

UCh-FC
Biotecnología
G 984a
C 1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“ANÁLISIS DEL PATRÓN DE INERVACIÓN DE NEURONAS AFERENTES DE LA LÍNEA LATERAL POSTERIOR DEL PEZ CEBRA DURANTE EL DESARROLLO NORMAL Y TRAS UN PROCESO REGENERATIVO”

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

DANIELA GUTIÉRREZ GARCÍA

Director del Seminario de Título:
Miguel Allende Connelly

Co-Director:
María Laura Ceci

Marzo 2016
Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

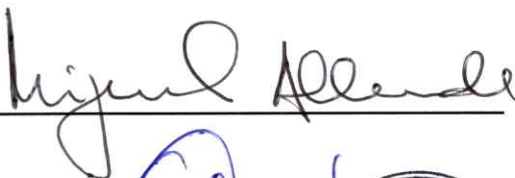
Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.

Daniela Andrea Gutiérrez García

“ANÁLISIS DEL PATRÓN DE INERVACIÓN DE NEURONAS AFERENTES DE LA LÍNEA LATERAL POSTERIOR DEL PEZ CEBRA DURANTE EL DESARROLLO NORMAL Y TRAS UN PROCESO REGENERATIVO”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título:
Miguel Allende Connelly



Co-Director:
María Laura Ceci





Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:
Alejandro Roth Metcalfe



Evaluador:
Álvaro Glavic Maurer



Santiago de Chile, marzo 2016

BIOGRAFÍA



Daniela Andrea Gutiérrez García (1991-hoy) (Maipú, Chile). Entré a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para convertirme en Ingeniero en Biotecnología Molecular porque quiero seguir el camino de la ciencia, porque la investigación hace que cada día sea más interesante.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a quienes me enseñaron desde un principio: Mario y Lau, quienes amablemente me guiaron en el proceso de diseñar los experimentos, explicar resultados y tratar de ser siempre lo más conciso y didáctico posible. A Miguel Allende por su disposición a recibir nuevas ideas, y permitirme conocer tanta gente nueva y lugares que no pensé que visitaría tan pronto. Agradezco a los zebralolos y gente de desarrollo por aceptarme y crear un buen ambiente de laboratorio, y en especial por su crítica. A mis amigos que me siguen sorprendiendo. Y al final de esta etapa universitaria, agradezco principalmente a mi familia por estar ahí conmigo hasta el final. Por recibir las penas y alegrías, y darme la fuerza para avanzar.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA Y AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS O CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
ABSTRACT.....	1
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
Desarrollo de línea lateral posterior del pez cebra.....	7
Organización somatotópica de las neuronas aferentes de la línea lateral posterior del pez cebra.....	10
Regeneración de neuronas aferentes de la línea lateral posterior del pez cebra.....	15
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	19
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIALES y MÉTODOS	
3.1 Mantenimiento de los peces y obtención de huevos fecundados.....	20
3.2 Líneas transgénicas.....	20
3.3 Constructos de DNA para microinyección de embriones y técnica de microinyección.....	21
3.4 Electroablación.....	22

3.5 Montaje de larvas en agarosa.....	22
3.6 Adquisición de imágenes y seguimiento de proyecciones neuronales.....	23
3.7 Análisis estadístico.....	23
4. RESULTADOS	
4.1 Identificar y caracterizar neuronas aferentes del ganglio de la línea lateral posterior: <i>leaders</i> y <i>followers</i>	24
4.2 Evaluación de conexiones sinápticas durante el desarrollo de larvas de pez cebra.....	27
4.2.1 Campo sensorial de neuronas <i>leader</i> y <i>follower</i>	32
4.3 Re-adquisición de los blancos sinápticos inervados tras un daño al nervio de la línea lateral posterior.....	38
4.3.1 Campo sensorial de neuronas <i>leader</i> y <i>follower</i>	40
4.3.2 Análisis de sobrevivencia neuronal.....	48
5. DISCUSIÓN.....	52
5.1 Variación en el patrón de inervaciones de neuronas <i>leader</i> y <i>follower</i> durante el desarrollo de la larva de pez cebra.....	54
5.2 Variación en el patrón de inervaciones de neuronas <i>leader</i> y <i>follower</i> tras un daño regenerativo en larvas de pez cebra.....	55
5.3 Muerte celular en el ganglio de línea lateral posterior.....	58
6. CONCLUSIONES.....	60
7. BIBLIOGRAFÍA.....	61

ÍNDICE DE TABLAS O CUADROS

Tabla I. Recuento de experimentos de inyección para marcaje de neurona única

Tabla II. Análisis de inervaciones de neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo. Campo sensorial promedio a los 3 (CS 3), 5 (CS 5) y 7 dpf (CS 7); e Índice de cambio (IC).

Tabla III. Resumen de las modificaciones en las conexiones de neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo; y si aumenta, disminuye o estabiliza sus conexiones.

Tabla IV. Análisis de inervaciones de neuronas *leader* y *follower* tras la regeneración. Campo sensorial promedio a 0 (CS 0), 2 (CS 2) y 4 dpn (CS 4); e Índice de cambio (IC).

Tabla V. Resumen de las modificaciones en las conexiones de neuronas *leader* y *follower* tras un proceso regenerativo; y si aumenta, disminuye o mantiene las mismas conexiones que presentó previo al daño.

Tabla VI. Porcentaje de mortalidad de neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo (control) y tras la regeneración (neurectomizado).

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Desarrollo de la línea lateral y composición.

FIGURA 2. Somatotopía del ganglio de línea lateral posterior en embriones de pez cebra.

FIGURA 3. Resumen de la somatotopía de la línea lateral posterior del pez cebra.

FIGURA 4. Representación esquemática del patrón de invasión de neuromastos de la LLP: control y regeneración de nervio.

FIGURA 5. Neuronas *leader* y *follower* migrando con el primordio de LLP.

FIGURA 6. Dos células marcadas en el ganglio de la LLP.

FIGURA 7. Patrón de invasión de una neurona desde los 3 a 9 dpf en una larva de pez cebra.

FIGURA 8. Las invaciones a los neuromastos de LLP son refinadas durante el desarrollo de larvas de pez cebra.

FIGURA 9. Modificación de invaciones durante el desarrollo de la larva del pez cebra.

FIGURA 10. Representación de las invaciones de neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo de la larva de pez cebra.

FIGURA 11. El campo sensorial promedio no varía y el número de conexiones de neuronas *leader* y *follower* tiende a la sección media del pez durante el desarrollo y la regeneración.

FIGURA 12. Las neuronas re-inervan sus blancos luego de la regeneración del nervio de LLP.

FIGURA 13. Representación de las invaciones de las neuronas *leader* y *follower* tras un proceso regenerativo en larvas de pez cebra.

FIGURA 14. El campo sensorial promedio de neuronas *leader* y *follower* no se modifica durante el desarrollo y la regeneración.

FIGURA 15. Neuronas *follower* presentan mayor variación en el índice de cambio de invaciones durante la regeneración en larvas de pez cebra.

FIGURA 16. Existe muerte neuronal en el ganglio de línea lateral posterior de larvas de pez cebra.

FIGURA 17. Las neuronas *leader* presentan menor sobrevida tras la regeneración.

LISTA DE ABREVIATURAS

dpf: Días post-fertilización

dpn: Días post-neurectomía

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*

GFP: Proteína fluorescente verde (del inglés *Green Fluorescent Protein*)

gLLP: Ganglio de Línea Lateral Posterior

HC: Células ciliadas (del inglés *Hair Cells*)

han: Horas antes de la neurectomía

hpn: Horas post-neurectomía

IC: Índice de cambio de inervaciones

LLP: Línea Lateral Posterior

LMP: Bajo punto de fusión (del inglés *Low Melting Point*)

NMO: Núcleo Medial-Octavolateral

nLLP: Nervio de Línea Lateral Posterior

RFP: Proteína fluorescente roja (del inglés *Red Fluorescent Protein*)

Prim I: Primer Primordio de Línea lateral posterior o primario

Prim II: Segundo Primordio de Línea lateral posterior o secundario

L1 a L8: Enumeración de los neuromastos de la Línea lateral posterior

L: Neuronas líderes (del inglés *Leader neuron*)

F: Neuronas seguidoras (del inglés *Follower neuron*)

LT: Neuromastos terminales según nomenclatura L6+L7+L8

SNP: Sistema nervioso periférico

ABSTRACT

The zebrafish posterior lateral line (pLL) is a mechanosensory system that detects water movements. It comprises peripheral organs (neuromasts), intermediate afferent transmission elements, and central processing units. Each neuromast has hair cells that transform mechanical signals from the surrounding water into electrical pulses transmitted centrally by afferent neurons, whose somas are located in the pLL ganglion. Two different subtypes of neurons have been described within the ganglion: *leaders* and *followers*, and these are somatotopic in that they generate a sensory map in the hindbrain. We ignore whether the topology of neural connections established during larval development is maintained if they are interrupted; and we address this question in a damage-regeneration protocol established in larval zebrafish. Previously, we saw that after injury to the pLL nerve both, *leader* and *follower*, pLL neurons have the capability to extend new axons and reinnervate target organs, although the specificity of the rewiring process has not been fully addressed. To identify these types of neurons, we labeled single pLL neurons by transient transgene expression using DNA constructs, and at 3 dpf, we recorded their neuromast innervation pattern, and injured the pLL nerve. After regeneration of the nerve, 5-7 dpf, respectively (2 to 4 days post-injury (dpi)), we recorded which neuromasts were innervated and compared it with the original situation. We did the same for control larvae (without neurectomy) in order to analyze modifications on innervation during development.

We have seen that during development the connections established by *leaders* and *followers* are mostly stable. After neurectomy, these neurons do not precisely innervate the same target organs as they did prior damage, especially for *follower* neurons. However a degree of somatotopy is maintained. In other hand, we observed that *leader*

neurons survive the most during development, but after neurectomy, are the most affected by cell death. Our results show that *follower* neurons were the most promiscuous in terms of contacting neuromasts after damage. And even though both types of neurons are prone to reinnervation errors, the sensory map can be partially reconstructed after neurectomy, but the number of innervations varies.

In this work we introduce a new, simple and accessible model to explore the mechanisms involved in reestablishment of a functional sensory system in vertebrates after peripheral nerve damage. We hope this project brings new and detailed information in the field of neural regeneration.

RESUMEN

La línea lateral posterior (LLP) del pez cebra es un sistema mecanosensorial que percibe los movimientos del agua. Este sistema presenta unos órganos llamados neuromastos que poseen células sensoriales especializadas, denominadas células ciliadas (*hair cells*). Estas células convierten los estímulos mecánicos, producidos por el movimiento del agua en torno a la superficie corporal del pez, en un impulso eléctrico que se transmite desde la periferia hacia el núcleo medio octavolateral en el cerebro posterior. Este impulso nervioso es conducido por neuronas aferentes, cuyos somas se encuentran en el ganglio de LLP. Dentro del ganglio podemos encontrar dos subtipos neuronales con diferentes características: *leaders* y *followers*. Estas neuronas organizan sus proyecciones en el sistema nervioso central y periférico construyendo un mapa somatotópico en el ganglio de LLP. Se desconoce si esta somatotopía se mantiene durante el desarrollo de la larva, y si frente a un daño las neuronas son capaces de reconectar con los mismos blancos que inervaban justo antes de interrumpir sus axones. Para responder a estas preguntas, a los 3 dpf dañamos el nervio de LLP en larvas de pez cebra, utilizando un protocolo de neurectomía desarrollado en nuestro laboratorio. Hemos observado que ambos tipos celulares son capaces de regenerar y de re-inervar los órganos blancos. Con el objetivo de investigar si las conexiones establecidas durante el desarrollo se mantienen tras un daño, se inyectó un constructo de DNA que permite marcar azarosamente células únicas en el ganglio de la LLP. A las 24 hpf se clasificó a las neuronas en *leaders* o *followers* en base a diferencias anatómicas. Posteriormente observamos los neuromastos contactados antes y después del daño, entre los 3 y 7 dpf (0 a 4 dpn), y se evaluó el proceso de refinamiento de las conexiones durante el desarrollo. Se observó que las

conexiones de las neuronas *leaders* y *followers* son ligeramente refinadas entre los 3 y 7 dpf. Sin embargo, tras la neurectomía, el 90,9% de las neuronas *leader* y el 100% de las *follower* modifican sus inervaciones. A pesar de ello, logran recapitular, de forma aproximada, el mapa somatotópico previamente establecido. Por otro lado, hemos observado que las neuronas *leaders* tienden a sobrevivir más tiempo en comparación con las neuronas *followers*. Sin embargo, son las más afectadas por la neurectomía.

En resumen, en este trabajo proponemos un nuevo modelo, simple y accesible, que permite explorar los mecanismos involucrados en el restablecimiento de un mapa somatotópico tras un daño al nervio periférico. Esperamos que este proyecto pueda generar información nueva y detallada en el campo de la regeneración neuronal.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso es un complejo sistema de redes neurales y accesorios, como las glías, que funcionan en perfecta combinatoria y constituyen el sustrato de la memoria, permiten la percepción del medio y su interpretación en los centros superiores del cerebro. Este sistema tiene neuronas de diversas características, desde expresión génica diferencial a diferente tamaño y morfología. Para que este funcione como un todo es necesario que esta diversidad de componentes se estructure de manera coordinada. Se requiere que las conexiones que se establecen durante el desarrollo se formen correctamente; dado que su incorrecto funcionamiento lleva a la generación de enfermedades neurodegenerativas que afectan progresivamente al individuo. A medida que los organismos se desarrollan, sufren procesos de refinamiento de las conexiones establecidas. Estos procesos de eliminación de conexiones o poda de proyecciones nerviosas, son eventos normales que dependen de la expresión de caspasas a lo largo del axón, o de la funcionalidad defectuosa de los canales de calcio (Riccomagno & Kolodkin, 2015). Las conexiones neurales también pueden modificarse debido al aprendizaje, donde las neuritas se re-organizan y seleccionan aquellas que permanecerán funcionales en el tiempo. Esto ha sido ampliamente estudiado en el desarrollo del mapa visual (Feldheim y col., 2010).

Durante el desarrollo de vertebrados y otros cordados, el sistema nervioso se forma a partir de una capa embrionaria llamada ectodermo, el cual generará la piel y el componente nervioso al especificarse en neuroectodermo. A medida que se forma el tubo neural a lo largo del organismo, ocurre la neurogénesis, donde las neuronas comienzan a formarse a partir de progenitores y diferenciarse debido a diferentes gradientes de morfógenos que establecen el patrón de la placa neural (Schmidt y col.,

2013). Las neuronas en diferenciación deben llegar al lugar en donde finalmente cumplirán su función, migrando y estableciendo contactos temporales a medida que el cono axonal en crecimiento avanza, atraído y repelido por moléculas quimioatractantes. Una vez que se construye el sistema nervioso, comienza la selección de conexiones, donde se presume intervendría en la correcta disposición de las neuronas y cómo estas se ven influenciadas con el ambiente externo en el que están estableciendo contactos sinápticos.

Uno de los modelos vertebrados más utilizados para abordar estos estudios ha sido el sistema visual del ratón. Sin embargo, la complejidad e inaccesibilidad del sistema neural imposibilita la realización de observaciones *in vivo*; por tanto, se ha presentado la oportunidad de utilizar un modelo accesible, con un número discreto de órganos sensoriales, como la línea lateral del pez cebra. Durante los últimos años, el pez cebra se ha convertido en un modelo ampliamente utilizado para el estudio de procesos *in vivo*. Este modelo permite, por la amplia gama de líneas transgénicas disponibles, y la transparencia del animal en sus estadios larvales, la observación *in vivo* y en tiempo extendido de diversos procesos como el comportamiento neuronal. En particular, los peces poseen en su superficie, un sistema mecanosensor perteneciente al SNP, denominado sistema de línea lateral. Este sistema se compone de órganos sensoriales denominados neuromastos, los cuales presentan una posición estereotipada a lo largo del pez y hacen relativamente sencillo el estudio de la inervación y los procesos de refinamiento del sistema neuronal. Mediante un simple procedimiento, es factible marcar azarosamente aferencias únicas del ganglio de la LLP (gLLP) y analizar su comportamiento de manera individual a través del tiempo. Por último, la superficialidad y su fácil acceso hacen, de este sistema sensorial, un modelo ideal para el desarrollo de este trabajo.

Desarrollo de la Línea Lateral Posterior del pez cebra

La línea lateral posterior es un sistema mecanosensorial que se forma a partir de la placoda de LLP derivada de la placoda cefálica que aparece caudal al oído (Kimmel y col., 1995). Alrededor de las 18 horas post-fertilización, esta placoda se divide en dos grupos celulares: un grupo estático de aproximadamente 20 células que forman el ganglio de LLP, y un grupo de alrededor de 100 células migratorias que forma el primordio de LLP (priml). Este priml se desplaza por el miosepto horizontal, hacia la cola del pez, guiado por la internalización del ligando cxcl12 y su receptor cxcr4b. El frente migratorio anterior del primordio (*leading domain*) posee células más planas con una morfología mesenquimal; mientras que el frente posterior del primordio (*trailing end*), presenta células más anchas, con polaridad basal y apical prominente con morfología de epitelio columnar. Estas últimas formarán cúmulos celulares en forma de rosetas o proto-neuromastos que se van depositando regularmente a lo largo del tronco del pez, y formarán los neuromastos de LLP (Chitnis y col, 2012). La LLP primaria consta de aproximadamente 8 neuromastos interconectados por células interneuromásticas. Una vez depositados, las células que lo componen se diferencian en: células del manto, células de soporte, células ciliadas sensoriales, y un grupo que mantiene sus características de progenitor (Figura 1 B). Las células que permanecieron inmóviles en el origen formarán el ganglio de LLP. Estas neuronas extienden sus axones periféricos junto con el priml, innervando los neuromastos a medida que estos son depositados (Gompel y col. 2001; Gilmour y col, 2004; Ghysen & Dambly-Chaudière, 2007).

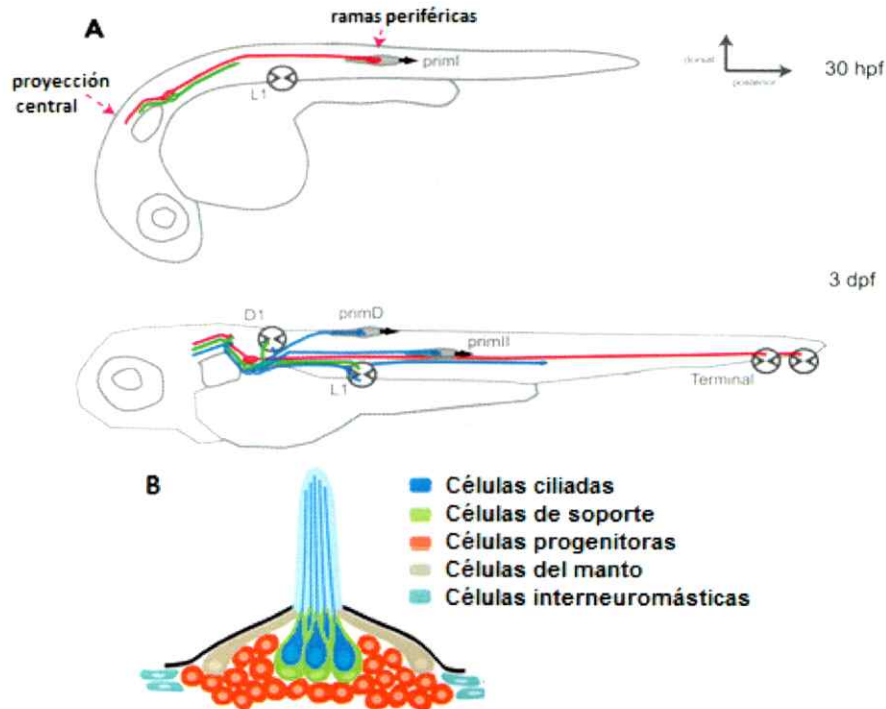


FIGURA 1. Desarrollo de la línea lateral y composición. A: Formación de la línea lateral posterior durante el primer día de desarrollo de la larva de pez cebra. La migración del primI comienza cerca de las 18 hpf a partir de la placoda de LLP caudal al oído, y a las 30 hpf se observa el primer neuromasto depositado y el primordio migratorio. El nervio de LLP sigue la migración del primI, extendiendo una proyección central (flecha punteada) y periférica (cabeza de flecha). Se observan una neurona en rojo siguiendo al primI y una en verde muy retrasada. A los 3 dpf la larva presenta los componentes de LLP, y la migración del primD y primII (Adaptación Pujol-Martí & López-Schier, 2013). **B:** Composición de un neuromasto. Células ciliadas al centro (azul), células de soporte (verde), células del manto (gris), células progenitoras (rojo) y células interneuromásticas que contactan los neuromastos entre sí (celeste). Undurraga y Allende, datos no publicados.

A los 2 días de desarrollo (alrededor de las 52 hpf) comienza la migración de un segundo primordio (primII), el cual deposita neuromastos secundarios entre los neuromastos primarios L1-L2 y L2-L3, desarrollando células ciliadas con polaridad

dorso-ventral; alcanzando 12 neuromastos hacia los 5 dpf. Estos neuromastos secundarios son inervados por nuevas neuronas que migran junto al primII (Figura 1 A).

Las células ciliadas de los neuromastos reciben información del medio, y transforman los estímulos mecánicos en potenciales eléctricos. Esta información es transmitida desde la periferia hacia uno de los centros de procesamiento en el Núcleo Medio Octavolateral (MON), en el cerebro posterior; por axones aferentes. Los somas de estas neuronas bipolares se encuentran en el ganglio de LLP y el conjunto de sus proyecciones axonales, constituyen el nervio de LLP.

Cada neuromasto maduro posee unas 20 a 30 células ciliadas (HC) que detectan el movimiento del agua de la misma manera que las células ciliadas en el oído interno de los mamíferos: cada HC posee un esterocilio y un quinocilio, que al deflectarse, despolariza o hiperpolariza la célula. La LLP del pez cebra presenta HC de distinta polaridad: las que derivan del primI están orientadas de manera antero-posterior (AP); mientras que los neuromastos derivados del primII poseen HC orientadas en posición dorso-ventral (DV). Esta orientación permite discriminar el movimiento del agua en, al menos, dos direcciones (AP y DV).

Se ha visto que aunque una neurona inerve múltiples neuromastos, siempre conecta con células ciliadas de la misma polaridad. (Hudspeth y col., 2008; Faucherre y col., 2009). Esta conexión con células de una misma polaridad, también se cumple para neuronas que reconectan los neuromastos una vez han regenerado.

Organización somatotópica de las neuronas aferentes de la Línea Lateral Posterior del pez cebra

Para la correcta interpretación del movimiento del agua y su direccionalidad, es fundamental que la información captada por las células ciliadas, sea transmitida al sistema nervioso central de manera organizada. Esta organización se establece durante el desarrollo; y al igual que los neuromastos, que derivan del primI y el primII; las neuronas aferentes de la LLP se desarrollan progresivamente en dos olas de neurogénesis (Pujol-Martí & López Schier, 2013). La primera ola de neurogénesis se asocia a la formación del gLLP y la migración del primI alrededor de las 18 hpf; mientras que la segunda ola de neurogénesis se asocia con la migración del primII alrededor de las 36 hpf. Este desarrollo temporal y progresivo permite que los neuromastos de la línea lateral primaria sean inervados por neuronas generadas durante la primera ola de neurogénesis, mientras que los neuromastos de la línea lateral secundaria son inervados por la segunda ola de neurogénesis. En términos generales, durante la primera oleada se generan dos subtipos de neuronas en el gLLP: *leaders* y *followers*. Las *leader* son consideradas "neuronas viejas", cuya área promedio es $90,4 \pm 13,7 \mu\text{m}^2$, mientras que las neuronas *follower* son consideradas más "jóvenes", porque nacen poco después que las *leader* (Liao & Haenel, 2012). En esta última categoría se incluyen todas las neuronas nacidas durante la segunda oleada. Los somas de ambos tipos de neuronas permanecen entremezclados en el ganglio.

En un principio se sugirió que la morfología del cono de crecimiento de una neurona indicaría qué neuromastos inervaría, y que este estaría correlacionado con su posición a nivel central. Es decir, que las neuronas de LLP forman, a nivel central, un mapa somatotópico de las inervaciones de los neuromastos en la periferia. En el trabajo publicado por Sato y col., en 2010, decidieron evaluar el momento en que esto ocurría. Por lo que tomaron como punto inicial las 54 horas de desarrollo de la larva de pez cebra y realizaron marcaje retrógrado de neuronas de la LLP, inyectando rodamina-

dextrano en las regiones interneurómicas detalladas en la Figura 2A con una línea roja entre L4-L5 (A, E), L3-L4 (B, F), L2-L3 (C, G) y L1-L2 (D, H), creando una pequeña lesión con una aguja. De este modo, pudieron marcar un conjunto de axones entre los neuromastos y observaron que la aplicación del trazador a nivel posterior resultó en el marcaje de somas en la región dorsal del gLLP, mientras que la aplicación del trazador en un nivel más anterior, resultó en una expansión ventral de las células marcadas. El patrón presentado a los 6 dpf también se observó tempranamente a las 54 hpf. Y pudieron determinar que no solo existe una organización somatotópica a nivel central, sino que las somas de las neuronas poseen una posición estereotipada dentro del ganglio de LLP.

El análisis de marcaje retrógrado evidenció células que no tenían una posición determinada en el ganglio, a las que Sato denominó células excepcionales. Estas células disminuían en cantidad a medida que la larva avanza en el desarrollo y se presentan en la Figura 2A (C, F y G), ver flechas. Esto sugirió que podría existir un proceso de refinamiento en la organización del ganglio entre los cinco días luego de la formación de la LLP, al menos en las neuronas que inervaban neuromastos anteriores. El estudio de Gompel analizó el comportamiento del cono de crecimiento axonal y su morfología a medida que el primordio de LLP migra a través del miosepto horizontal (Gompel y col., 2001). Y observó que las neuronas *leader* poseen conos más ramificados que las *follower*, y que esta morfología se correlaciona con la inervación a determinados neuromastos, tal y como sugirieron otros autores posteriormente. Realizando marcajes de neurona única con DsRed, Sato (Sato y col., 2010) probó que aquellas neuronas consideradas como *leaders* (Tipo A) inervaban neuromastos terminales y tendían a organizarse aleatoriamente. Mientras que las *followers* (Tipo B), poseían una posición estereotipada y tendían a inervar neuromastos anteriores del

pez. Por lo tanto, ellos plantearon que sólo el subtipo *follower* formaba un mapa en el gLLP en función del neuromasto inervado (Figura 2B).

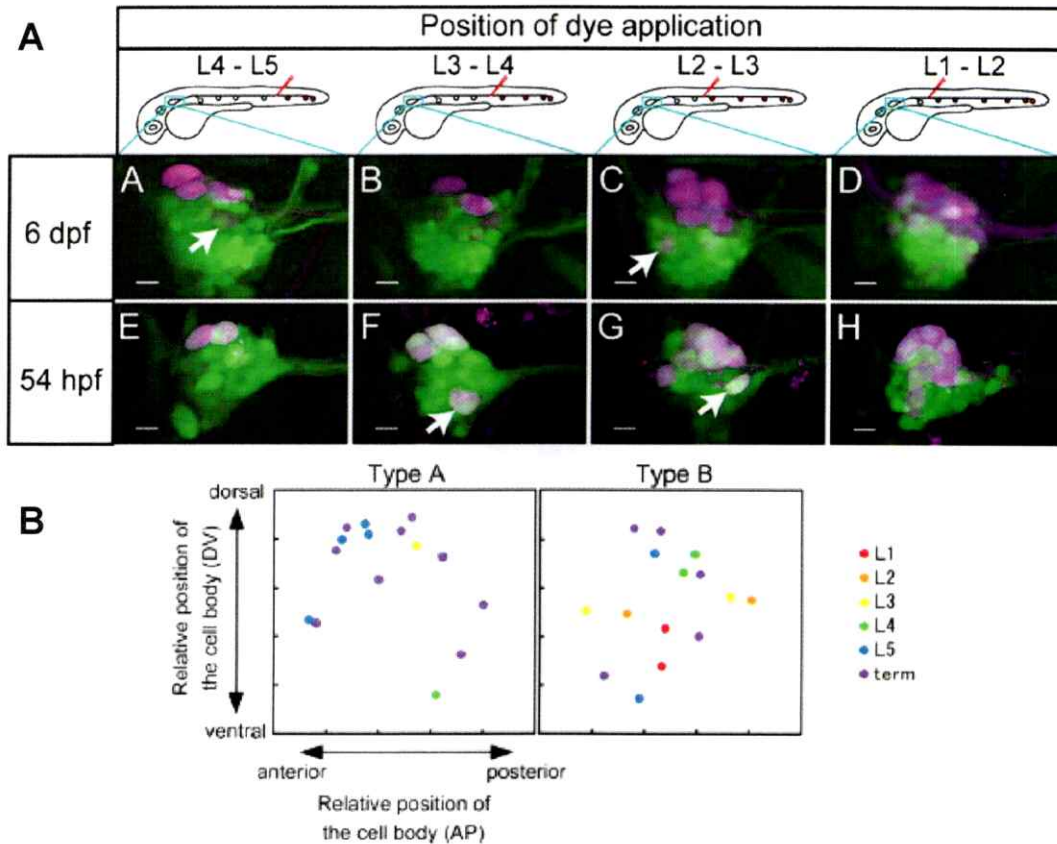


FIGURA 2. Somatotopía del ganglio de línea lateral posterior en embriones de pez cebra.

A: A-H: Imágenes de microscopía confocal del ganglio de LLP a los 6 dpf (A-D) y 54 hpf (E-H). Los embriones Tol047 han sido marcados retrógradamente en las regiones inter-neuromastos, entre el cuarto (L4) y el quinto (L5) neuromasto (A, E); el tercero (L3) y cuarto (L4) neuromasto (B, F); segundo (L2) y tercer (L3) neuromasto (C, G); y primero (L1) y segundo (L2) neuromasto (D, H). En algunos casos se observaron “células excepcionales” (flechas blancas). **B:** Se muestra la distribución de los cuerpos celulares (en el eje dorso-ventral) y la posición de los neuromastos inervados por estas neuronas (en el eje antero-posterior). Las neurona Tipo A y B fueron analizadas por separado. L1, L2, L3, L4 y L5 representan el neuromasto más anterior, segundo, tercero, cuarto y quinto, respectivamente. Los neuromastos al final de la cola son considerados terminales (“term”), en colores. (Adaptado de Sato y col., 2010).

A modo de resumen, podemos decir que existen, al menos, dos subtipos neuronales descritos en el ganglio de LLP: *leaders* y *followers*. Estos subtipos se diferencian en función de cómo avanzan sus conos de crecimiento de acuerdo con la posición del primI. Las neuronas pioneras o *leaders* migran junto con el primI, a una velocidad de $80 \pm 7.6 \mu\text{m/h}$, tienden a proyectar sus axones periféricos hacia neuromastos más posteriores de la LLP, poseen un soma en posición dorsal, aunque no estereotipada en el ganglio de LLP; y una rama central que proyecta dorsalmente al cerebro posterior. Las neuronas más tardías o *followers*, por otro lado, proyectan axones por detrás del primI a una velocidad de $32 \pm 11 \mu\text{m/h}$; e inervan, en general, neuromastos más anteriores, y proyectan ventralmente en el centro de procesamiento del cerebro posterior.

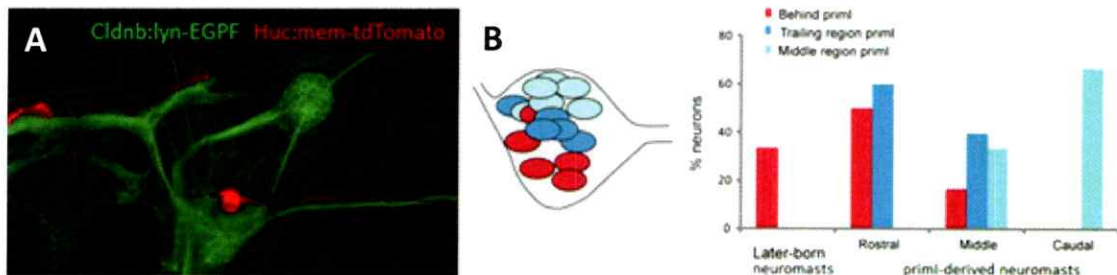


FIGURA 3. Resumen de la somatotopía de la línea lateral posterior del pez cebra. A: Ganglio de la LLP (3 dpf) con una célula única marcada en rojo como resultado de inyección del constructo *HuC:mem-Tdtomato* en embriones de una célula. Se observan las proyecciones central (izquierda) y periférica (derecha). **B:** Los somas que se encuentran dorsalmente en el gLLP proyectan axones que siguen al primI y tienden a inervar neuromastos más posteriores del pez (caudal); mientras que los somas ubicados en las regiones medias del gLLP, tienden a proyectar axones que inervan neuromastos en las regiones anterior y media del pez. Ventralmente en el gLLP se encuentran somas cuyos axones al primer día de desarrollo siguen al primordio I muy por detrás e inervan neuromastos nacidos tardíamente (secundarios) o

neuromastos primarios en la región anterior y media del pez (Adaptado de Pujol-Martí y col., 2010).

Se ha demostrado que ambos subtipos cumplen distintas funciones. Las neuronas *leader* contactan más de un neuromasto y proyectan sus axones centrales hacia la dendrita lateral de la célula de Mauthner, célula responsable de la respuesta de escape del pez. Mientras que las neuronas *followers* son un más pequeñas y proyectan sus axones ventro-lateralmente hacia otros núcleos centrales formando un mapa sensorial denominado "mapa somatotópico". Este subtipo no contactan la dendrita de Mauthner (Pujol-Martí y col., 2012); por lo que estarían relacionadas con la direccionalidad y el sistema de navegación orientativo, más que con la respuesta de escape (Liao & Haenel, 2012). Por tanto, los peces utilizan un mismo sistema sensorial para elaborar diferentes respuestas. Estímulos débiles son detectados por neuronas más pequeñas, que presentan una mayor resistencia. Y estímulos más fuertes como el generado por la presencia de un depredador, son detectados por neuronas más grandes, de menor resistencia debido a axones de mayor diámetro, que contactan más de un neuromasto y proyectan sus axones centrales dorsalmente en la célula de Mauthner, generando una respuesta de escape inmediata (Liao & Haenel, 2012).

Regeneración del nervio de la línea lateral posterior del pez cebra

Se sabe que luego de un daño al nervio de LLP, las neuritas pierden sus proyecciones periféricas por un mecanismo denominado degeneración Walleriana. Una vez que la proyección desconectada del soma degenera, estas células tienen la capacidad de regenerar, proceso que demora alrededor de 24 horas (Villegas y col., 2012). En

conjunto con la migración exploratoria de los axones para reestablecer las conexiones perdidas, ocurre la reconexión de células de Schwann. Estas células normalmente rodean el nervio de LLP, formando la capa de mielina, y responden al daño de manera que las células localizadas en la región distal al daño se desdiferencian, proliferan, e incrementan su motilidad; ayudando a los axones a atravesar la zona del daño mediante la formación de “puentes gliales” (Ceci y col., 2014). Una vez el nervio ha regenerado, las células de Schwann se diferencian y vuelven a expresar la proteína básica de la mielina (MBP) como parte del proceso de re-mielinización.

Simple técnicas de marcaje de célula única, han permitido evaluar cómo las neuronas del nervio de LLP regeneran y reconectan con sus blancos sinápticos (Ceci y col., 2014). Con ellas, se ha visto que tras una neurectomía, las neuritas no siempre reconectan con el mismo blanco, aun cuando 48 horas después del daño tienden a generar un patrón de inervación aproximado al original (Figura 3A, B y C). También se observó que tras la regeneración algunas neuronas inervaron neuromastos secundarios, y se desconoce si estas conexiones son estables en el tiempo. Por otro lado, no se ha visto en detalle el comportamiento de los subtipos neuronales: las células *leaders* y *followers*.

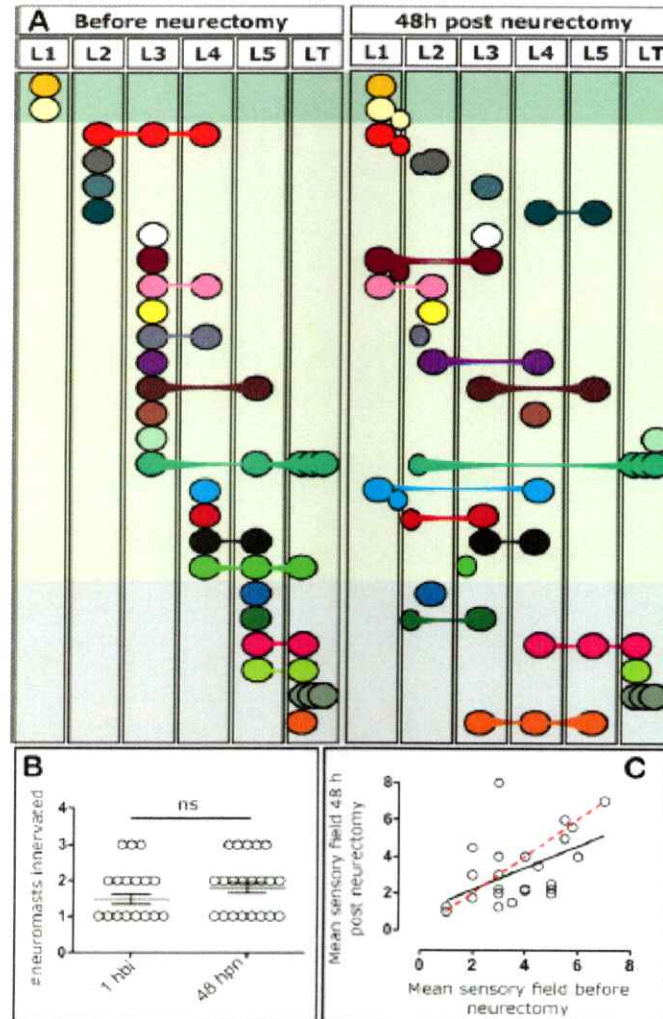


FIGURA 4. Representación esquemática del patrón de innervación de neuromastos de la LLP durante la regeneración. A: El patrón de innervación de neuronas únicas a neuromastos (L1-L5) o neuromastos terminales (LT), se registró antes (1 hbn) y después de la neurectomía (48 hpn). Cada neurona pertenece a una larva distinta y es representada por un color específico en el diagrama. Los círculos más grandes representan neuromastos primarios, mientras que los óvalos pequeños representan secundarios. **B:** El promedio de neuromastos innervados no es significativamente distinto entre las dos muestras. ($P < 0.05$). **C:** El patrón de neuromastos innervados antes y después de la regeneración se comparó utilizando el “Campo sensorial promedio”, de neuronas individuales en ambas condiciones ($P = 0.009$; $P = 0.0618$) (Ceci et al., 2014).

En base a los antecedentes presentados, se propone utilizar la línea lateral posterior del pez cebra como modelo para el estudio de la re-adquisición de blancos sinápticos tras un daño al sistema nervioso periférico. Para comprender el comportamiento neuronal en un contexto regenerativo, se requiere observar en tiempo real cómo las neuritas extienden sus procesos para re-contactar sus blancos. Por ello el pez cebra constituye una herramienta muy valiosa en el campo de la regeneración de sistemas.

En particular, el sistema de línea lateral posterior es un sistema sensorial fundamental para la vida del pez. Anteriormente se ha demostrado la capacidad regenerativa de las neuronas aferentes (Villegas y col., 2012; Ceci y col., 2014); sin embargo, no se ha discriminado el comportamiento de las neuronas *leader* vs *followers*. La existencia de células *leaders* a los 6 dpf sugiere que estas células permanecen viables en el ganglio, al menos, durante las etapas juveniles del pez. Se postula que estas células, al igual que las células *leader* del sistema visual del ratón, son las responsables de guiar a las células más jóvenes en el establecimiento definitivo de las conexiones.

En nuestro laboratorio, hemos observado que luego de un daño al nervio de la LLP, el mapa somatotópico es reconstruido de manera similar al punto original (3 dpf). Por lo tanto, proponemos que tanto las neuronas *leader* como *followers*, tienen la capacidad de regenerar; y debido a que las segundas necesitan de las primeras y más antiguas para extender sus axones de manera apropiada, proponemos que las neuronas *leader* guían el proceso de regeneración, estableciendo conexiones inestables y cometiendo más errores durante el proceso. Sobre estas células recae la presión biológica de preservar la integridad de un sistema sensorial fundamental para la vida del pez. En efecto, hace algún tiempo se sugirió que el sistema nervioso central podría ser el responsable de guiar a las neuronas a establecer el contacto con el neuromasto

adecuado a la posición que ocupa la inervación de la rama central de esta neurona (Alexandre & Ghysen, 1999). Si bien esta hipótesis no ha sido demostrada aún, proponemos que las células *leaders*, sujetas a esta presión, extenderían nuevos axones en un territorio completamente denervado, aunque poblado de órganos blanco que pueden ser contactados. En este sentido, creemos que estas células pioneras son más promiscuas en términos de la re-adquisición de inervaciones, pudiendo re-inervar cualquiera de los neuromastos presentes durante la regeneración. Por lo tanto, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPÓTESIS DE TRABAJO

“Luego de un daño, la re-inervación de los neuromastos de la línea lateral posterior del pez cebra, ocurre de manera diferencial entre las neuronas *leader* y *follower*, siendo las primeras las más promiscuas en la readquisición de blancos durante la regeneración”.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Determinar el grado de promiscuidad de las neuronas *leader* y *follower* luego de un daño al nervio de línea lateral posterior del pez cebra, analizando el patrón de inervación de neuromastos luego de la regeneración.

2.2 Objetivos específicos:

- 2.2.1 Identificar neuronas *leaders* y *followers* utilizando métodos de marcaje de neurona única.
- 2.2.2 Evaluar el refinamiento de conexiones de neuronas *leaders* y *followers* durante el desarrollo normal de la larva (de 3 a 7 días).
- 2.2.3 Comparar el patrón de inervación de neuronas *leaders* y *followers* tras un proceso regenerativo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Mantenimiento de los peces y obtención de huevos fecundados: Las larvas de pez cebra (*Danio rerio*) se obtuvieron desde cruces de peces adultos mantenidos en el vivero del edificio Milenio, bajo ciclos de 14 h luz y 10 h oscuridad en acuarios con flujo continuo de agua. El agua de sistema proviene de agua de osmosis reversa salinizada con Instant Ocean (60 mg/mL) (SS15-10 Tetra Fish, Blacksburg, US). Se mantuvieron las condiciones de temperatura a 28°C, pH entre 6,5 a 7,0 ajustado con sales NaHCO₃, y conductividad entre 400-600 µS (Westerfield, 2000). Las larvas se mantuvieron en placas de Petri en incubadoras a 28°C con medio E3 de cultivo (5 mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,33 mM CaCl₂; 0,3 mM MgSO₄) o E3 + 0,1% de azul de metileno. Los animales se anestesiaron con tricafina MS-222 (A5040, Sigma, Sant Louis MO, USA). Expresamos la edad de las larvas en horas (hpf) o días post-fertilización (dpf).

3.2 Líneas transgénicas: En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas transgénicas: *Tg(-8.0cldnb:lyn-GFP)*: proteína de transmembrana claudinb de uniones estrechas que marca el primordio de LLP y sus derivados a lo largo del tronco y la cabeza del pez (Haas & Gilmour, 2006). Estos se observan de color verde. *Tg(cxcr4b:mCherry^{ump1})*: receptor de quimioquina 4b, se observa el mismo patrón anterior en color rojo (Gamba y col., 2010). *TgBAC(NeuroD:EGFP)^{nl1}*: el gen pan neural neuroD de diferenciación neuronal temprana dirige la expresión de la proteína fluorescente verde en las neuronas del gLLP, cerebro, retina, nervio óptico, entre otros (Obholzer y col., 2008).

3.3 Constructos de DNA para microinyección de embriones y técnica de

microinyección: Se inyectó 5-8 μ l de un constructo de DNA *HuC:mem-TdTomato* (25 ng/ μ l) (obtenido del Dr. Hernán López-Schier), donde el promotor del gen *HuC* de diferenciación temprana de neuronas que permite marcar distintos tipos de neuronas en el pez en rojo. Marca neuronas *leaders* y *followers* en proporciones equivalentes, además de otros tipos neuronales. O 20 ng/ μ l del constructo *pE46:GPF*, enhancer del gen de ratón *delta like 1* (Leonardo Valdivia y Allende, no publicado), en particular marca de manera más específica las neuronas de la línea lateral. O 28,5 ng/ μ l del constructo *HuC:Kaede* (cedido gentilmente por el Dr. Hitoshi Okamoto). Este constructo permite trazar a diferentes tipos neuronales (entre ellas, las neuronas del ganglio de la LLP, con la proteína fotoconvertible con luz UV, Kaede). Esta proteína inicialmente es de color verde. Tras una breve exposición a la luz UV, las células que han incorporado este constructo cambian a color rojo. Por tanto, es posible realizar un seguimiento más preciso de las células en el tiempo. La inyección se realizó en embriones en el estadio de una célula en embriones transgénicos *Tg(cldnb:lyn-EGFP)* o *Tg(cxcr4b:RFP)* o *TgBAC(NeuroD:EGFP)*, los que permiten la visualización de los distintos componentes de la línea lateral del pez cebra. Los embriones inyectados se mantuvieron en medio E3 bajo condiciones controladas de temperatura (28°C) y Luz/oscuridad (14h luz/10 h oscuridad). Entre las 24 hpf y las 31 hpf (Kimmel y col., 1995), los embriones inyectados fueron observados bajo la lupa de fluorescencia con objeto de seleccionar aquellos peces que poseían una sola célula marcada con el transgen en el ganglio de la línea lateral posterior. De aproximadamente 200 embriones inyectados, se obtienen cerca de 20 embriones con neuronas marcadas en la línea lateral, esto incluye algunos con dos somas en el gLLP, por lo que el rendimiento de la inyección transiente es del 10%

(9,52% obtenido en un set de inyección). En este estadio se clasificaron las neuronas *leaders* y *followers*, y se individualizó a cada una de las larvas para su seguimiento en el tiempo, hasta los 7 dpf.

3.4 Electroablación: Se siguió el protocolo de electroablación descrito en (Moya y col., 2014) y desarrollado en el laboratorio del Dr. Miguel Allende. Brevemente: las larvas de 3 dpf se anestesiaron con tricaina y se montaron en agarosa 0,75% en disposición lateral, dejando expuesto el lado en que se encontró la neurona única marcada. Utilizando un micromanipulador unido a un electrodo de tungsteno acoplado a un microscopio de observación directa, se aplicó un único pulso de corriente de 17 μ A durante 1,5 s entre el ganglio de LLP y el primer neuromasto depositado (L1). Este pulso eléctrico permitió generar una interrupción del nervio de la LLP. Al terminar el procedimiento, las larvas se desmontaron y se mantuvieron a 28°C en medio de cultivo E3 (Ver sitio del daño Figura 12).

3.5 Montaje de larvas en agarosa: Para el montaje de las larvas para la electroablación (neurectomía por pulso eléctrico) o para la observación de individuos en microscopía, se utilizó un medio compuesto por agarosa LMP al 0,75% disuelto en medio E3. Una vez solidificado este medio, se recubría con E3+tricaina para evitar la desecación de las larvas. Durante todo el proceso de intervención y observación, las larvas permanecían anestesiadas con tricaina al 0,01%.

3.6 Adquisición de imágenes y seguimiento de proyecciones neuronales: Para la adquisición de imágenes *in vivo* se anestesió a las larvas en 0,01% p/v de tricaina, y se montó en agarosa LMP 0,75% p/v en E3 con 0,01% p/v de tricaina.

Utilizando microscopía de epifluorescencia, al primer día se clasificaron aquellos peces que poseían inervaciones de neuronas únicas, *leader* o *follower*, posicionadas en el ganglio de línea lateral. Se evaluó el/los neuromasto/s inervado/s a los 3, 4, 5 y 7 dpf (días post fertilización) con el objeto de detectar cambios en el/los neuromastos inervados a lo largo del desarrollo. Este mismo procedimiento se aplicó a larvas neurectomizadas para evaluar el patrón de neuromastos inervados tras un daño. Se consideró inervación a toda ocasión en que la proyección del terminal sináptico axonal se encontró arborizado hacia las células ciliadas. Las imágenes fueron tomadas en microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 a 10X y 20X; o microscopio confocal Zeiss LSM 710 meta en 25X con stacks de 5 μm . Fueron procesadas utilizando el programa ImageJ para ajustar el brillo y contraste y la composición en z-stacks.

3.7 Análisis estadístico: El campo sensorial corresponde al promedio de la posición de neuromastos inervados, sobre la cantidad total de inervaciones de cada neurona. Se utilizó el análisis de regresión lineal y ANOVA de 2 vías para datos paramétricos de GraphPad Prism 5 para evaluar la correlación del campo sensorial de neuronas *leader* y *follower* en condiciones control y neurectomía entre los 3, 5 y 7 dpf. El índice de cambio corresponde al valor otorgado a la modificación de las inervaciones, penalizada con un valor de +1 por cada cambio de posición. Se realizó regresión de Poisson para los datos obtenidos del índice de cambio de inervaciones, para que datos no paramétricos se representen de forma gaussiana, luego de transformar logarítmicamente. Se utilizó ANOVA de una o dos vías y diferente t test, como test no pareado con corrección de Welch. Para todos los análisis *Pvalue* < 0.05 es significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Identificar y caracterizar neuronas aferentes del ganglio de la línea lateral posterior: *leaders* y *followers*

Como las neuronas *leader* y *follower* se diferencian de acuerdo a su posición con respecto al primordio migratorio; para identificar estos dos tipos de neuronas en el ganglio de LLP, y analizar el patrón de conexiones adquirido a los 3, 5 y 7 días de desarrollo de la larva (dpf), necesitamos realizar marcaje de neurona única mediante mosaicismo genético y mirar estas neuronas durante el primer día de desarrollo. Para ello se inyectaron los constructos de DNA *HuC:mem-tdTomato* o *pE46-egfp* en embriones en estadio de 1 célula, en un *background* transgénico *Tg(-8.0cldnb:lyn-gfp)* o *Tg(cxcr4b:mcherry)*, respectivamente (ver materiales y métodos). Esta inyección genera embriones mosaico, que presentan distintos tipos neuronales marcados de manera azarosa en diferentes regiones del sistema nervioso central o periférico; como neuronas del cerebro, neuronas de la LLP, interneuronas y neuronas motoras de la médula espinal, neuronas del par V mixto que forman el nervio trigémino, neuronas que inervan la piel, entre otras. A partir de las 24 hpf, momento en que el prim I de la LLP ha comenzado su migración, se seleccionan aquellos peces que presentan una única neurona marcada en la LLP. Los peces seleccionados se clasificaron en *leader* o *follower* según la posición en que se encuentra el cono de crecimiento con respecto al primordio migratorio (primI). En todos los casos analizados, la observación se realizó entre las 24 y 34 hpf. Como se observa en la Figura 5A, las neuronas *leaders* son las primeras en extender sus axones. Estas células proyectan sus terminales periféricas en íntimo contacto con el primI en sus regiones anterior, media o posterior. En general

estas neuronas acompañan al primordio durante toda su migración, llegando a inervar neuromastos terminales. Por otro lado, las neuronas *follower* extienden sus conos de crecimiento axonal siguiendo el trayecto del primordio varios somitos atrás (Figura 5B), alcanzando el primer neuromasto depositado, no contactando directamente el *leading* o *trailing end*. Por lo que se cree que las proyecciones axonales de las neuronas *follower* son guiadas por los axones de las neuronas *leader* a lo largo del miosepto horizontal (Sato y col., 2010; Pujol-Martí y col., 2012).

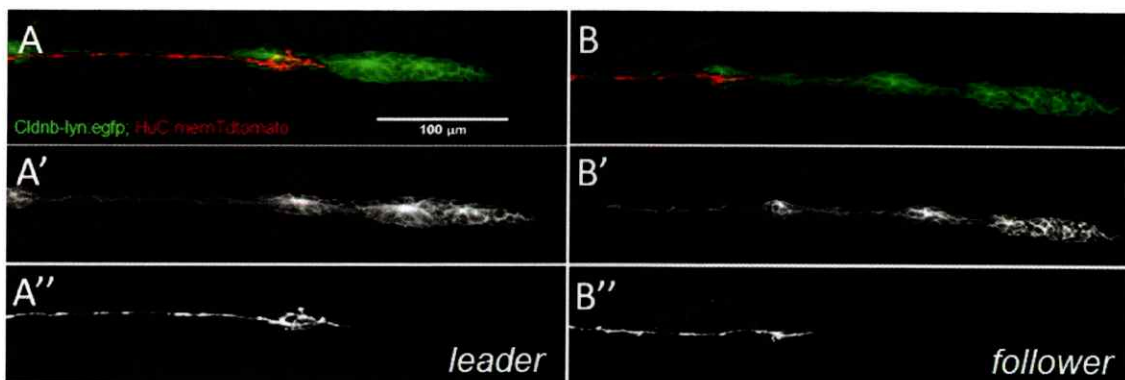


FIGURA 5. Neuronas *leader* y *follower* migrando con el primordio de LLP. Mediante la inyección de *HuC:mem-Tdtomato* en peces *Tg(-8.0cldnb:lyn-EGFP)* en estadio de 1 célula es posible marcar neuronas aisladas. En verde se observa el primordio de LLP que migra a lo largo del miosepto horizontal del pez cebra, seguido por el nervio de LLP (rojo). En todos los paneles dorsal es arriba y rostral a la izquierda. **A.** Axón *leader* siguiendo la región anterior del primordio. **A'-A'':** Los canales rojo y verde se presentan por separado. **B.** Neurona *follower* que extiende su proyección periférica siguiendo al primordio migratorio varios somitos detrás. **B'-B'':** Los canales rojo y verde se presentan por separado. Microscopía confocal, aumento 25X. Barra de escala 100 μm.

Para la identificación de estas neuronas se realizaron múltiples experimentos de inyección en embriones de una célula, algunos de los cuales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla I. Recuento de experimentos de inyección para marcaje de neurona única.

N° experimento	Total de peces inyectados	Total de peces con neurona marcada en gLLP	Total peces con >1 soma	Porcentaje de peces con neurona marcada
1	210	20	6	9,52%
2	250	5	1	2%
3	290	11	2	3,8%
4	300	12	7	4%
5	250	11	5	4,4%
6	270	15	6	5,6%
7	250	5	2	2%

Como se observa en la tabla, durante la identificación de neuronas *leader* y *follower* se encontró alrededor de un 36% (promedio de 7 sets de inyección), en que las larvas presentaban más de una neurona marcada en el ganglio de LLP, como se muestra en la Figura 6. Dada la imposibilidad de diferenciar la pertenencia de los múltiples axones a cada soma por separado, estas larvas se descartaron para los análisis de cada subtipo neuronal. En este trabajo únicamente se consideraron las neuronas que fueran fácilmente reconocibles por sus características anatómicas a lo largo de todo el tiempo que duró el experimento, con el objeto de asegurar que estábamos evaluando siempre el comportamiento de la misma neurona.

Utilizando esta metodología sencilla y de rutina en nuestro laboratorio, hemos podido discriminar células únicas en el ganglio de la línea lateral posterior del pez cebra. Además, mediante observación directa de un espécimen vivo hemos sido capaces de

discriminar entre los diferentes tipos neuronales presentes en este ganglio: las neuronas más viejas (pioneras o *leaders*) y aquellas más jóvenes (o *followers*).

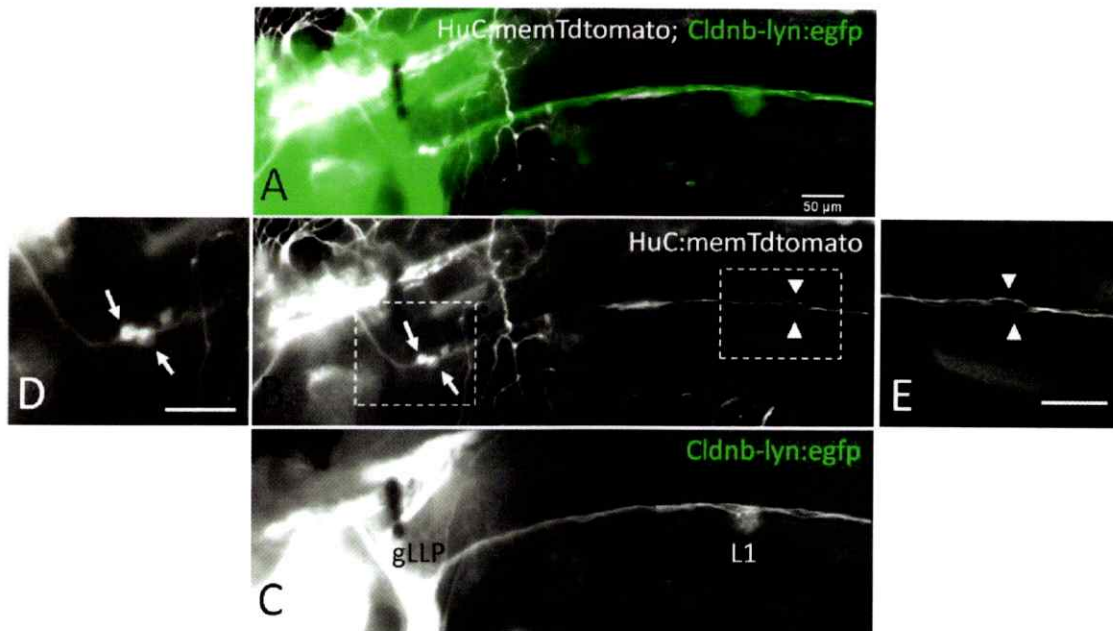


FIGURA 6. Dos células marcadas en el ganglio de la LLP. En un 30% de los peces inyectados encontramos casos con más de una neurona marcada en el ganglio de la línea lateral. **A:** Larva transgénica *Tg(-8.0cldnb-lyn:egfp)* (en verde), inyectada con el constructo *HuC:mem-Tdtomato* (en escala de grises). Los canales se muestran por separado (B, C). **B:** Se observan dos somas neuronales, cercanos entre sí (flechas), que extienden dos axones que recorren estrechamente el miosepto horizontal, pero pueden ser diferenciados como dos axones en el punto indicado por las cabezas de flecha. **C:** Se observa el ganglio de línea lateral posterior (gLLP) y el primer neuromasto L1. **D, E:** Secciones aumentadas de rectángulos en B. Microscopía epifluorescencia, aumento 10X. Barra de escala 50 μ m.

4.2 Evaluación de conexiones sinápticas durante el desarrollo de larvas del pez cebra

El sistema nervioso vertebrado es sometido a procesos de refinamiento neural debido al aprendizaje, proceso en el cual se seleccionan conexiones funcionales específicas

que tienen que ver con la plasticidad sináptica y la memoria a largo plazo en el cerebro. En pez cebra, Sato discutió que la ocasional desaparición de células en el gLLP (Figura 3B) hacia los 7 dpf, demostraba que existía un proceso de refinamiento que eliminaba estas células sin posición estereotipada, del mapa somatotópico del ganglio (Sato y col., 2010). Por ello quisimos observar que sucedía con estas neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo; es decir, si existía un fenómeno de poda o refinamiento de conexiones que estuviese afectando la sobrevivencia de las neuronas y su inervación final.

Para esto, las larvas seleccionadas durante el primer día de desarrollo se individualizaron en pocillos y se mantuvieron aisladas hasta los 3 dpf; estadio en el que la LLP se encuentra completamente formada (Ghysen & Dambly-Chaudière, 2007; Sarrazín y col., 2010). A este tiempo de desarrollo se observó y registró el patrón de inervaciones inicial; es decir, cuántas y cuáles eran las inervaciones que presentaban las neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo de la larva. Lo mismo se repitió día por medio hasta los 7 dpf, momento en el cual el nervio de LLP se encuentra completamente mielinizado (Lyons y col., 2005).

En algunos casos se pudo hacer un seguimiento de las células hasta los 9 u 11 dpf (Figura 7), sin embargo, a medida que las larvas crecen, aumentan de tamaño y se vuelven menos transparentes en estadios superiores a 6-7 dpf, lo que imposibilita la observación del comportamiento de células únicas (Figura 7C, D).

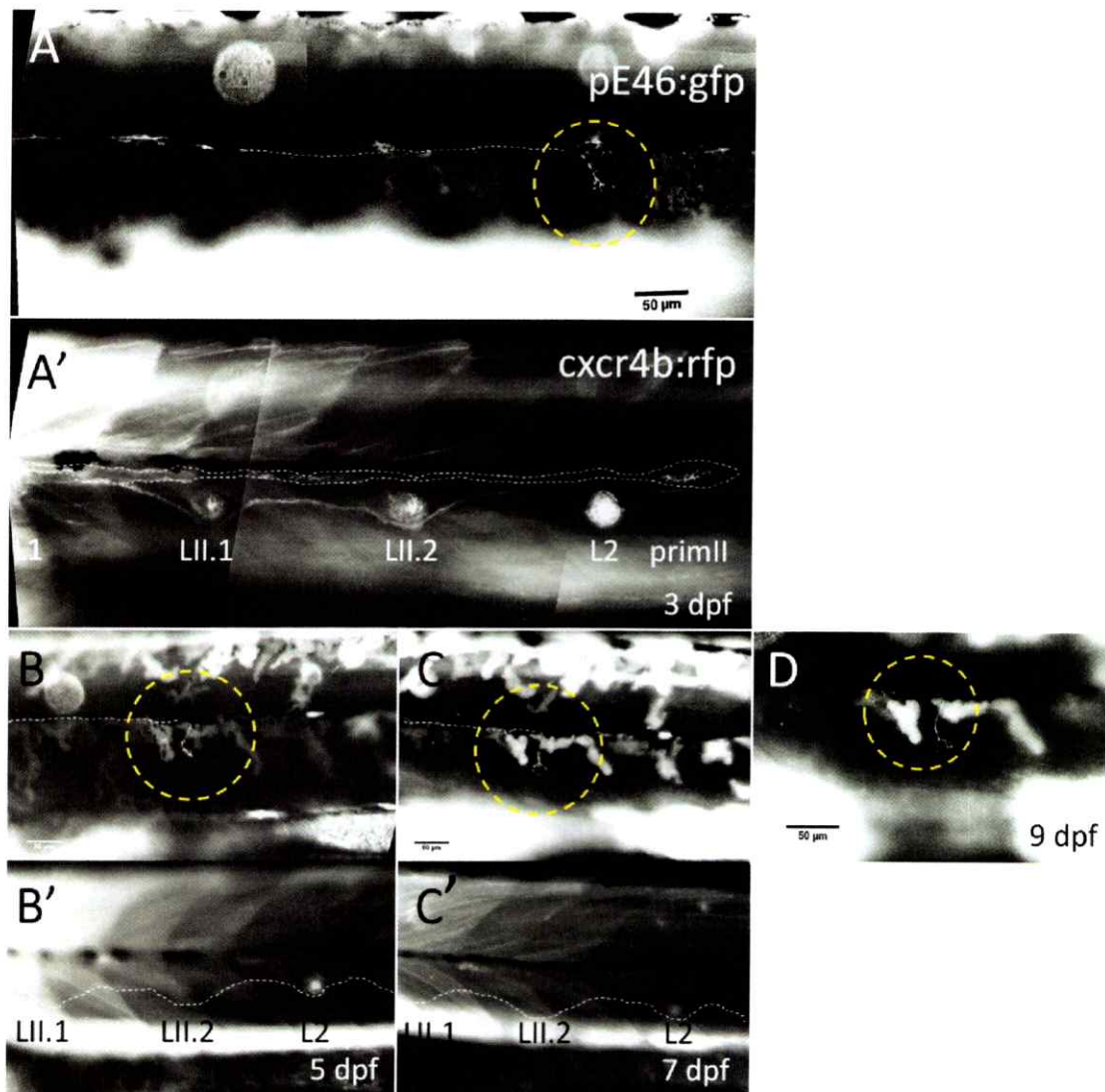


FIGURA 7. Patrón de invasión de una neurona desde los 3 a 9 dpf en una larva de pez cebra. **A:** Se presenta la invasión de una neurona única *follower* al neuromasto L2 (**A'**) en una larva *Tg(cxcr4b:RFP)* inyectada con el plásmido pE46:GFP, previo a la neurectomía, a los tres días de desarrollo (3 dpf). **B, B':** La misma larva invierte el neuromasto LII.2 una vez regenerada a los 5 dpf, y la mantiene hacia los 7 dpf (**C, C'**) y a los 9 dpf (**D**). Se observan modificaciones en la morfología del terminal axonal hacia el neuromasto invadido a medida que transcurre el tiempo. Encerrado en el círculo punteado se observa la invasión y su ramificación terminal. Microscopía epifluorescencia, aumento 20X. Barra de escala 50 μm .

Para todos los análisis realizados se consideró como inervación a las ramificaciones complejas, arborizadas, presentadas por los terminales axonales hacia sus blancos sinápticos, las células ciliadas. No se consideró como inervación aquellas prolongaciones axonales rectas y pequeñas, que no presentan arborización hacia los neuromastos, a las que llamaremos "principio de elongación". Si posteriormente, estas se expanden y arborizan hacia los neuromastos, entonces las consideraremos como inervaciones. A continuación se presenta un ejemplo de inervación. Como se observa en la Figura 8B', C' y D', la flecha apunta al terminal axonal de una neurona única *leader* que inerva el neuromasto L3. Esta proyección axonal se encuentra ramificada hacia las células ciliadas y presenta una arborización compleja, característico de una inervación (Pujol-Martí y col., 2014, Hudspeth y col., 2015).

Es común observar a los tres días de desarrollo que las neuronas que inervan un neuromasto no terminan su recorrido allí. Generalmente los axones de estas neuronas siguen y terminan a mitad de camino entre un neuromasto y otro (Figura 8B'). Esta proyección recta es finalmente refinada y no se observa a los 5 dpf (Figura 8C'). Tal y como hemos mencionado anteriormente, las neuronas *leaders* inervan los neuromastos de la línea lateral primaria. Nótese que la aparición de un neuromasto de la línea lateral secundaria a los 5 dpf, no provocó ni indujo a la neurona a inervar esta estructura (Figura 8C-D').

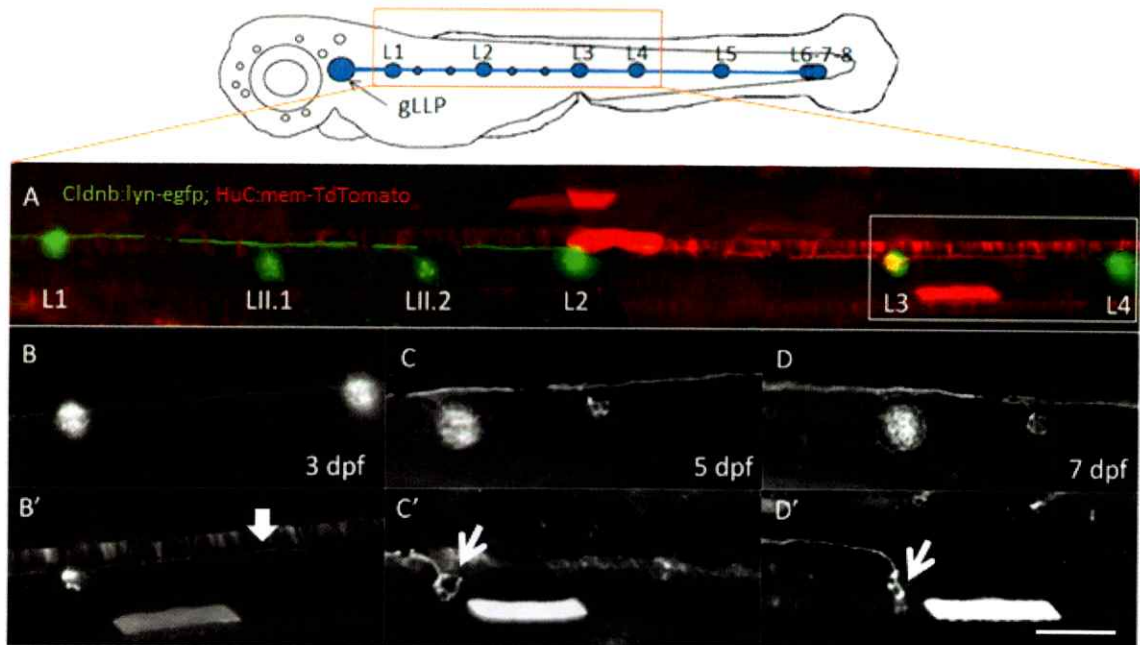


FIGURA 8. Las invenciones a los neuromastos de LLP son refinadas durante el desarrollo de larvas de pez cebra. **A.** Larva transgénica *Tg(-8.0cldnb:lyn-EGFP)* de 3 dpf mostrando el sistema de LLP en verde, inyectada con *HuC:mem-TdTomato* para marcar diferentes tipos neuronales en rojo. Se observan los neuromastos de la LLP primaria (L1-L4) y dos de la LLP secundaria (LII.1 y LII.2). **B-D'** son una ampliación del recuadro de A. **B, B'** A los 3 dpf el axón periférico de la neurona de LLP marcada inerva el neuromasto L3 y extiende recto hasta poco antes del L4 (ver cabeza de flecha). **C-C'**: A los 5 dpf la neurona continúa inervando el neuromasto L3, presentando diferente ramificación. Se observa una retracción de la proyección lineal hacia el L4 (cabeza de flecha en B'). En C se observa la aparición de un nuevo neuromasto secundario (LII.3), el cual no se encuentra inervado por esta neurona. A los 7 dpf (D, D'), se mantiene la invención a L3. Barra de escala 100 μ m.

4.2.1 Campo sensorial de neuronas *leader* y *follower*:

El resumen de las observaciones registradas para ambos subtipos neuronales (*Leader* control: LC y *Follower* control: FC) se presenta en la Tabla II. En esta se registró el número y posición de los neuromastos inervados (L1-L8) por neuronas únicas durante el desarrollo de la larva del pez cebra, entre los 3 y 7 dpf. También se anotaron los neuromastos contactados que no se consideraron como inervación, ya que no presentaron una arborización hacia el terminal sináptico, como ha sido descrito anteriormente. Se anotó este “principio de elongación” en raíz de que estos pseudo-contactos son indicativos de una posible futura inervación. El campo sensorial de una neurona (CS) y su índice de cambio (IC), serán descritos posteriormente.

Tabla II. Análisis de inervaciones de neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo. Campo sensorial promedio a 3 (CS3), 5 (CS5) y 7 dpf (CS7); e índice de cambio (IC).

LEADER CONTROL							
3 dpf	CS 3	5 dpf	CS 5	7 dpf	CS 7	IC 3-5	IC 3-7
2-4	3	2-4	3	2-4	3	0	0
3	3	1-3-4	2,7	1-3	2	3	2
3	3	3	3	3	3	0	0
3	3	3-4	3,5	3-4**	3,5	1	1
3-4	3,5	3-4	3,5	3-4	3,5	0	0
3-4	3,5	3-5*-7	5	3-5**-7	5	4	6
4	4	2	2	2	2	4	4
4	4	4	4	4	4	0	0
6-7-8	7	6-7-8	7	6-7-8	7	0	0
7-8	7	7-8	7	7-8	7	0	0
7-8	7	7-8	7	7-8	7	0	0

FOLLOWER CONTROL							
3 dpf	CS 3	5 dpf	CS 5	7 dpf	CS 7	IC 3-5	IC 3-7
1	1	1	1	1	1	0	0
1-3	2	1-3	2	1-3	2	0	0
1-3	2	3	3	3	3	2	2
2	2	2	2	2	2	0	0
2-3	2,5	2-3	2,5	2-3	2,5	0	0
2-7-8	4,5	2-7-8-9	4,5	2*-7-8-9	7	0	4
3	3	3	3	3	3	0	0
6	6	6	6	6	6	0	0
7-8-9*	7	7-8-9**	7	7-8-9	7	0	0
D1	0	D1	0	D1	0	0	0

*: "principio de elongación", leve elongación axonal hacia el blanco, no se considera inervación.

** : Modificación de la ramificación axonal hacia su blanco.

CS: Campo sensorial.

IC: Índice de cambio de conexiones.

Corroboramos que este subtipo *follower* presenta una tendencia a la inervación de neuromastos anteriores del pez, como ha sido descrito en (Sato y col., 2010; Pujol-Martí y col., 2010; Haenel y col., 2012). Para simplificar el análisis de conexiones se realizó una representación esquemática donde cada neurona única *leader* o *follower* ocupa una fila y se identifica con un color, y cada neuromasto inervado por esta, se representa con un círculo. Cuando las neuronas conectan con más de un neuromasto se grafican unidos por una línea recta.

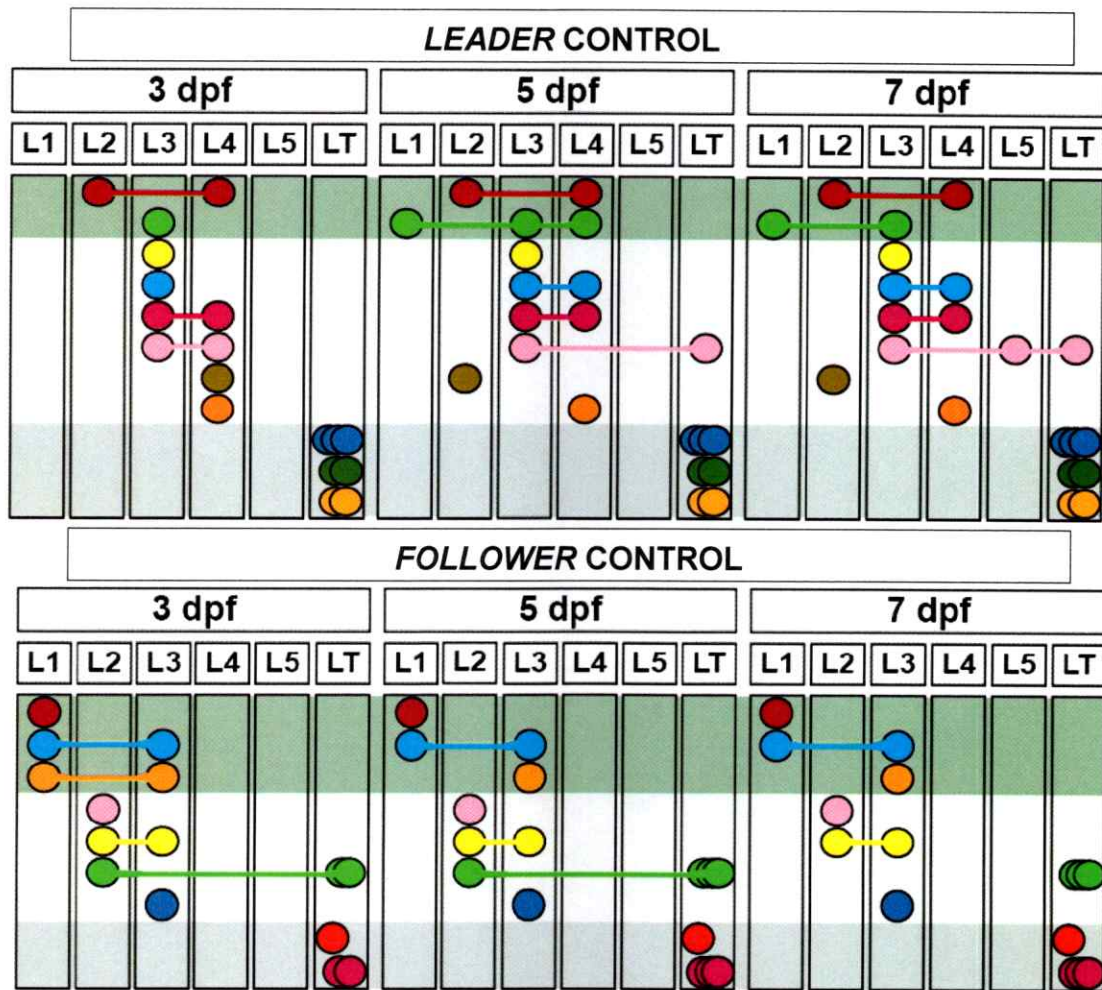


FIGURA 10. Representación de las invenciones de neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo de la larva de pez cebra. En el gráfico, cada fila representa una única neurona por larva (*Leader*: N=11, y *Follower*: N=8 larvas independientes). Cada neuromasto es representado como una esfera de color. LT corresponde a los tres neuromastos terminales L6-L7-L8, que son representados como tres esferas cercanas.

Tal y como se muestra en esta representación, la invención de los neuromastos a lo largo del desarrollo es un proceso dinámico. Como se observa en la Tabla III, algunas de ellas aumentan el número de blancos contactados (LC: 27,27%, FC: 12,5%), otras estabilizan la invención (LC: 63,64%, FC: 75%), y otras modifican completa o parcialmente sus invenciones, añadiendo, disminuyendo o desplazando

completamente la ramificación hacia el blanco (LC: 36,36%, FC: 37,5%), pero en general las conexiones permanecen estables. De modo que un 90,9% de las células *leader* y un 100% de las neuronas *follower*, mantiene al menos una proyección en el tiempo. En todos los casos analizados, las neuronas inervan únicamente los neuromastos derivados de la línea lateral primaria, rotulados como L1-L5 y los tres neuromastos terminales de la cola del pez L6-L7 y L8 (LT).

Tabla III. Resumen de las modificaciones en las conexiones de neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo; y si aumenta, disminuye o estabiliza sus conexiones.

Conexiones (%)	LEADER CONTROL	FOLLOWER CONTROL
Estabiliza	63,64	75
Aumenta	27,27	12,5
Disminuye	0	25
Modifica	36,36	37,5

Encontramos que ambos subtipos presentan una correlación lineal casi perfecta entre el campo sensorial promedio a los 3, 5 y 7 dpf (Figura 11A), por lo que se deduce que estas células refinan levemente sus inervaciones a medida que pasa el tiempo. Mantienen estable su inervación entre 5 y 7 dpf, en un porcentaje mayor al observado en la población de neuronas *leader*. Y a pesar del crecimiento de la línea lateral dada por la aparición de nuevos neuromastos en el cuerpo del pez (desarrollo de la línea lateral secundaria), el número de neuromastos que, en promedio, una neurona aferente *leader* o *follower* contacta entre los 3 a 7 dpf no cambia significativamente (ver Figura 11A 5 FC y 7 FC, Figura 14 A). A esto le llamamos campo sensorial promedio de una neurona (CS), el cual corresponde al promedio de los neuromastos inervados a lo largo del tronco del pez. Refiriéndose a la cantidad de inervaciones y a la posición en que se

encuentran las ramificaciones axonales. Entonces, el campo sensorial corresponde al promedio de la posición de los blancos contactados a lo largo de la línea lateral del pez cebra, dividido en el número total de inervaciones de la neurona única; es decir, si analizamos el primer caso de la Figura 10 (rojo) a los 3 dpf:

$$CS = \text{posición del neuromasto contactado} / n^{\circ} \text{ inervaciones}$$

$$CS = 2+4/2 = 3$$

Para este análisis de conexiones consideramos los neuromastos terminales (LT) como una posición única (L7), ya que se encuentran muy cercanos entre sí, a diferencia del resto. Pero en los peces que presentan una única inervación al neuromasto terminal L6, lo consideramos como posición 6.

En este sentido, encontramos casos en que las neuronas *leader* aumentaban el número de blancos contactados o se mantenían en la misma posición. Encontramos, por ejemplo, un caso en que se observó una variación significativa en los neuromastos contactados (Figura 10, LC verde): a los 3 dpf inervó el neuromasto L3; a los 5 dpf agregó una conexión hacia un neuromasto anterior L1, mantuvo L3 y agregó un posterior L4. Y a los 7 dpf perdió la conexión al neuromasto L4, manteniendo un rango sensorial hacia la sección anterior del pez. Se observó que el campo sensorial promedio de neuronas *leader* y *follower* no varía durante el desarrollo, ya que se presenta una tendencia lineal entre los 3 y 7 dpf. Por otro lado, se cuantificó el número total de conexiones| de neuronas *leader* y *follower* en las secciones anterior (neuromastos L1 a LII.3), media (neuromastos LII.4 a L4), o posterior del pez (neuromastos L5 a LT). Y se observó que las neuronas *follower* tienden a inervar neuromastos anteriores del pez, L1, L2 y L3 (Tabla II, Figura 11B LC amarillo); mientras que las conexiones de neuronas *leader* tienden a concentrarse desde el

neuromasto L3-L4 en adelante (Figura 11B LC vs FC); es decir, en la zona media y posterior del pez.

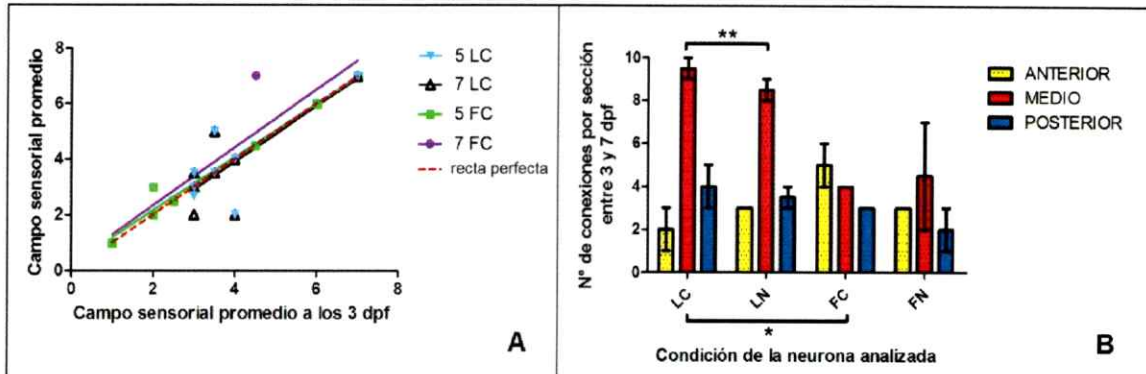


FIGURA 11. El campo sensorial promedio no varía y el número de conexiones de neuronas *leader* y *follower* tiende a la sección media del pez durante el desarrollo y la regeneración. **A:** Análisis de regresión lineal del promedio de las invaciones de neuronas *leader* ($Pvalue = 0,0002$ significativo) y *follower* control ($Pvalue < 0,0001$ significativo) a los 5 (5 LC: $r^2=0,8123$, 5 FC: $r^2=0,9737$); y 7 dpf (7 LC: $r^2=0,8034$, 7 FC: $r^2=0,8634$). En rojo se observa la tendencia lineal perfecta, donde cada posición permanece en el tiempo. **B:** ANOVA de 2 vías para el número de conexiones en las diferentes regiones del pez, entre 3 y 7 dpf. La región anterior se presenta en amarillo (L1-LII.1-LII.2-L2-LII.3), media en rojo (LII.4-L3-L4) y posterior en azul (L5-LT); tanto durante el desarrollo (LC, FC), como tras la neurectomía (LN, FN).

4.3 Re-adquisición de blancos sinápticos invadidos tras un daño al nervio de línea lateral posterior.

Con el fin de evaluar si una neurona presenta una pre-determinación a inervar un blanco determinado, o si es incapaz de distinguir entre dos de ellos, realizamos un daño al nervio de LLP, y evaluamos el restablecimiento de conexiones de estos dos subtipos neuronales (*leader* y *follower*). Sabemos de antemano que al realizar un daño con dos fotones, el nervio de LLP regenera y reconecta los neuromastos a lo largo del

pez (Villegas y col., 2012). También se ha visto que tras un daño realizado con electrodo de tungsteno (Ceci y col., 2014), las neuronas regeneran y re-adquieren parcialmente el mapa somatotópico que presentaban previo al daño. Sin embargo, se desconoce si los dos subtipos neuronales presentes en el ganglio de LLP se comportan de la misma manera durante la regeneración, ya que presentan diferentes características de migración y niveles de expresión del gen pan-neural *neuroD* (Sato y col., 2013) durante el desarrollo. Por otro lado, las neuronas *follower* establecen el mapa somatotópico en el cerebro posterior; mientras que las *leader* poseen una posición dorsalizada pero no colaboran en su formación. Esto implicaría que para mantener esta organización las neuronas *follower* deberían adquirir aproximadamente los mismos blancos que poseían previo a la neurectomía, de manera tal que no alteren el mapa sensorial previamente establecido.

Para abordar esta pregunta se realizó un daño a los axones del nervio de LLP durante el desarrollo temprano de la larva, en un punto entre el ganglio y el neuromasto L1 (ver Materiales y Métodos) (Moya y col., 2013), al que llamamos neurectomía. La proyección axonal periférica de la neurita queda completamente desconectada del soma y degenera desde el punto del daño hacia caudal (Villegas y col., 2012). La elongación de axones comienza alrededor de las 4 horas post-neurectomía (hpn), los axones atraviesan el sitio de daño (Figura 12 B) y hacia las 12 hpn las neuritas conectan con los primeros neuromastos, y comienzan a reestablecer las conexiones perdidas, generando nuevos patrones de inervación. La regeneración se completa pasadas las 24 hpn. Ignoramos si estas nuevas conexiones son estables en el tiempo; por lo que en las siguientes secciones veremos cómo se comportan estos dos subtipos neuronales después de un daño regenerativo.

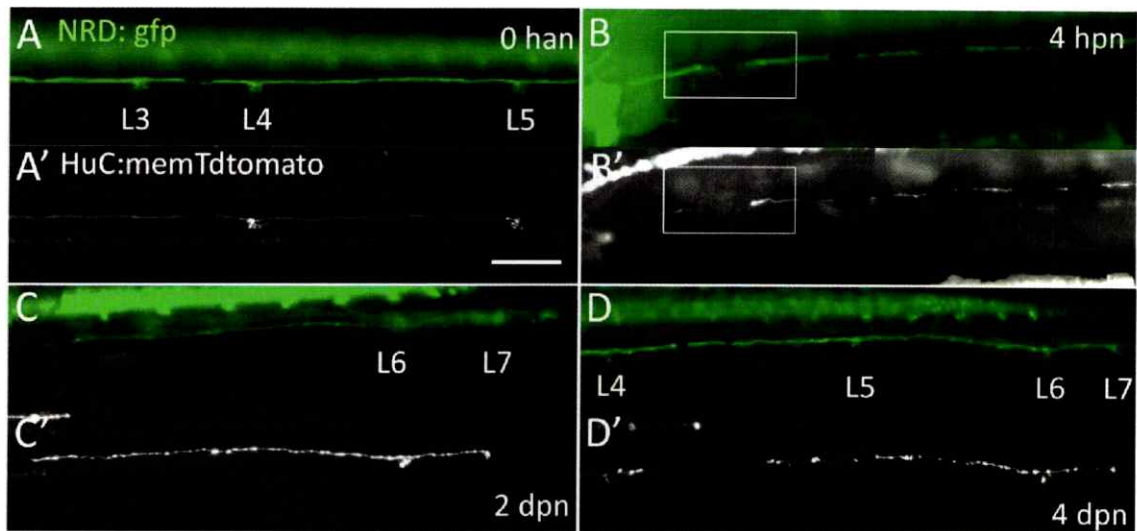
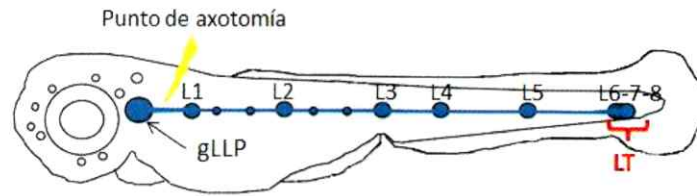


FIGURA 12. Las neuronas re-inervan sus blancos luego de la regeneración del nervio de LLP. Arriba: Representación esquemática de una larva de pez cebra de 3 dpf, que muestra la disposición de los neuromastos de la línea lateral L1 a LT (L6, L7, L8); y el punto de neurectomía (ver rayo). **A, B, C, D:** Se presenta el nervio de LLP y la inervación de una neurona única a los neuromastos L3, L4 y L5 en una larva transgénica *TgBAC(NeuroD:gfp)* inyectada con *HuC:memTdtomato* (en gris) (A). El sitio de daño (B), con la interrupción del nervio (recuadro). Y la reinervación de los neuromastos L4, L5, L6 y L7 a los 2 dpn (C) y a los 4 dpn (D). **A', B', C', D':** Neurona *leader* inervando los neuromastos L4 y L5 (A'); previo al daño (0 han), y a las 4 hpn (B'). Barra de escala de 100 µm.

4.3.1 Campo sensorial de neuronas *leader* y *follower*:

Tras un daño al nervio de LLP se interrumpe el conjunto axonal y degenera posterior al sitio del daño. Como la regeneración ocurre pasadas las 24 h, evaluamos el restablecimiento de nuevas conexiones al quinto y séptimo día de desarrollo. Al quinto

día (5 dpf o 2 dpn) se espera que las conexiones sean promiscuas y poco estables, ya que ha terminado la regeneración. Mientras que al séptimo día (7 dpf o 4 dpn), las células de Schwann han re-mielinado el nervio, y se espera que las conexiones sean más estables en el tiempo (Ceci y col., 2014). El resumen de la re-conexión con los neuromastos se presenta en la siguiente tabla:

Tabla IV. Análisis de invenciones de neuronas *leader* y *follower* tras la regeneración. Campo sensorial promedio a 0 (CS0), 2 (CS2) y 4 dpn (CS4); e índice de cambio (IC).

LEADER NEURECTOMIZADA							
0 han	CS 0	2 dpn	CS 2	4 dpn	CS 4	IC 3-5	IC 3-7
2	2	11.2	1,5	11.2	1,66	0,66	0,66
2	2	11.2	1,5	11.2	1,66	0,66	0,66
2-4	3	3	3	5-7-8	6	4	5
3	3	3	3	3	3	0	0
3	3	4	4	-	-	2	-
3	3	4-5	4,5	4	4	4	2
3	3	4-5	4,5	3	3	4	0
3-4	3,5	4	4	-	-	1	-
4	4	4	4	4	4	0	0
4	4	2-3-4	3	3	3	3	2
4-5	4,5	3-11.1	2,17	3	3	5,66	4
4-5	4,5	3-6*-7*	3	4-5*-6*	4	4	1
6-7-8	7	2-3*	2	2-3**	2,5	8	7
7	7	3-7-8	5	3-7-8	5	6	6
8	7	7-8	7	8	7	0	0

FOLLOWER NEURECTOMIZADA							
3 dpf	CS 3	5 dpf	CS 5	7 dpf	CS 7	IC 3-5	IC 3-7
1-2	1,5	1-2-II.2	1,5	2-II.3*	2	0,33	2,33
2	2	4-II.3*	4	4	4	4	4
2*-3	3	3-4*	3	4*-5	5	3	4
2-3-5	3,3	2	2	-	-	4	-
3	3	II.1	1,5	II.1	1,5	3,32	3,32
3-4	3,5	3	3	3	3	1	1
3-4	3,5	4	4	5	5	1	3
1*-4	4	II.4-3*	2,5	II.4	2,5	2,66	2,66
6-8	7	-	-	4*-6	6	-	0

-: no se observa ni el soma ni axón de la neurona en pLL. *: "principio de elongación", leve elongación axonal hacia el blanco, no se considera inervación. **: Modificación de la ramificación axonal hacia su blanco. CS: campo sensorial. IC: índice de cambio.

Observamos que a diferencia de lo ocurrido con las conexiones establecidas durante el desarrollo, sólo durante la regeneración ambos subtipos conectan neuromastos secundarios derivados del primII. Como se observa en la Figura 13, un 13,33% de las neuronas *leader* y un 22,22% de las *follower*, contacta con un secundario (pequeñas esferas en la figura) y mantiene estable esta inervación. Determinamos el número de neuronas que presentaron una variación en las conexiones establecidas luego de la regeneración; y cuantificamos aquellas que aumentaban, disminuían o cambiaban total o parcialmente la posición del neuromasto inervado, y lo resumimos en la Tabla V.

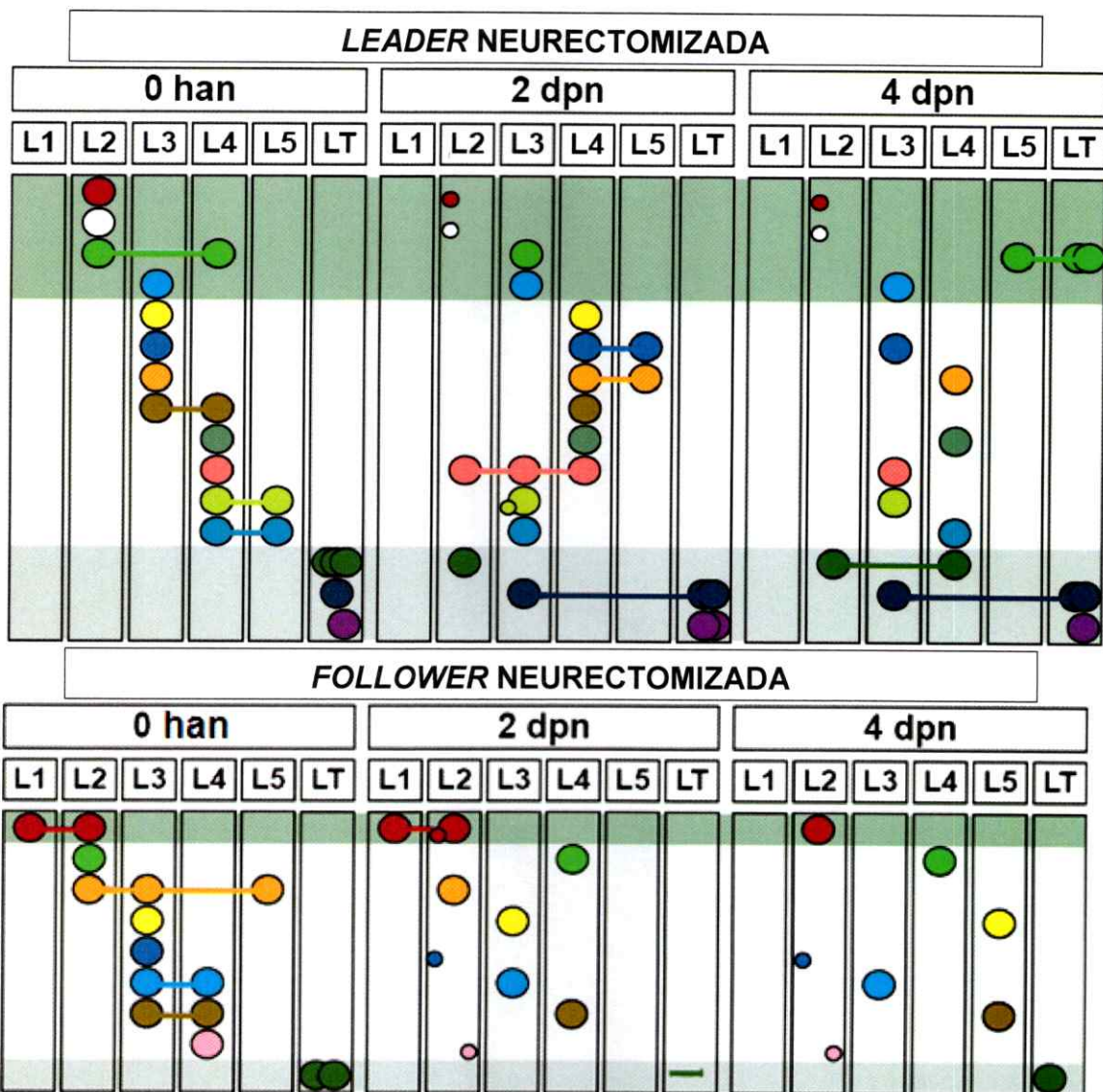


FIGURA 13. Representación de las inervaciones de las neuronas *leader* y *follower* tras un proceso regenerativo en larvas de pez cebra. Cada neuromasto es representado como una esfera de color asociado a la inervación de una neurona única, y los neuromastos terminales (LT): L6-L7-L8, son representados como tres esferas en la misma posición (*Leader*: N=15, *Follower*: N=9). La esfera más pequeña representa la inervación a un neuromasto derivado del primII. Se presenta el patrón de conexiones antes del daño (0 han) y luego de la regeneración (2 y 4 dpn).

También encontramos neuronas que morían hacia los 7dpf, como se explica más adelante.

Tabla V. Resumen de las modificaciones en las conexiones de neuronas *leader* y *follower* tras un proceso regenerativo; aumenta, disminuye o mantiene las mismas conexiones que presentó previo al daño.

Conexiones (%)	<i>LEADER</i> NEURECTOMIZADO	<i>FOLLOWER</i> NEURECTOMIZADO
Mantiene	20	0
Aumenta	13,33	0
Disminuye	13,33	50
Modifica	60	100

Observamos que las conexiones establecidas por ambos subtipos se desordenan entre los 2 y 4 dpn, invadiendo distintos blancos durante la regeneración. En muy pocos casos se añaden conexiones (LN: 13,33, FN: 0%), y a diferencia de las *leader*, la mitad de las neuronas *follower* disminuye el número de conexiones (LN: 13,33%, FN: 50%). Encontramos que un 40% de las neuronas *leader* y un 33,33% de las *follower*, reconecta con al menos un blanco original, pero sólo un 20% de las *leader* y ninguna de las *follower* mantiene todas las conexiones previas a la neurectomía. De la Figura 13 también es posible observar que las neuronas tienden a inervar un único neuromasto, en especial, el subtipo *follower*, donde el 100% de las neuronas de este subtipo analizadas inerva un único neuromasto hacia el cuarto día de regeneración.

Como en la mayoría de los peces los neuromastos se depositan entre los mismos somitos siempre, calculamos el campo sensorial como el promedio de la posición de los neuromastos inervados. Para los neuromastos secundarios definimos una distancia de 0,33 puntos por cada secundario sumado hacia el neuromasto primario más

cercano. Por ejemplo, para una neurona *follower* (Figura 13, FN rosado) que inerva el neuromasto L4 previo a la neurectomía (0 han), se calculó un campo sensorial de 4, y a los 2 dpn, la misma neurona regeneró e invió un neuromasto secundario LII.4, entonces el campo sensorial de esta neurona es:

$$CS = (2+0,66)/1 = 2,66$$

A los 4 dpn, se mantiene en la misma posición. De esta manera, se calculó el campo sensorial para ambos subtipos sometidos a neurectomía y posterior regeneración. Los resultados se presentan en la Tabla IV.

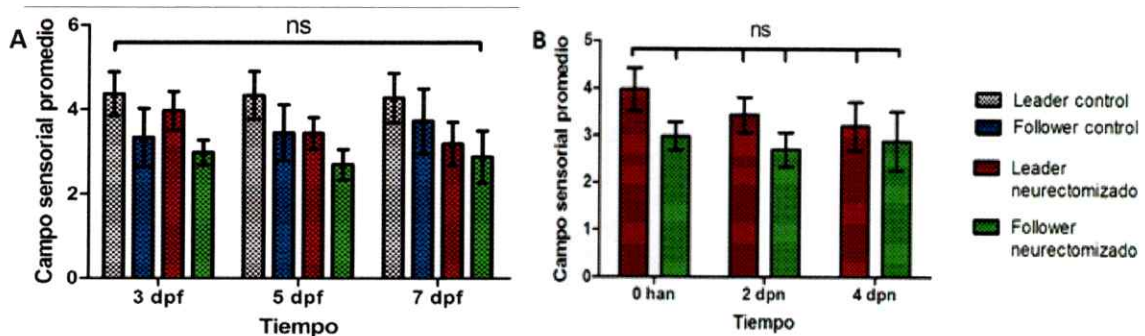


FIGURA 14. El campo sensorial promedio de neuronas *leader* y *follower* no se modifica durante el desarrollo y la regeneración. ANOVA de 2 vías para condiciones control y neurectomía de neuronas *leader* y *follower*. Se representa el campo sensorial promedio de ambos subtipos en ambas condiciones a medida que la larva de pez cebra se desarrolla: 3 días post-fertilización (dpf) o 0 horas antes neurectomía (han), 5 dpf o 2 dpn y 7 dpf o 4 dpn. **A:** Comparación entre *leader* vs *follower* durante el desarrollo (control) y la regeneración. **B:** Comparación entre *leader* vs *follower* tras un proceso regenerativo (neurectomizados). Pvalue > 0,05 no significativo (ns).

Podemos concluir que las condiciones neurectomizadas se alejan de la tendencia lineal del campo sensorial en comparación al control, y presentan una baja correlación, por lo

que las conexiones de una misma neurona son diferentes antes y después de la regeneración. Encontramos que luego de la neurectomía, las neuronas tienden a inervar neuromastos en la zona media del pez (L3-L4), con una distribución similar para *leaders* y *followers* (Figura 11B). A diferencia del control, las *followers* pasan de la región principalmente anterior, a la media del pez. Mientras que las *leaders* se distribuyen desde la región media-posterior, hacia la media del pez, presentando una cantidad de conexiones similar en las regiones media y posterior de la larva. Sin embargo, al realizar el análisis de ANOVA de 2 vías para evaluar si existe un efecto del tratamiento (Figura 14 B), o del tiempo de desarrollo de la larva sobre las conexiones establecidas, encontramos que el cambio en el campo sensorial promedio de ambos subtipos no es significativo.

Este análisis demuestra que el parámetro llamado campo sensorial no es capaz de representar las variaciones en las inervaciones de las neuronas después del daño, observables en la Figura 13. Debido a esto, decidimos generar un "Índice de cambio", que representa los errores de inervación. Se le otorga un valor sumatorio "1" a cada variación de las inervaciones vistas en la Figura 13, Tabla IV, para cada neurona única; y se penaliza la modificación de las inervaciones con un valor "1" que se añade a lo anterior. Por lo tanto, el cambio en las conexiones de una neurona entre la condición inicial previa al daño (3 dpf) y el final (7 dpf), obtiene un valor fijo que puede ser analizado estadísticamente. De manera que mientras mayor sea la modificación de conexiones, mayor será el valor del índice de cambio (Tabla II y IV). Por ejemplo, si una neurona inerva el neuromasto L3 al tercer día de desarrollo, y el L4 a los cuatro días; este cambio de posición tiene un índice de cambio igual a 2 (Figura 15A).

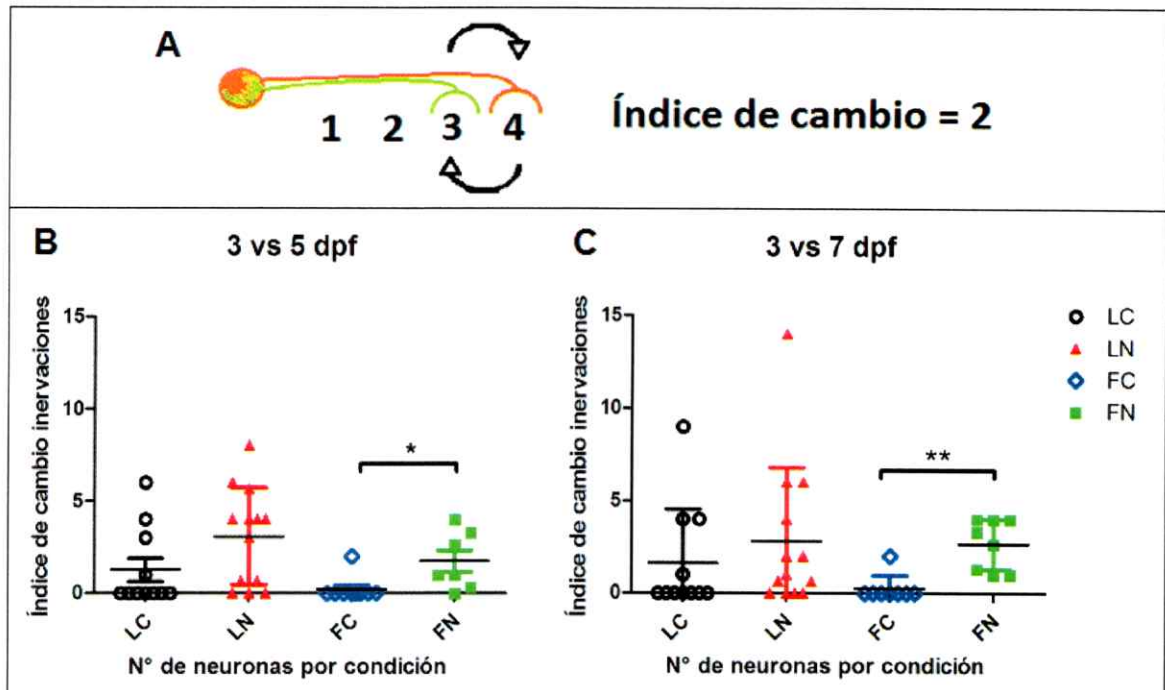


FIGURA 15. Neuronas *follower* presentan mayor variación en el Índice de cambio de inervaciones durante la regeneración en larvas de pez cebra. A: Representación visual del cálculo del índice de cambio de conexiones de una neurona entre 3 (en naranja) y 7 dpf (en verde). Índice de cambio de inervaciones entre 3 y 5 dpf (B) (Pvalue 0.0018), y entre 3 y 7 dpf (C) (Pvalue 0.0447), para neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo (control: LC, FC, respectivamente); y neurectomizada (LN, FN, respectivamente).

Como se observa en la figura anterior, las condiciones control mantienen principalmente un índice igual a cero; es decir, no modifican sus conexiones de manera particular durante el desarrollo de la larva. Mientras que la neurectomía provoca cambios en el patrón de inervaciones (según el test de Bartlett las varianzas son significativamente distintas al comparar todas las condiciones (**Pvalue 0,0001)). Y son las neuronas *followers* las que presentan una modificación completa de sus inervaciones, siendo las más promiscuas durante la regeneración.

Este índice de cambio nos permitió observar la modificación de las conexiones de ambos subtipos con mayor detalle. Observamos que tras la neurectomía, las neuronas *leader* varían sus inervaciones individualmente, presentando un índice de cambio distinto de cero. Sin embargo, el análisis a nivel poblacional nos muestra que estas variaciones no son significativas al comparar con el control (Figura 15 B LC/LN). Entre 5 y 7 dpf, algunas de las inervaciones presentadas por el subtipo *leader* son modificadas o eliminadas; aunque este efecto de poda de proyecciones axonales no altera significativamente el contacto establecido hacia los 7 dpf (Figura 15 B, C). Lo que implica que las neuronas *leader* readquieren sus blancos con mayor fidelidad. A diferencia, las neuronas más jóvenes o *followers*, cambian significativamente sus conexiones, tal que todas modifican al menos una inervación. Esto se evidencia a nivel individual como poblacional (Figura 15 B FC/FN), y es observable a los 2 dpn (5 dpf). Pasado este punto, las nuevas conexiones se mantienen mayormente estables (4 dpn). Por lo que las neuronas *follower* son las más promiscuas durante la regeneración.

4.3.2 Análisis de sobrevivencia neuronal

Durante el análisis de inervaciones de las neuronas *leader* y *follower* se presentaron casos (de hasta un 37,5% del total) en que se perdía la marca del constructo de expresión neural inyectado (*HuC:mem-TdTomato* o *pE46:egfp*). Por lo que se utilizó la inyección transiente del constructo *HuC:Kaede*, para comprobar si se debía a un *bleaching* de la marca o a un proceso de muerte celular. En particular, Kaede es una proteína fotoconvertible frente a la luz U.V en distintos tipos neuronales, incluyendo las neuronas aferentes de la LLP. Los peces inyectados con este constructo presentaron el mismo fenómeno que los inyectados con los otros dos constructos; por lo que se

consideró que independiente del constructo utilizado, este fenómeno de muerte celular ocurre naturalmente en el ganglio de LLP y actúa sobre estas neuronas. Como se muestra en la siguiente figura, soma y axón se pierden hacia los 7 dpf (Figura 16, E, F).

Tabla VI. Porcentaje de mortalidad de neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo (control) y tras la regeneración (neurectomizado).

Tiempo (dpf)	<i>Leader</i> Control (%)	<i>Leader</i> Neurectomizada (%)	<i>Follower</i> Control (%)	<i>Follower</i> Neurectomizada (%)
3	7,69	0,00	25,0	0,00
5	15,38	26,09	37,5	28,57
7	15,38	34,78	37,5	35,71

Como se muestra en la Tabla VI, se agrupó la cantidad de peces en los que una neurona *leader* o *follower* moría versus el total de peces con marca o neurona viva al momento de observación, tanto en la condición control como después de un daño al nLLP, y se realizó un análisis de sobrevivencia utilizando el programa estadístico GraphPad (Figura 17).

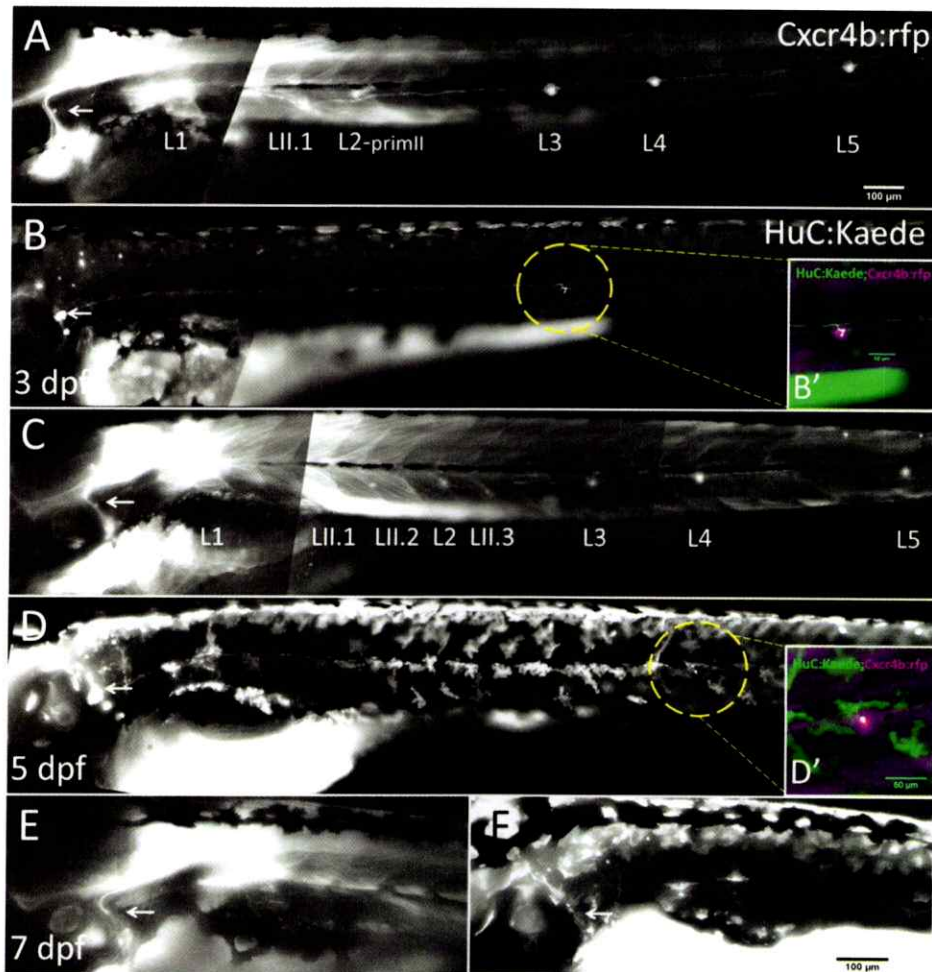


FIGURA 16. Existe muerte de neuronas en el ganglio de LLP de larvas de pez cebra. Seguimiento de la misma larva transgénica *Tg(cxcr4b:rfp)* inyectada con el constructo *HuC:kaede* para marcaje de una neurona *leader*. **A, B:** A los 3 dpf se observa la disposición de neuromastos desde el L1-L5, y la migración del primordio secundario (primII). **B':** Amplificación de la sección encerrada en el círculo amarillo, que engloba la inervación al neuromasto L3. **C, D:** La misma larva a los 5 dpf presenta un patrón de neuromastos más complejo, y tras la regeneración, la neurona *leader* inerva el neuromasto L4. Se observa la breve ramificación del terminal axonal hacia el neuromasto (**D'**). **E, F:** Hacia los 7 dpf la misma larva no presenta ni el soma ni el axón de la neurona *leader*. Las flechas blancas apuntan al soma neuronal (ausente en E y F), que debido a que Kaede es una Proteína fotoconvertible, puede ser observado en ambos canales. A, B, C, D, E, F: barra de escala 100 μm . B',D': barra de escala 50 μm .

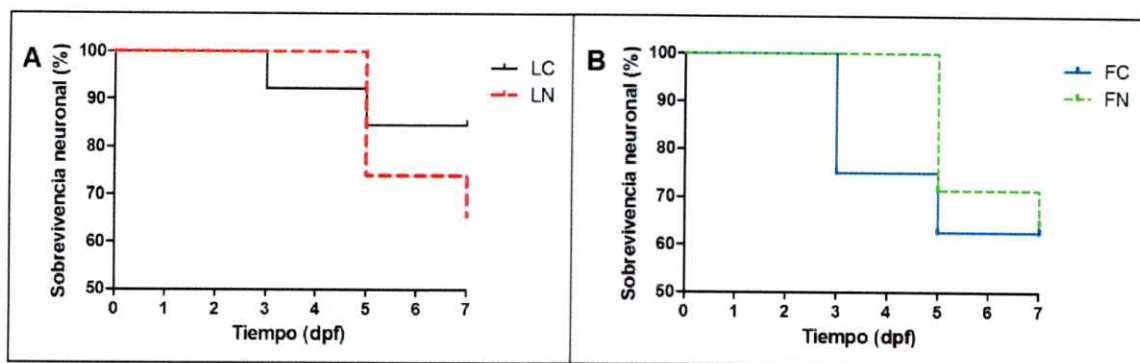


FIGURA 17. Las neuronas *leader* presentan menor sobrevida tras la regeneración. A: Curva de sobrevivencia de neuronas *leader* y **B:** neuronas *follower* en sus condiciones control (LC, FC, respectivamente) y neurectomizada (LC, LN, respectivamente), a los 3, 5 y 7 días post fertilización (dpf).

Encontramos que hacia el tercer día de desarrollo había muerte celular de ambos subtipos, en particular, del subtipo *follower*, donde el 37,5% de las neuronas totales observadas moría. Mientras que sólo el 15,4% de las *leader* presentaba muerte celular. Se observó una disminución similar en el porcentaje de sobrevida de neuronas *follower* tanto en el desarrollo (37,5%) como en la regeneración (35,71%). Y a diferencia de las neuronas *leader*, las *follower* presentan un 2,2% más de muerte celular durante la regeneración. Por lo que se puede decir que la disminución en el porcentaje de sobrevivencia de neuronas *follower* es independiente de la neurectomía. No así para las neuronas *leader*, donde estas presentan un 19,4% más de muerte celular frente a la neurectomía. Por lo que la sobrevivencia de estas sí se ve afectada por la neurectomía. En este punto suponemos que la presión que ejerce el sistema nervioso central sobre la regulación de las conexiones, podría estar afectando la sobrevida de estas neuronas al seleccionar aquellas inervaciones que serán permanentes.

5. DISCUSION

El sistema nervioso es un conjunto de diversas estructuras interconectadas, neuronas, glías y células sensoriales, que funcionan en sincronía, pero cuando se presentan defectos en alguna de ellas, se puede generar una patología. En el sistema nervioso central de mamíferos, si las conexiones establecidas durante el desarrollo se pierden frente a un daño, no pueden volver a ser re-adquiridas, ya que la lesión suele generar una cicatriz glial debido a que el debris celular no es completamente removido (Wanner y col., 2008); y en vez de permitir que los procesos celulares vuelvan a unirse, se forma una barrera física. A diferencia, el sistema nervioso periférico regenera, pero muchas veces esta regeneración no es completa.

Los peces, a diferencia de los mamíferos, son capaces de regenerar diferentes estructuras, ya que no se forma esta cicatriz. Entre los distintos tipos de tejido que el pez cebra puede regenerar está: el corazón, la cola, y el sistema nervioso central y periférico. En particular, el pez cebra posee un sistema sensorial, que es parte del sistema nervioso periférico denominado línea lateral. Este es un sistema mecanosensorial que procesa los estímulos del movimiento del agua y los traslada a una respuesta de escape direccionada (Ghysen and Dambly-Chaudière, 2007). La línea lateral posterior del pez cebra permite el fácil estudio de sus componentes celulares, y debido a la transparencia del animal, se pueden seguir en el tiempo. Utilizando técnicas simples de marcaje de neurona única, como inyección (Pujol-Martí y col., 2010) o marcaje retrógrado (Sato y col., 2010), se pueden seguir las neuronas aferentes de la línea lateral posterior en el nervio de LLP y analizar sus conexiones en el tiempo. En el ganglio de LLP existen dos tipos de neuronas: *leader* y *follower*, según su posición con respecto al primordio migratorio (Gompel y col., 2001, Sato y col.,

2010, Pujol-Martí & López-Schier 2013). Estas neuronas poseen diferentes características migratorias y presentan una cierta somatotopía en el sistema nervioso central, donde las *leader* se encuentran dorsalmente en el ganglio y proyectan dorsalmente en el cerebro posterior. Mientras que las *follower* se encuentran en una posición más ventral en el ganglio, y proyectan ventralmente en el cerebro posterior.

En Ceci y col., 2014, se observó que frente a un daño las neuronas de LLP reconectaban con sus blancos sinápticos, reconstruyendo parcialmente el patrón de inervaciones que presentaban previo al daño, entre los tres y cinco días de desarrollo del pez. Se encontró que las neuronas que reconectaban con la región posterior del pez (L4 en adelante), tendían a ser las más alejadas de la recta perfecta (Figura 4C). Las cuales podrían corresponder a las neuronas *leader*. En ninguno de los casos encontrados se evaluó la diferencia entre *leaders* y *followers*. De esta manera nos preguntamos si es que ambos subtipos presentaban el mismo patrón de conexiones tanto durante el desarrollo como durante la regeneración posterior a un daño.

Se ha sugerido que las *leader* funcionarían como guía axonal para el establecimiento de conexiones por las neuronas *follower* (Whitlock & Westerfield, 1998; Sato y col., 2010; Ceci y col., 2014). Como además tienden a conectar con neuromastos posteriores en la cola del pez, para mantener este patrón posterior al daño, deben recorrer un largo camino durante la regeneración para volver al punto inicial. Por ello podría ser posible que estas neuronas percibieran otro tipo de señales del medio, que fuesen liberadas desde los neuromastos no inervados, llevando a que se cometan errores de inervación, modificando el patrón que presentaban inicialmente. A diferencia de las anteriores, las *follower* establecerían un blanco estable durante el desarrollo en la región anterior del pez (Liao & Haehnel, 2012), por lo que recuperarlo conllevaría

menos errores. Por ello apostamos a que las neuronas *leader* son las más promiscuas durante la regeneración.

5.1 Variación en el patrón de inervaciones de neuronas *leader* y *follower* durante el desarrollo de la larva de pez cebra

Para analizar el patrón de inervaciones de ambos subtipos neuronales, se realizó inyección transiente con constructos que expresan proteínas fluorescentes asociadas a un gen de expresión neural. Luego de seleccionarlas, las seguimos en el tiempo. De esta manera, encontramos que un 90,9% de las células *leader* y un 100% de las neuronas *follower*, mantiene al menos una proyección desde el momento inicial (3 dpf), en adelante, estable en el tiempo. Corroboramos lo descrito en Sato y col., 2010; donde las neuronas *follower* tienden a contactar con la región anterior del pez, conformada por los neuromastos L1 a LII.3, como se muestra en la Figura 11B. Mientras que las *leader* tienden a contactar con neuromastos de las regiones media y posterior del pez; es decir, L3-L4 en adelante. En principio, analizamos el patrón de inervaciones como el campo sensorial promedio de una neurona. Esto significa sumar la posición absoluta de los neuromastos con los que conecta, sobre la cantidad total de inervaciones. Esto nos permite conocer la posición promedio en que se encuentran las ramificaciones del axón de una neurona única. De manera que entre los 3 y 7 días de desarrollo del pez, no se encuentran diferencias significativas en el campo sensorial promedio para ambos subtipos. Con este análisis perdimos información del cambio de inervaciones que observamos en la Figura 10 y 13. Por esta razón creamos el "índice de cambio" de inervaciones, donde aquellas conexiones que se mantienen entre 3 y 5 dpf, o entre 3 y 7 dpf, obtienen un valor de cero. Y encontramos que el 70% (7/10) de

las *leader* y el 77,8% (7/9) de las *follower* presenta un índice de valor cero entre el establecimiento de conexiones inicial y el definitivo. Encontramos una relación lineal entre el patrón de neuromastos inervados entre 3 vs 5 y 7 dpf; es decir, la inervación a determinados neuromastos de una única neurona a medida que transcurre el tiempo se mantiene constante.

5.2 Variación en el patrón de inervaciones de neuronas *leader* y *follower* tras un daño regenerativo en larvas de pez cebra

Para evaluar el patrón de inervaciones de estas neuronas antes y después de la regeneración, se realizó un daño con un pulso de corriente utilizando un electrodo de Tungsteno. De este modo, interrumpimos el conjunto axonal del nervio de la LLP desde el primer neuromasto hacia el final, daño al que llamamos neurectomía. Las neuritas degeneran y comienzan a regenerar alrededor de cuatro horas después del daño, mientras los blancos permanecen intactos y denervados. De manera que la porción axonal tiene un largo camino para recorrer desde el ganglio, y un amplio número de posibles blancos para re-contactar. Encontramos que un 40% de las neuronas *leader* y un 33,33% de las *follower*, reconecta con al menos uno de los blancos que presentaba originalmente. Pero sólo un 20% de las *leader* y ninguna de las *follower* mantiene todas las conexiones previas a la neurectomía. De este simple cálculo concluimos que las neuronas *follower* son las más erradas en la reconexión; y presentan un alto porcentaje de muerte celular que podría estar dado por la inestabilidad de las conexiones durante la regeneración, no así durante el desarrollo, ya que se mantienen estables en el tiempo. Sin embargo, este porcentaje podría no ser completamente representativo dado el número de casos analizados de entre aproximadamente 20-30 neuronas

aferentes que posee el nervio de LLP. Se debe considerar que luego de la regeneración todos los neuromastos se inervan y no estamos observando todas las inervaciones.

Al realizar un promedio de las inervaciones, lo que llamamos campo sensorial, perdimos información de la variación de las conexiones. En este sentido, dos neuronas que inervan blancos muy cercanos, o uno cercano y uno lejano, pueden tener el mismo promedio. Calculamos el campo sensorial promedio para cada subtipo *leader* y *follower* después de un daño, y observamos que no se presentan cambios significativos para ninguno de los subtipos; a pesar de lo visto previamente (Figura 10 y 13). Por ello creamos el índice de cambio de conexiones, el cual refleja lo que observamos; es decir que ambos subtipos mantienen o cambian sus inervaciones, añaden o pierden proyecciones hacia diferentes neuromastos. De esta manera vimos que las neuronas *follower* presentaron la mayor correlación durante el desarrollo, con un índice de cambio de cero; y una menor correlación durante la regeneración, alejándose completamente de la tendencia lineal de la inervación de neuromastos entre 3 y 7 dpf, presentada durante el desarrollo normal de la larva de pez cebra. Presentando, en conjunto, un alto índice de cambio entre el inicio y la re-adquisición de blancos. Por otro lado, las *leader* presentan los índices de cambio más altos individualmente. De manera que la varianza de estas es significativamente diferente, no así la media de los datos con respecto a la situación ocurrida durante el desarrollo. Por tanto concluimos que las neuronas *follower* son las más promiscuas en la re-adquisición de blancos. Es decir, globalmente cometen más errores durante la regeneración, mientras que sólo algunas *leader* presentan altos índices de cambio en comparación al momento previo al daño. Además, el 100% de las *follower* modifica el patrón de inervaciones entre los 3

y 7 dpf, por lo que ninguna establece las mismas inervaciones que presentaba previo a la neurectomía. Cabría pensar que la posición ventralizada en el cerebro posterior, soporta un rango ampliado de conexiones y no determina la posición de los neuromastos que inerva cada subtipo. Sin embargo, también cabría pensar que el sistema nervioso central ejerce una presión sobre las conexiones que se establecen en la periferia, y las pre-determina a un blanco, al menos, aproximado al original. Como propone Alexandre & Ghysen en 1999, es el sistema nervioso central el que regula, de manera general, el correcto establecimiento de las conexiones, ejerciendo una presión selectiva al refinamiento de estas. Esta teoría explicaría el hecho de que las neuronas *follower* ven afectada su sobrevida tanto en el desarrollo como en la regeneración. Y cabría pensar que la plasticidad demostrada por el subtipo *leader* es el modo en que estas intentan establecer conexiones en posiciones similares a las que poseía previo al daño. Y aquellas que reconectaron con blancos completamente errados, fueron eliminadas del sistema por la presión ejercida por el sistema nervioso central.

Al igual como se reportó en Faucherre y col., 2009, también observamos que los terminales axonales arborizados hacia las células ciliadas de los neuromastos presentaban modificaciones entre los días 3 a 7 post-desarrollo, dando cuenta de un refinamiento de los botones sinápticos. Ellos mencionan que las neuronas de la LLP siempre inervan células ciliadas de una misma polaridad. Sin embargo, como parte de este trabajo, hemos encontrado que las conexiones a neuromastos secundarios descritas en Ceci y col., 2014, son estables en el tiempo, y representan una inervación a células ciliadas de distinta polaridad. Esto ocurre sólo durante la regeneración, en un 13,3% de las neuronas *leader* y un 22,22% de las *follower*. Esto significa que neuronas que en un principio inervan células ciliadas de polaridad antero-posterior, pueden

cambiar esta disposición, mantenerla en el tiempo, y en teoría, transducir información de células ciliadas de polaridad dorso-ventral. Para confirmar la funcionalidad de estas neuronas se requiere realizar estudios de electrofisiología que demuestren la generación de potenciales eléctricos frente a un estímulo.

En la realización de este trabajo no probamos si es que una neurona mantiene el subtipo *leader* o *follower* durante el proceso regenerativo. Considerando que durante la regeneración no hay un primordio migratorio que aporte con alguna señalización que guíe a estas neuronas, podría ser el propio cono axonal el que determine la velocidad de migración, al captar moléculas repelentes y quimiotractantes que determinen su paso por el miosepto horizontal. Hasta ahora se ha visto que la principal vía de señalización por la que el primordio se mueve a lo largo del miosepto horizontal depende del receptor *cxcr4b* y su ligando *sdf-1* o *cxcl12b* (Ghysen & Dambly-Chaudière, 2007). En los mutantes para el receptor *cxcr4b* (Gilmour y col., 2004), los axones del nLLP siguen al primordio que posee defectos de migración, y se retrasan o migran de manera ectópica; por lo que el primordio es suficiente para guiar el conjunto axonal. Sin embargo se desconoce si existen otras señales presentes en el miosepto horizontal que guíen al conjunto axonal.

5.3 Muerte celular en el ganglio de Línea Lateral Posterior

Como parte de procesos de refinamiento normales durante el desarrollo, puede ocurrir eliminación de proyecciones, debido a competencia o pérdida de funcionalidad (Riccomagno & Kolodkin, 2015). Esto también ha sido visto en axones sensoriales y simpáticos, donde la "poda", viene acompañada por apoptosis de la neurona (Harrington & Ginty, 2013). Previamente se ha descrito la posibilidad de que las

neuronas de la línea lateral se eliminaban por apoptosis, ya que se perdía la marca de estas. Durante el seguimiento de neuronas únicas, *leader* y *follower*, encontramos que en algunos peces estas desaparecían, o morían. Lo que sugiere que las neuronas llevan a cabo un proceso normal de muerte celular, sea o no por apoptosis. Esto se corroboró utilizando marcaje de neurona única mediante la expresión de una proteína fotoconvertible con luz UV llamada Kaede. La expresión de esta proteína permite visualizar neuronas de distintos tipos, incluidas las de la línea lateral posterior, en ambos colores, verde y rojo, si se realiza la fotoconversión.

Al realizar el análisis de sobrevivencia pudimos observar que existía una diferencia entre la proporción de neuronas *leader* y *follower* que sobrevivían en el tiempo, tanto en la condición de neurectomía como de control. Pudimos ver que tanto durante el desarrollo, como durante la regeneración, se presentaba un porcentaje de disminución de la sobrevivencia neuronal, lo que implica que en el nervio de LLP existe un proceso de refinamiento normal de las proyecciones a medida que el pez se desarrolla, que afecta a las neuronas *follower*, no así las neuronas *leader*. Ya que las neuronas *follower* presentaron un porcentaje de mortalidad similar en ambas condiciones, la sobrevivencia de estas es independiente de la condición de neurectomía. No así para las neuronas *leader*, siendo éstas las más susceptibles a la neurectomía, presentando un 19,4% más de muerte celular durante la regeneración. Lo que implicaría que durante el desarrollo existe un proceso de refinamiento normal, y que tras un daño al nervio de LLP, son las neuronas *leader* las que pierden sus conexiones, probablemente inestables. Las neuronas *follower* serían entonces, aquellas neuronas que se seleccionan a medida que el pez crece, como producto de un refinamiento constante de las conexiones en la periferia.

6. CONCLUSIONES

- En el modelo de pez cebra se pueden realizar observaciones de neuronas únicas y en tiempo real, y observar su comportamiento durante la regeneración.
- Existen dos subtipos de neuronas en el ganglio de LLP: *leader* y *followers*, las cuales se distinguen de acuerdo a la posición en que se encuentran con respecto al primordio migratorio.
- Durante el desarrollo no se observan cambios significativos en el patrón de inervaciones adquiridas a los 3 dpf vs 7 dpf.
- Tanto neuronas *leader* como *follower* regeneran tras un daño al nervio de LLP, re-adquieren sus blancos y en cierta medida las *leader* preservan el mapa de conexiones originales. Si bien existen neuronas *leader* que varían individualmente, la población "mantiene" su rango de inervaciones.
- Las neuronas *follower* son las más promiscuas en términos de la re-adquisición de blancos sinápticos. Los cambios observados son significativos tanto a nivel individual, como poblacional.
- Tras un daño al nervio de LLP las neuronas *leader* son las más afectadas, disminuyendo alrededor de un 40% en comparación a la situación presentada durante el desarrollo. Mientras que las neuronas *follower* se ven afectadas por igual durante el desarrollo y la regeneración, presentando un fenómeno de refinamiento normal del sistema.
- El nivel de mortalidad de las neuronas *leader* es un 15% durante el desarrollo, y un 35% en la regeneración, por lo que suponemos, estarían siendo reguladas por un sistema superior como el SNC.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alexandre, D., Ghysen, A.** (1999) Somatotopy of the lateral line projection in larval zebrafish. *PNAS*. **96**:7558-7562
- Ceci, ML., Mardones-Krsulovic, C., Sánchez, M., Valdivia, L., Allende, M.** (2014) Axon-Schwann cell interaction during peripheral nerve regeneration in zebrafish larvae. *Neural Dev.* **9**:22
- Faucherre, A., Pujol-Martí, J., Kawakami, K., López-Schier, H.** (2009) Afferent neurons of the zebrafish lateral line are strict selectors of hair-cell orientation. *PLoS One*. **4**(2): e4477.
- Feldheim, D.A., and O'Leary, D.D.** (2010). Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2** a001768.
- Ghysen, A., and Dambly-Chaudière, C.** (2007) The lateral line microcosmos. *Genes Dev.* **21**:2118–2130.
- Gilmour, D., Knaut, H., Maischein, H.M., Nusslein-Volhard, C.** (2004) Towing of sensory axons by their migrating target cells *in vivo*. *Nat Neurosci.* **7**:491–492.
- Gompel, N., Dambly-Chaudière, C., Ghysen, A.** (2001) Neuronal differences prefigure somatotopy in the zebrafish lateral line. *Development.* **128**: 387-393.
- Haas, P., Gilmour, D.** (2006) Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev Cell.* **10**:673–680
- Haehnel, M., Taguchi, M., and Liao, J. C.** (2012). Heterogeneity and dynamics of lateral line afferent innervation during development in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* **520**:1376–1386.
- Harrington, A.W., Ginty, D.D.** (2013) Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**:177–87
- Nagiel, A., Andor-Ardó, D., Hudspeth, A.** (2008) Specificity of afferent synapses onto plane-polarized hair cells in the posterior lateral line of zebrafish. *J Neurosci.* **28**:8442-8453.
- Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, SR., Ullmann, B., Schilling, T.** (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**:253–310.
- Liao, J. C., and Haehnel, M.** (2012) Physiology of afferent neurons in larval zebrafish provides a functional framework for lateral line somatotopy. *J. Neurophysiol.* **107**:2615–2623.
- Lyons, D., Pogoda, H.M., Voas, M.G., Woods, I.G., Diamond, B., Nix, R., Arana, N., Jacobs, J., Talbot, W.S.** (2005) *erbb3* and *erbb2* are essential for schwann cell migration and myelination in zebrafish. *Curr Biol.* **15**:513–524.
- Moya-Díaz, J., Peña, O., Sánchez, M., Ureta, D., Reynaert, N., Anguita-Salinas, C., Marín, G., Allende, ML.** (2014) Electroablation: a method for neurectomy and localized tissue injury. *BMC Dev. Biol.* doi:10.1186/1471-213X-14-7

- Núñez, V., Sarrazin, A., Cubedo, N., Allende, M.L., Dambly-Chaudière, C., Ghysen, A.** (2009) Post-embryonic development of the posterior lateral line in the zebrafish. *Evol Dev.* **11**:391–404.
- Pujol-Martí, J., Baudoin, J. P., Faucherre, A., Kawakami, K., and López-Schier, H.** (2010) Progressive neurogenesis defines lateralis somatotopy. *Dev. Dyn.* **239**:1919–1930.
- Pujol-Martí, J and López-Schier, H.** (2013) Developmental and architectural principles of the lateral-line neural map. *Front. Neural Circuits* **7**:13 doi: 10.3389/fncir.2013.00047
- Pujol-Martí, J., Zecca, A., Baudoin, J.P., Faucherre, A., Asakawa, K., Kawakami, K.** (2012) Neuronal birth order identifies a dimorphic sensorineural map. *J. Neurosci.* **32**:2976–2987.
- Riccomagno, M.M., and Kolodkin, A.M.** (2015) Sculpting neural circuits by axon and dendrite pruning. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **31**:779-805
- Sarrazín, A. F., Nunez, V. A., Sapede, D., Tassin, V., Dambly-Chaudière, C., Ghysen, A.** (2010) Origin and early development of the posterior lateral line system of zebrafish. *J. Neurosci.* **30**:8234–8244.
- Sato, A., Koshida, S., Takeda, H.** (2010) Single-cell analysis of somatotopic map formation in the zebrafish lateral line system. *Dev. Dyn.* **239(7)**: 2058-2065.
- Sato, A., and Takeda, H.** (2013) Neuronal subtypes are specified by the level of neurod expression in the zebrafish lateral line. *J. Neurosci.* **33**:556–562.
- Schmidt, R., Strähle, U., Scholpp, S.** (2013) Neurogenesis in zebrafish—from embryo to adult. *Neural Dev.* **8**:3
- Villegas, R., Martín, S.M., O'Donnell, K.C., Carrillo, S.A., Sagasti, A., Allende, M.L.** (2012) Dynamics of degeneration and regeneration in developing zebrafish peripheral axon reveals requirement for extrinsic cell types. *Neural Dev.* **8**:7-19.
- Wanner, I.B., Deik, A., Torres, M., Rosendahl, A., Neary, J.T., Lemmon, V.P., Bixby, J.L.** (2008) A new in vitro model of the glial scar inhibits axon growth. *Glia* **56**:1691–1709.
- Whitlock, K.E and Westerfield, M.** (1998) A transient population of neurons pioneers the olfactory pathway in the zebrafish. *J Neurosci* **18**:8919–8927.