

Se observó que el axón único tiene un comportamiento similar al que se visualiza cuando se estudia el nervio completo, además esto nos permitió ver que el axón, al menos en el período de 2 horas deprivado de sus células blanco, no degenera sino más bien que se desorganiza similar a lo que ocurre en la incubación con 10 μM de sulfato de cobre, ya que no se observó una pérdida de fluorescencia en el soma de la neurona (Fig. 11).

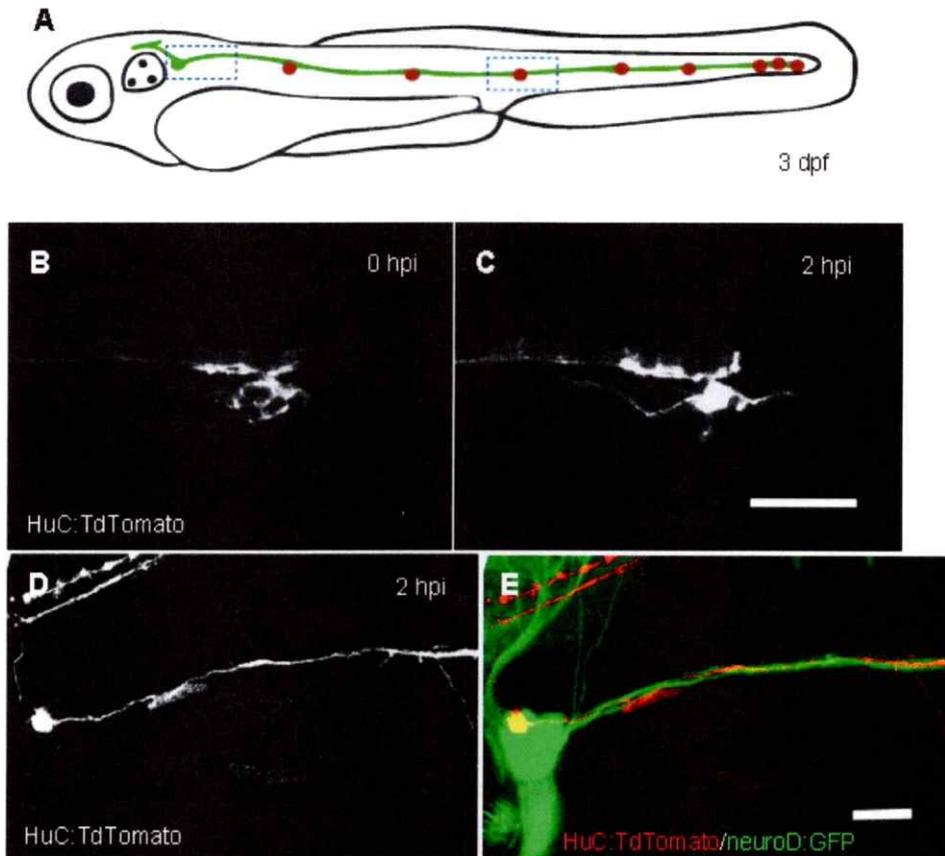


Figura 14. Cambio en la morfología observado durante incubación en sulfato de cobre $50 \mu\text{M}$ a nivel de neurona única. (A) Esquema de larva de 3 dpf, los recuadros punteados muestran la región enfocada en las imágenes inferiores. (B) Inervación de L3 antes del tratamiento con sulfato de cobre. (C) Al final del tratamiento, la estructura nerviosa se encuentra desorganizada. (D,E) El soma de la neurona se observa 2 hpi. Microscopía confocal 20X. Escala $35 \mu\text{m}$ (paneles superiores), $50 \mu\text{m}$ (paneles inferiores).

Paralelamente, se evaluó la viabilidad de las neuronas sensoriales tras el tratamiento con $50 \mu\text{M}$ de sulfato de cobre. Para ello, larvas tratadas con $50 \mu\text{M}$ de sulfato de cobre o con solución control fueron fijadas 2 y 12 horas post tratamiento para realizar un ensayo TUNEL. Las larvas fueron observadas por microscopía confocal y las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa *ImageJ* para cuantificar el número de células que tenía marca positiva para el ensayo TUNEL. El resultado de la cuantificación demostró que no habían

diferencias significativas en el número de neuronas sensoriales apoptóticas, por lo que no hay un fenómeno de muerte celular asociado a la pérdida de las células del neuromasto.

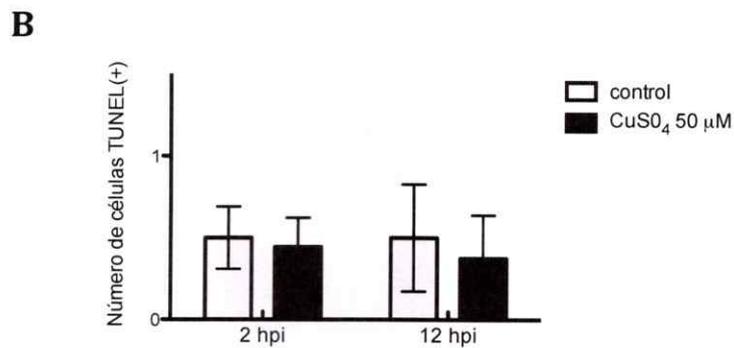
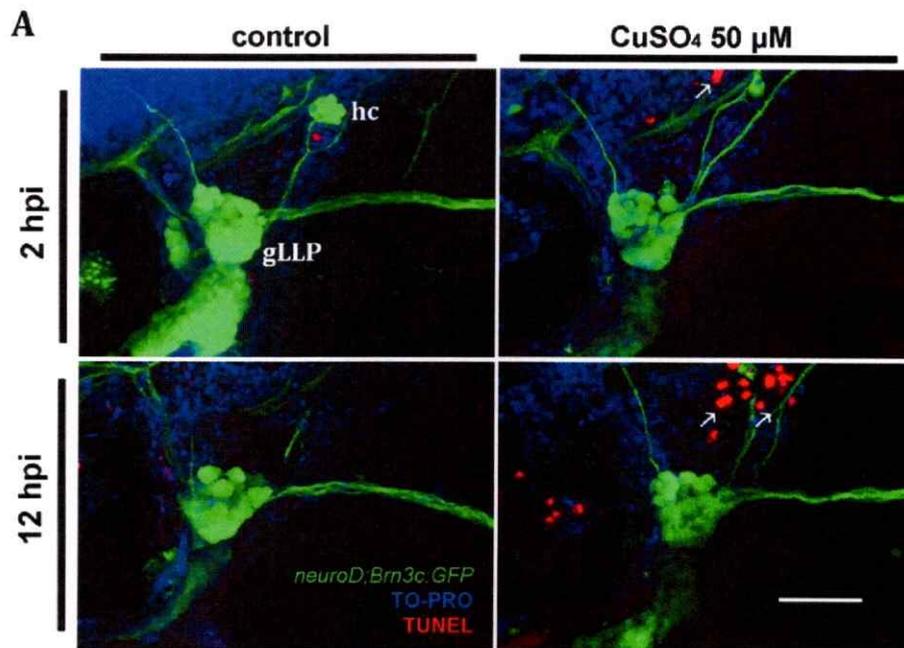


Figura 15. Evaluación de muerte neuronal asociada a la privación de blancos sinápticos. Larvas transgénicas *NeuroD:GFP; Brn3c:gap43-GFP*: de 3dpf fueron tratadas con CuSO_4 50 μM por dos horas y fijadas inmediatamente y luego 12 hpt. Se realizó un ensayo TUNEL para evaluar muerte celular en el ganglio. (A) Se muestra el ganglio (gLLP) de las larvas en verde y las células ciliadas (hc) en la condición control. Las células TUNEL positivas se muestran en rojo y se indican con flechas blancas. Se observan marcadas las células del primer neuromasto dorsal cuando las larvas son tratadas con cobre. En general no se observan células del ganglio que presenten marca TUNEL en ninguna de las condiciones. (B) Cuantificación del número de células TUNEL positivas en el ganglio para cada condición. Se muestra el promedio de éstas para cada condición \pm el error estándar. Se hizo una comparación con un test de

Mann-Whitney dentro de cada tiempo, mostrando que el número de células marcadas no difiere significativamente entre las condiciones control y CuSO_4 50 μM ($p=0,52$ y $p=0,60$ para 2 y 12 hpi respectivamente), $N = 32$. Microscopía Confocal 40X. Escala 50 μm .

4.4 La ausencia de células ciliadas no afecta la regeneración de la rama principal del nervio de la línea lateral posterior, pero si tiene un efecto sobre las raíces aferentes

La rama principal del nervio de la línea lateral es capaz de regenerar en ausencia de células ciliadas, demostrando que aun cuando éstas no están presentes el nervio es capaz de volver a prolongarse por completo y sin defasciculaciones hasta la cola del pez, a una velocidad igual a la de las larvas controles (Villegas y cols., 2012).

En este trabajo se observó lo que ocurría con la emisión de raíces aferentes, durante la regeneración, hacia la zona de los neuromastos en ausencia de células ciliadas y otras células del neuromasto. Para ello, se utilizaron larvas dobles transgénicas provenientes de un cruce entre dos líneas transgénicas *NeuroD:EGFP* y *Brn3c:gap43-GFP*. Esto nos permitió observar tanto las células ciliadas como el nervio de la LLp. Las larvas seleccionadas fueron axotomizadas a los 3 dpf y luego fueron incubadas en una solución de sulfato de cobre 3 μM de manera permanente hasta las 48 hpa para evitar la regeneración de las células ciliadas.

Se observó que en ausencia de células ciliadas el nervio fue capaz de regenerar prolongándose nuevamente a lo largo del miosepto sin defasciculaciones, y también formando proyecciones colaterales hacia los neuromastos. Además, no se observaron diferencias significativas en la temporalidad en que el nervio lograba alcanzar la cola del pez, respecto de las larvas controles (Fig. 13C,D).

En el sitio de los neuromastos las raíces aferentes primarias se encuentran presentes, pero a nivel de las raíces secundarias se encuentra una morfología alterada respecto de los controles (Fig. 13C',D').

Por último, ante la eliminación de todas las células de los neuromastos, mediante un tratamiento de sulfato de cobre 50 μ M por 2 horas, subsiguiente a la axotomía, el nervio era capaz de prolongarse a lo largo del miosepto hasta la cola del pez, en una temporalidad no diferente de la que lo hacen las larvas no tratadas (Fig. 13 C,E). Sin embargo, estas larvas presentaban una ausencia casi total de la emisión de raíces primarias hacia ventral. Y en general las raíces emitidas se encontraban totalmente desorganizadas respecto de los controles y de las larvas tratadas con sulfato de cobre 3 μ M (Fig. 13 E').

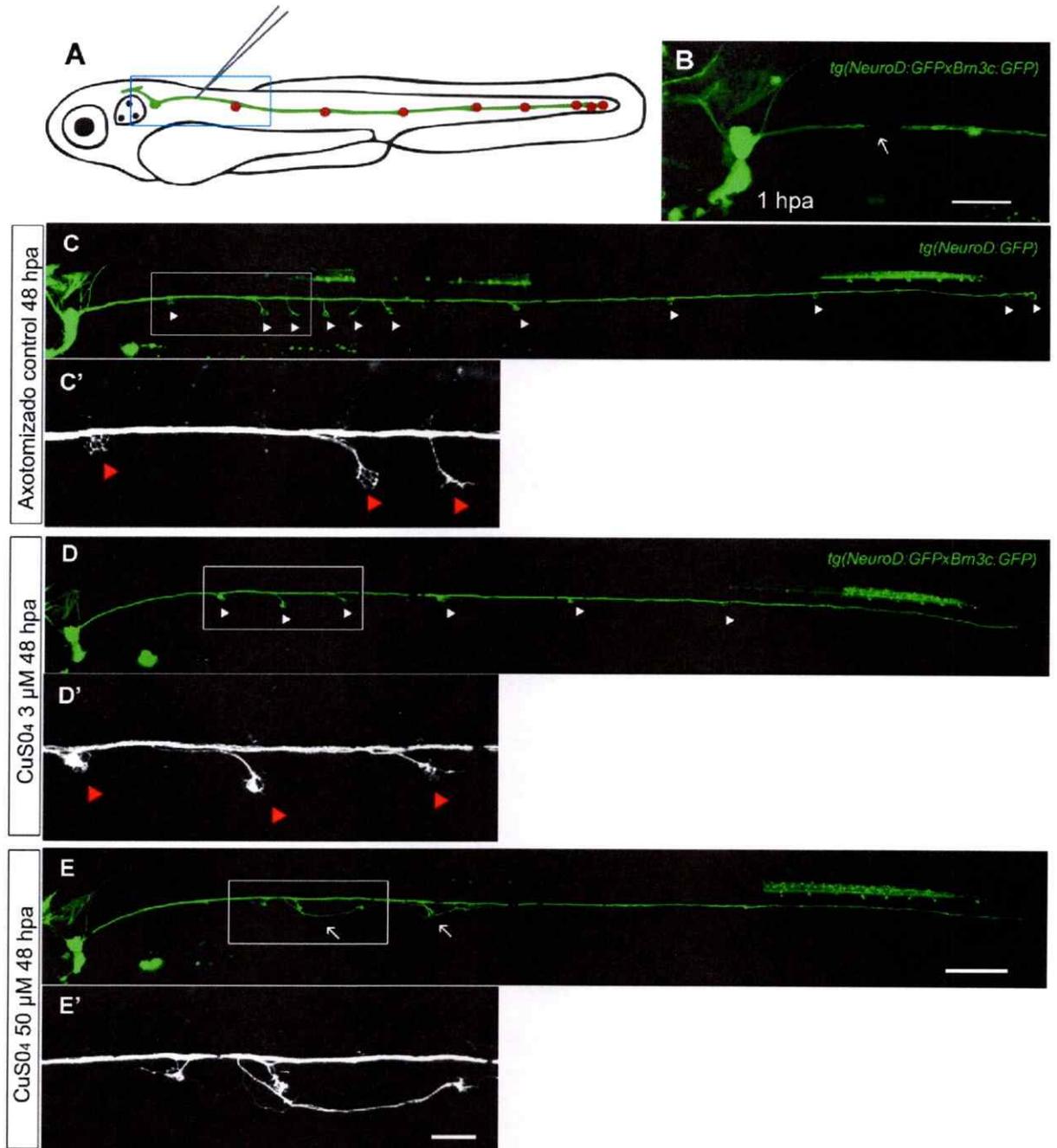


Figura 16. Regeneración del nervio de la LLp en ausencia de células ciliadas. Larva transgénica *NeuroD:GFPxBrn3c:gap43-GFP* tras 48 hpa (5dpf). (A) Esquema de una larva de 3 dpf en el que se muestra la zona del nervio en donde se realiza la electroablación. El recuadro azul indica la región visualizada en el panel B. (B) Tras 1 hpa, el nervio se ve totalmente seccionado (flecha blanca). (C) Larva control y neurotomizada tras 48 hpa (D) Eliminación de las HC, el nervio ha regenerado y ha sido capaz de prolongarse a lo largo del eje del miosepto sin defasciculaciones ni neuritas fuera de la zona del miosepto. Se observa la presencia de raíces colaterales hacia la zona de los neuromastos (flechas

blancas). (D') Amplificación del recuadro blanco en (D), se muestran las raíces colaterales, pero se observa que si bien estos están presentes, se encuentran desorganizados en comparación a la condición control (C'). (E) Eliminación de todas las células del neuromasto, el nervio regenera. Se observa la presencia de neuritas hacia el miosepto (E') Se muestran amplificadas las neuritas, las cuales no presentan ninguna organización similar a las condiciones anteriores. Microscopía confocal 20X. Escala 200 μm , inset 50 μm .

4.5 La electroablación de un neuromasto tiene múltiples resultados sobre la inervación asociada

a éste

Debido a que observamos que al eliminar los neuromastos no había un fenómeno de muerte neuronal en el ganglio, nos pareció interesante estudiar un único axón y que era lo que ocurría cuando el neuromasto inervado por éste era eliminado de manera selectiva, es decir, cuál era el destino de una neurona, cuando esta era privada de su blanco sináptico y por último, evaluar la capacidad de esta célula nerviosa para reinervar a otros neuromastos.

Con este propósito, se utilizaron larvas transgénicas *Sqet20:GFP*, las cuales fueron inyectadas en estadio de una célula con un constructo de cDNA *HuC:memTdTomato*, lo que permite generar cierto grado de mosaicismo en su expresión. A los 3 dpf se seleccionaron las larvas que tenían marca en una neurona del ganglio. Posteriormente a estas larvas se les hizo un daño en el neuromasto inervado por la neurona marcada.

La técnica de electroablación del neuromasto se desarrolló en el laboratorio para estudiar fenómenos de regeneración en este órgano y de diferenciación celular. Así, se ha observado que tras dañar al neuromasto siguiendo las condiciones mencionadas anteriormente, existe un 60% de larvas que regenera el neuromasto y el 40% restante no logra regenerar y sólo repara la zona de daño sin formarse un nuevo neuromasto. De las larvas que regeneran el neuromasto dañado, un 30% logra hacerlo antes de las 48 hpd y el resto lo hace a

las 72 hpd. Así, las larvas son seguidas hasta las 72 horas posteriores al daño, y se consideran como no regeneradas las larvas que una vez pasado este tiempo no han formado un nuevo neuromasto en el sitio de daño (Sánchez y Allende, datos no publicados).

Es importante destacar que como consecuencia de la metodología de electroablación utilizada para dañar al neuromasto se produce inherentemente un daño en el nervio de la LLP, produciéndose una lesión similar a una neurotomía, la cual desencadena todos los procesos asociados a la degeneración Walleriana hacia caudal desde la zona de daño. En estudios previos (Sarrazín y cols., 2010) y resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Ceci y Allende, datos no publicados) se ha demostrado que las neuronas después de una lesión del nervio, no presentan especificidad por el blanco sináptico que inervaban previo al daño. Así, después de una lesión una neurona que inervaba el L1 puede inervar el L3, incluso neuronas derivadas de la placoda del primordio primario pueden inervar neuromastos secundarios (Sarrazín y cols., 2010).

En este trabajo se observó que después de aplicar el estímulo eléctrico para eliminar el neuromasto, la neurona asociada a éste puede inervar neuromastos posteriores a la zona de daño.

En nuestras manos, para efectos de este trabajo, no hemos logrado obtener larvas que hayan regenerado el neuromasto dañado. En estas larvas que no regeneran hemos observado cuando las células interneuromásticas comienzan a repoblar la zona dañada, la neurona emite una raíz aferente hacia ésta. Esta ramificación permanece hasta los 2 días posteriores al daño y, en el sitio donde se realizó la lesión, la raíz colateral de la neurona se retrae (Fig. 17, Fig. 18).

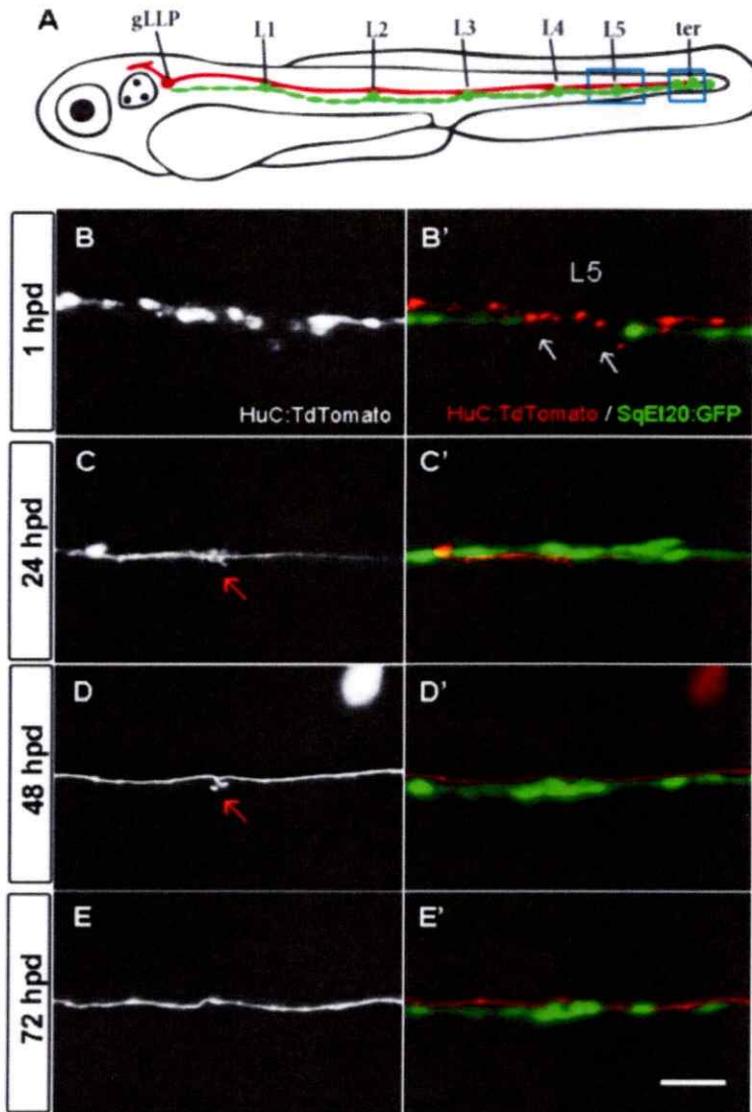


Figura 17. Retracción de la inervación durante la eliminación de un neuromasto. (A) Esquema de una larva de 3dpf donde se indica que neuromastos fueron observados. (Imágenes columna izquierda) Se muestra la inervación del neuromasto. La marca corresponde a una neurona única. (Imágenes columna derecha) Se muestra la superposición de las células interneuromásticas (verde) y el axón asociado al neuromasto que fue dañado (rojo). (B, B') 1 hpd se ve una discontinuidad de las células interneuromásticas (flechas blancas), además de una fragmentación del nervio debido a la axotomía. (C, C') 24 hpd se observa que las células interneuromásticas se reconectan, y reaparece la inervación asociada al neuromasto (flecha roja). (D, D') 48 hpd se observa que el neuromasto aun no ha regenerado y aun se visualiza una raíz aferente hacia la zona dañada. (E, E') 72 hpd el neuromasto no regenera y se observa que la raíz aferente asociada ha desaparecido. Microscopía de fluorescencia. Escala 35 μ m.

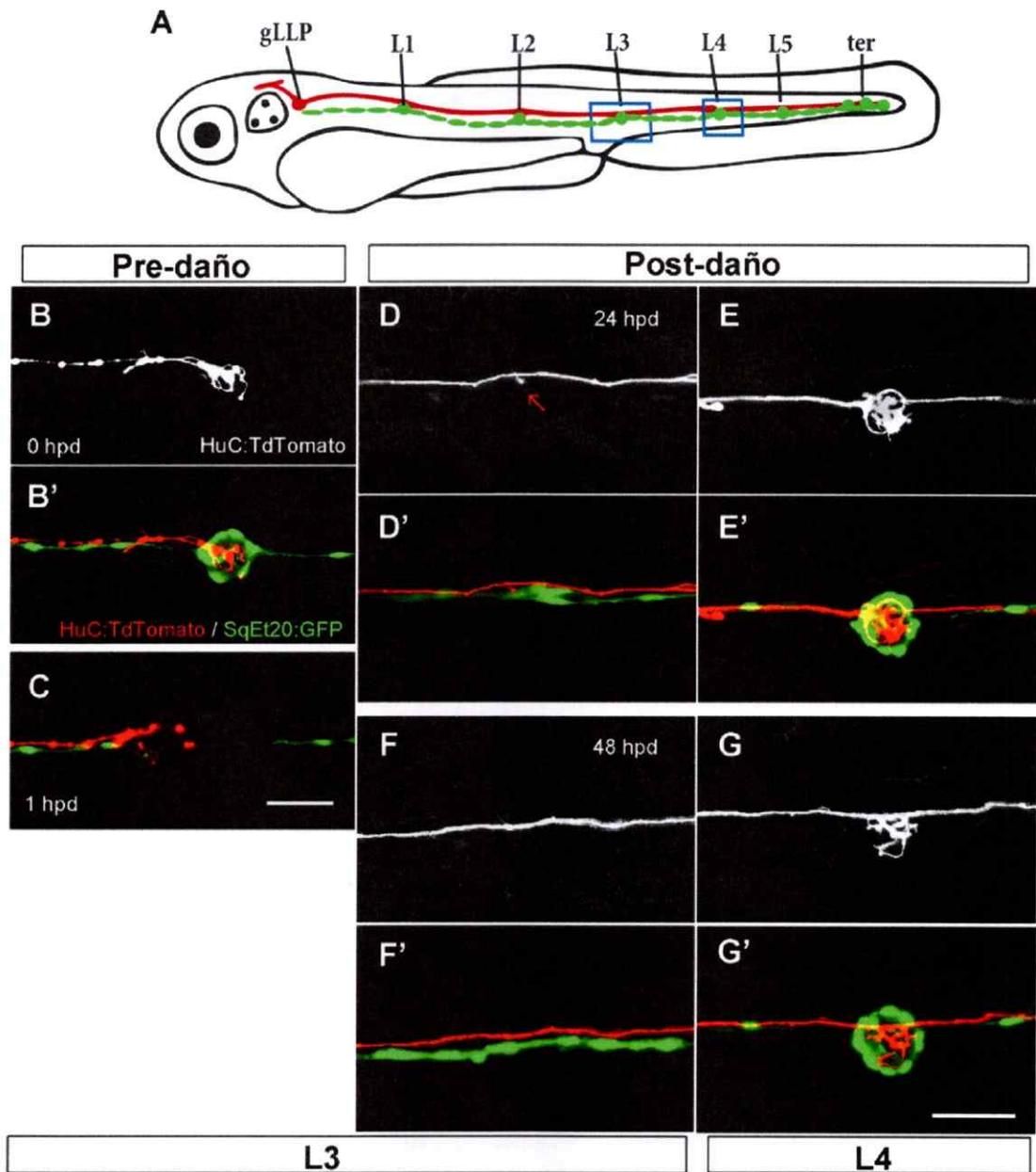


Figura 18. Inervación de neuromastos posteriores después de la eliminación de un neuromasto específico. (A) Esquema de una larva de 3 dpf, los recuadros encierran los neuromastos mostrados en las imágenes inferiores. (B) Previo al daño, la neurona inerva el L3, 1 hpd (C) no se observan células que expresen GFP en la zona del neuromasto. 24 hpd (D-E') en L3 se observa una pequeña ramificación del nervio hacia la zona de daño (flecha roja), por otro lado la neurona ha inervado el L4. 48 hpd (F-G') El neuromasto no regenera, y la inervación de la zona desaparece, mientras que en L4 la inervación permanece. Microscopía confocal 20X. Escala 50 μ m.

5. DISCUSION

El objetivo del presente trabajo fue analizar la presencia de relaciones tróficas o de dependencia entre los componentes del sistema de la línea lateral posterior en la larva del pez cebra.

5.1 Las células ciliadas, en estadios tempranos de desarrollo, son independientes de la inervación

En estudios previos se ha observado que las células ciliadas y los neuromastos no presentan una dependencia, al menos en el corto, de la presencia del nervio. Ya que en estadios tempranos del desarrollo, aun cuando la migración del nervio es detenida o inhibida, el primordio de la LLp es capaz de migrar y depositar los proneuromastos y estos son capaces de diferenciarse posteriormente en neuromastos (López-Schier y cols., 2004; Schuster y cols., 2010). Y por otro lado, en estudios de regeneración axonal, Villegas y cols. (2012) describieron que cuando el nervio degenera y está ausente, las células ciliadas son capaces de regenerar y no presentan mayor muerte celular que cuando el nervio está presente. Un estudio posterior, realizado por Wada y cols. (2013) demostró que la eliminación del nervio de la LLp a largo plazo, tiene efectos sobre el desarrollo de los neuromasto en el adulto, ya que afecta el proceso de *budding* por el cual éstos se forman. Estos resultados sugieren que el desarrollo larval de los neuromastos no depende en gran medida de la presencia del nervio, pero el desarrollo adulto de éstos si depende de que la inervación esté presente. Sin embargo, este estudio se centra en el estado larval del desarrollo, y en este estado los neuromastos no dependen de la inervación.

Es por esto que nos decidimos centrar exclusivamente en la dependencia del nervio de la presencia de células ciliadas. Esto fue observado de dos maneras: primero se observó el fenómeno asociado a la deprivación de las células blanco y otras células del neuromasto en condiciones normales del nervio, y debido a que se encontró un efecto, en segundo lugar decidimos estudiar si es que este efecto era replicable en condiciones de regeneración del nervio luego de una neurotomía de éste.

5.2 Estudios sobre el nervio de la línea lateral posterior durante la eliminación de células ciliadas

Se han realizado diversos estudios sobre la regeneración de las células ciliadas en el sistema de la LLp del pez cebra (Harris y cols., 2003; Hernández y cols., 2006, 2007; Ma y cols., 2008), pero muy pocos trabajos se han centrado en observar qué es lo que ocurre con el nervio durante y después de la regeneración de las células ciliadas. Las células ciliadas después de ser tratadas de manera aguda con drogas ototóxicas regeneran aproximadamente dentro de 12 horas después del tratamiento, produciendo la recuperación funcional y anatómica del neuromasto en 48 horas (Harris y cols., 2003; Hernández y cols., 2007). Posteriormente, un estudio realizado por Nagiel y cols. (2008) mostró que después de un tratamiento con una solución sulfato de cobre 10 μ M la neurona que inerva al neuromasto retrae sus terminales de la zona y 12 hpt comienzan a formarse nuevamente las sinapsis sobre las primeras HC que han regenerado. Además de este estudio, en conjunto con un estudio realizado por Faucherre y cols. (2009) no existen otros trabajos que se centren en el nervio y sus aferencias durante procesos de eliminación de las células ciliadas y otras células del neuromasto.

5.3 Ventajas del modelo de la línea lateral posterior

5.3.1. Ventajas para estudios en dinámica neuronal

Los estudios de este tipo realizados hasta ahora han sido desarrollados principalmente en el modelo murino, debido a que ha sido de gran interés entender los procesos debidos a los cuales se produce el daño del nervio auditivo, o la muerte de las células ciliadas internas presentes en la cóclea del oído mamífero por su relación con enfermedades como la sordera y otras que pueden afectar el sistema auditivo en el ser humano. Y hasta ahora estos procesos han sido descritos en muestras *in vitro* o *ex vivo* tales como muestras fijadas para histología (Xiang y cols., 2003; Stankovic y cols., 2004), explantes de tejido nervioso (Zheng y Gao, 1996; Evans, y cols., 2009) y cultivos neuronales (Campenot, 1977, 1982a, 1982b; Davies y cols., 1986).

Pero a pesar de que las técnicas *in vitro* tienen múltiples ventajas, una de sus mayores desventajas es la imposibilidad de re-establecer la mayoría de las propiedades de las células nerviosas en su contexto original dentro del organismo vivo (Federoff y Richardson, 2001).

Por esto, la metodología de visualización *in vivo*, en un organismo completo, abre una serie de posibilidades en la investigación de las dinámicas neuronales durante procesos regenerativos. La visualización *in vivo* permite describir el comportamiento de crecimiento de las neuritas durante estos procesos, el cual muchas veces corresponde a un movimiento de elongación-retracción, y permite la observación continua en el tiempo de un mismo individuo.

5.3.2 Ventajas para el estudio de eliminación de blancos sinápticos

El sistema de la LLp al ser un sistema que se encuentra en la superficie de la larva, y debido a que los neuromastos están en estrecho contacto con el medio líquido en el que los

peces habitan, éstos pueden ser eliminados fácilmente por distintos métodos (por ejemplo: drogas, electroablación). A la vez que presenta la ventaja de poder eliminar de manera selectiva distintos tipos celulares presentes en el órgano blanco, y al estar éstos distribuidos de manera discreta a lo largo del pez, poder eliminar de manera selectiva un único órgano. Finalmente, el que sea un modelo *in vivo* facilita, la descripción de procesos de retracción y degeneración del nervio durante la eliminación de blancos sinápticos, además de otorgar la posibilidad de realizar un *screening* de las moléculas que están implicadas la mantención y estabilización de los terminales nerviosos.

5.4 Efectos colaterales del sulfato de cobre sobre el nervio y otras posibles metodologías para la eliminación de las células del neuromasto

El cobre en su forma iónica puede presentar efectos en múltiples niveles en un organismo, y debido a su alto potencial de óxido-reducción es capaz de generar un estrés oxidativo importante en las células (Gaetke y Chow, 2003). El cobre interactúa con los canales iónicos de las células ciliadas, y en teoría es a través de sus canales para la mecanotransducción que el cobre ingresa a éstas (Nagiel y cols. 2008). A nivel neuronal el cobre presenta múltiples efectos, tales como un aumento de la excitabilidad

De todas formas, nuestros resultados sugieren que lo observado no tiene que ver con un efecto directo del cobre sobre las neuronas y la inervación, ya que los efectos se observan a largo plazo, incluso una vez que el cobre es removido del medio. Por otro lado, si bien la concentración de cobre que finalmente alcanza el sitio de los terminales nerviosos es indeterminada, sabemos con seguridad que esta es bastante inferior a la concentración contenida en el medio de incubación, ya que, al menos en ratón se ha estudiado en neurona

única y en rebanada que a estas concentraciones son altamente tóxicas y letales para las células nerviosas (Mathie y cols., 2006). Ahora, si bien lo más probable es que el sulfato de cobre, en las condiciones utilizadas en este trabajo, no esté teniendo un efecto directo sobre la organización de los terminales nerviosos, no se puede descartar un posible efecto colateral, el que podría ser probado utilizando en un futuro trabajo otras metodologías o ensayos.

Un método alternativo para eliminar de manera específica distintos tipos celulares presentes en el neuromastos podría ser el mecanismo de expresión de nitroreductasa a través del sistema Gal4-UAS, implementado por Davison y cols. (2007). Este sistema es relativamente nuevo, y ha sido ampliamente utilizado en el modelo del pez cebra para generar la muerte de un tejido específico (Pisharath y Parsons, 2009). Este método consiste en la expresión de una nitroreductasa de *E. Coli* (NTR) que se expresa asociado a la secuencia UAS y una proteína fluorescente, dirigida por el factor de transcripción Gal4, que se encuentra asociado a un promotor específico. En el caso de estudios de eliminación de blancos sinápticos, este sistema podría servir para eliminar de manera específica cada tipo celular del neuromasto, utilizando distintos promotores únicos de cada célula.

5.5 Rol de las células ciliadas en la estabilidad de los terminales nerviosos del nervio de la LLp

Se sabe que las células ciliadas expresan BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*) en estadios larvales y juveniles del pez cebra, presentando un *peak* en su expresión a los 20 dpf y posteriormente comienza a disminuir (Hashimoto y Heinrich, 1997; Germanà y cols., 2010). BDNF es un receptor del ligando *Trk*, que está presente en las neuronas del ganglio de la LLp (Martin y cols., 1995). Por lo que efectivamente existe una relación trófica entre ambos tipos celulares.

En el trabajo aquí expuesto, se analizó qué ocurría en el nervio de la LLp cuando las células ciliadas eran eliminadas por períodos de tiempo breves y prolongados. Se demostró que en el sistema de la línea lateral del pez cebra, las células ciliadas no son un factor determinante en la supervivencia de las neuronas que las contactan. Sin embargo, las células ciliadas sí parecen tener un rol en la estabilidad de los terminales nerviosos que las contactan, ya que cuando éstas son eliminadas, incluso por períodos breves de tiempo, estos terminales se desorganizan rápidamente perdiendo su conformación original.

Por otro lado, aun cuando fueron eliminadas por períodos prolongados de tiempo, simulando lo que ocurre en mamíferos, donde estas células no tienen la capacidad de regenerar (Rev. en Warchol, 2011), los terminales nerviosos no se retrajeron de la zona de los neuromastos. Las raíces aferentes del nervio permanecieron en la región ventral a éste, incluso prolongándose y extendiéndose hacia la región de neuromastos adyacentes. Estos resultados sugieren que los terminales nerviosos son capaces de recibir señales de otros tipos celulares de la línea lateral, diferentes a las células ciliadas.

5.6 Posibles tipos celulares involucrados en la llegada y mantención de la inervación en el sitio del neuromasto

5.6.1 Células de soporte y progenitores de las células ciliadas

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, las células que podrían en primera instancia tener un rol en la mantención de las raíces aferentes primarias del nervio, en la región de los neuromastos, serían los progenitores basales de las células ciliadas presentes en los neuromastos. Ya que cuando estos fueron eliminados se produjo una severa retracción de los

terminales nerviosos. En la base de datos ZFIN (The zebrafish model organism database)¹ no se registra la expresión de factores neurotróficos en las células de soporte de los neuromastos, a pesar de que lo observado en este trabajo indica una influencia importante de este tipo celular en la inervación del neuromasto. Queda por investigar sobre que posibles factores moleculares presentes en este tipo celular podrían estar ejerciendo una influencia sobre el nervio de la LLp.

5.6.2 Células interneuromásticas

Los resultados obtenidos en esta tesis en conjunto con resultados obtenidos por otros miembros del laboratorio (Sánchez y Allende, datos no publicados) sugieren que las células interneuromásticas, en ausencia de células gliales diferenciadas, son capaces de generar la emisión de una raíz aferente desde el nervio hacia la zona del neuromasto cuando este ha sido dañado. Se sabe que estas células interneuromásticas expresan diversos marcadores moleculares similares a los presentes en la glia, uno de ellos es el factor neurotrófico GDNF (*Glial derived neurotrophic factor*) (Schuster y cols., 2010), por lo que potencialmente estas células tendrían la capacidad de generar la formación de raíces colaterales desde el nervio principal. Además en el trabajo realizado por Schuster y cols. se demuestra que durante la regeneración del nervio, en ausencia de células de Schwann diferenciadas, el nervio puede ser guiado por las células interneuromásticas. Así, sugerimos que las células interneuromásticas, durante la regeneración del neuromasto después de una electroablación, son necesarias para que se emita una raíz del nervio hacia el sitio de daño, pero esta señal, en ausencia de otras

¹ Bradford, Y., Conlin, T., Dunn, N., Fashena, D., Frazer, K., Howe, D.G., Knight, J., Mani, P., Martin, R., Moxon, S.A., Paddock, H., Pich, C., Ramachandran, S., Ruef, B.J., Ruzicka, L., Bauer Schaper, H., Schaper, K., Shao, X., Singer, A., Sprague, J., Sprunger, B., Van Slyke, C., and Westerfield, M. (2011) ZFIN: enhancements and updates to the zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Res.* 39(suppl 1):D822-D829

señales que podrían estar siendo secretadas por células del neuromasto diferente de las células ciliadas, no es suficiente para la mantención de la raíz en este sitio.

5.7 Las neuronas de nervio de la LLp difieren de las neuronas del ganglio espiral en su dependencia de las células del órgano blanco.

En el trabajo aquí presentado, se determinó que en el sistema mecanosensorial de la larva del pez cebra, la privación de blancos sinápticos, no produce la degeneración de las neuronas aferentes de este sistema. Más aun, se demostró que incluso la eliminación de las células de soporte y otras células acompañantes de las células ciliadas tampoco tenía un efecto degenerativo sobre estas neuronas, contrariamente a lo observado previamente en mamíferos, en los que tanto la eliminación de células ciliadas (Xiang y cols., 2003) como la disminución de la expresión del receptor *erbB3* de las células de soporte del oído (Stankovic y cols., 2004), tienen un efecto degenerativo sobre las neuronas del ganglio espiral; que son las neuronas aferentes del oído interno en mamíferos. Estos resultados sugieren que la capacidad regenerativa del sistema de la línea lateral posterior, podrían tener un efecto sobre la sobrevivencia de las neuronas, sugiriendo que este sistema sensorial presenta una gran plasticidad neuronal. Cabe destacar que los estudios realizados en el modelo murino presentan un seguimiento prolongado de las neuronas, varios días después de que los animales han nacido. En esta tesis sólo se siguió por un período de tiempo acotado el comportamiento del nervio una vez denervado de sus células blanco. Queda por estudiar si es que eliminaciones aún más prolongadas, a través del uso de mutantes por ejemplo, podría finalmente terminar provocando fenómenos degenerativos en el ganglio de la LLp.



6. CONCLUSIONES

1. Las células ciliadas estabilizan los terminales aferentes del nervio de la LLp.
2. Las células del neuromasto son necesarias en la mantención de la raíz primaria, pero no en la sobrevivida de las neuronas aferentes del nervio de la LLp.
3. Al igual que en el oído mamífero, las células de soporte y otros tipos celulares acompañantes de las células ciliadas estarían emitiendo una señal de mantención de los axones que inervan la zona.
4. La elongación del nervio de la LLp, durante su regeneración, depende de factores distintos a los necesarios para la emisión de raíces colaterales.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALOE, L. (2004). Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends in cell biology*, 14(7), 395-399.
- ADRIAN, E. D. (1941). Afferent discharges to the cerebral cortex from peripheral sense organs. *The Journal of physiology*, 100(2), 159-191.
- ANNIKO M, THORNELL LE, GUSTAVSSON H AND VIRTANEN I (1986) Intermediate filaments in the newborn inner ear of the mouse. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 48:98–106.
- BALAK, K. J., CORWIN, J. T., & JONES, J. E. (1990). Regenerated hair cells can originate from supporting cell progeny: evidence from phototoxicity and laser ablation experiments in the lateral line system. *The Journal of Neuroscience*, 10(8), 2502-2512.
- BEHRA, M., BRADSHAW, J., SOUGRAT, R., GALLARDO, V., ALLENDE, M. L., & BURGESS, S. M. (2009). Phoenix is required for mechanosensory hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *PLoS genetics*, 5(4), e1000455. doi:10.1371/journal.pgen.1000455
- BELY, A.E., NYBERG, K.G., (2010). Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 161-170.
- BONFANTI, L. (2011). From hydra regeneration to human brain structural plasticity: a long trip through narrowing roads. *The Scientific World Journal*, 11, 1270-1299.
- BRIGNULL, H. R., RAIBLE, D. W., AND STONE, J. S. (2009). Feathers and fins: non-mammalian models for hair cell regeneration. *Brain research*, 1277, 12-23.
- CAMPENOT, R. B. (1977). Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4516-4519.
- CAMPENOT, R. B. (1982a). Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. I. Local control of neurite growth by nerve growth factor. *Dev. Biol.* 93, 1-12.
- CAMPENOT, R. B. (1982b). Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II. Local control of neurite survival by nerve growth factor. *Dev. Biol.* 93, 13-21.
- CARLSON, BRUCE M. (ed.). (2011). *Principles of regenerative biology*. Academic press,
- CARONI, P. AND SCHWAB, M. E. (1988a) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J. Cell Biol.* 106, 1281-1288
- CARONI, P., SAVIO, T. AND SCHWAB, M. E. (1988b). Central nervous system regeneration: oligodendrocytes and myelin as non-permissive substrates for neurite growth. *Prog. Brain Res.* 78, 363-370
- CHEN ZL., YU WM., ET AL. (2007). Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci* 30: 209-233.

- COLLAZO, A., S. E. FRASER AND MABEE, P. M. (1994). A dual embryonic origin for vertebrate mechanoreceptors. *Science* 264:426-430.
- DAMBLY-CHAUDIÈRE C, SAPÈDE D, SOUBIRAN F, DECORDE K, GOMPEL N AND GHYSEN A. (2003). The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates. *Biol Cell* 95, 579:87.
- DAVIES, A. M., THOENEN, H., AND BARDE, Y.A. (1986). Different factors from the central nervous system and periphery regulate the survival of sensory neurons. *Nature* 319, 497-499.
- DAVISON, J. M., AKITAKE, C. M., GOLL, M. G., RHEE, J. M., GOSSE, N., BAIER, H., AND PARSONS, M. J. (2007). Transactivation from Gal4-VP16 transgenic insertions for tissue-specific cell labeling and ablation in zebrafish. *Developmental biology*,304(2), 811-824.
- DUFOURCQ, P., ROUSSIGNÉ, M., BLADER, P., ROSA, F., PEYRIERAS, N., AND VRIZ, S. (2006). Mechano-sensory organ regeneration in adults: the zebrafish lateral line as a model. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 33(2), 180-187.
- ENDLER, J. A. (1993). Some general comments on the evolution and design of animal communication systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 340(1292), 215-225.
- EVANS, A. J., THOMPSON, B. C., WALLACE, G. G., MILLARD, R., O'LEARY, S. J., CLARK, G. M., AND RICHARDSON, R. T. (2009). Promoting neurite outgrowth from spiral ganglion neuron explants using polypyrrole/BDNF-coated electrodes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91(1), 241-250.
- FAUCHERRE A, PUJOL-MARTÍ J, KAWAKAMI K AND LÓPEZ-SCHIER H. (2009). Afferent Neurons of the Zebrafish Lateral Line Are Strict Selectors of Hair-Cell Orientation. *PLoS ONE* 4(2): 4477.doi:10.1371/journal.pone.0004477.
- FAUCHERRE A, BAUDOIN JP, PUJOL-MARTÍ J AND LÓPEZ-SCHIER H. (2010). Multispectral four-dimensional imaging reveals that evoked activity modulates peripheral arborization and the selection of planepolarized targets by sensory neurons. *Development*. May;137(10):1635-43.
- FAWCETT, J. W. AND ASHER, R. A. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* 49, 377-391
- FEDOROFF, S., AND RICHARDSON, A. (Eds.). (2001). *Protocols for neural cell culture*. Springer.
- GAETKE, L. M., & CHOW, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147-163.
- GALE, J. E., MARCOTTI, W., KENNEDY, H. J., KROS, C. J., AND RICHARDSON, G. P. (2001). FM1-43 dye behaves as a permeant blocker of the hair-cell mechanotransducer channel. *The Journal of Neuroscience*, 21(18), 7013-7025.
- GALLARDO VE., LIANG J, BEHRA M, ELKAHLOUN A, VILLABLANCA EJ., RUSSO V, ALLENDE ML AND BURGESS SM. (2010). Molecular dissection of the migrating posterior lateral line primordium during early development in zebrafish. *BMC Dev Biol* 10, 120.

- GERMANÀ, A., LAURÀ, R., MONTALBANO, G., GUERRERA, M. C., AMATO, V., ZICHICHI, R., AND VEGA, J. A. (2010). Expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in the lateral line system of zebrafish during development. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(5), 787-793.
- GHYSEN, A., AND DAMBLY-CHAUDIÈRE, C. (2004). Development of the zebrafish lateral line. *Current opinion in neurobiology*, 14(1), 67-73.
- GHYSEN A AND DAMBLY-CHAUDIÈRE C. (2007). The lateral line microcosmos. *Genes Dev* 21, 2118-2130
- GILMOUR, D. T., MAISCHEIN, H. M., AND NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (2002). Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron*,34(4), 577-588.
- GILMOUR D, KNAUT H, MAISCHEIN HM AND NÜSSLEIN-VOLHARD C. (2004). Towing of sensory axons by their migrating target cells in vivo. *Nat Neurosci* 7, 491-492.
- 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(1-2):69-77.
- GRACIARENA, M., DAMBLY-CHAUDIÈRE, C., AND GHYSEN, A. (2014). Dynamics of axonal regeneration in adult and aging zebrafish reveal the promoting effect of a first lesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), 1610-1615.
- GUTMANN, E. (1964). Neurotrophic relations in the regeneration process. *Prog. Brain Res*, 13, 72-112.
- 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, 219e234.
- HASHIMOTO, M., AND HEINRICH, G. (1997). Brain-derived neurotrophic factor gene expression in the developing zebrafish. *International journal of developmental neuroscience*, 15(8), 983-997.
- HERNÁNDEZ P, MORENO V ET AL. (2006). Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res* 213(1-2): 1-10.
- HERNÁNDEZ P, OLIVARI F, ET AL. (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(5): 637-654.
- 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. *Biological research*, 44(1), 7-15.
- IZUMIKAWA, M., MINODA, R., KAWAMOTO, K., ABRASHKIN, K. A., SWIDERSKI, D. L., DOLAN, D. F., AND RAPHAEL, Y. (2005). Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals. *Nature medicine*, 11(3), 271-276.
- JACOBSON, M. D., WEIL, M., AND RAFF, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88(3), 347-354.
- KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R., ULLMANN, B., AND SCHILLING, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), 253-310.

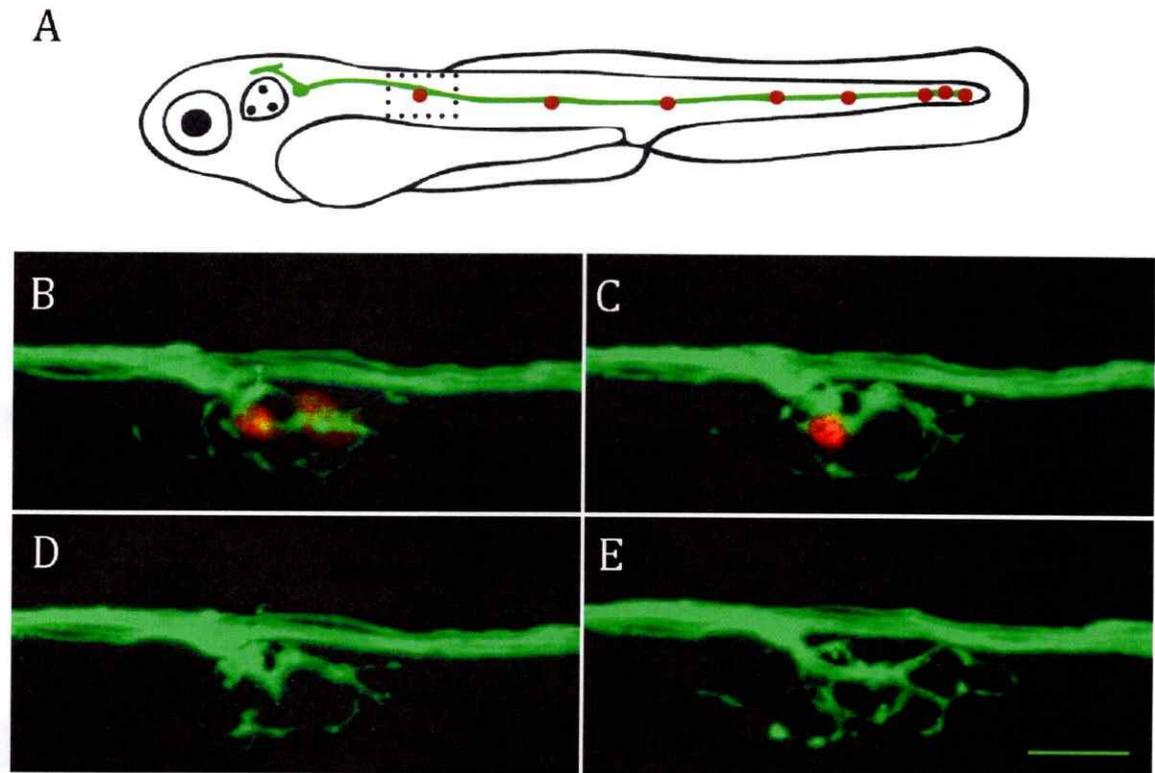
- KING, R. S., AND NEWMARK, P. A. (2012). The cell biology of regeneration. *The Journal of cell biology*, 196(5), 553-562.
- LEDENT, V. (2002). Postembryonic development of the posterior lateral line in zebrafish. *Development* 129, 597-604.
- LESTIENNE, R. (2001). Spike timing, synchronization and information processing on the sensory side of the central nervous system. *Progress in neurobiology*, 65(6), 545-591.
- 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. *Developmental cell*, 7(3), 401-412.
- LÓPEZ-SCHIER, H., AND HUDSPETH, A. J. (2006). A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), 18615-18620.
- LUO L AND O'LEARY D. (2005). Axon Retraction and Degeneration in Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 2005.28:127-156
- MA, E. Y. AND RAIBLE, D. W. (2009). Signaling pathways regulating zebrafish lateral line development. *Current biology : CB*, 19(9), R381-6.
- MARTIN SC, MARAZZI G, SANDELL JH AND HEINRICH G. (1995). Five Trk receptors in the zebrafish. *Dev Biol* 169:745-758.
- MATHIE, A., SUTTON, G. L., CLARKE, C. E., & VEALE, E. L. (2006). Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. *Pharmacology & therapeutics*, 111(3), 567-583.
- MCKERRACHER L, DAVID S, JACKSON DL, KOTTIS V, DUNN RJ AND BRAUN PE. (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*;13(4):805-11.
- METCALFE WK. (1985). Sensory neuron growth cones comigrate with posterior lateral line primordial cells in zebrafish. *J Comp Neurol* 238(2): 218-224.
- METCALFE, W. K., KIMMEL, C. B., AND SCHABTACH, E. (1985). Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish. *Journal of Comparative Neurology*, 233(3), 377-389.
- MOYA-DÍAZ, J., PEÑA, O. A., SÁNCHEZ, M., URETA, D. A., REYNAERT, N. G., ANGUITA-SALINAS, C., AND ALLENDE, M. L. (2014). Electroablation: a method for neurectomy and localized tissue injury. *BMC developmental biology*, 14(1), 7.
- MURAKAMI, S.L., CUNNINGHAM, L.L., WERNER, L.A., BAUER, E., PUJOL, R., RAIBLE, D.W. AND RUBEL, E.W., (2003). Developmental differences in susceptibility to neomycin-induced hair cell death in the lateral line neuromasts of zebrafish (*Danio rerio*). *Hear. Res.* 186, 47-56.
- NAGIEL A, ANDOR-ARDO D AND HUDSPETH AJ. (2008). Specificity of Afferent Synapses onto Plane-Polarized Hair Cells in the Posterior Lateral Line of the Zebrafish. *J Neurosci* 28(34):8442- 8453

- NADOL, J. B. (1997). Patterns of neural degeneration in the human cochlea and auditory nerve: implications for cochlear implantation. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 117(3), 220-228.
- NISHIKAWA, S., AND SASAKI, F. (1996). Internalization of styryl dye FM1-43 in the hair cells of lateral line organs in *Xenopus* larvae. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 44(7), 733-741.
- NUÑEZ, 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. *Evolution & development*, 11(4), 391-404.
- OBHOLZER N, WOLFSON S, TRAPANI JG, MO W, NECHIPORUK A, BUSCH-NENTWICH E, SEILER C, SIDI S, DUNCAN RN, BOEHLAND A AND NICOLON T. (2008). Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish haircells. *J Neurosci* 28(9): 2110-2118.
- O'BRIEN GS, RIEGER S, MARTIN SM, CAVANAUGH AM, PORTERA-CAILLIAU C, AND SAGASTI A. (2009). Twophoton axotomy and time-lapse confocal imaging in live zebrafish embryos. *Jo VE*. 24
- OLIVARI F, HERNÁNDEZ P. AND ALLENDE M. (2008). Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res* 1244, 1-12.
- OPPENHEIM RW, PREVETTE D, TYTELL M AND HOMMA S. (1990). Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo required protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Devel.Biol.*138:104-113.
- OU, H. C., RAIBLE, D. W., AND RUBEL, E. W. (2007). Cisplatin-induced hair cell loss in zebrafish (*Danio rerio*) lateral line. *Hearing research*, 233(1), 46-53.
- OWENS, K. N., COFFIN, A. B., HONG, L. S., BENNETT, K. O. C., RUBEL, E. W., AND RAIBLE, D. W. (2009). Response of mechanosensory hair cells of the zebrafish lateral line to aminoglycosides reveals distinct cell death pathways. *Hearing research*, 253(1), 32-41.
- PACK AK AND SLEPECKY NB (1995) Cytoskeletal and calcium-binding proteins in the mammalian organ of Corti: cell type-specific proteins displaying longitudinal and radial gradients. *Hear Res* 91:119-135.
- PERRY, V. H., BROWN, M. C., AND GORDON, S. (1987). The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *The Journal of experimental medicine*, 165(4), 1218-1223.
- PICHON F. AND GHYSEN A. (2004). Evolution of posterior lateral line development in fish and amphibians. *Evol Dev* 6, 187-193.
- Pisharath, H., & Parsons, M. J. (2009). Nitroreductase-mediated cell ablation in transgenic zebrafish embryos. In *Zebrafish* (pp. 133-143). Humana Press.
- PISTOCCHI, A., FEIJOO, C.G., CABRERA, P., VILLABLANCA, E.J., ALLENDE, M.L., AND COTELLI, F. (2009) The zebrafish prospero homolog prox1 is required for mechanosensory hair cell differentiation and functionality in the lateral line. *BMC Dev. Biol.* 9: 58.
- PURVES D, AUGUSTINE GJ, FITZPATRICK D, ET AL., (ed) (2001) *Trophic Interactions and the Ultimate Size of Neuronal Populations*. Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11022/>

- RAFF, M. C., WHITMORE, A. V., AND FINN, J. T. (2002). Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science*. 296:868-71.
- RICHARDSON, P. M., MCGUINNESS, U. M., AND AGUAYO, A. J. (1980). Axons from CNS neurones regenerate into PNS grafts.
- RIO C, DIKES P, LIBERMAN MC AND CORFAS G (2002) Glial fibrillary acidic protein expression and promoter activity in the inner ear of developing and adult mice. *J Comp Neurol* 442:156–162.
- SAPÈDE D, DAVID N, ST-ETIENNE L, THISSE C, THISSE B, DAMBLY-CHAUDIÈRE C, ROSA F AND GHYSEN A. (2002). Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc Natl Acad Sci* 99:16297-16302.
- 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. *The Journal of Neuroscience*, 30(24), 8234-8244.
- 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(45): 19531-19536.
- SNIDER WD, ELLIOTT JL AND YAN Q (1992) Axotomy-induced neuronal death during development. *J Neurobiol* 23:1231-1246.
- SOHAL GS (1992) The role of target size in neuronal survival. *J Neurobiol* 23: 1124-1130.
- STANKOVIC, K., RIO, C., XIA, A., SUGAWARA, M., ADAMS, J. C., LIBERMAN, M. C., AND CORFAS, G. (2004). Survival of adult spiral ganglion neurons requires erbB receptor signaling in the inner ear. *The Journal of neuroscience*, 24(40), 8651-8661.
- STOLL, G., AND MÜLLER, H. W. (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain pathology*, 9(2), 313-325.
- SPOENDLIN, H. (1975). Retrograde degeneration of the cochlear nerve. *Acta Otolaryngol.(Stockh.)* 79: 266–275.
- TERENGI, G. (1999). Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *Journal of anatomy*, 194(1), 1-14.
- UCHIYAMA, M., IWASAKI, S. I., AND MURAKAMI, T. (1991). Surface and subsurface structures of neuromasts in tadpoles of the crab-eating frog, *Rana cancrivora*. *Journal of morphology*, 207(2), 157-164.
- VARGAS, M. E., AND BARRES, B. A. (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow?. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30, 153-179.
- VARON, S. S. AND BUNGE, R. P. (1978). Trophic Mechanisms in the Peripheral Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*, 1(1), 327–361.

- VERDÚ, E., CEBALLOS, D., VILCHES, J. J. AND NAVARRO, X. (2000), Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 5: 191–208.
- 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 development*, 7, 19.
- WARCHOL, M. E. (2011). Sensory regeneration in the vertebrate inner ear: differences at the levels of cells and species. *Hearing research*, 273(1), 72-79.
- WADA, H., GHYSEN, A., SATOU, C., HIGASHIJIMA, S.I., KAWAKAMI, K., HAMAGUCHI, S., AND SAKAIZUMI, M. (2010) Dermal morphogenesis controls lateral line patterning during postembryonic development of teleost fish. *Dev. Biol.* 340(2): 583-594.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14), 5659-5664.
- WEBB, J., (1989). Neuromast morphology and lateral line trunk canal ontogeny in two species of cichlids: An SEM study. *J. Morphol.* 202, 53-60.
- WANG Z AND JIN Y. (2011). Genetic dissection of axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 21(1):189-196
- WESTERFIELD M. (1994). *The Zebrafish Book*. Eugene, University of Oregon Press.
- WILLIAMS, J. A., AND HOLDER, N. (2000). Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hearing research*, 143(1), 171-181.
- YANNAS, IV. (2001) *Tissue and organ regeneration in adults*. Springer.
- XIANG M, MAKLAD A, PIRVOLA U AND FRITZSCH B (2003) Brn3c null mutant mice show long-term, incomplete retention of some afferent inner ear innervation. *BMC Neurosci* 4:2.
- XIAO T, ROESER T, STAUB W AND BAIER H. (2005). A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. *Development* 132: 2955-2967
- YLIKOSKI, J., J. WERSALL AND B. BJORKROTH (1974) Degeneration of neural elements in the cochlea of the guinea pig after damage to the organ of Corti by ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 326 (Suppl.): 23–41.
- ZHENG, J. L., AND GAO, W. Q. (1996). Differential damage to auditory neurons and hair cells by ototoxins and neuroprotection by specific neurotrophins in rat cochlear organotypic cultures. *European Journal of Neuroscience*, 8(9), 1897-1905.

Anexo 1. Secuencia *timelapse* de la desorganización de la innervación aferente del neuromasto L1



(A) Esquema de una larva de 3 dpf, el recuadro punteado muestra el área enfocada en los paneles B-E. (B-E). Larva transgénica *HGn39D x atoh1* de 3dpf marca el nervio en verde y las células ciliadas en rojo. (B) 10 minutos de incubación en cobre, se observan 3 células ciliadas y la innervación que ha comenzado a desorganizarse. (C) 20 minutos después del comienzo de la incubación se observa una única célula roja. (D) 30 minutos post inicio de la incubación ya no se observan células ciliadas y la innervación ha perdido su conformación inicial. (E) 2 horas, al final de la incubación, se observa la innervación totalmente desorganizada respecto del inicio. Microscopía Confocal 40X. Escala 20 μ m.