

UCH-FC  
DOC - BMCM  
S 210  
C.1



**FUNCIÓN DE *ath1a*, *neuroD* Y LOS GENES DE LA FAMILIA  
*soxB1* EN LA DIFERENCIACIÓN Y REGENERACIÓN DE LA  
LÍNEA LATERAL DE PEZ CEBRA**

Tesis entregada A La Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular Y**

**Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

**Pablo Andrés Sandoval Concha**

Enero, 2010

**Director de Tesis:**

**Dr. Miguel L. Allende**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO**

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

**Pablo Andrés Sandoval Concha**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 19 de Enero del 2010

**Director de Tesis:**

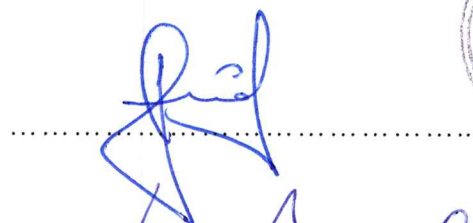
Dr. Miguel L. Allende



.....

**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

Dr. Juan Larrain



.....



Dr. Juan Bacigalupo



.....

Dra. Verónica Cambiazo

.....

Dra. Verónica Palma



.....



*A mi esposa Ginny y nuestras hijas Isidora y Valentina*



Pablo Andrés Sandoval Concha, nació en Santiago de Chile el día 20 de Julio de 1979. Terminó sus estudios de enseñanza media en Rancagua y posteriormente ingresa a la Pontificia Universidad Católica de Chile para estudiar Biología en el año 1998. Comienza sus estudios en investigación en los laboratorios del Dr. Enrique Brandan y de la Dra. Alejandra Alvarez. Una vez obtenida su licenciatura en Cs. Biológicas, ingresa al Doctorado en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias en la Universidad de Chile en el año 2004. Realiza su tesis en el laboratorio del Dr. Miguel Allende.

Mientras desarrolla su doctorado, sus aspiraciones familiares lo llevan a contraer matrimonio con Ginny Farías y tener 2 hermosas hijas: Isidora y Valentina.

## AGRADECIMIENTOS



Son tantas las personas a las que debo agradecer por haber alcanzado esta meta, no tan solo por el apoyo en la realización de mi tesis, sino también por el amor, cariño, amistad, apoyo, fortaleza y comprensión que me brindaron a lo largo de esta tesis.

En primer lugar, agradezco al Dr. Miguel Allende por haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio. Por todos sus consejos, sus críticas, por las constantes discusiones científica. Pero principalmente quisiera agradecerle por todo su apoyo, y por todo lo que me ha enseñado tanto en lo profesional como en lo personal. Gracias.

Al Dr. Alain Ghysen por la valiosa colaboración en la realización de parte de esta tesis.

Al jurado evaluador, Dres. Juan Larrain, Juan Bacigalupo, Verónica Cambiazo y Verónica Palma, por sus valiosos comentarios y sugerencias acerca del planteamiento, la ejecución y la discusión de este trabajo.

Esta tesis doctoral, se llevó a cabo junto con la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré:

A Andrés Sarrazin y Carmen Gloria Feijoo por haberme enseñado muchas de las técnicas que he utilizado en el desarrollo de esta tesis.

A Catalina Lafurcade por su ayuda, paciencia y buena disposición para ayudarme en el soporte técnico y por su amistad.

A Cristian Undurraga, Leonardo Valdivia, Rosario Villegas, Pedro Hernández, Viviana Gallardo quienes participaron activamente en distintos aspectos de la ejecución y discusión de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio que de alguna u otra forma contribuyeron en el desarrollo de esta tesis.

A MECESUP, Instituto Milenio y beca de Posgrado de la Universidad de Chile por sus beca de manutención y excepción de matrícula durante mi doctorado.

A ECOS-CONICYT y EMBO long-term fellowship por sus financiamientos para mis estadías en el extranjero.

Principalmente agradezco a mis padres Ricardo Sandoval y María Julia Concha por su apoyo incondicional y cariño.



<b>INDICE DE MATERIAS</b> .....	iv
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>INDICES DE TABLAS</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
I. 1. La línea lateral .....	1
I. 2. Formación de la línea lateral .....	2
I. 2. 1. Origen placodal.....	2
I. 2. 2. Migración de precursores de la LLP .....	5
I. 2. 3. Depósito de proneuromastos .....	8
I. 2. 4. Diferenciación celular en el neuromasto .....	9
I. 3. Regeneración de las células ciliadas de la línea lateral .....	12
I. 4. Los factores de transcripción <i>ath1a</i> , <i>neuroD</i> , <i>sox2</i> y <i>sox3</i> : ¿Reguladores de la diferenciación celular de la línea lateral? .....	14
I. 5. Regeneración: ¿Una recapitulación de la diferenciación ocurrida en el desarrollo? .....	16
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	17
III. 1. Objetivos generales .....	17
III. 2. Objetivos específicos .....	17

<b>IV. MATERIALES</b> .....	18
IV.1. Material Biológico .....	18
IV. 2. Reactivos para Biología Molecular y otros .....	19
IV. 3. Soluciones.....	23
<b>V. MÉTODOS</b> .....	24
V.1. Mantenición de los peces y recolección de embriones .....	24
V.2. Microinyección de embriones .....	25
V.3. Síntesis de sondas e hibridación in situ en embrión completo .....	25
V.4. Inmunohistoquímica en embrión completo .....	28
V.5. Construcción de vectores de expresión y morfolinós .....	29
V.6. Marcación de células y microscopía .....	30
V.7. Electroporación de morfolinós .....	31
V.8. Análisis estadísticos .....	32
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	35
VI.1. <i>ath1a</i> induce la diferenciación de células de soporte a células ciliadas en la línea lateral de pez cebra. ....	35
VI.2. <i>ath1a</i> induce la expresión de <i>neuroD</i> durante la diferenciación de las células ciliadas. ....	38
VI.3. Caracterización de genes involucrados en la diferenciación de las células de la línea lateral.....	42
VI.4. Los genes <i>soxB1</i> son necesarios para la formación de la línea lateral de pez cebra.....	46
VI.4.1. Pérdida de función de los genes <i>sox</i> afecta el número y distribución de los neuromastos durante el desarrollo.....	46

VI.4.2. <i>Sox3</i> es necesario para la organización de las células del neuromasto .....	54
VI.4.3. Neuromastos de los morfantes <i>sox</i> poseen un menor número de células ciliadas .....	58
VI.5. Los genes <i>soxB1</i> regulan la neurogénesis en el primordio migratorio .....	61
VI.6. La secuencia temporal de expresión de genes embrionarios, importantes para la diferenciación de las células ciliadas, es recapitulada durante la regeneración de ellas.....	65
VI.7. <i>sox2</i> y <i>sox3</i> participan en la regeneración de las células ciliadas de los neuromastos .....	70
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	76
VII.1. <i>ath1a</i> induce la diferenciación a células ciliadas. ....	77
VII. 2. Jerarquías de regulación en la diferenciación de las células ciliadas.....	79
VII. 3. Genes <i>sox2</i> y <i>sox3</i> poseen funciones diferentes en el desarrollo de la línea lateral de pez cebra.....	80
VII. 4. Efectos de la falta de función de los genes <i>soxB1</i> sobre el número de células ciliadas en los neuromastos de la línea lateral .....	82
VII. 5. Depósito concentrado y posteriorizado de los neuromastos en dobles morfantes <i>sox</i> .....	84
VII. 6. Pérdida de función de <i>sox3</i> afecta la cohesión de las células del neuromasto induciendo su migración .....	85
VII. 7. Dinámica de re-expresión de <i>eya1</i> , <i>ath1a</i> y <i>sox2</i> durante la regeneración de las células ciliadas de los neuromastos. ¿Una recapitulación de lo ocurrido en el desarrollo o un proceso independiente? .....	86





VII. 8. Papel fundamental de <i>sox2</i> y <i>sox3</i> en la regeneración de las células ciliadas .....	87
VII. 9. Modelos propuestos de la participación de los genes <i>sox</i> y <i>ath1a</i> en la formación y regeneración de la línea lateral .....	90
<b>VIII. RESUMEN DE RESULTADOS</b> .....	96
<b>IX. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	98
<b>X. REFERENCIAS</b> .....	99



## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Modelo de la cascada génica que estaría regulando la diferenciación de las placodas neurogénicas .....	4
<b>Fig. 2.</b> Conexiones neuronales de los neuromastos de la línea lateral de pez cebra ....	7
<b>Fig. 3.</b> Los genes proneurales <i>ath1a</i> y <i>neuroD</i> afectan la formación de las células ciliadas de la línea lateral .....	11
<b>Fig. 4.</b> Sobre-expresión de <i>ath1a</i> induce diferenciación celular en neuromastos de la línea lateral .....	37
<b>Fig. 5.</b> La sobre-expresión de <i>ath1a</i> induce la expresión de <i>neuroD</i> .....	41
<b>Fig. 6.</b> Expresión de distintos genes relacionados con diferenciación en el primordio de la línea lateral. ....	44
<b>Fig. 7.</b> Expresión de distintos genes relacionados con diferenciación en los neuromastos de la línea lateral .....	45
<b>Fig. 8.</b> La pérdida de <i>sox2</i> genera fenotipos de disminución del número de neuromastos, efecto dependiente de la dosis de morfolino inyectada.....	48
<b>Fig. 9.</b> La inyección de un dominante negativo (Dn) de <i>sox2</i> genera fenotipos equivalentes a los generados mediante la inyección del morfolino de <i>sox2</i> .....	50
<b>Fig. 10.</b> El depósito normal de los neuromastos de la línea lateral requiere de al menos un gen <i>sox</i> de la familia B1 .....	52
<b>Fig. 11.</b> La pérdida de función de <i>sox2</i> y <i>sox3</i> provoca un depósito posteriorizado de los neuromastos.....	53

<b>Fig. 12.</b> Embriones inyectados con <i>MO-sox2</i> y/o <i>MO-sox3</i> presentan anomalías en la morfología de sus neuromastos.....	55
<b>Fig. 13.</b> Embriones inyectados con <i>MO-sox2</i> y <i>MO-sox3</i> presentan anomalías en el número y distribución de las células ciliadas funcionales de los neuromastos.....	56
<b>Fig. 14.</b> La pérdida de función de <i>sox3</i> produce desorganización en las células del neuromasto.....	57
<b>Fig. 15.</b> Pérdida de función de <i>sox</i> afecta el número de células ciliadas de los neuromastos.....	59
<b>Fig. 16.</b> La pérdida de función de <i>sox2</i> elimina la expresión de marcadores de diferenciación de células ciliadas.....	63
<b>Fig. 17.</b> La pérdida de función de <i>sox2</i> y <i>sox3</i> ( <i>MO sox2/sox3</i> ) modifica la expresión de <i>notch3</i> .....	64
<b>Fig. 18.</b> La expresión de <i>eyal</i> y <i>ath1a</i> son inducidas en neuromastos durante la regeneración.....	67
<b>Fig. 19.</b> Expresión de <i>sox2</i> durante la regeneración.....	68
<b>Fig. 20.</b> Células carentes de <i>sox2</i> o <i>sox3</i> no regeneran normalmente en transgénicos <i>claudinB</i> .....	72
<b>Fig. 21.</b> Células carentes de <i>sox2</i> y/o <i>sox3</i> no regeneran normalmente en transgénicos <i>sqET-20</i> .....	73
<b>Fig. 22.</b> <i>sox2</i> y <i>sox3</i> son requeridos para el aumento del número de células en neuromastos en regeneración.....	74
<b>Fig. 23.</b> Modelo de dinámica de expresión de los genes <i>sox</i> , la vía <i>notch/delta</i> y <i>ath1a</i> en la formación de pro-neuromastos y el depósito de neuromastos.....	91

**Fig. 24.** Modelo de la dinámica de expresión de los genes *soxB1*, la vía *notch* y *ath1a* en el proceso de regeneración de los neuromastos de la línea lateral..... 94

**Fig. ANEXO 1.** Esquema del sistema de micro-electroporación de pez cebra ..... 109

### ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Sondas utilizadas para hibridación *in situ*..... 27

**Tabla 2.** Experimentos de rescate en embriones de pez cebra..... 40

**Tabla 3.** Embriones inyectados con MO-*sox2* y MO-*sox3* presentan anomalías en el número de células ciliadas funcionales por neuromasto. .... 60

## RESUMEN

El sistema nervioso de los vertebrados consta de una gran variedad de tipos celulares, que provienen de progenitores multi-potentes. Una pregunta fundamental en neurobiología del desarrollo es comprender los mecanismos moleculares por los cuales esta gran diversidad se genera en la embriogénesis. La diferenciación es el proceso por el cual células indiferenciadas adquieren especificidad a través de una particular combinación de expresión de genes. Las células ciliadas del sistema auditivo son un ejemplo de células altamente diferenciadas del sistema nervioso; estas células tienen una función mecanoreceptora y su estructura está conservada en los vertebrados. Mientras que en todos los vertebrados estas células se encuentran en el oído interno, en peces y anfibios estas células además se encuentran en otro sistema sensorial denominado línea lateral, el cuál responde a movimientos y cambios de presión en el agua.

La línea lateral del pez cebra es un sistema particularmente atractivo para estudiar el proceso de diferenciación de las células ciliadas. Estas se encuentran en una serie de órganos superficiales llamados neuromastos formados por sólo tres tipos celulares: las células ciliadas, las de soporte y las del manto. A diferencia de lo que ocurre con las células ciliadas del oído de mamíferos, las de peces sufren un constante recambio, y además pueden regenerar luego de un daño.

La hipótesis de esta tesis, es que los genes que participan en el proceso de diferenciación inicial de las células ciliadas de la línea lateral del pez cebra, están también presentes y cumplen las mismas funciones en su proceso de regeneración. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es caracterizar genes importantes para el proceso de diferenciación durante el

desarrollo y durante el proceso de regeneración de las células ciliadas de la línea lateral del pez cebra.

Encontramos que los genes *neuroD*, *ath1*, *sox2* y *sox3* se expresan durante el desarrollo normal y durante el proceso de regeneración de la línea lateral de pez cebra. Ensayos de ganancia y pérdida de función indican que *ath1a* y *neuroD* son requeridos y suficientes para inducir la diferenciación de las células ciliadas durante el desarrollo, siendo la expresión de estos genes regulada por los genes *sox2* y *sox3*. Además, a través de ensayos de pérdida de función de *sox2* y *sox3*, encontramos que estos genes son requeridos para la normal formación de los tipos celulares del neuromasto.

Por otra parte, estudiamos la expresión y función de estos genes en el proceso de regeneración de las células ciliadas. Se determinó que todos estos genes se expresan en el proceso de regeneración celular de la línea lateral, controlando la diferenciación celular. *ath1a* controla la diferenciación de las células ciliadas y ambos genes *sox* son requeridos para la regeneración de todos los tipos celulares presentes en el neuromasto. Estos resultados sugieren una recapitulación de la expresión y función de diferentes genes en el proceso de diferenciación tanto en el desarrollo como en la regeneración de las células de la línea lateral de pez cebra.

## ABSTRACT

The vertebrate nervous system is comprised of a vast variety of cellular types, which arise from multipotent progenitors. A fundamental question in developmental neurobiology is to understand the molecular mechanisms by which this vast diversity is generated in embryogenesis. Differentiation is the process by which undifferentiated cells acquire specificity through a particular combination of gene expression. The hair cells of the auditory system are an example of a highly differentiated cell in the nervous system; these cells have a mechano-receptor function and their structure is conserved among vertebrates. While in all vertebrates these cells are found in the inner ear, in fish and amphibians these cells are also present in another sensory system called the lateral line, which responds to movements and pressure changes in the water. The zebrafish lateral line is particularly attractive for studying the differentiation process that the hair cells undergo. Lateral line hair cells reside in superficial organs called neuromasts formed by only three cell types: hair cells, supporting cells and mantle cells. Unlike what happens with the hair cells of the mammalian inner ear, hair cells in fish undergo a constant turnover, and also can regenerate after damage.

The hypothesis of this thesis is that the genes involved in the initial differentiation process of the hair cells of the zebrafish lateral line, are also present and have the same functions during the regeneration process. Therefore, the objective of this study is to characterize genes relevant for the differentiation process during development and regeneration of the lateral line hair cells in the zebrafish. We have found that *neuroD*, *ath1a*, *sox2* and *sox3* genes are expressed both during normal development and during the regeneration process

of the zebrafish lateral line. Gain and loss of function assays indicate that *ath1a* and *neuroD* are required and sufficient to induce hair cell differentiation during development, and that these genes are regulated by the *sox2* and *sox3* genes. Moreover, through loss of function analysis of *sox2* and *sox3*, we found that these genes are required for the normal formation of the cell types of the neuromast.

On the other hand, we studied the expression and function of these genes during hair cell regeneration. It was determined that all of these genes are expressed in the regeneration process of the lateral line, controlling cell differentiation. *ath1a* controls the differentiation of the hair cells while both *sox* genes are required for the regeneration of all cell types present in the neuromast. These results suggest a recapitulation of the expression and function of different genes in the differentiation process in both development and regeneration of the lateral line cells of the zebrafish.



## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1 La Línea Lateral**

Los peces, así como también algunos anfibios, poseen un sistema sensorial conocido como línea lateral, que les permite detectar movimientos del agua en torno a su cuerpo. La línea lateral corresponde a un sistema mecanosensorial propio de peces y anfibios acuáticos, usado para detectar estimulación hidrodinámica del cuerpo (Baker y Bronner-Fraser, 2001), con el cual el animal percibe movimientos del agua a un cuerpo de distancia. Se le asocia a respuestas conductuales que van desde la detección de potenciales presas, reconocimiento de pareja sexual, conducta de escuela o cardumen hasta la posibilidad de esquivar obstáculos y predadores. Los órganos funcionales de la línea lateral son llamados neuromastos y están compuestos por células ciliadas y células accesorias de al menos dos tipos: de soporte, que rodean a las células ciliadas y del manto, que bordean externamente al neuromasto (Metcalfé y cols., 1985; Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004). La disposición de cada órgano individual es conservada entre los individuos de una misma especie, manteniendo un patrón especie-específico. Las células ciliadas de la línea lateral son homólogas a las presentes en los oídos de todos los vertebrados, pero poseen la particularidad de estar expuestas al medio en la superficie de la piel y mantienen una capacidad regenerativa durante toda la vida del individuo.

El mecanismo mecanorreceptor de cada célula ciliada involucra la disposición apical de un grupo de microvellosidades (estereocilio) y un único kinocilio, en conjunto

conocidos como haz de cilios; (Kroese y van Netten, 1989; Popper y Platt, 1993). Las señales captadas por las células ciliadas son proyectadas hacia el sistema nervioso central (SNC) a través de neuronas sensoriales aferentes y eferentes, que las inervan. Éstas poseen sus cuerpos celulares en ganglios craneales y sus axones en el romboencéfalo (aferentes y eferentes inhibitorias) y en el cerebro anterior (eferentes excitatorias (McCormick, 1989).

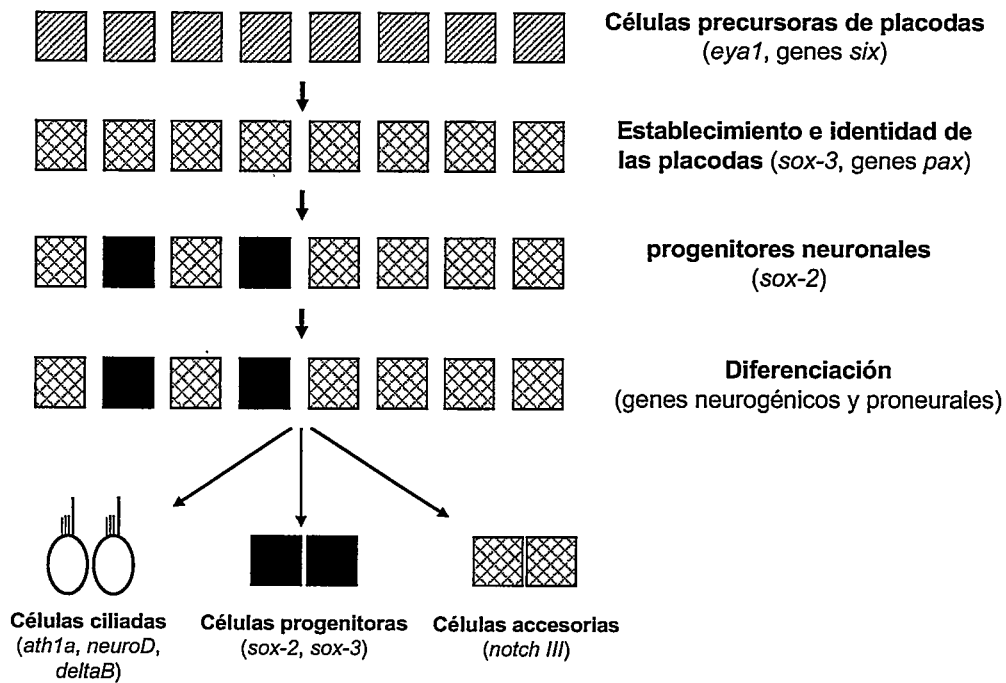
## **I.2. Formación de la línea lateral**

### **I.2.1. Origen placodal**

Las placodas son estructuras embrionarias transitorias ubicadas exclusivamente en la cabeza de los vertebrados (Graham y Begbie, 2000; Schlosser y Northcutt, 2000, 2001; Baker y Bronner-Fraser, 2001). Dan origen a las neuronas sensoriales (que formarán los ganglios craneales) y en algunos casos a las células receptoras de los sistemas sensoriales. El sistema de la línea lateral se origina a partir de un grupo de placodas presente únicamente en peces y anfibios (placodas dorso-laterales), ubicadas a ambos lados (rostral y caudal) de la vesícula ótica. La placoda pre-ótica dará lugar a la componente anterior de la línea lateral y la placoda post-ótica a la componente posterior de la línea lateral (Northcutt y cols., 1994; Baker y Bronner-Fraser, 2001). La porción distal (con respecto a la vesícula ótica) de cada placoda migrará (primordio de la línea lateral) y formará los órganos receptores (neuromastos), mientras la parte estática más proximal dará origen a los ganglios de la línea lateral.

Temprano en el desarrollo (de 1 a 10 somitos), las placodas comienzan a formarse a partir del ectodermo anterior, del cual derivan todas las placodas ectodermales, incluyendo la de la línea lateral (Baker y Bronner-Fraser, 2001; Brugmann y Moody, 2005). En peces, los factores de transcripción *six4.1* y *eya1*, se expresan en un dominio con forma de herradura característicamente pre-placodal, que se restringe progresivamente a las placodas olfatoria, hipofisial, ótica y de la línea lateral (Kobayashi y cols., 2000; Sahly y cols., 1999). En medaka (*Oryzias latipes*), el gen *sox3* se expresa en el territorio pre-placodal presuntivo y posteriormente en todas las placodas ectodermales (Köster y cols., 2000), sugiriendo una función de este gen en la definición de las placodas.

En lo que concierne a la expresión de genes en el territorio placodal, se conocen algunos como *dlx3*, *six4.1*, *eya1*, *msx2*, *hoxb3* (Metscher y cols., 1997), *dachshundB* (Hammond y cols., 2002), *nkx5.1* (Adamska y cols., 2000) y *sox3* (Nikaido y cols., 2007), los cuales determinan las placoda. En pez cebra, los factores de transcripción *dlx3*, *six4.1* y *eya1* se expresan, hacia el final de la gastrulación, en una banda con forma de herradura que rodea la placa neural anterior y que corresponde a las células que formarán las placodas craneales (células precursoras placoidales, **Fig. 1**). Durante la somitogénesis, *six4.1* y *eya1* restringen su expresión a las placodas olfatoria, ótica y de la línea lateral LL y en estadios posteriores mantiene esta expresión en los neuromastos de la línea lateral anterior LLA y posterior LLP. El gen *sox3* mantiene su expresión en todos los componentes de la línea lateral, incluidos las placodas, primordio migratorio y neuromastos durante el desarrollo controlando la neurogénesis y *stem cell* neurales. (**Fig. 1**) (Schlosser y cols., 2008). El gen *nkx5.1* por su parte, se



**Figura 1: Modelo de la cascada génica que estaría regulando la diferenciación de las placodas neurogénicas:** Primero, el ectodermo pre-placodal indiferenciado, el cual posee las células precursoras placodales, expresa los genes *six*. Luego, la expresión de genes *sox* define un sub-grupo de las células de la placoda en *stem cells* neurales. Mas adelante en el desarrollo, la expresión de diferentes genes *pax* define la identidad de las diferentes placodas. Una vez que la diferenciación se inicia, los progenitores neuronales comienzan a expresar genes neurogénicos y pro-neurales como neurogenina (*ngn*). Finalmente la expresión de genes pro-neurales como *neuroD* y atonal (*ath*) definen los precursores de los diferentes tipos neuronales e inducen su diferenciación.

expresa desde muy temprano (4 somitos) en las placodas de la línea lateral, previo a su expresión en la placoda ótica. Posteriormente se expresa en la vesícula ótica y en el primordio migratorio anterior y posterior, pero no así en los neuromastos de la línea lateral. Ya que *sox3*, *eya1*, *six4.1* y *nkx5.1* son genes que se expresan en las placodas y continúan su expresión en el primordio en movimiento e incluso en los neuromastos, estos antecedentes nos sugieren la participación de ellos en el proceso de diferenciación de las células de la línea lateral (Schlosser 2006).

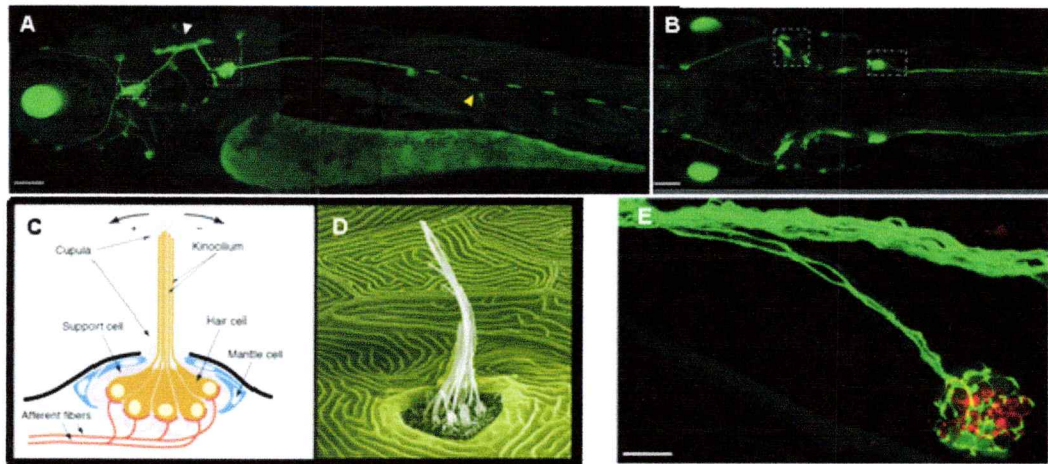
## **I.2.2 Migración de precursores de la LLP**

A partir de las placodas de la línea lateral un grupo de células comienza a migrar hacia posterior a través del mioseptum horizontal<sup>1</sup> coincidiendo con el comienzo de la expresión de genes involucrados en migración, adhesión y diferenciación celular. La migración del primordio es completamente dependiente de la interacción de los dos receptores de quimioquinas CXCR4b y CXCR7b y su ligando, SDF1a (factor derivado del estroma 1a, o actualmente llamado CXCL12), este último es expresado en el mioseptum horizontal, a lo largo de todo el trayecto que sigue el primordio (David y cols., 2002; Chong y cols., 2001). La migración del primordio es dirigida por las interacciones diferenciales entre estos receptores de quimioquinas con su ligando generándose un movimiento neto del primordio gracias a la expresión

---

<sup>1</sup> Partición del tejido conectivo que se forma entre los miótomos y que separa los cuerpos musculares dorsal y ventral.

diferencial de ellos. CXCR4b se expresa y actúa sólo en las células guía del primordio (de vanguardia), dirigiendo la migración del primordio. CXCR7 por el contrario, posee una expresión complementaria a CXCR4b, es decir en el grupo posterior de células del primordio, secuestrando el ligando e impidiendo la retro-migración de estas células (Gompel y cols., 2001; Haas y Gilmour, 2006). Hacia el final de la somitogénesis, aproximadamente a las 20 horas post-fertilización (hpf), el primordio de la línea lateral posterior contiene aproximadamente 100 células, alrededor de 4-5 células de ancho y 20-25 células de largo. En este momento el primordio comienza a migrar caudalmente a lo largo del mioseptum horizontal. En forma paralela, el ganglio de la línea lateral posterior, que se encuentra entre la vesícula ótica y el primordio, comienza a extender sus axones hacia el cerebro posterior (proyección central) y hacia el primordio migratorio (proyección periférica), con el que mantiene una estrecha relación a lo largo de todo el trayecto (los conos de crecimiento sensoriales son arrastrados por el primordio; Gilmour y cols., 2004). Durante su migración, el primordio va depositando grupos de células denominados pro-neuromastos sin detener su marcha (David y cols., 2002). El primordio deposita alrededor de 5 grupos de células indiferenciadas (pro-neuromastos L1-L5) sobre el mioseptum horizontal del tronco del embrión (a intervalos regulares de 5-6 somitos) y se divide en 2-3 grupos de células en posiciones más ventrales (pro-neuromastos L6-L8), una vez que ha alcanzado el final de la cola (alrededor de las 40-42 hpf) (Fig. 2)



**Figura 2. Conexiones neuronales de los neuromastos de la línea lateral de pez cebra:** (A, B, E), patrón de expresión de GFP en peces transgénicos (HGn39D-GFP) de 4 días post fertilización, que expresan GFP en las neuronas aferentes en la línea lateral. Vista lateral (A) y superior (B) están representados. Blanco y amarillo, puntas de flechas apuntan a las proyecciones de las neuronas al cerebro posterior y al neuromasto respectivamente. Los marcos discontinuos indican los ganglios de la línea lateral en A y B (Faucherre A y cols. 2009). (C) esquema de un neuromasto ilustrando los diferentes tipos celulares que lo componen y su organización. (Ghysen and Dambly-Chaudiere, 2004). (D) células ciliadas de un neuromasto en la superficie de la piel de una larva de pez cebra. (Portada Neuron, Berger J, Febrero 1998). (E) proyección de un neuromasto inmunomarcado con anticuerpos anti-HCS1 (rojo) innervado por neuronas aferentes del transgénico HGn39D-GFP. (Faucherre A y cols. 2009)

### **I.2.3. Depósito de proneuromastos**

El depósito de los neuromastos de la línea lateral es producto de un proceso de partición intrínseco del primordio (Gompel y cols., 2001; Itoh y Chitnis, 2001) y parece depender de la activación de genes proneurales y neurogénicos de una manera que recuerda la formación de los órganos mecano-sensoriales en insectos (Itoh y Chitnis, 2001; Ghysen, 2003) (**Fig. 1**)

El clásico modelo descrito para neurogénesis ocurre mediante el proceso de inhibición lateral, en el cuál unas pocas células centrales de un "parche" sensorial adopta el destino de precursor sensorial, mientras el resto adquiere por defecto el destino epidermal. En esta etapa, los genes proneurales inhiben su propia expresión en células vecinas activando la vía de señalización de Notch en ellas. Delta, el ligando de Notch, se expresa en la membrana de la célula que adoptará el destino neuronal y se unirá a su receptor en la célula vecina, activando la expresión de represores que regulan negativamente la expresión del gen pro-neural, refinando así el patrón inicial de grupos de células potencialmente neuronales a una o dos células que posteriormente se diferenciarán en neuronas (Itoh y Chitnis, 2001).

En peces, la expresión de los genes pro-neurales (*ath1a* y *neuroD*) y neurogénicos (*notch* y *delta*) ha sido descrita durante la migración del primordio (Itoh y Chitnis, 2001), sugiriendo que las células ciliadas pueden ser especificadas antes de posicionarse definitivamente. Los patrones de expresión de los genes antes mencionados parecen prefigurar la formación del neuromasto antes de su depósito e



incluso se evidencian las distintas identidades celulares del neuromasto dentro del primordio.

Una vez que el futuro neuromasto ya está definido a través de la expresión local de los genes pro-neurales, se escinde del primordio, y eventualmente se detiene y completa su diferenciación. Esta maduración en secuencia de los pro-neuromastos por depositarse y la escisión del primordio evidencian una intensa actividad cíclica de determinación y diferenciación celular, horas antes del depósito (Gompel y cols., 2001).

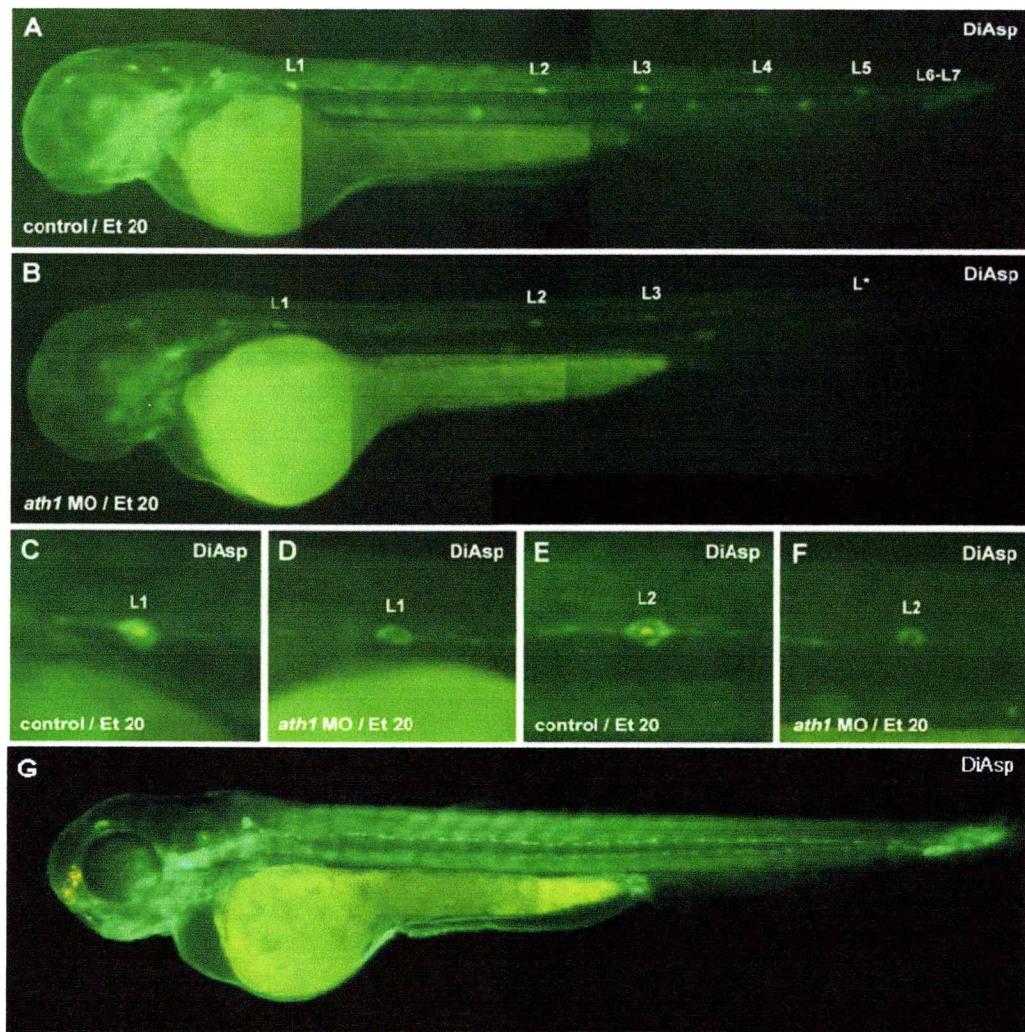
Un par de horas después del depósito de un proneuromasto, es posible apreciar morfológicamente el haz de cilios de las células ciliadas, las cuales irán aumentando progresivamente en número en estadios posteriores (Metcalf y cols., 1985; Gompel y cols., 2001). En el pez cebra existe un gran número de líneas transgénicas que permiten detectar mediante visualización de GFP, *in vivo*, los diversos tipos celulares diferenciados de los neuromastos (ver por ejemplo, Sarrazin y cols., 2006; Hernández y cols., 2007). Con ellos, ha sido posible seguir el desarrollo temporal de este sistema mecanosensor, el cuál es funcional tres días después de la fecundación.

#### **I.2.4. Diferenciación celular en el neuromasto.**

La restricción progresiva de la expresión de los genes pro-neurales y neurogénicos en el primordio se correlaciona directamente con la selección de los tipos celulares que formarán el neuromasto maduro (Itoh y Chitnis, 2001).

*ath1a*, *deltaB* y *neuroD* se expresan en las células centrales del neuromasto presumiblemente en las futuras células ciliadas. *ath1a* ha sido involucrado directamente con la diferenciación de las células ciliadas, ya que en experimentos de sobre-expresión del gen vía adeno-virus se logró inducir nuevas células ciliadas en el oído interno de mamíferos (Kawamoto y cols., 2003; Shou y cols., 2003), posicionándolo como gen clave de la diferenciación de las células ciliadas. Por otro lado, *deltaB* ha sido descrito como el gen que controla la expresión de genes proneurales en el primordio manteniendo este control incluso en neuromastos depositados (Ito y Chitnis, 2001). En nuestro laboratorio se ha observado que *neuroD* también se expresa en estas células centrales del neuromasto. Además se ha determinado, mediante el uso de inhibidores antisentido de la traducción (morfolinos MO), que los genes pro-neurales *ath1a* y *neuroD* son requeridos para el desarrollo normal de la línea lateral, ya que los morfantes para estos genes presentan neuromastos aberrantes carentes de células ciliadas funcionales, sugiriendo su participación en la diferenciación de estas células (Sarrazin y cols., 2006) e incluso afectando el número de neuromastos (Fig. 3).

Por otra parte, las células accesorias están definidas por la expresión en los pro-neuromastos de los genes *notch3*, *sox2* y *sox3*, que se restringen a estos tipos celulares excluyéndose de las células centrales y que, por lo tanto, podrían estar controlando la diferenciación de las células accesorias. Estos genes se expresan inicialmente en todas las células del neuromasto y se van restringiendo a las células periféricas de los pro-neuromastos. *sox3* se expresa temporalmente desde la definición de las placodas hasta el neuromasto completamente diferenciado incluyendo la etapa de primordio migratorio, y *sox2* se comienza a expresarse al inicio de la migración del primordio



**Figura 3. Los genes proneurales *ath1a* y *neuroD* afectan la formación de las células ciliadas de la línea lateral. (A–G)** Larvas transgénicas Et 20 control o morfantes (*ath1a* MO o *neuroD* MO) fueron incubadas con DiAsp y visualizadas en microscopio de fluorescencia, permitiendo la visualización simultánea de GFP en células del manto (verde) y DiAsp que marca las células ciliadas funcionales (amarillo). **(B)** Larva morfante *ath1a* presenta un número inferior de neuromastos depositados. **(C, F)** Vista ampliada de los neuromastos L1 y L2 de larvas control y de larvas morfantes de *ath1a* **(D, F)** se observa la ausencia de células ciliadas funcionales en los morfantes de *ath1a*. **(G)** Vista lateral de una larva transgénica Et 20 inyectada con *neuroD* MO en la que se observa una completa ausencia de células ciliadas funcionales y e incluso de células del manto (Sarrazin y cols., 2006).

y mantiene su expresión en los neuromastos diferenciados. Los genes *sox* han sido relacionados a procesos de diferenciación celular, mantención de progenitores, e incluso migración celular, posicionándolos como candidatos importantes en la diferenciación de las células accesorias y/o la mantención de progenitores en neuromastos diferenciados.

### **I.3. Regeneración de las células ciliadas de la línea lateral**

En la mayoría de los mamíferos las células ciliadas no son reemplazadas, pero en peces, anfibios y aves las células ciliadas regeneran constantemente durante la vida del individuo (Swanson, 1988). En peces, las células ciliadas de la línea lateral están expuestas al medio ambiente y son permeables y sensibles a moléculas presentes en el agua. Las células ciliadas mueren debido a traumas acústicos, daños inducidos por drogas, edad, o exposición a metales pesados.

Diversos protocolos experimentales se han desarrollado para inducir daño a las células ciliadas y producir su muerte y regeneración. Alguno de estos son: la incubación con aminoglicósidos, antibióticos, o metales, que producen la pérdida temporal de las células ciliadas en neuromastos y su posterior reaparición después de un breve periodo de tiempo. La regeneración de las células ciliadas en la línea lateral provee una oportunidad de estudiar la especificación y diferenciación de ellas, permitiendo a su vez conocer la naturaleza de la población de sus precursores

(Williams y Holder, 2000; Harris y cols., 2003; Murakami y cols., 2003; Hernández y cols., 2007).

Mediante exposición con distintas concentraciones de cobre se puede inducir la muerte celular de los distintos tipos celulares de los neuromastos de la línea lateral, lo que permite una instancia para observar la regeneración de estas células a distintas magnitudes de daño. Exposición a bajas concentraciones de cobre (1  $\mu\text{M}$ ) por dos horas afecta sólo a las células ciliadas de los neuromastos, y éstas regeneran en menos de 48 h sin ocurrir división celular en el proceso. A mayores concentraciones (10  $\mu\text{M}$ , por dos horas) las células ciliadas regeneran con mayor lentitud y se requiere división celular para alcanzar una regeneración completa. Finalmente, exposición a 50  $\mu\text{M}$  de cobre por dos horas lleva a una inhibición permanente de la regeneración. Este comportamiento celular frente al daño con cobre se correlaciona con la pérdida de distintas poblaciones celulares de los neuromastos con las distintas concentraciones, tal que, en las concentraciones mas bajas de cobre se pierden sólo las células ciliadas activas, a concentraciones medias (10  $\mu\text{M}$ ) todas las células ciliadas y parcialmente las del manto, y finalmente, con altas concentraciones de cobre de 50  $\mu\text{M}$  o más, se pierden todas las células de los neuromastos (Hernández y cols., 2007)..

Estos resultados sugieren la presencia de progenitores ubicados en el neuromasto que son sensibles sólo a altas concentraciones de cobre. Se ha propuesto que estas células progenitoras serían las células de soporte (Hernández y cols., 2007).

#### **I.4. Los factores de transcripción *ath1a*, *neuroD*, *sox2* y *sox3*:**

##### **¿Reguladores de la diferenciación celular de la línea lateral?**

Se han identificado varios genes que se expresan en la línea lateral y que han sido involucrados en procesos de diferenciación celular y que podrían estar relacionados asimismo con regeneración en la línea lateral, entre los cuales podemos nombrar *ath1a*, *neuroD*, *sox2* y *sox3*.

*ath1* es un factor de transcripción proneural del tipo “Basic helix-loop-helix (bHLH)”, ortólogo al gen *atonal* de *Drosophila*. Su expresión está inversamente correlacionada con la proliferación celular (Kim y cols., 1997; Moore y cols., 2002; Ishibashi, 2004). En el oído de mamíferos es un regulador positivo de la diferenciación de las células ciliadas durante el desarrollo coclear (Zheng y cols., 2000; Kawamoto y cols., 2003). En experimentos recientes, se mostró que, la sobre-expresión de *ath1* vía adenovirus es capaz de inducir la producción de nuevas células ciliadas en el oído interno de roedores adultos, en los cuales se había previamente eliminado estas células (Shou y cols., 2003). Por otro lado, ratones mutantes que no expresan *ath1* en el oído carecen de células ciliadas y poseen más células de soporte de lo normal (Wang y cols., 2002). Esta evidencia relaciona a *ath1* con el fenómeno de trans-diferenciación, ya que, la aparición de nuevas células ciliadas en condiciones de sobre-expresión sería a expensas de células de soporte y ocurriría sin un proceso de proliferación. En pez cebra, *ath1a* se expresa en el primordio migratorio y en los neuromastos en diferenciación. En nuestro laboratorio, en ensayos de pérdida de función mediante la utilización de morfolidos antisentido, se determinó que *ath1a* es requerido para un normal desarrollo

de la línea lateral. En los morfantes, no ocurre diferenciación de células ciliadas a pesar que el resto de los componentes del sistema se desarrolla normalmente. Además de *ath1a*, la línea lateral requiere de la expresión de *neuroD* para su desarrollo normal, *neuroD* es también un factor de transcripción del tipo “Basic helix-loop-helix (bHLH)” que promueve la salida del ciclo celular y la diferenciación de neuroblastos hacia neuronas. En embriones de *Xenopus* es capaz de convertir células embrionarias epidermales en neuronas totalmente diferenciadas, siendo además requerido para la sobrevivencia y diferenciación de las neuronas sensoriales del oído interno (Bermingham y cols., 1999; Chae y cols., 2004). En la línea lateral de pez cebra *neuroD* se expresa en estadios tempranos en la placoda, más tarde en el ganglio y en el primordio migratorio. Se ha detectado también una expresión baja en los neuromastos y su inhibición también se correlaciona con ausencia de células ciliadas (Sarrazin y cols., 2006).

Los genes *sox2* y *sox3* son miembros de la familia de proteínas de unión al ADN de alta movilidad (HMG) que controlan la arquitectura de la cromatina y la transcripción (Zygar y cols., 1998). Han sido implicados en la decisión del destino celular durante embriogénesis (Zygar y cols., 1998) y se ha descrito su participación en neurogénesis en varios sistemas (Mizuseki y cols., 1998; Buescher y cols., 2002; Bylund y cols., 2003; Kan y cols., 2004). *sox2*, a su vez, es requerido para el desarrollo del oído interno de mamíferos (Kiernan y cols., 2005). Sin embargo, aún se desconoce su función precisa en el desarrollo y mantención de la línea lateral. Además de expresarse en los pro-neuromastos y neuromastos maduros, *sox2* se expresa en el primordio migratorio, por lo que este gen puede tener funciones en varios procesos como la migración, la diferenciación, la mantención y la regeneración celular.

### **I.5. Regeneración: ¿Una recapitulación de la diferenciación ocurrida en el desarrollo?**

La regeneración de las células de la línea lateral pasa por un proceso proliferativo y de diferenciación. Por lo tanto, elegimos centrar el estudio de los genes *ath1a*, *neuroD* y los genes *sox* de la familia B1 (*sox2* y *sox3*) en estos procesos. Además, consideramos necesario hacer una comparación de la expresión y función de estos genes entre el desarrollo inicial de la línea lateral y la regeneración de las células ciliadas después de un daño. Nuestra propuesta sugiere que durante la regeneración se recapitula la expresión de genes que ocurre durante la diferenciación en el desarrollo temprano y que estos genes estarían cumpliendo roles equivalentes en ambos procesos. En este contexto nos formulamos 4 preguntas centrales: ¿Qué genes participan del proceso de diferenciación de los distintos tipos celulares de los neuromastos?, ¿participan los mismos genes en el desarrollo inicial de la línea lateral y en la regeneración celular de los neuromastos?, ¿existen interacciones funcionales entre estos genes en el proceso de regeneración de los neuromastos? y ¿cómo se coordinan los procesos de proliferación y diferenciación?



## **II. HIPÓTESIS**

Los genes *ath1a*, *neuroD*, y los genes de la familia *soxB1*, participan y cumplen las mismas funciones tanto en la diferenciación inicial de las células ciliadas de la línea lateral como en el proceso de regeneración de ellas.

## **III. OBJETIVOS**

### **III. 1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la expresión, interacciones y función de los genes *ath1a*, *neuroD* y *sox2* y *sox3* en la diferenciación inicial de las células ciliadas de la línea lateral del pez cebra y durante la regeneración de este sistema.

### **III. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la función clave de *ath1a* en la diferenciación de las células ciliadas en la línea lateral.
2. Determinar la dinámica de expresión de genes requeridos para la formación y regeneración de las células de la línea lateral.
3. Determinar la función de los genes *sox2* y *sox3* en la formación y regeneración de los neuromastos de la línea lateral de pez cebra.

## IV. MATERIALES

### IV.1. Material Biológico

- Bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competentes (Clontech). Los plásmidos utilizados en esta tesis se amplificaron previa transformación con golpe de calor en estas bacterias.

- Enzimas de restricción y tampón respectivo (Fermentas):

*BamH I, Cla I, EcoR I, Kpn I, Not I*

- Peces y embriones de pez cebra (*Danio rerio*) fueron mantenidos a 28° C. Los embriones fueron obtenidos mediante cruces espontáneos de cepas silvestres, transgénicas o mutantes de peces adultos.

Líneas transgénicas:

*sqET4* (Dr. Vladimir Korzh, IMCB, Singapur)

*sqET20* (Dr. Vladimir Korzh, IMCB, Singapur)

*FoxD3-GFP* (Dr. Darren Gilmour, Tübingen, Alemania)

*claudinB* (Dr. Darren Gilmour, Tübingen, Alemania)

*Brn-3C::mGFP*

Líneas mutantes:

*Dogeyed (eya 1)*

- Plásmidos:

pBluescript II SK +/- (Fermentas)

pGEM (T-easy-vector; Promega, USA)

pCS2+MT (Fermentas)

#### **IV. 2. Reactivos para Biología Molecular y otros**

Acetato de sodio 3M, pH 5,2 (Winkler, Chile)

Acetona (Merck, Alemania)

Ácido maleico (Winkler, Chile)

Agua sin nucleasas (Winkler, Chile)

Cloruro de calcio (Merck, Alemania)

Cloruro de litio (Merck, Alemania)

Cloruro de potasio (Merck, Alemania)

Cloruro de sodio (Winkler, Chile)

Columnas de purificación BD Chroma Spin-100 (Clontech)

CuSO<sub>4</sub> (Merck, Alemania)

Diaminobencidina (DAB; Sigma, USA)

DiAsp (Yoduro de 4-(4-dietilaminoestiril)-N-metilpridinio; Sigma, USA)

DiI (Perclorato de 1,1'-dioctadecil- 3, 3, 3', 3'-tetrametilindocarbocianina;  
Molecular Probes, USA)

Dimetilsulfóxido (DMSO, Winkler, Chile)

DNA ligasa T<sub>4</sub> (New England Biolabs, USA)

DNA polimerasa Taq (GibcoBRL, Inglaterra)

DNAsa (Boehringer Mannheim, Alemania)

DTT (ditiotreitól; Winkler, Chile)

EDTA (Winkler, Chile)

Feniltioúrea (feniltiocarbamida; Sigma, USA)

Formamida (Merck, Alemania)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Alemania)

HEPES (Sigma, USA)

Marcador de peso molecular de 1kb (Fermentas)

Metanol (Merck, Alemania)

NBT / BCIP (nitro blue tetrazolium chloride / 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl phosphate; Boehringer Mannheim, Alemania)

Paraformaldehido (PFA; J. T. Baker, USA)

PBS (Tampón fosfato; Winkler, Chile)

Proteinasa K (GibcoBRL, Inglaterra)

Reactivo de bloqueo (BMB; Boehringer Mannheim, Alemania)

RNA de tórula (Sigma, USA)

RNA polimerasa SP6, T3 y T7 (Fermentas)

RNAsa (Boehringer Mannheim, Alemania)

Suero de oveja inactivado (Sigma, USA)

Sustrato quimioluminiscente Supersignal West Pico (Pierce, IL, USA)

Tampón de transcripción (Roche, Alemania)

Tween 20 (Monolaurato de poli-oxietilen-sorbitan; Sigma, USA)

Anticuerpos:

Anti  $\alpha$  Tubulina Acetilada (Sigma, USA)

Anti GFP (Molecular Probes, Cat. no. A11122)

Anti c-myc 9E10 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

Anti Digoxigenina (Roche Diagnostics, Alemania)

Anti IgG de Ratón (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra)

Anti IgG de raton (Alexa Alexa Fluor 594, , Molecular Probes, A11032)

Anti IgG de conejo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11034)

Anti IgG de conejo Alexa Fluor 594 (Molecular Probes A31632)

Anti-sox2 (Chemicon, Cat. no. AB5603)

Oligonucleótidos:

5' TGA~~CTTCGTC~~CATGTCGGA~~ACTCTAG~~ 3' (MO-*nrd*)

5' TCTGTTGGTTTGTGCTTTTGGGAGG 3' (MO-*ath1a*)

5' CCATCTTGGCGGTGATGTCCATTTC 3' (MO-*ash1a*)

5' ATGATGCTATCGTAAAATTCCATTT3' (MO-*cxc4*)

5' AACCGATTTTCTCGAAAGTCTACCC 3' (MO-*sox2*)

5' GGTGCCAAGCACTCGAAAGAAAACG 3' (MO-*sox3*)

5' GCTCGGTTTCCATCATGTTATACAT 3' (MO-*sox2/sox3*)

MO: Morfolino (Gene Tools; Philomath, Oregon)

*Sitios de unión de morfolinos a los genes soxB1*

Secuencia morfolino *sox2*: AACCGATTTTCTCGAAAGTCTACCC

Secuencia morfolino *sox3*: CGTTTTCTTTCGAGTGCTTGGCACC

Secuencia morfolino *sox2/sox3*: GCTCGGTTTCCATCATGTTATACAT

*Secuencia genómica de sox2*

GTTGACAAGGGCTCTGGCGAGGAGGGAAACCGAGTTTGTGTTGATTCTTCAAGACTAAGAAAAGAAATTT  
GTGGGCACAACAGGACCTAAGAGCGCTTCCCTCCCCAGCAAAGTTACCTCCAAGTCTAAGGTAAGTCA  
GCAGCCTCTCCACACACTTTTTGGACTTCTTTATTTTTATTTTTACGGCTGGTGGGGTAGACTTTCAAG  
AAAAATCGGTTTAAATGTATAACATGATGGAAAACCGAGCTGAAGCCCCGGCGCCCCAGCCCAACACCGGG  
GGCACGGGGAACCAACTCCTCGGGAAACAACAGAAAAACAGCCCGGACCGCATCAAGAGACCCATGA  
ACGCCTTCATGGTGTGGTCGAGGGGACAGCGGCGGAAAATGGCACAGGAGAACCCCAAAATGCACAATTC

*Secuencia genómica de sox3*

AGCTTAGCGCACAACCTTGCAGAGTCCGTGGCAGAGCAGAACGAGACACACGGGACTGGTGTGGAGACT  
TTTGAAAGACTTTACTTGACCAGAGTTTGAGCTCTCTGAACTTTTGACTGACTTCATTTTTTTGTAAGAC  
TCTTGAAATTTCAAAGTTTTCTTTCGAGTGCTTGGCACC ACTTTTAAGAATGTATAACATGATGGAAAAC  
GAGATTAAGCCCCATTCCGCAGTCCAACACGGGCTCGGTGACGGGCGGCAAAAACAACAGTGCCAACG  
ACCAGGACCGGGTGAAGCGGCCTATGAATGCTTTCATGGTGTGGTCTCGGGGAGCGGAGGAAGATGGC  
TCAGGAGAATCCTAAAATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTCGGTGCTGACTGGAAACTTTTGACT

### IV. 3. Soluciones

MAB (ácido maleico 100mM; NaCl 150mM; Tween 20 0,1%; pH 7,5)

MAB / BMB / LS (MAB + reactivo de bloqueo 2% + suero de oveja inactivado 20%)

MABT (MAB + Tween 20 0,1%)

Medio de peces (solución E3) (NaCl 5mM; KCl 0,17mM; CaCl<sub>2</sub> 0,13mM; MgSO<sub>4</sub> 0,33mM; azul de metileno 10<sup>-5</sup> %)

Mezcla NTP digoxigenina (ATP, GTP, CTP 2,5mM; UTP 1,625mM; UTP-dig 0,875mM)

PBST (PBS + Tween 20 0,1%)

Ringers (116mM NaCl; 2,9mM KCl; 1,8mM CaCl<sub>2</sub>; 5mM HEPES; pH 7,2)

Ringers Electroporación (180mM NaCl, 5mM KCl, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.2)

Sample buffer (0,63ml Tris 1M pH 6,8; 1ml glicerol 100%; 0,5ml β-mercapto-etanol; 1,75ml SDS 20%; 20μl PMSF 100mM, para 10 ml)

Solución AP (MgCl<sub>2</sub> 50mM; NaCl 100mM; Tris 100mM; Tween 20 0,2%; pH 9,5)

Solución de bloqueo inmunocitoquímica (suero de oveja 20%; DMSO 1% en PBST)

Solución de hibridación *in situ* (SSC 5X; heparina 50μg/ml; RNA de tórula 500μg/ml; formamida 50%; Tween 20 0,1%)

Solución peroxidasa de marcación para inmunocitoquímica (DAB 0,03% en PBS)

SSC 20X (175,3g NaCl; 88,2g citrato de sodio; pH 7 en 1 litro de agua destilada)

## V. MÉTODOS

### V.1 Mantención de los peces y recolección de embriones

Los peces son mantenidos a 28° C en un ciclo de 14 horas luz, 10 horas oscuridad. Para la obtención de embriones, se seleccionaron cada vez un número similar de hembras y machos y se mantuvieron separados durante la noche. Al día siguiente, al momento de dar la luz, se juntaron hembras con machos y se dejaron en una cubeta con agua fresca, que contiene un inserto enrejado que permite el paso de los huevos al fondo de la cubeta y así poder recolectarlos sin la posibilidad de que los peces se los coman. Una vez recolectados los huevos se traspasaron a Solución E3 1X y se utilizaron para microinyección o se dejaron en una estufa a 28° C para su crecimiento. Después de las 24 hpf, en algunas ocasiones, los embriones fueron mantenidos en feniltioúrea 0,03% para prevenir la formación de pigmentos (Westerfield, 1994).

Los embriones utilizados para hibridación *in situ* e inmunocitoquímica, fueron decorionados, clasificados por su estadio, según Kimmel y cols., (1995), y fijados en PFA 4% a 4°C, durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron tres veces por 5 minutos con PBS y se deshidrataron agregándoles metanol 100% e incubándolos por 10



minutos a temperatura ambiente y luego 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Luego de esto, los embriones fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  o utilizados inmediatamente.

## V.2. Microinyección de embriones

Para microinyectar embriones de pez cebra se utilizó una placa de Petri de plástico como soporte, en donde se colocó un portaobjetos de vidrio. Se depositaron los huevos recién fecundados sobre la placa, exactamente en el borde del portaobjetos, de manera que formaran filas paralelas al portaobjeto. Se retiró el exceso de agua a fin de que los huevos se adhirieran a la superficie por tensión superficial. Luego fueron instalados en una lupa de disección y microinyectados con 5 a 10 nL de una solución que contenía ARNm, ADN y/o un oligonucleótido antisentido (Morfolino), usando para esto un inyector de presión de nitrógeno (Narishige).

## V.3. Síntesis de sondas e hibridación *in situ* en embrión completo

Para la síntesis de sondas marcadas con digoxigenina, se incubó 1  $\mu\text{g}$  de ADN digerido con la enzima de restricción correspondiente a  $37^{\circ}\text{C}$  (ver Tabla 1) en las siguientes condiciones:

Tampón de transcripción	2 $\mu\text{l}$
ARN polimerasa (T3, T7 ó SP6)	2 $\mu\text{l}$
Mezcla NTP digoxigenina	8 $\mu\text{l}$
DTT 0,1 M	1 $\mu\text{l}$

ADN digerido (linearizado)	1 µg
H <sub>2</sub> O libre de ARNasa	hasta completar 20 µl

Luego de incubar toda la noche se agregó 2 µl de ADNasa y se incubó por 30 minutos más. Posteriormente se añadió 30 µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasa y se precipitó la mezcla agregando 2 µl de LiCl 10 M y 200 µl de etanol al 100% dejando a -20 °C toda la noche. Luego se centrifugó a 14.000 rpm por 30 minutos y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Posterior a esto se resuspendió el precipitado en 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNas y se diluyó en 950 µl de tampón de hibridación. La información relativa a la preparación de cada sonda se resume en la **Tabla 1**.

Para la hibridación *in situ* los embriones fijados fueron rehidratados mediante lavados sucesivos de 5 minutos con metanol 75%, 50% y 25% (en PBS), respectivamente, seguido de 3 lavados de 5 minutos con PBST. A continuación, los embriones se permeabilizaron incubándolos 10 a 30 minutos con una solución de proteinasa K 10 µg/ml en PBS (a mayor estadio, mayor tiempo de exposición a proteinasa K). Luego se lavaron 2 veces con PBST y se refrigeraron en PFA al 4% durante 20 minutos. Se lavaron nuevamente en PBST 5 veces por 5 minutos cada una, para luego prehibridar los embriones entre 57°C y 65°C en solución de hibridación, por 4 horas, luego de un lavado corto de 10 minutos en la misma solución. Posteriormente se agregó la sonda y se incubaron durante toda la noche a la misma temperatura. Al comienzo del segundo día se recuperó la sonda y se guardó a -20°C. Los embriones fueron lavados de la sonda con formamida al 50% y 25% en SSC 2X por 10 minutos cada vez, luego 30 minutos con SSC 2X y 2 veces de 30 minutos con SSC 0,2X, todo a

<b>Sonda:</b>	<b>vector</b>	<b>enzima</b>	<b>polimerasa</b>	<b>referencia</b>
<i>ath1a</i>	pBluescript SK	BamHI	T7	Kim y cols., 1997
<i>claudinB</i>	?	BamHI	T7	Kollmar y cols., 2001
<i>eya1</i>	?	EcoRI	T7	Sahly y cols., 1999
<i>deltaB</i>		Xba I	T3	
<i>notchIII</i>		Hind III	T3	
<i>neuroD</i>	pBluescript SK	NotI	T3	Korzh y cols., 1998
<i>sox2</i>		Kpn I	T7	Huntsville, AL. (Open Biosystems) BC065656

**Tabla 1. Sondas utilizadas para hibridación *in situ*.** Se señala en cada caso la enzima de restricción y ARN polimerasa utilizadas, además del vector de clonamiento.

la misma temperatura de hibridación. A continuación los embriones fueron incubados a temperatura ambiente en MAB durante 5 minutos, y en MAB+BMB+LS durante 4 horas.

En forma paralela se bloqueó el anticuerpo anti digoxigenina (1:1000), incubándolo en la misma solución. Pasadas las 4 horas, se agregó el anticuerpo a los embriones y se dejó incubar por toda la noche, a 4°C.

Al tercer día, a fin de eliminar el anticuerpo libre, los embriones se lavaron en MABT 5 veces por 20 minutos. Luego se equilibraron en solución AP durante 5 minutos por 3 veces. A continuación se les agregó una solución de NBT/BCIP (sustratos de la fosfatasa alcalina que en una reacción de óxido-reducción dan como producto un precipitado azul/morado) diluida en solución AP y se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad, hasta la aparición del precipitado azul. Posteriormente se lavaron con PBS 3 veces por 5 minutos. En caso de embriones de estadios posteriores a 48 hrs. los embriones son incubados en una solución de blanqueamiento (Buffer SSC 0.5X, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%, formamida 5%), utilizada para eliminar los pigmentos, por 10 minutos. Finalmente los embriones ya teñidos y blanqueados se pasan a glicerol mediante incubaciones sucesivas a concentraciones crecientes de glicerol en PBS.

#### **V. 4. Inmunohistoquímica en embrión completo**

Embriones fijados en estadios entre 24 y 96 hpf. fueron lavados 3 veces por 5 minutos en PBS, incubados 1 hora en agua destilada, 7 minutos en acetona fría, lavados 2 veces por 5 minutos en PBST y transferidos a solución de bloqueo por 1 hora. Luego,

los embriones fueron incubados toda la noche a 4°C con el anticuerpo correspondiente diluido en solución de bloqueo (anti tubulina acetilada 1:1000, anti sox2 1:500, anti GFP 1:500). A continuación se lavaron 4 veces por 25 minutos en PBST, se incubaron 30 minutos en solución de bloqueo y toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti Ig correspondiente, diluido en solución de bloqueo. Posteriormente se lavaron 4 veces por 20 minutos en PBST, fueron transferidos a solución peroxidasa por 30 minutos y luego a solución de marcación 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o incubados por 30 minutos en solución de bloqueo e incubados toda la noche a 4° con anticuerpo secundario anti-mouse IgG Alexa Alexa Fluor 594, anti IgG de conejo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11034), anti IgG de conejo Alexa Fluor 594 (Molecular Probes A31632), fueron usados 1:500. Después que fue detectado el producto de la reacción de la peroxidasa, los embriones fueron lavados 3 veces en PBS y transferidos a glicerol o en el caso de anticuerpos secundarios se lavan 5 veces por 10 minutos, se montan y se observan al microscopio de fluorescencia.

#### **V. 5. Construcción de vectores de expresión y morfolinós**

Para generar los constructos de fusión *neuroD*- y *ath1a*-myc, utilizamos el ADN codificante completo de cada uno como templado para la reacción de PCR. Los partidores usados contienen un sitio *Bam*HI (partidor río-arriba que contiene el ATG) y un sitio *Cla*I (partidor río-abajo que carece el codón de término) y sus secuencias aparecen en el capítulo Materiales. Estos productos de PCR fueron clonados en un vector pGEM por clonamiento TA, digeridos con *Bam*HI y *Cla*I, y subclonados en el

vector de expresión pCS2MT, generando los constructos pCS2*neuroDMT* y pCS2*ath1MT*.

Los morfolinos específicos diseñados para inhibir la traducción de los genes *neuroD*, *ath1a*, *ash1a*, *sox2*, *sox3*, *cxcr4* y *ash1b* fueron sintetizados por Gene Tools. Todos los morfolinos fueron dirigidos contra la región 5' del ADN codificante. 8,5 ng a 20ng de morfolino fueron inyectados en cada cigoto. En los experimentos de rescate, se co-inyectaron 4,25 ng de morfolino con 125 pg del plásmido de expresión. En los experimentos de electroporación, los morfolinos se fabricaron acoplados a lisamina, que les confiere carga (+) y permite la posibilidad de visualizar las células electroporadas por la fluorescencia de esta molécula.

#### **V. 6. Marcación de células y microscopía**

Las células ciliadas de los neuromastos fueron marcadas en embriones vivos con DiAsp (Yoduro de 4-(4-dietilaminoestiril)-N-metilpridinio; Sigma, USA) como se describe en Collazo y cols., (1994). Larvas de 48-72 hpf fueron incubadas en solución E3 1X 5 mM en DiAsp por 5 minutos y luego lavados varias veces con medio fresco y visualizados bajo luz fluorescente en un microscopio de disección. Al momento de evaluar el efecto de la perturbación de la actividad de un gen, contamos los neuromastos marcados con DiAsp de cada lado de la larva. La LL posterior embrionaria consta de 5 neuromastos laterales alineados a lo largo del mioseptum horizontal y 2-3 neuromastos terminales en una posición más ventral en la punta de la cola. Por lo tanto, el número total de neuromastos es 7-8 en más del 90% de los embriones. A fin de considerar la ocurrencia de embriones silvestres con menos

neuromastos, consideramos “normal” cualquier embrión con 5-8 neuromastos, “subnormal” aquellos que posean 1-4 neuromastos, y “anormal” los embriones que no poseen neuromastos de la línea lateral posterior marcados. Los dos lados de cada embrión fueron contados como resultados independientes.

Para seguir la formación del nervio de la línea lateral posterior, embriones de 30 hpf fueron fijados toda la noche en paraformaldehído al 4% en PBS. La inyección de DiI (Perclorato de 1, 1'-dioctadecil- 3, 3, 3', 3'-tetrametilindocarbocianina; Molecular Probes, USA) en los embriones fijados se realizó como se describe en David y cols., (2002).

El primordio de la línea lateral posterior y los neuromastos fueron visualizados también en animales vivos o fijados, mediante microscopía Nomarski en un microscopio Zeiss (#37477, Carl Zeiss). Aquellos embriones teñidos mediante hibridación *in situ* inmunocitoquímica, fueron transferidos a glicerol y en su mayoría desvitelados (remoción del vitelo), para ser observados. Los embriones vivos tratados con DiAsp fueron visualizados en una lupa de fluorescencia Leica MZ12 en medio para embriones.

## V. 7. Electroporación de morfolidos

Embriones de líneas transgénicas *sqET20*, *claudinB::GFP* o *brn3::GFP* de 72 hpf fueron desvitelados y montados en porta objetos embebidos en agar 0.05% en E3 a 55°C. Los embriones fueron ubicados sobre un electrodo de plata basal (electrodo 1; ver **Fig. Anexo 1**). Luego se buscaron los neuromastos de la línea lateral guiándose por

la expresión de GFP de sus células o mediante el uso de microscopía Nomarski, usando un microscopio Zeiss Axioscop (Oberkochen, Germany) con objetivos de 10X o 20X. El microscopio utilizado se encuentra acoplado a un micromanipulador y a un electroporador (WPI electrometer, Sarasota, Florida, USA), Al detectar el neuromasto a electroporar, se le aproxima el electrodo móvil, de vidrio, (electrodo 2; ver Fig. Anexo 1, filamento de 7.8mm, (Narishige, Tokio, Japón) alargado en forma de aguja de inyección) mediante el uso del objetivo de 10X y finalmente a 63X, se ingresa el electrodo de vidrio que contiene la solución de MO-lisamina (1mM) o dextrano tetramethylrodamine (al 5% en solución 0,2 M KCl o buffer de electroporación) al neuromasto, acercándolo a las células basales de este (células de soporte). Se aplican de 5 a 12 pulsos de 0.2ms a 12 volt y se evalúa el ingreso de la solución a las células blanco, mediante visualización de la lisamina (fluoroforo que emite en 590nm). Se retiran los embriones exitosamente electroporados (de 2 a 5 células por neuromasto) y se dejan a 28°C por 1 hora.

## **V. 8 Análisis estadísticos**

Para comparar las diferentes condiciones experimentales se utilizaron diferentes análisis estadísticos, dependiendo del número de variables y las características de los datos obtenidos tales como:



### **Comparación de 2 poblaciones:**

**t-test (datos con distribución normal).** Con la intención de comparar 2 poblaciones experimentales se utilizó t-student. Este es un test que permite decidir si dos variables aleatorias normales (gaussianas) que con la misma varianza tengan o no, medias diferentes. Dada la ubicuidad de la distribución normal o gaussiana el test puede aplicarse en numerosos contextos, para comprobar si la modificación en las condiciones de un proceso esencialmente aleatorio produce una elevación o disminución de la media poblacional. El test opera decidiendo si una diferencia en la media muestral entre dos muestras es estadísticamente significativa, y entonces poder afirmar que las dos muestras corresponden a distribuciones de probabilidad de media poblacional distinta, o por el contrario afirmar que la diferencia de medias puede deberse a oscilaciones estadísticas azarosas.

**Prueba de U. Mann-Whitney (datos sin distribución normal).** Esta es una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes, cuyos datos han sido medidos al menos en una escala de nivel ordinal. Este test una respuesta para comparar 2 grupos que no posean una distribución normal o gaussiana.

### **Comparación de más de 2 poblaciones:**

**ANOVA: (ANDEVA) análisis de varianza.** Este test permite comprobar si existen diferencias entre promedios de tres o más tratamientos y para ello se calcula el

valor de F, y es equivalente al test de Student, salvo que éste último solamente sirve para dos grupos. También requiere de una distribución normal o gaussiana de los datos.

**Kruskal-Wallis, análisis de varianza en rangos.** En estadística, la prueba de Kruskal-Wallis (de William Kruskal y W. Allen Wallis) es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población.. Es una extensión de la prueba de la U de Mann-Whitney para 3 o más grupos. Intuitivamente, es idéntico al ANOVA con los datos reemplazados por categorías, pero, dado que es, una prueba no paramétrica, no asume normalidad en los datos.

## VI. RESULTADOS

Existen numerosas evidencias que muestran a *ath1a* como un gen clave en la determinación del tipo celular y en el proceso de diferenciación de las células ciliadas en el oído de mamíferos. Sin embargo, se desconoce gran parte de su mecanismo de regulación, los genes que lo controlan y su participación en el proceso de regeneración de las células ciliadas.

En la línea lateral de embriones de pez cebra mutantes *mindbomb* (mutante con la vía *Notch* inhibida) se observó que la activación del sistema de inhibición lateral controla la expresión de *ath1a* (Ito y Chitnis, 2001), siendo ésta la única evidencia de regulación de la expresión de este gen en el desarrollo en la línea lateral.

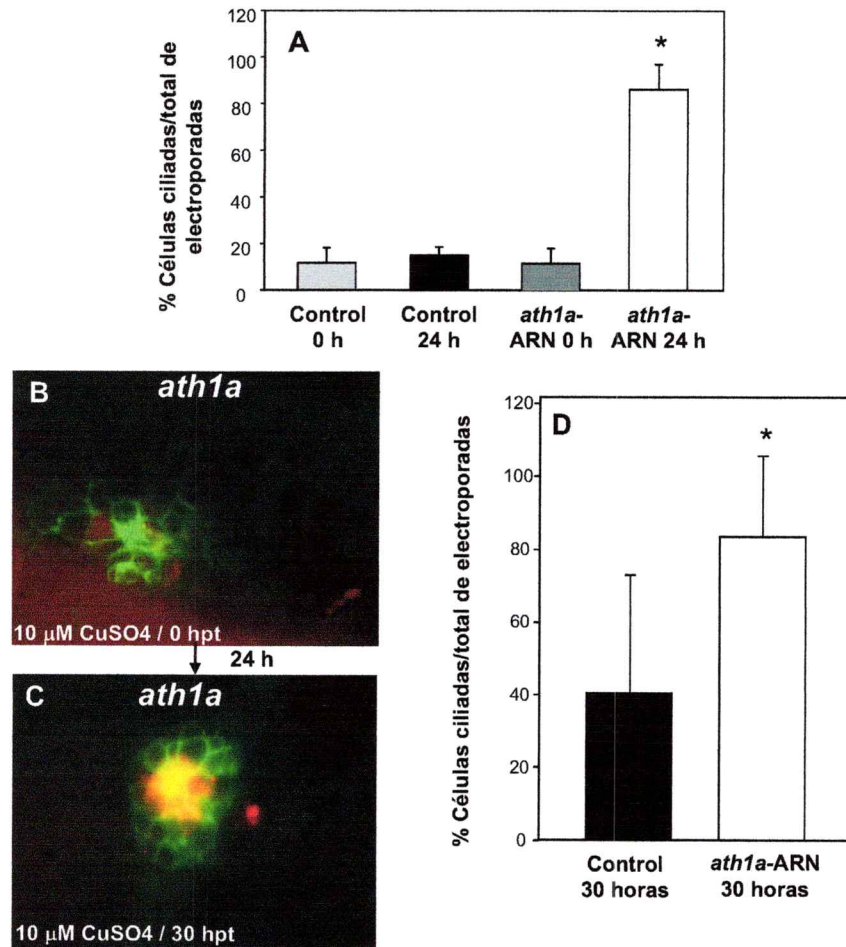
### VI.1. *ath1a* induce la diferenciación de células de soporte a células ciliadas en la línea lateral de pez cebra.

Se ha demostrado en el oído de mamíferos que la expresión normal de *ath1a* es necesaria para la formación de las células ciliadas, ya que ratones mutantes para este gen carecen de ellas (Chen y cols. 2002). Además la sobre-expresión de *ath1a*, en las células de soporte del oído interno, inducen su diferenciación a células ciliadas, sugiriendo que la función de *ath1a* es suficiente y necesaria para la formación de las células ciliadas en mamíferos. Por otra parte la pérdida de función de *ath1a*, impide la diferenciación de las células ciliadas de la línea lateral de pez cebra, demostrando que *ath1a* es necesario, al

igual que en mamíferos, para la generación de células ciliadas (Sarrazin y cols., 2006). Para comprobar si *ath1a* es suficiente para inducir la diferenciación de ciliadas de la línea lateral de pez cebra (al igual que en mamíferos), se evaluó su función en la línea lateral mediante su sobre-expresión en células de soporte de neuromastos diferenciados. Se electroporaron las células del neuromasto de embriones transgénicos *claudinB::GFP* de 72 hpf con ARNm de *ath1a* y/o rodamina-dextrano (para marcar y seguir las células electroporadas). En los neuromastos de estos embriones se caracterizó, mediante morfología, el destino de las células electroporadas luego de 24 horas, además de su efecto en el proceso de regeneración.

Al electroporar el ARNm de *ath1a* y evaluar luego de 24 horas, se observó un aumento en el número de células ciliadas marcadas (electroporadas) respecto a electroporaciones control. Esta observación se obtuvo evitando electroporar las células ciliadas; en promedio se obtuvo una electroporación de un 10,8% de células ciliadas y del resto, un 32,3% corresponde a células del manto. Al electroporar las células sólo con rodamina (control) y evaluar su destino luego de 24 horas, se observó que un 14,2% corresponde a células ciliadas y un 33,4% corresponde a células del manto (n=22). En cambio, al electroporar con ARNm de *ath1a*-rodamina, se observó que un 85,4%, de las células marcadas a las 24 horas corresponden a células ciliadas, el 12,6% a células del manto y un 2 % de las células no pertenecen a estos 2 tipos celulares (n=29 Fig. 4A).

Se evaluó además la participación de *ath1a* en el proceso de regeneración., Los neuromastos electroporados fueron expuestos a cobre 10  $\mu$ M por 2 h, para inducir la muerte de las células ciliadas. Luego, cada neuromasto electroporado fue fotografiado a



**Figura 4. Sobre-expresión de *ath1a* induce diferenciación celular en neuromastos de la línea lateral.** (A) Neuromastos de embriones transgénicos de *claudinB*-GFP de 72hpf, fueron electroporados con rodamina (rojo) o con ARNm de *ath1a*-rodamina y fotografiados luego de 24 horas (63X). En neuromastos electroporados solo con rodamina, se observa un aumento en la proporción de células ciliadas marcadas desde un 10,8% a las 0 horas a un 14,2% a las 24 horas post electroporación. Al electroporar los neuromastos con ARNm de *ath1a*, se observa un mayor incremento en la proporción de células ciliadas marcadas, desde un 10,8% a un 85,4% (B, C, D) En el proceso de regeneración, de las células electroporadas con rodamina (control) se observan en un 48,4% en células ciliadas, un 19,3% en células del manto y un 32,3% de células de soporte. Por otra parte, las células electroporadas con ARNm de *ath1a* generan principalmente células ciliadas (84,5%) y un 15,5% se observa en las células del manto. Por lo tanto, la sobre-expresión de *ath1a* incrementa la proporción de células ciliadas electroporadas respecto al total de células electroporadas en los neuromastos.

0 y 30 h post-tratamiento. Al analizar los neuromastos regenerados, se observó que en embriones control el 48,4% de las células electroporadas eran células ciliadas, el 19,3% células del manto y un 32,2% de células del soporte. Por otro lado, las células electroporadas con ARNm de *ath1a* se transforman en un 84,5% en células ciliadas, siendo el resto células del manto 15.5% y un 0 % de células de soporte (Fig. 4B, C, D). Es decir, las células electroporadas con ARNm *ath1a* se transforman preferentemente en células ciliadas sugiriendo que *ath1a* es capaz de inducir la diferenciación de las células basales del neuromasto a células ciliadas (Fig. 4D). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en oídos de mamíferos, donde la expresión ectópica de *ath1* inducía la diferenciación de las células de soporte hacia el destino de célula ciliada (Izumikawa M. y cols., 2005).

## **VI.2. *ath1a* induce la expresión de *neuroD* durante la diferenciación de las células ciliadas.**

En trabajos previos de nuestro laboratorio, se demostró el requerimiento de *ath1a* y *neuroD* para el normal desarrollo de la línea lateral, ya que inyecciones de morfolinós para ambos genes generan ausencia de células ciliadas de la línea lateral. Esto sugiere que ambos genes podrían estar participando en la misma vía de señalización para inducir la diferenciación de las células ciliadas en el desarrollo de los neuromastos.

Con el fin de esclarecer estas dudas y determinar una posible jerarquía de regulación entre estos dos genes, realizamos experimentos de rescate y sobre-expresión

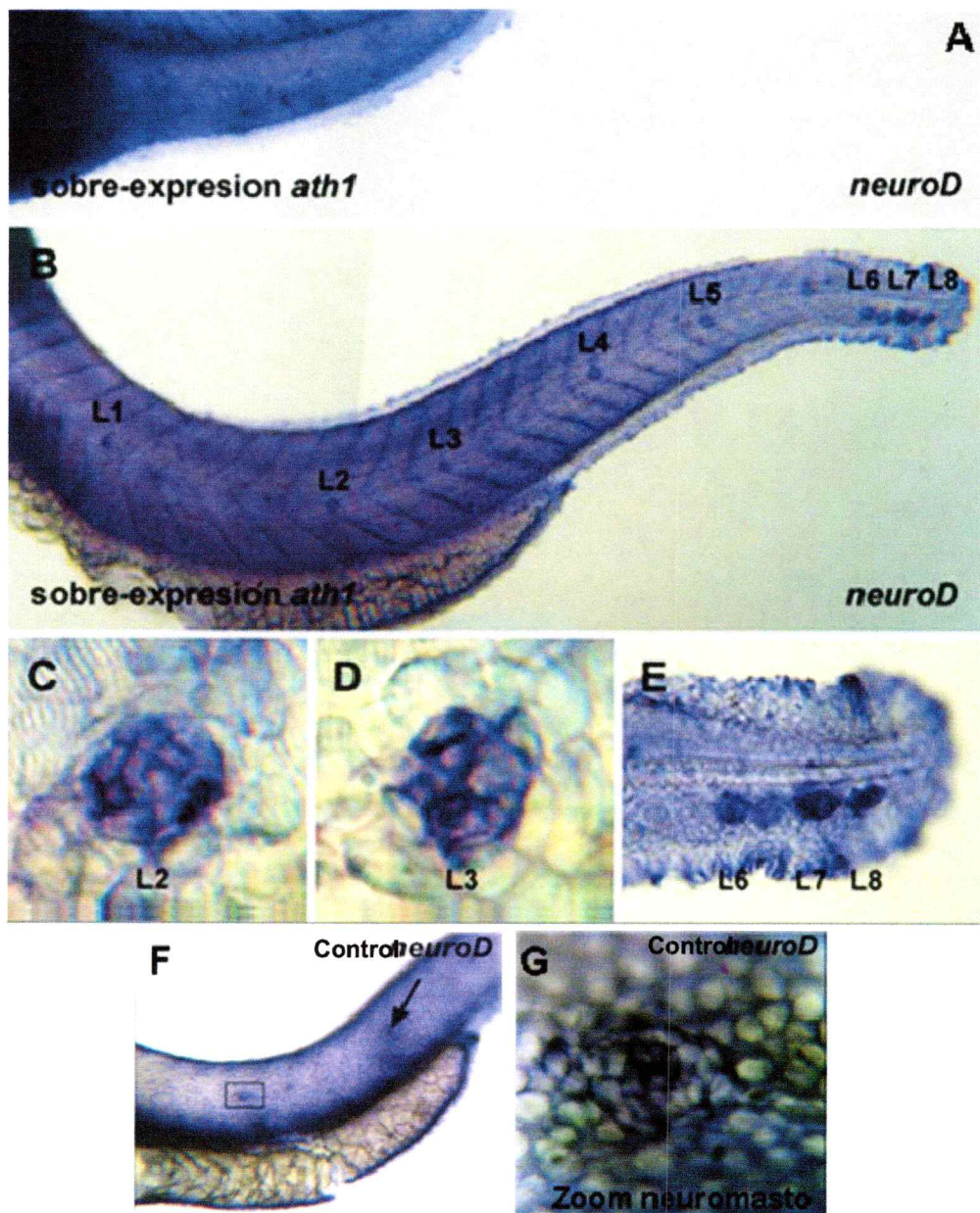
(Tabla 2). Inyectamos el constructo de expresión *neuroD:myc* (ver Materiales y Métodos) junto con el morfolino de *ath1* en cigotos de pez cebra. A las 72 hpf, se analizó la presencia de neuromastos funcionales mediante tratamiento con DiAsp. Encontramos que el fenotipo resultante de la inyección de MO-*ath1a*, fue revertido parcialmente con la co-inyección de *neuroD* (41% de rescate: 66% de embriones con fenotipo morfantes al inyectar MO-*ath1a*; al rescatar el fenotipo con ARNm de *neuroD* se obtiene solo un 39% de embriones con fenotipo morfante) (Tabla 2). Estos resultados muestran que *ath1a* regula a *neuroD*, quizás directamente, y que es el gen proneural responsable del establecimiento del destino de célula ciliada en el sistema de la línea lateral. Además, a manera de control, realizamos el rescate cruzado: Inyectamos cigotos de pez cebra, con el morfolino de *neuroD* más el constructo de expresión de *ath1a*. Mediante el mismo análisis anterior, encontramos que los embriones co-inyectados no presentaron diferencias apreciables al comparar la incorporación de la tinción DiAsp con los embriones morfantes (Tabla 2), lo que implica que *ath1a* no estaría río-abajo de *neuroD*.

Finalmente, para confirmar que *ath1a* regula a *neuroD* durante la formación de los neuromastos de la línea lateral posterior, efectuamos un experimento de sobre-expresión de *ath1a* y análisis de la expresión de *neuroD*. Cuando *ath1a* es expresado ectópicamente en todo el embrión por inyección de ARNm al estado de 1 célula, *neuroD* es regulado positivamente y sobre-expresado, como lo pudimos observar mediante hibridación *in situ*. Algunos embriones inyectados presentaron expresión ectópica del transcrito de *neuroD* (Fig. 5A), mientras otros mostraron un aumento de su expresión sólo en los neuromastos de la línea lateral posterior (Fig. 5B-E). Finalmente,

	normal (5-8 nm)	subnormal (1-4 nm)	anormal (0 nm)
<b>CONTROLES:</b>			
no inyectados (58 embriones)	97% (56 e)	3% (2 e)	0% (0 e)
<sup>a</sup> MO- <i>ash1a</i> (75 embriones)	95% (71 e)	5% (4 e)	0% (0 e)
<b>RESCATE 1:</b>			
MO- <i>neuroD</i> (78 embriones)	22% (17 e)	47% (37 e)	31% (24 e)
MO- <i>neuroD</i> co- inyectado con <i>neuroD</i> (71 embriones)	68% (48 e)	18% (13 e)	14% (10 e)
<b>RESCATE 2:</b>			
MO- <i>ath1a</i> (53 embriones)	34% (18 e)	55% (29 e)	11% (6 e)
MO- <i>ath1a</i> co-inyectado con <i>neuroD</i> (46 embriones)	61% (28 e)	37% (17 e)	2% (1 e)
<b>RESCATE 3:</b>			
MO- <i>neuroD</i> (52 embriones)	50% (26 e)	50% (26 e)	0% (0 e)
MO- <i>neuroD</i> co- inyectado con <i>ath1a</i> (64 embriones)	52% (33 e)	41% (26 e)	7% (6 e)

**Tabla 2. Experimentos de rescate en embriones de pez cebra.** Número de neuromastos visualizados con DiAsp a las 72 hpf en embriones inyectados con morfolidos *neuroD* y *ath1a* y embriones morfantes rescatados con *neuroD* y *ath1a*. **nm:** neuromastos. **e:** embriones. <sup>a</sup> La inyección del morfolido contra *ash1a* no afecta la formación normal de la línea lateral posterior en los embriones y fue usada como inyección control.





**Figura 5. La sobre-expresión de *ath1a* induce la expresión de *neuroD*.** (A-E) Expresión de *neuroD*, en embriones inyectados con el plásmido de expresión de *ath1a*, visualizada mediante hibridación *in situ*. (A) Expresión ectópica de *neuroD* a lo largo de todo el embrión. (B-E) Vista general (B) y detalles (C-E) de la expresión de *neuroD* inducida en un embrión sobre-expresando *ath1a*. L2, L3...L8 indican la posición del neuromasto señalado. (E) Neuromastos de la cola. Vistas laterales. (F-G) Expresión normal de *neuroD* en embriones controles.

la sobre-expresión de *neuroD* no provocó el aumento ni la aparición ectópica del transcrito de *ath1a* (dato no mostrado). Los resultados, en su conjunto, indican una relación jerárquica en que *ath1a* regula la expresión de *neuroD* y que ambos son necesarios para la diferenciación de las células ciliadas.

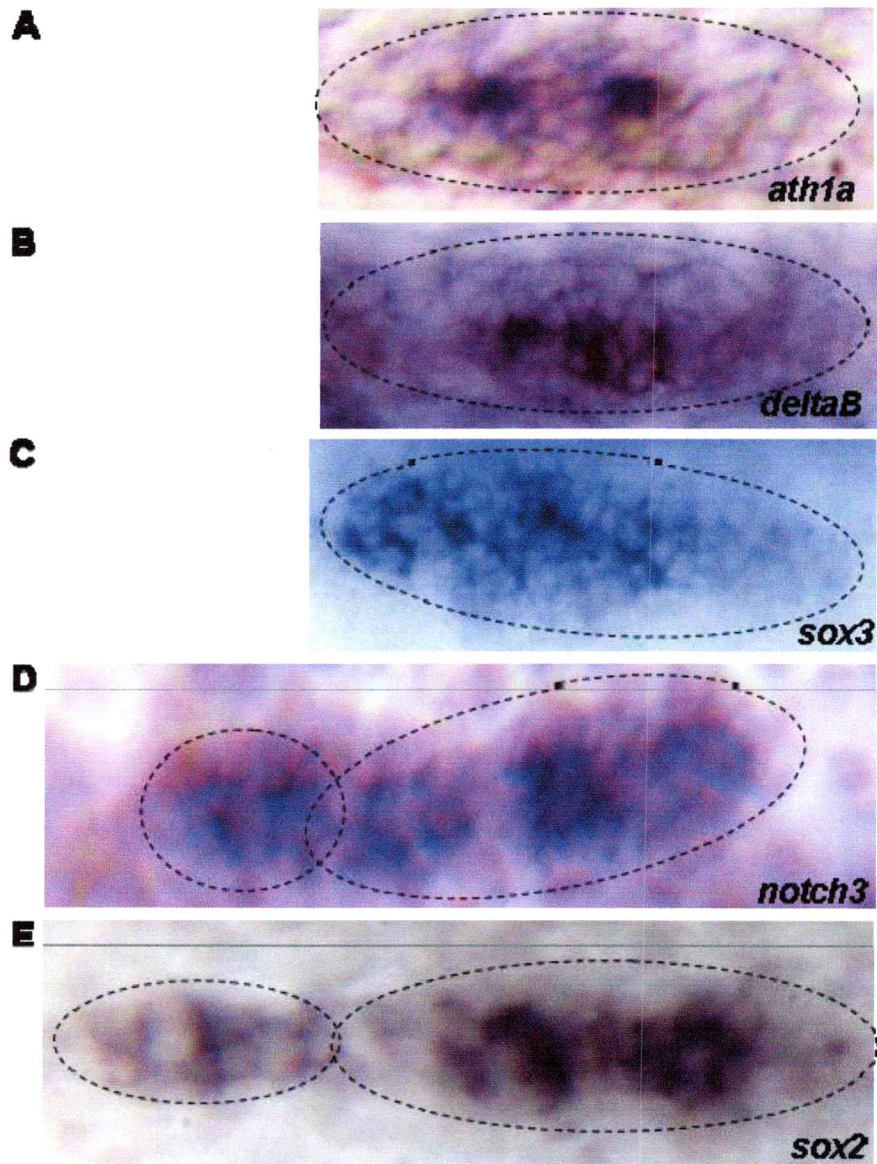
### **VI.3. Caracterización de genes involucrados en la diferenciación de las células de la línea lateral.**

Para determinar que genes podrían interactuar funcionalmente con *ath1a* en el proceso de diferenciación de las células ciliadas de la línea lateral, se analizó la expresión de diversos genes que han sido relacionados con estos procesos.

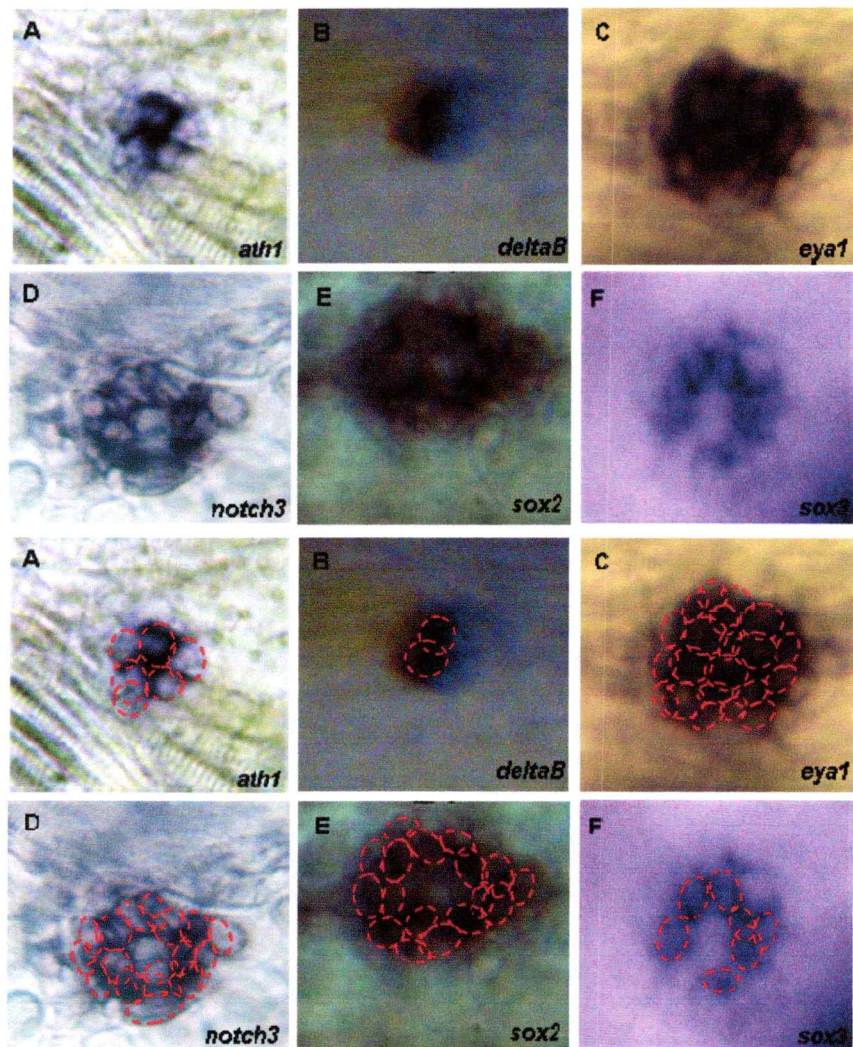
Se analizó la expresión de *deltaB*, *eyal*, *neuroD*, *notch3*, *sox2* y *sox3* durante la formación de la línea lateral, desde la definición del territorio placodal que dará origen al sistema, hasta la formación de pro-neuromastos y su maduración final. Se seleccionaron estos genes porque diversos antecedentes los relacionan con el control de la diferenciación neuronal y de los genes pro-neurales. Los patrones de expresión de estos genes se analizaron, mediante hibridación *in situ*, usando sondas antisentido marcadas con digoxigenina, desde que las placodas de la línea lateral han sido establecidas (aproximadamente a las 10-11 hpf, comienzo de la somitogénesis) hasta que los neuromastos de la línea lateral primaria ya fueron depositados y diferenciados (48-72 hpf). Este rango de tiempo incluye el periodo de migración del primordio de la línea lateral, estructura en la que comienza el proceso de diferenciación de los diversos tipos

celulares de los neuromastos (**Fig. 6**). Los genes *notch3* y *sox2* se expresan luego del inicio de la migración del primordio (20 a 22 hpf.) en forma homogénea (Schlosser y Northcutt, 2000; Ito y Chitnis, 2001; Schlosser y Ahrens, 2004; Hernández y cols., 2007); al avanzar el primordio, la expresión se va restringiendo a la zona periférica de los pro-neuromastos formando anillos (26-34 hpf.) (**Fig. 6D, E**). La expresión de *ath1a*, *deltaB* y *neuroD* se observa en pequeños grupos de células en el centro de los pro-neuromastos en el primordio migratorio (**Fig. 5F; Fig. 6A, B;**).

Mediante hibridación *in situ* se analizó la expresión de estos mismos genes en los neuromastos depositados a las 72 hpf. Se detectó la expresión de *deltaB*, *eyal*, *neuroD*, *notch3*, *sox2* y *sox3* restringida a distintas áreas del neuromasto (**Fig. 7**). Al comparar la expresión de estos genes con la de *ath1a* con la intención de buscar posibles relaciones funcionales con este gen, se pudo observar que *ath1a* se expresa en alrededor de 6 células centrales del neuromasto, las cuales corresponden presumiblemente (por su ubicación) a las células ciliadas (**Fig. 7A**). Al comparar la expresión de *ath1a* con la de *deltaB*, *eyal* y *neuroD*, se pudo observar que tanto la expresión de *deltaB* (**Fig. 7B**) como de *neuroD* (**Fig. 5G**) está restringida solo a un pequeño grupo de células centrales del neuromasto, sugiriendo una co-expresión con *ath1a*. *eyal* se expresa en una mayor cantidad de células que *ath1a*, presumiblemente en las células que expresan *ath1a*, más otras células periféricas del neuromasto (**Fig. 7C**). Por otra parte, al evaluar la expresión de *sox2*, *sox3* y *notch3* en los neuromastos, se observa que los patrones de expresión de *ath1a* y *deltaB* parecen complementarios a estos, tanto por el número de células marcadas como por la posición que ocupan en los neuromastos. (**Fig. 7D-F**), sugiriendo una exclusión o complementariedad sus expresiones.



**Fig. 6. Expresión de distintos genes relacionados con diferenciación en el primordio de la línea lateral.** Se evaluó la expresión de diversos genes mediante *hibridación in situ* en embriones de 32-34 hpf. *ath1a* (A) y *deltaB* (B) se expresan en pequeños grupos de células en el centro de los pro-neuromastos en el primordio migratorio. La expresión de *sox3* (C) se observa en gran parte de las células del primordio migratorio, concentrando su expresión en la parte distal del primordio migratorio. La expresión de *notch3* (D) y *sox2* (E) se va restringiendo a la zona periférica de los pro-neuromastos formando anillos, los cuales poseen cierta complementariedad con la expresión de *ath1a* y *deltaB*.



**Fig. 7. Expresión de distintos genes relacionados con diferenciación en los euromastos de la línea lateral.** Se evaluó la expresión de diversos genes mediante hibridación *in situ* en embriones de 72 hpf. *ath1a* (A) se expresa en alrededor de 6 células centrales del neuromasto, lo que coincide con la ubicación de las células ciliadas en el neuromasto diferenciado. *deltaB* (B) está restringida solo a un par de las células centrales del neuromasto, coincidiendo solo parcialmente con la expresión de *ath1a*. *eya1* (C) es expresada en todas las células de la primera capa celular de los neuromastos y abarcaría las células que expresan *ath1a* además de otras células más perimetrales del neuromasto. Los genes *notch3* (D), *sox2* (E) y *sox3* (F) no se expresan en el área central de los neuromastos, sugiriendo una exclusión de la expresión de estos genes en las células que expresan *ath1a*, observándose su expresión en zonas más perimetrales y basales del neuromasto al compararlos con *ath1a*.

#### **VI.4. Los genes *soxB1* son necesarios para la formación de la línea lateral de pez cebra.**

Los genes *sox* han sido relacionados con el control de la diferenciación neuronal, mantenimiento de células indiferenciadas (células troncales), migración celular y división celular (Buesher y cols., 2002; Miyagi y cols., 2004). Además se ha descrito que el control de la diferenciación neurogénica en otros sistemas, lo realizan mediante una interacción regulatoria con genes pro-neurales (Buesher y cols., 2002), sugiriendo una posible función regulatoria de parte de los genes *sox* de la familia B1 sobre los genes proneurales (*ath1a* y/o *neuroD*), en la formación de la línea lateral y en su regeneración. Ya que los genes *sox* han sido relacionados con el control de procesos de migración, diferenciación, división celular y mantención de progenitores, procesos que ocurren en el desarrollo de la línea lateral, consideramos importante evaluar su participación en el desarrollo de este sistema sensorial. Para esto, se realizaron ensayos de pérdida de función de los genes *sox2* y *sox3* y se evaluaron los fenotipos observados en la formación de la línea lateral de pez cebra, centrándonos en el proceso de diferenciación celular.

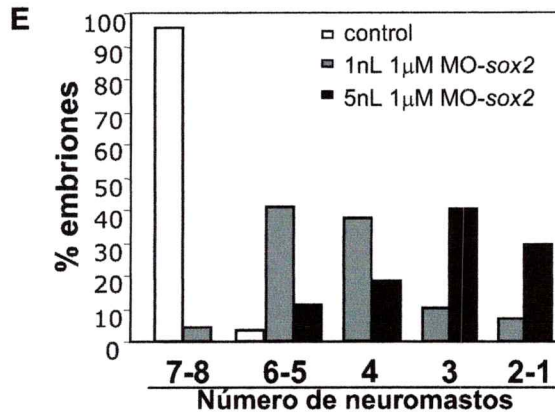
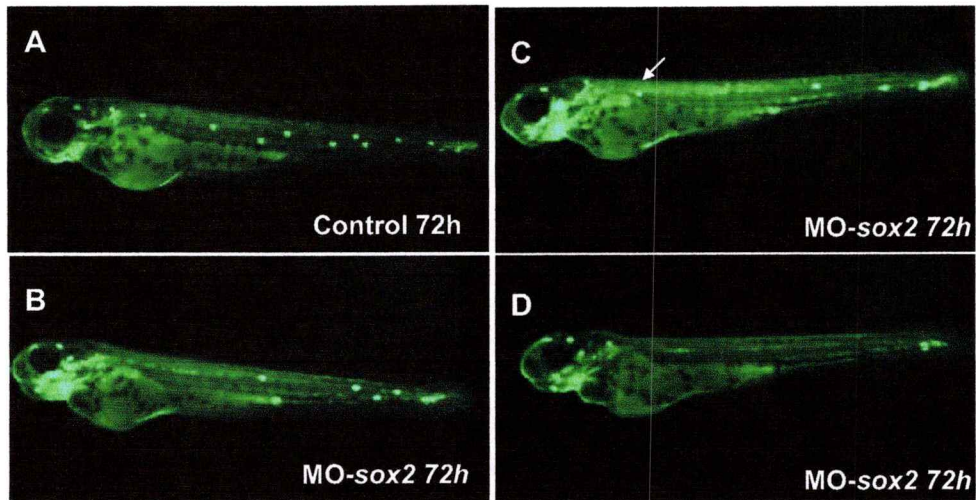
##### *VI.4.1. Pérdida de función de los genes *sox* afecta el número y distribución de los neuromastos durante el desarrollo.*

La pérdida de función se obtuvo mediante la inyección de morfolidos (oligonucleótidos antisentido) en cigotos de pez cebra. Los morfolidos se inyectaron en líneas transgénicas que expresan GFP en distintos tipos celulares de la línea lateral. Estas son: *claudinB*

(expresión de GFP de membrana de todas las células del neuromasto), *sqET20* (expresión de GFP citoplasmático exclusivamente en células del manto) y *Brn-3C::mGFP* (expresión exclusiva en el citoplasma de células ciliadas). A las 72 hpf se analizó el efecto de la pérdida de función de los genes *sox* en depósito y distribución de neuromastos, y en la organización celular y actividad de las células del neuromasto.

Embriones transgénicos *sqET20* controles a las 72 h presentan en promedio 7,5 neuromastos por lado distribuidos a lo largo de todo el mioseptum horizontal. (Fig. 8A, E). Al observar los embriones transgénicos morfantes *sox2*, estos presentan anomalías en el número de neuromastos. Morfantes inyectados con 1 nL de morfolino 1mM (4ng) de *sox2* presentan en promedio 4,54 neuromastos por lado (n=29) (Fig. 8B, C, E), y el número de neuromastos disminuye a un promedio de tan solo a 3,12 por lado al inyectar 5 nL (20ng) de morfolino *sox2* 1mM (n=44) (Fig. 8D, E). Además, se puede observar que los neuromastos de la zona media del embrión son más sensibles a la falta de expresión de *sox2*, ya que la mayor pérdida de neuromastos se concentra en esta área, la zona del L2 al L4, casi sin afectar los neuromastos más caudales (7 afectados de 44, 15,9%) (Fig. 8B-D). Estos resultados sugieren una dosis-dependencia en el número de neuromastos de *sox2* y una diferencia en la susceptibilidad predominante de algunos de los neuromastos a la falta de expresión de *sox2*.

Para corroborar los resultados obtenidos con el morfolino de *sox2*, se inyectaron construcciones que expresan versiones dominantes negativas (dn-*sox2*) para este gen en las mismas líneas transgénicas. Los embriones inyectados con 0,25ng ARN dn-*sox2* presentaron anomalías similares a las observadas en los morfantes *sox2*, observándose



**Figura 8. La pérdida de *sox2* genera fenotipos de disminución del número de neuromastos, efecto dependiente de la dosis de morfolino inyectada. (A)** embrión transgénico de la línea *sqET20* de 72 hpf, en donde se observa la expresión de GFP en 6 a 8 neuromastos, distribuidos uniformemente a lo largo del mioseptum horizontal. **(B-D)** Embriones *sqET20* inyectados con MO-*sox2* presentan anomalías en la línea lateral, observándose 3 fenotipos: **(B)** Agrupación de los neuromastos en la parte posterior del mioseptum horizontal, **(C)** deposito del primer (P1) o segundo neuromasto (P2) (ver flecha) y la agrupación del resto de los neuromastos en la parte posterior del mioseptum horizontal, siendo el número de neuromastos totales menor que el del control y **(D)** pérdida casi total de los neuromastos de la línea lateral posterior del pez cebra, observado solo a concentraciones mayores de morfolino (5nL de 1mM de MO-*sox2*). **(E)** Cuantificación del número de neuromastos depositados con las 2 concentraciones inyectadas de MO-*sox2*, donde se muestra que la disminución de neuromastos ocurre en ambas concentraciones de MO y sugiere un efecto dosis dependiente.

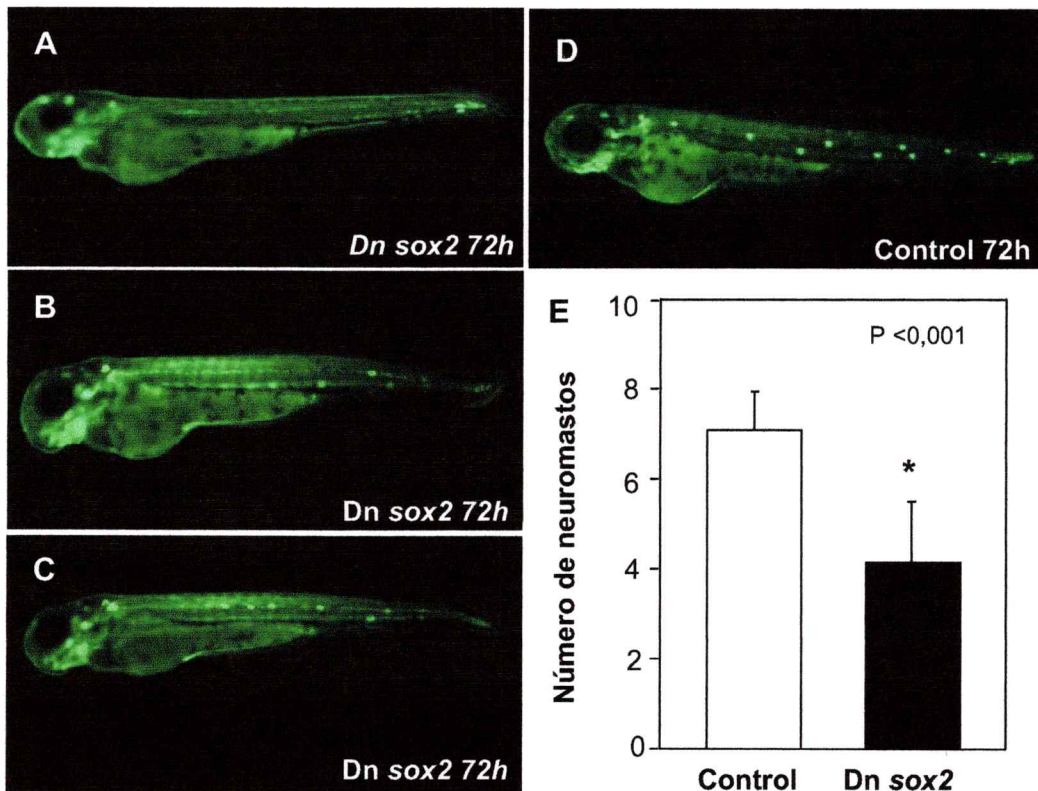


sólo un promedio de 4,12 neuromastos en los embriones inyectados (**Fig. 9 A-D**). Este resultado corrobora los resultados obtenidos y la especificidad del fenotipo.

Al comparar embriones controles v/s *dn-sox2* se observó diferencias significativas en el número de neuromastos (controles 7,42; *dn-sox2* 4,21,  $p < 0,01$ ,  $n=14$ ) (**Fig. 9E**).

Con la intención de aclarar si la menor cantidad de los neuromastos observados en los morfantes *sox2* se debe a un problema surgido directamente de defectos en el depósito de los neuromastos, en la migración del primordio o a la sobrevivencia de los neuromastos depositados, se analizaron los peces transgénicos *SqET20* morfantes para *sox2* a las 48 hpf (recién finalizado el depósito de neuromastos). En esta etapa del desarrollo, se observó un número indistinguible de neuromastos depositados en controles vs. morfantes. Por lo tanto, el defecto inducido por la pérdida de función de *sox2* ocurre entre las 48hpf y las 72hpf y no está relacionado al depósito de los neuromastos sino a su sobrevivencia. Una observación cuidadosa del intervalo de tiempo en que desaparece la marca de GFP en los transgénicos *SqET20* morfantes para *sox2*, mostró la pérdida progresiva de estas células y la degeneración de la estructura del neuromasto (datos no mostrados).

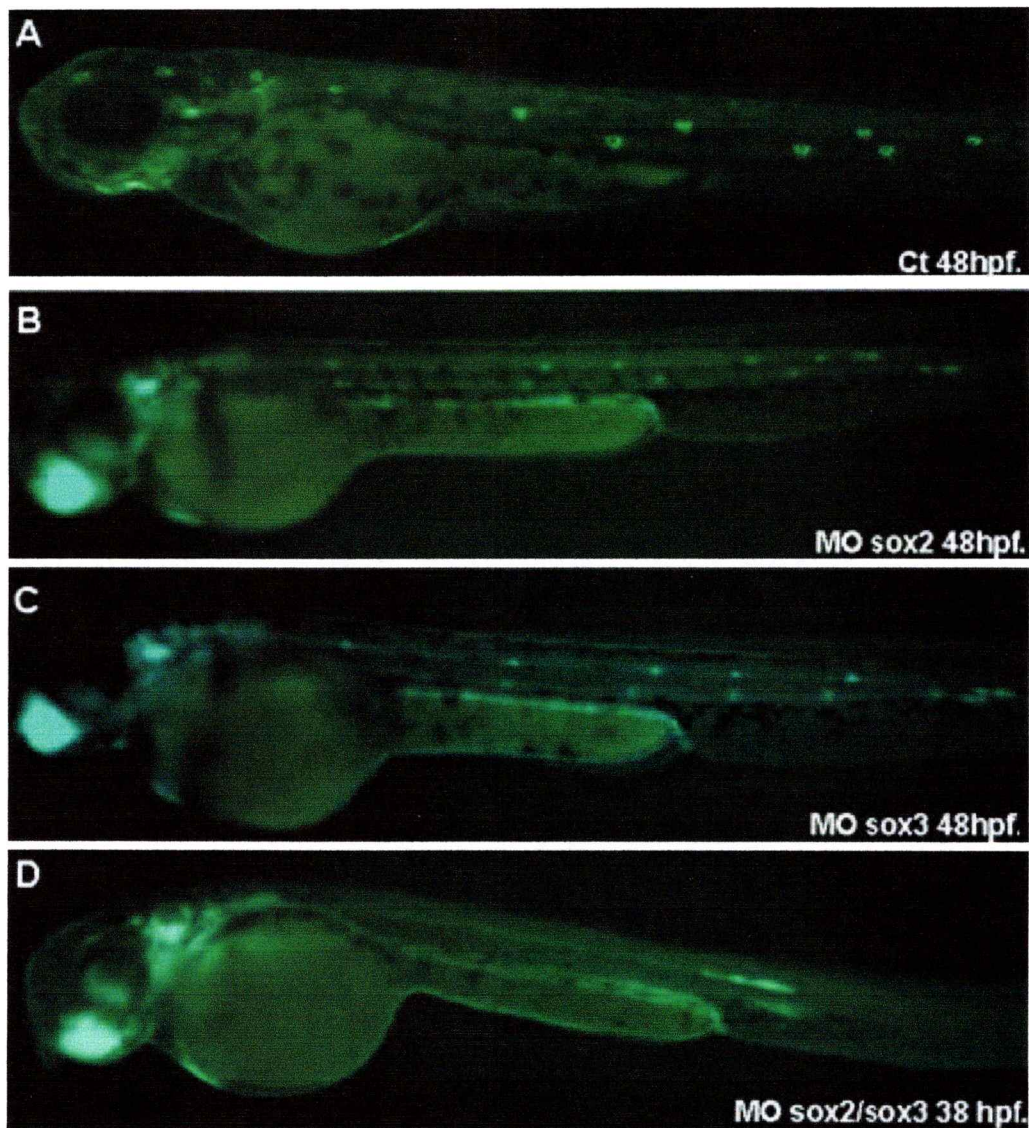
Por otro lado se evaluó el requerimiento de *sox3* para la formación de la línea lateral. Para esto se inyectaron 20 ng de morfolino por embrión, en cigotos de pez cebra y a las 72 hpf se analizó el depósito de los neuromastos. Los embriones inyectados con MO-*sox3* no presentaron anomalías en el número de neuromastos ni en la distribución de



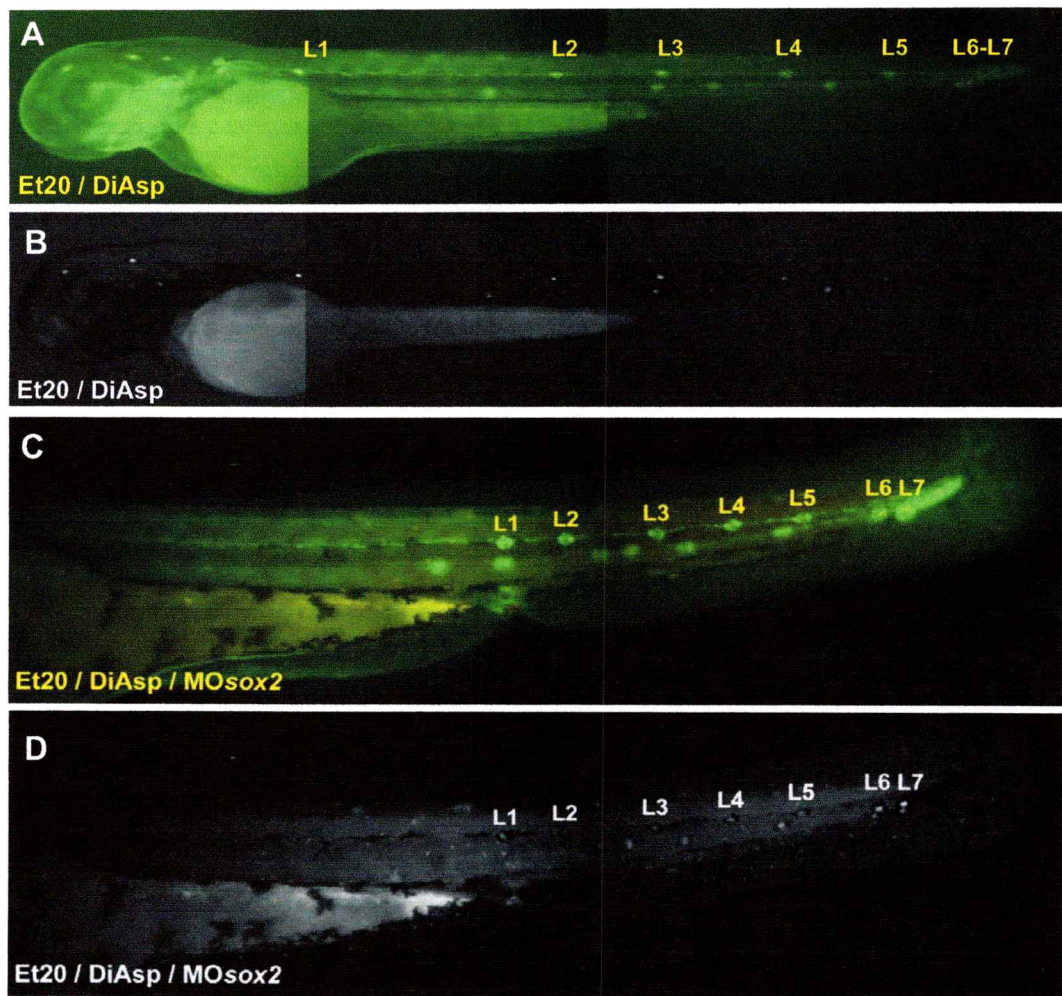
**Figura 9.** La inyección de un dominante negativo (Dn) de *sox2* genera fenotipos equivalentes a los generados mediante la inyección del morfolino de *sox2*. (A-C) Embriones *sqET20* inyectados con el Dn-*sox2* y observados a las 72 hpf presentan 3 fenotipos: (A) la agrupación de los neuromastos en la parte posterior del mioseptum horizontal; (B) Un depósito agrupado de los neuromastos en la parte posterior del mioseptum horizontal; y (C) una pérdida casi total de los neuromastos de la línea lateral posterior del pez cebra. (D) Embrión transgénico de la línea *sqET20* es visualizado a las 72 hpf en embriones controles, donde se puede observar la expresión de GFP en 6 a 8 neuromastos, distribuidos uniformemente a lo largo del mioseptum horizontal. (E) Gráfico comparativo del número de neuromastos depositados en los embriones inyectados con Dn-*sox2* y control. El número de neuromastos totales de embriones inyectados con Dn-*sox2* es menor con respecto al control a las 72 hpf.

estos en el mioseptum horizontal a las 48 hpf (**Fig. 10**), pero si presentaron anomalías en la forma y disposición de los neuromastos al examinarlos en larvas más avanzadas (96 hpf; ver sección VI.4.2).

Con la intención de analizar la participación de los 2 genes *sox* analizados en la formación de la línea lateral se inyectó ambos morfolinós en conjunto o un morfolino diseñado para inhibir ambos genes simultáneamente en cigotos de pez cebra (ver materiales y métodos). En embriones inyectados con los 2 morfolinós *MO-sox2* más *MO-sox3* (20ng totales por embrión) o inyectados con el morfolino que afecta a ambos genes, *MO-sox2/3*, (20 ng), se observó un depósito anómalo de los neuromastos, siendo este depósito más caudal y concentrado (**Fig. 11C**). Todos los neuromastos en los dobles morfantes se agrupan posterior a la zona donde normalmente se deposita el neuromasto L4 (**Fig. 10D; 11A**). Además se pudo observar, en un muy bajo porcentaje de casos, una disminución del número de los neuromastos a las 72 hpf, a diferencia de lo observado con inyecciones con morfolino *sox2* o *sox3*, donde se afecta el número de neuromastos diferenciados o donde no se afecta ni el número ni la distribución de estos neuromastos, respectivamente. Por lo tanto, los morfantes de *sox2* poseen un fenotipo más severo que el doble morfante (*sox2/sox3*) (**Fig. 8, Fig. 11**) ya que los morfantes *sox2* muestran un menor número de neuromastos a las 72 hpf. y los dobles morfantes *sox2/sox3* muestran sólo un retraso en el depósito, pero una correcta diferenciación y sobrevivencia. Estos resultados sugieren diferentes funciones para los genes *soxB1* en el desarrollo de la línea lateral.



**Figura 10. El depósito normal de los neuromastos de la línea lateral requiere de al menos un gen *sox* de la familia B1.** (A) Embrión transgénico de la línea *claudinB* de 48 hpf, en donde se observa la expresión de GFP en 6 a 8 neuromastos, distribuidos uniformemente a lo largo del mioseptum horizontal. (B) Embriones *claudinB* inyectados con MO *sox2* no presentan anomalías en el depósito de los neuromastos a las 48 hpf. (C) Embriones *claudinB* inyectados con MO *sox3* tampoco presentan anomalías en el depósito de los neuromastos a las 48 hpf. (D) Embriones *claudinB* inyectados con MO *sox2/sox3* presentan fallas en el depósito de los neuromastos, no presentando depósito alguno hasta las 36 hpf.



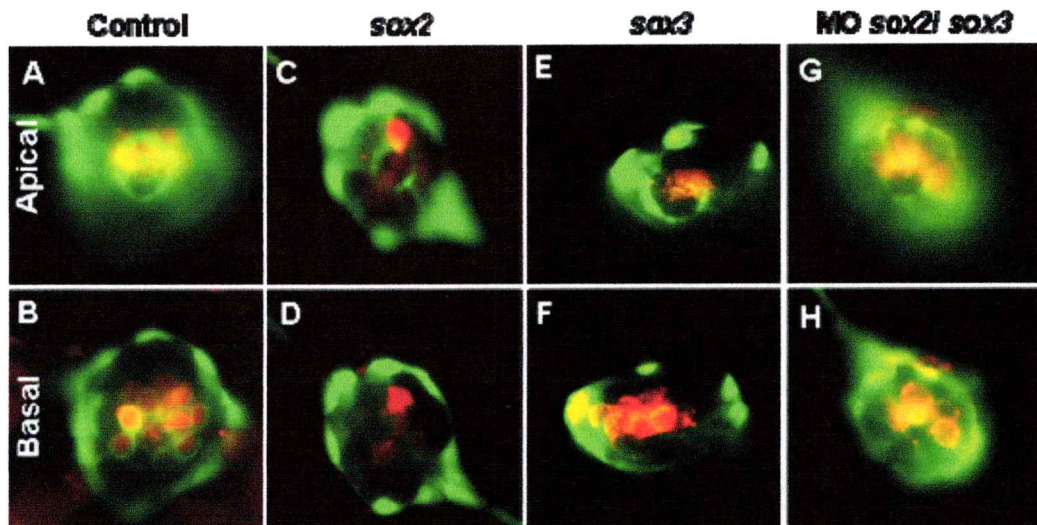
**Figura 11. La pérdida de función de *sox2* y *sox3* provoca un depósito posteriorizado de los neuromastos. (A)** Embriones transgénicos *sqET20* control; donde se muestra el depósito normal de los neuromastos a lo largo de todo el embrión. **(B)** Tinción con DiAsp muestra una actividad normal de las células ciliadas de neuromastos de un embrión control. **(C)** Embriones transgénicos *sqET20* inyectados con 20ng de morfolino para *sox2/sox3* muestran un aumento en la proximidad de los neuromastos y su posteriorización. **(D)** Incorporación normal de DiAsp en las células ciliadas de un embrión morfante *sox2/sox3*

#### VI.4.2. *sox3* es necesario para la organización de las células del neuromasto.

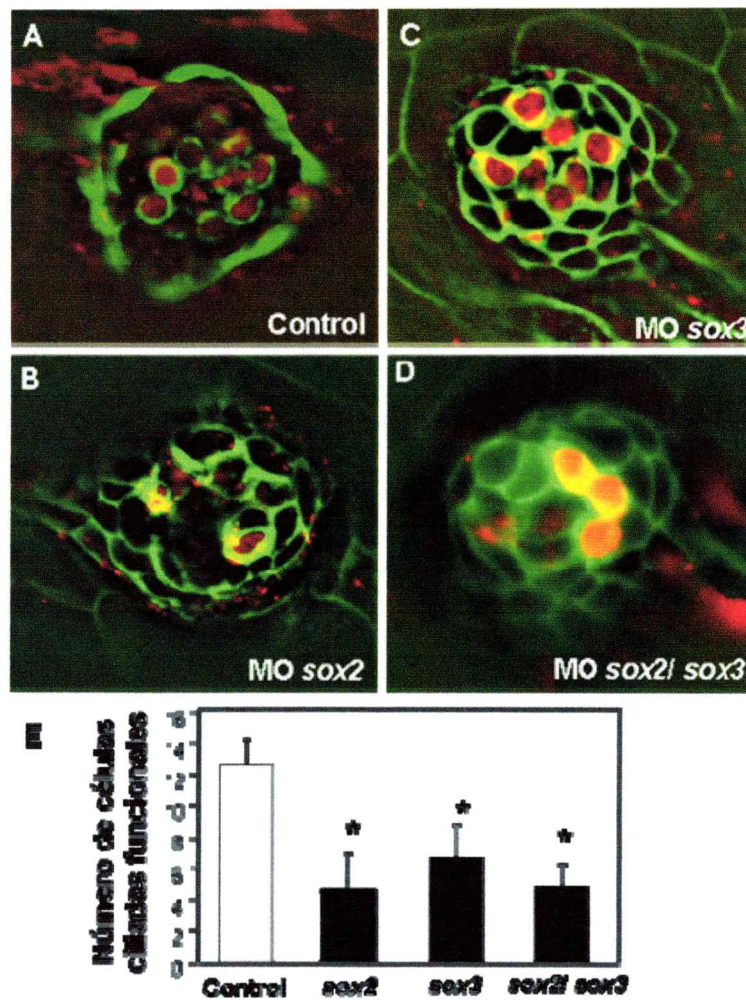
Si bien el depósito de neuromastos es normal en los morfantes *sox3*, detectamos formas aberrantes en ellos en larvas de 96hpf. Para estudiar la identidad y morfología de los distintos tipos celulares de los neuromastos en condiciones de falta de función de *sox3*, se utilizaron líneas transgénicas que expresan GFP en los diversos tipos celulares del neuromasto.

Mediante el uso del transgénico *sqET20* se pudo observar que en embriones morfantes inyectados con 20ng de morfolino contra *sox2*, las células del manto no presentan anomalías morfológicas (**Fig. 12C, D**) al compararlos con embriones control (**Fig. 12A, B**). Por el contrario, al evaluar los distintos tipos celulares del neuromasto en el morfante *sox3* usando los transgénicos *sqET20* y *claudinB* se observó neuromastos con forma ovoidal acompañados por un cambio en la distribución de las células ciliadas en el neuromasto (**Fig. 12E, F; Fig. 13C**). Se observa esta desorganización de las células del neuromasto concentrada principalmente entre los neuromastos L1 al L4 (23,4% de los embriones, N=23). En estos neuromastos se observó un desplazamiento parcial (**Fig. 14B**) o incluso total (**Fig. 14C**) de sus células hacia el área ventral del embrión (**Fig. 14D**), no observándose este comportamiento en embriones control (**Fig. 14A**).

Finalmente al analizar los distintos tipos celulares de los neuromastos de los dobles morfantes *sox2/sox3* se observó que las células del manto no presentan anomalías (**Fig. 12G, H; Fig. 13D**), nuevamente sugiriendo que ambos genes regulan diferentes procesos del desarrollo de la línea lateral.

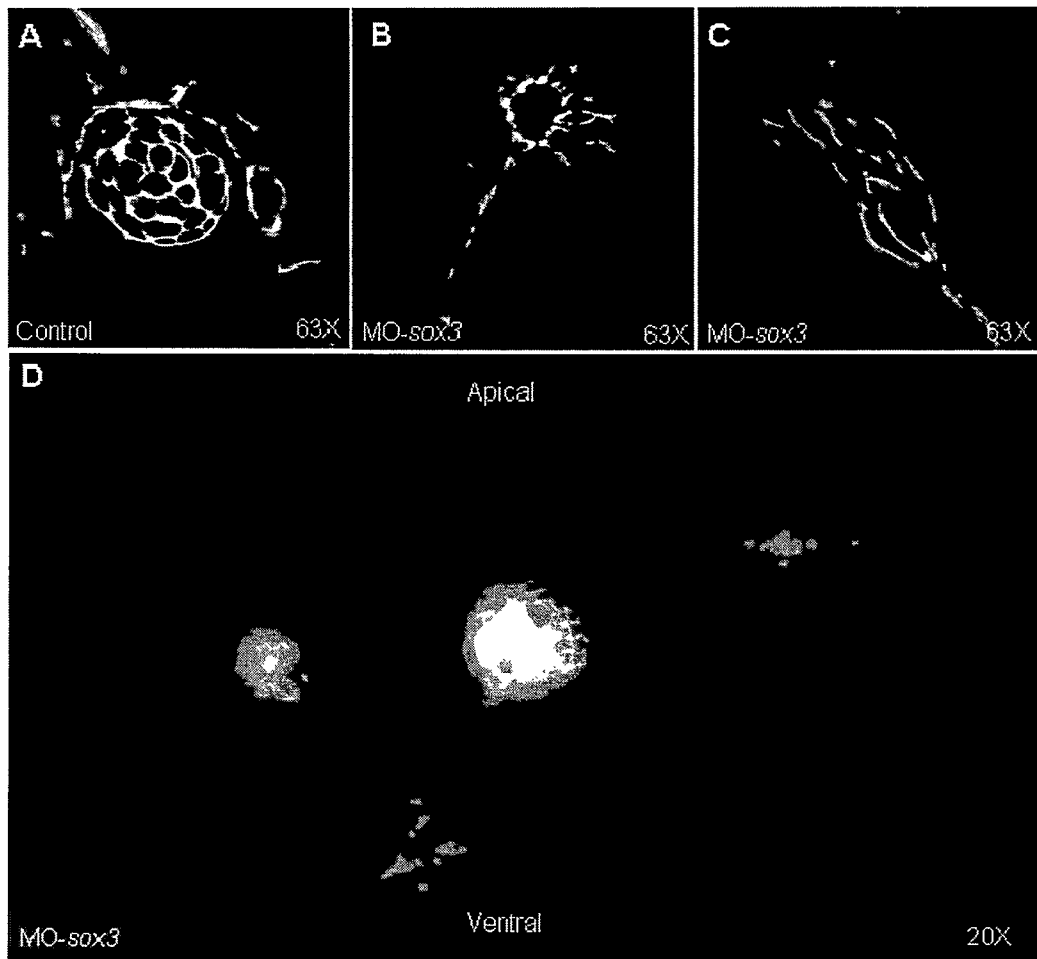


**Figura 12. Embriones inyectados con MO-*sox2* y/o MO-*sox3* presentan anomalías en la morfología de sus neuromastos. (A, C, E) Vista apical de los neuromastos L2, (B, D, F) Vista basal de los neuromastos L2. (A, B) embriones transgénicos *sqET20* control de 96 hpf., se observa la forma normal de un neuromasto, donde células del manto (verde) rodean a una agrupación maciza y centralizada de alrededor de 12 a 14 células ciliadas activas identificadas con DiAsp (rojo). (C, D) Pérdida de *sox2* en embriones transgénicos *sqET20* afecta la morfología de los neuromastos; se observa un menor tamaño de los neuromastos, con menor número de células ciliadas (4 a 8 células) pero igual número de células del manto. (E, F) Los neuromastos de los embriones morfantes *sox3* también muestran diferencias morfológicas con respecto al control. Por ejemplo, las células del manto pierden su distribución en forma de circunferencia, asemejándose más a un óvalo. Además, los neuromastos morfantes presentan un menor número de células ciliadas (3 a 8 células) que los neuromastos de larvas control. (G, H) Dobles morfantes para *sox2/sox3* no muestran anomalías en las células del manto, pero sí en el número de células ciliadas funcionales (4 a 8 células ciliadas).**



**Figura 13. Embriones inyectados con MO *sox2* y MO *sox3* presentan anomalías en el número y distribución de las células ciliadas funcionales de los neuromastos. (A)** Embriones transgénicos *claudinB* (GFP, verde) de 72hpf. sin inyectar (control) muestran una distribución normal de las células ciliadas en los neuromastos. Las células ciliadas permanecen agrupadas en el centro de los neuromastos en un grupo macizo de alrededor de 12 a 14 células identificadas con DiAsp (rojo). **(B)** Embriones morfantes de *sox2* presentan un número inferior de células ciliadas funcionales con respecto al control, además estas no se encuentran distribuidas al centro del neuromasto. **(C)** Neuromastos de los embriones morfantes *sox3* muestran las mismas diferencias que los embriones morfantes de *sox2* en el número de células ciliadas funcionales con respecto a las células control. **(D)** Gráfico comparativo del número de células ciliadas funcionales de los morfantes de distintos *sox*. Se analizó el número de células ciliadas de los neuromastos L1, L2 y L3 de los embriones. Ambos morfantes presentan un número inferior de células ciliadas en comparación con embriones control.





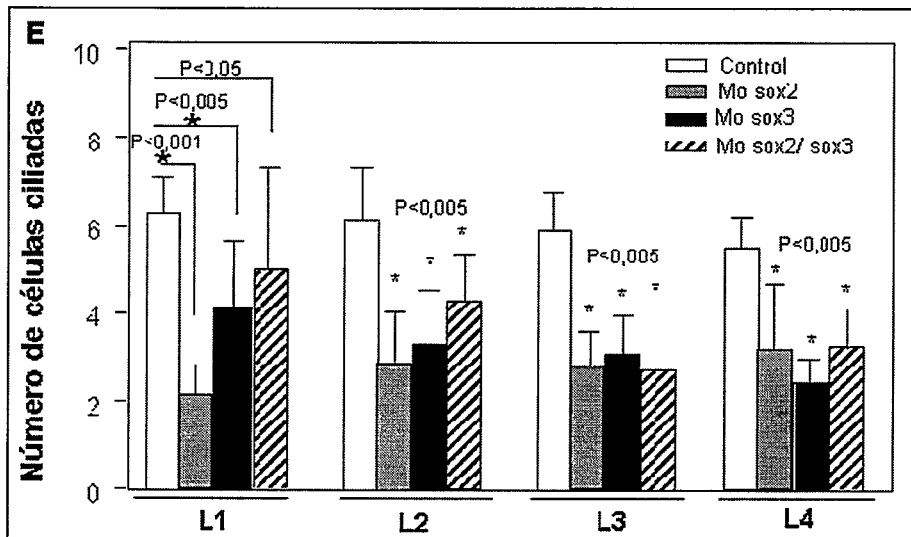
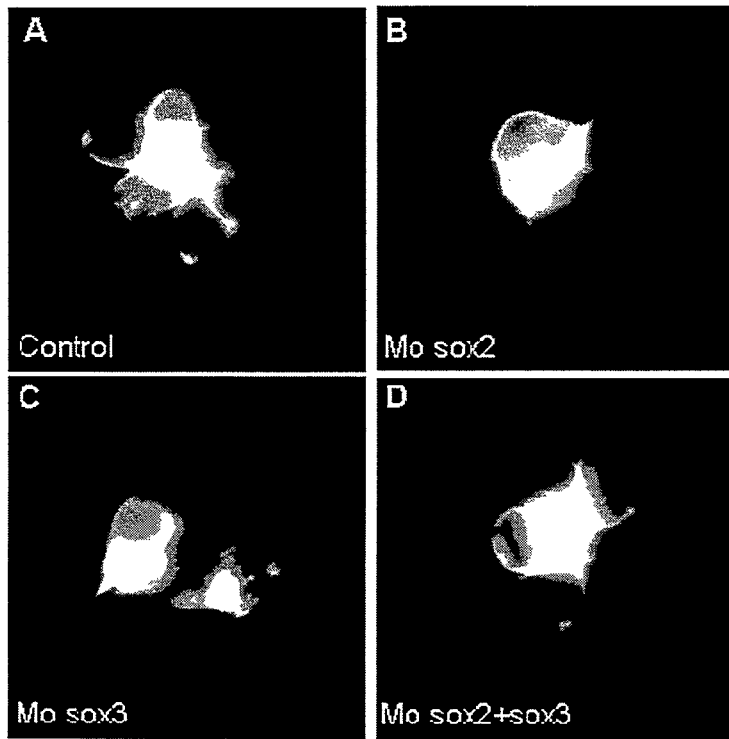
**Figura 14.** La pérdida de función de *sox3* produce desorganización en las células del neuromasto. (A) Neuromasto de un embrión control. (B-D) Embriones transgénicos *claudinB* inyectados con 20ng de MO-*sox3* presentan una desorganización de las células de los neuromastos a las 96 hpf; concentradas exclusivamente entre los neuromastos L1 a L4. Se muestra la desorganización de un neuromasto y el desplazamiento parcial (B), o total de sus células (C) hacia el área ventral del embrión (D).

#### VI.4.3. Neuromastos de los morfantes *sox* poseen un menor número de células ciliadas.

Para analizar si las inyecciones de MO-*sox2*, MO-*sox3* o MO-*sox2/sox3* afectan la diferenciación o funcionalidad de las células ciliadas, se utilizó la tinción DiAsp (72 hpf) que ingresa a las células ciliadas activas.

Los neuromastos de embriones transgénicos *SqET20* y *claudinB* inyectados con 20 ng de MO-*sox2*, MO-*sox3* o MO-*sox2/sox3* presentan diferencias en el número de células ciliadas funcionales (**Fig. 12, Fig. 13**) ya que incorporan el trazador vital DiAsp (en rojo) en un menor número de células que en embriones control (n=14; p<0,01 al comparar cualquiera de los morfantes con el control) (**Fig. 13E**).

Con la intención de aclarar si la diferencia en el número de células activas en los embriones morfantes en relación al control es debida a una pérdida de la función mecanotransdutora o a la reducción en el número de estas células *per se*, se analizó el efecto de los morfolinós en embriones transgénicos *Brn-3C::mGFP* (línea transgénica que expresa GFP anclado a membrana exclusivamente en células ciliadas) y se observó un menor número de células marcadas con GFP en los embriones morfantes (**Fig. 15B**) en comparación con embriones control (**Fig. 15A**) (control  $6,3 \pm 0,82$ ; MO-*sox2*  $2,14 \pm 0,690$ ; p<0.01; n=10). La disminución de células ciliadas en los neuromastos morfantes ocurrió en los neuromastos del L1 al L4 (**Fig. 15E**), ya que los neuromastos más caudales no presentaron esta anomalía. El resultado es similar al que se obtiene al contar las células ciliadas marcadas con DiAsp de los distintos morfantes (**Tabla 3**). El número de células ciliadas activas corresponde al total de las células ciliadas en los



**Figura 15. Pérdida de función de *sox* afecta el número de células ciliadas de los neuromastos.** Embriones transgénicos *Brn-3C::mGFP* que expresan GFP en las células ciliadas fueron inyectados con morfolinolinos contra *sox2*, *sox3* o ambos, y se evaluó a las 72 hpf el número de células por neuromasto. La pérdida de los genes *sox2* (B), *sox3* (C) y *sox2/sox3* (D), presentan un menor número de células ciliadas. (E) Cuantificación del número de células ciliadas.

	MO-sox3	MO-sox2	MO-(sox2+sox3)	Control
L1	3,833	3	4,714	7,5
L2	5	4,444	4,571	7,625
L3	5,833	4,667	3,857	7,571
L4	4,667	5,222	3,857	7,286
Nm final	6,286	6,412	6,323	6,823

**Tabla 3. Embriones inyectados con MO-sox2 y MO-sox3 presentan anomalías en el número de células ciliadas funcionales por neuromasto.** Embriones transgénicos *claudinB* sin inyectar (control), embriones morfantes de *sox2* o *sox3* y embriones morfantes para ambos genes, fueron teñidos con DiAsp para evaluar el número de células ciliadas funcionales por neuromasto. Los neuromastos analizados fueron desde L1 al L4.

embriones morfantes para los distintos genes *sox*, indicando que la pérdida de función de ambos genes afecta la diferenciación de las células ciliadas y no su funcionalidad.

Como se mostró anteriormente, embriones morfantes para *sox2/sox3* presentan un depósito posteriorizado, ubicándose el primer neuromasto en la posición que normalmente ocupa el neuromasto L4 en el embrión control (**Fig. 11**). Si se compara el neuromasto L1 control con el L1 del doble morfante (depositado en la zona de depósito normal L4-L5), se observa un menor número de células ciliadas, debiéndose quizás a una menor maduración del neuromasto. Sin embargo, al comparar el depósito del L1 morfante con el L4 control (equivalente en tiempo de maduración) no se observan diferencias significativas en el número de células ciliadas (**Tabla 3**).

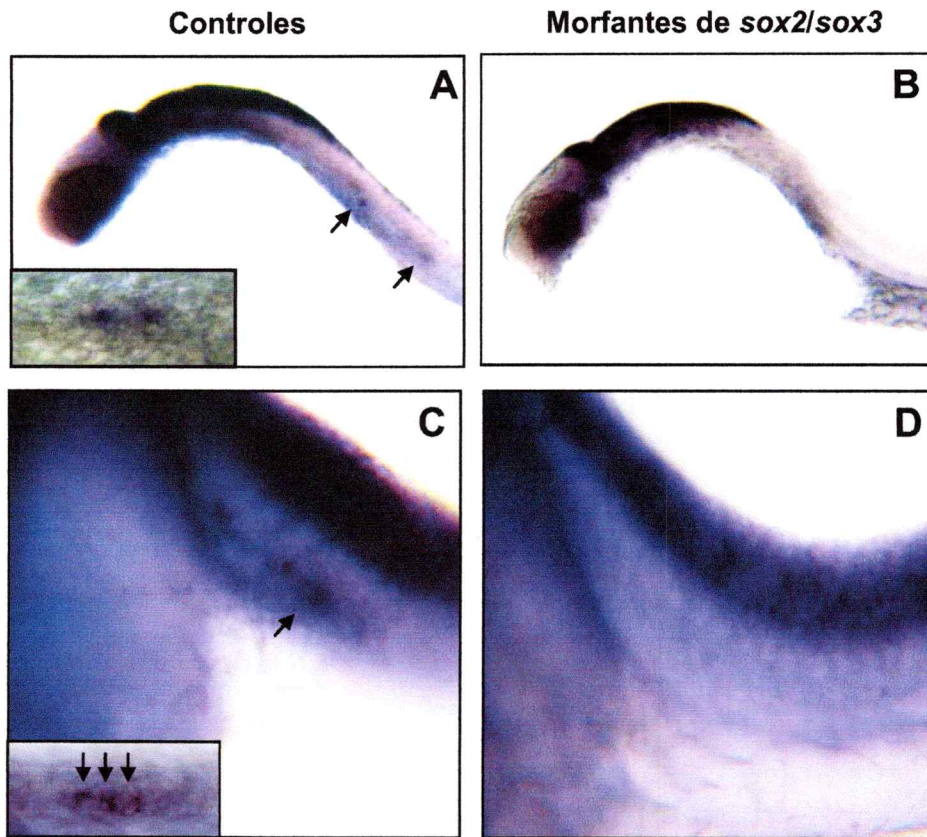
#### **VI.5. Los genes *soxB1* regulan la neurogénesis en el primordio migratorio.**

Con la intención de explicar el fenotipo del doble morfante *sox2/sox3* que presenta agrupación caudal de los neuromastos, evaluamos el estado de diferenciación de los pro-neuromastos en el primordio migratorio usando como marcadores de este estado la expresión de *ath1a* y de los componentes de la vía *notch/delta*. Existen evidencias de que los genes de la familia *soxB1* regulan la activación de genes proneurales del tipo bHLH, por lo tanto podrían estar regulando la expresión de *ath1a* (gen clave en la determinación del destino de las células ciliadas) o de los componentes de la vía *notch/ delta* en el primordio migratorio.

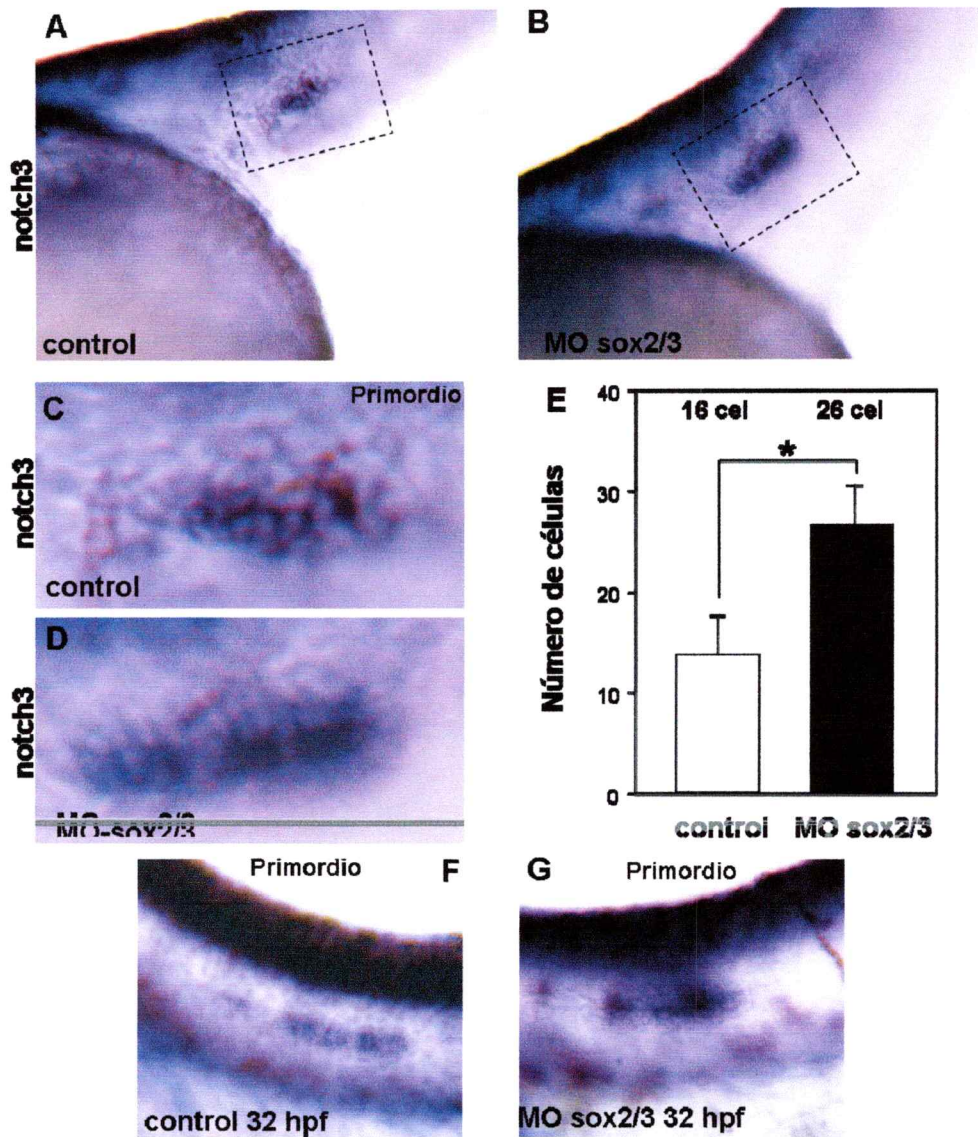
Como ya hemos visto, *ath1a* y *deltaB* se expresan en pequeños grupos centrales de células en el primordio (**Fig. 6A, B**) anticipando la formación de las células ciliadas en

el centro de los neuromastos. Por otro lado, *notch3* se expresa ubicuamente en el inicio de la migración del primordio y a lo largo de la migración su expresión se va restringiendo a las células periféricas de los pro-neuromastos (**Fig 6D**). Al evaluar la expresión de *ath1a*, *notch3* y *deltaB* en el primordio migratorio de embriones control y dobles morfantes *sox2/sox3*, se observó que estos últimos presentan alteraciones en la expresión de estos marcadores. En el primordio migratorio de embriones control (26-30hpf), previo al depósito de los neuromastos, se observa expresión de estos genes. Sin embargo en los embriones morfantes no se detecta expresión de *ath1a* (**Fig. 16A, B**) ni de *deltaB* (**Fig. 16C-E**). Por otro lado, se pudo observar en el primordio de embriones morfantes que *notch3* se expresa en un mayor número de células en comparación con el primordio control ( $p < 0.01$ ;  $n = 13$ ) (**Fig. 17**). Este resultado sugiere que los genes *sox* participan en la especificación y/o en el control de la diferenciación en los pro-neuromastos e interactúan con la neurogénesis mediada por la vía *notch/ delta*.

Por otra parte, al evaluar la expresión de *ath1a*, *notch3* y *deltaB* en embriones morfantes para *sox2/sox3* de 32 o 34 hpf, se pudo observar una recuperación gradual de la expresión normal de estos genes, coincidiendo con el inicio del depósito en los dobles morfantes (**Fig. 17F, G**). Dado que la actividad inhibitoria de los morfolinos decae con el tiempo, es posible sugerir que la reaparición de los marcadores moleculares en el primordio se debe a la recuperación de los niveles de las proteínas Sox2 y Sox3 en estadios tardíos. Por tanto, se establece una relación directa entre *sox2* y *sox3*, el inicio de la diferenciación de las células del primordio y el proceso de depósito de los neuromastos.



**Figura 16. La pérdida de función de *sox2* elimina la expresión de marcadores de diferenciación de células ciliadas. (A)** Hibridación *in situ* de *ath1a* donde se muestra la expresión normal de *ath1a* en embriones de 28 hpf, se observa un pequeño grupo de células marcadas tanto en el primordio como en los neuromastos (inserto). **(B)** Embriones morfantes de *sox2* de 28 hpf, pierden la expresión de *ath1a* específicamente en las células de la línea lateral, manteniendo su expresión en las otras áreas. **(C)** Expresión normal de *deltaB* en embriones de 28 hpf, se observan 3 pequeños grupos de células en el primordio (inserto) estas células prefiguran la aparición de pro-neuromastos. **(D)** Embriones morfantes de *sox2* de 26 hpf, pierden la expresión de *deltaB* específicamente en las células de la línea lateral, manteniendo su expresión en la notocorda.



**Figura 17. La pérdida de función de *sox2* y *sox3* (*MO-sox2/sox3*) modifica la expresión de *notch3*.** (A-D) Hibridación *in situ* de *notch3* en embriones de 27 hpf. (A) Expresión de *notch3* en embriones control. (B) Expresión de *notch3* en embriones morfantes de *sox2/sox3*. (C-D) Expresión de *notch3* en primordio de embriones control (C) y morfantes para *sox2/sox3* (D). Se observa expresión aumentada de *notch3* en morfantes *sox2/sox3*. (E) Cuantificación del número de células del primordio positivas para *notch3* de embriones controles versus morfantes de *sox2/sox3*. ( $P = <0,001$ ). (F) Primordio de embrión control y (G) embrión morfante *sox2/sox3* luego de 32 hpf muestra que la expresión de *notch3* regresa a niveles normales, coincidiendo con la recuperación del depósito de neuromastos.



**VI.6. La secuencia temporal de expresión de genes embrionarios, importantes para la diferenciación de las células ciliadas, es recapitulada durante la regeneración de ellas.**

Con la intención de estudiar la participación de *sox2*, *sox3* y *ath1a* en la diferenciación de las células ciliadas de la línea lateral, nos enfocamos en el proceso de regeneración, separando así el proceso de diferenciación del de la migración del primordio y del depósito de los neuromastos.

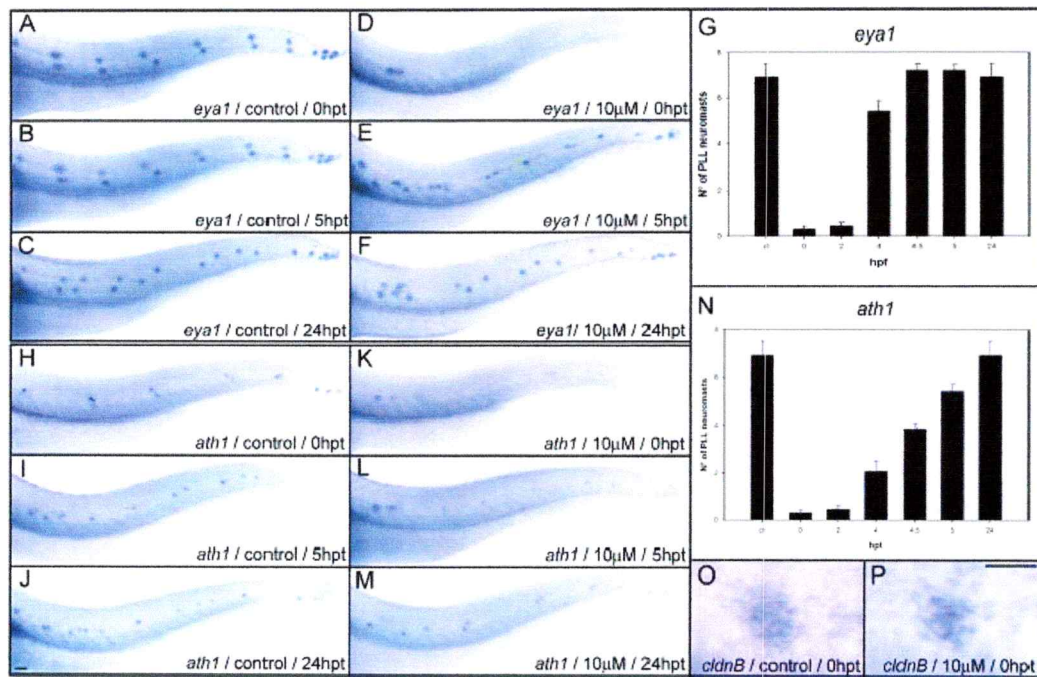
Para validar este estudio, es necesario comprobar que el proceso de diferenciación de las células del neuromasto durante la regeneración recapitula el proceso de diferenciación ocurrida durante el desarrollo de la línea lateral. Para esto se analizó la expresión de marcadores génicos que participan en la diferenciación de células ciliadas de la línea lateral durante la regeneración de los neuromastos.

Se indujo un daño de los neuromastos con 10  $\mu$ M  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  por 2 h y luego se evaluó, a distintos tiempos de regeneración, la expresión de marcadores de diferenciación presentes en el desarrollo mediante hibridación *in situ*: los genes evaluados fueron *eyal*, *ath1a* y *sox2*.

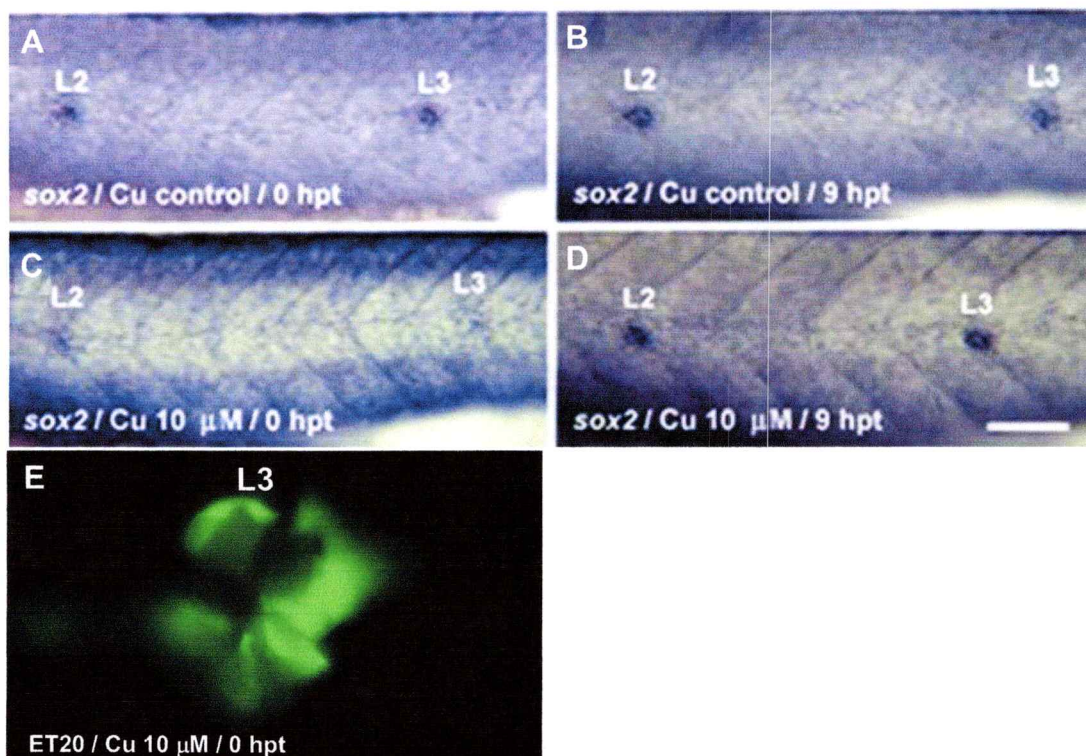
En el desarrollo, *eyal* comienza a expresarse en las placodas de la línea lateral y se mantiene su expresión durante todo el proceso de desarrollo de la línea lateral en todas las células derivadas del primordio (Fig. 7C). La expresión de *sox2* se inicia luego de la definición del ganglio y primordio de la línea lateral, cuando el primordio comienza a desplazarse hacia caudal. De los tres genes analizados, *ath1a* es el más

tardío en expresarse, se detecta cuando el primordio ya ha avanzado varios somitos y su expresión se localiza en células centrales de los pro-neuromastos. A las 72 hpf, momento en que la línea lateral primaria está completamente desarrollada, estos tres genes continúan expresándose en distintos tipos celulares de los neuromastos maduros. *sox2* se expresa en células de soporte y manto, *eyal* se expresa en células de soporte, del manto y ciliadas y *ath1a* exclusivamente en células ciliadas (Fig. 7).

Embriones tratados con cobre y analizados por hibridación *in situ* luego del tratamiento pierden totalmente la expresión de *ath1a* (Fig. 18D- G) y *eyal* (Fig. 18K- N). Para verificar que la pérdida de la expresión de *ath1a* es debido a la pérdida de las células que lo expresan (las ciliadas), se trataron en paralelo peces transgénicos *brn3c::mGFP* que expresan GFP en las células ciliadas. Se observó una pérdida total de este tipo celular luego del tratamiento (dato no mostrado), lo que confirma que la desaparición de la marca de *ath1a* se debe a la muerte de las células ciliadas con el tratamiento. Para evaluar si la pérdida de expresión de *eyal* se debe a la pérdida de las células que lo expresan, se analizó en paralelo la expresión de GFP en peces transgénicos *claudinB*, marcador que se co-expresa con *eyal* en las células de soporte y del manto. Se pudo observar que la expresión de GFP en los peces *claudinB* se mantiene en los peces tratados con cobre (Figura 18 O- P), indicando que la pérdida de la expresión de *eyal* no se debe a la pérdida de este tipo celular sino a una baja en los niveles de expresión del gen en estas células (Fig. 18P; Fig. 19E). Por otro lado, tratamientos con cobre afectan sólo parcialmente la expresión de *sox2* (Fig. 19A-D), siendo esta inhibición parcial no causada por la pérdida de células (Fig. 19E), ya que los



**Figura 18. La expresión de *eyal* y *ath1a* son inducidas en neuromastos durante la regeneración.** Expresión de *eyal* y *ath1a* en células de neuromastos control (A-J) y después de inducir daño con cobre 10  $\mu$ M por 2 horas (D-M). Los embriones tratados con cobre y los controles fueron fijados a diferentes tiempos y procesados para hibridación *in situ* para *eyal* (A-F), *ath1a* (H-M) y *claudinB* (O-P). El tiempo transcurrido después del tratamiento es expresado en horas post-tratamiento (hpt). La expresión de los transcritos *eyal* y *ath1a* son indetectables inmediatamente después del tratamiento con cobre (D, K); sin embargo, estos genes comienzan a reaparecer 5 horas después de remover el cobre de los peces (E, L), observándose una completa restauración de la expresión después de 24 horas, respecto a los embriones no tratados (F, M). Cuantificación del número de neuromastos marcados a diferentes tiempos durante el periodo de recuperación, para *eyal* (G) y *ath1a* (N). (O, P) *claudinB* permanece detectable en los neuromastos en todos los tiempos del tratamiento, incluso después de remover el cobre del agua (0 hpt) como puede ser observado comparando en embriones control (O) y embriones tratados (P). Barras, J=3  $\mu$ m, P=20  $\mu$ m.



**Figura 19. Expresión de *sox2* durante la regeneración.** Las larvas tratadas con  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  (Cu) por 2 h se removieron de la solución de cobre y fueron dejadas recuperar incubando en solución sin metal durante los tiempos indicados para evaluar la expresión de *sox2* mediante hibridación *in situ*. (A, C) En larvas control fijadas y procesadas para hibridación *in situ* inmediatamente luego del tratamiento (0 hpt), la expresión de *sox2* disminuye fuertemente después del tratamiento con cobre. Sin embargo no se pierde por completo (B, D) Larvas tratadas después de 9 hpt recuperan los niveles normales de expresión de *sox2*. (E) El número de células de neuromastos de embriones transgénico *sqET20* tratado con  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  por 2 h, es similar al número de células de neuromastos de embriones controles sin cobre. (barra de escala  $100\mu\text{m}$ )

tipos celulares que expresan este gen no se ven afectados por tratamientos con cobre (Hernández y cols., 2007 y datos no mostrados).

Luego de retirar el cobre de los embriones, se evaluó la reexpresión de estos genes en el proceso de regeneración, contando cada hora el número de neuromastos en que se detecta una marca de hibridación *in situ*. A las 4 h de regeneración se observó la recuperación casi total de la expresión de *eyal* (Fig. 18G). Más tarde, desde las 5 h en adelante, se observa la re-expresión de *ath1a* a niveles similares al control (Fig. 18N), manteniendo ambos genes una congruencia temporal respecto a su expresión en el desarrollo. *sox2*, por el contrario, recién es detectado a las 9 h (Fig. 19D) a niveles similares al control (Fig. 19B). Esta dinámica de expresión de *sox2* sugiere que los niveles de expresión en las células de soporte disminuyen al inicio del proceso de regeneración, posiblemente para permitir la activación de genes de diferenciación o proliferación, recuperando niveles de expresión normal luego de concluido el proceso de regeneración de las células ciliadas de los neuromastos.

En embriones tratados con 1  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  la expresión de *sox2* también se ve disminuida inmediatamente luego del tratamiento (dato no mostrado). Se ha observado que el proceso de regeneración de las células ciliadas luego de tratamientos con 1  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  no requiere proliferación celular, a diferencia de lo observado con tratamiento con 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  (Hernández y cols., 2007). Por lo tanto, se sugiere que *sox2* participa en el control de la diferenciación de las células ciliadas pero posiblemente no en el control del proceso proliferativo.

## **VI.7. *sox2* y *sox3* participan en la regeneración de las células ciliadas de los neuromastos.**

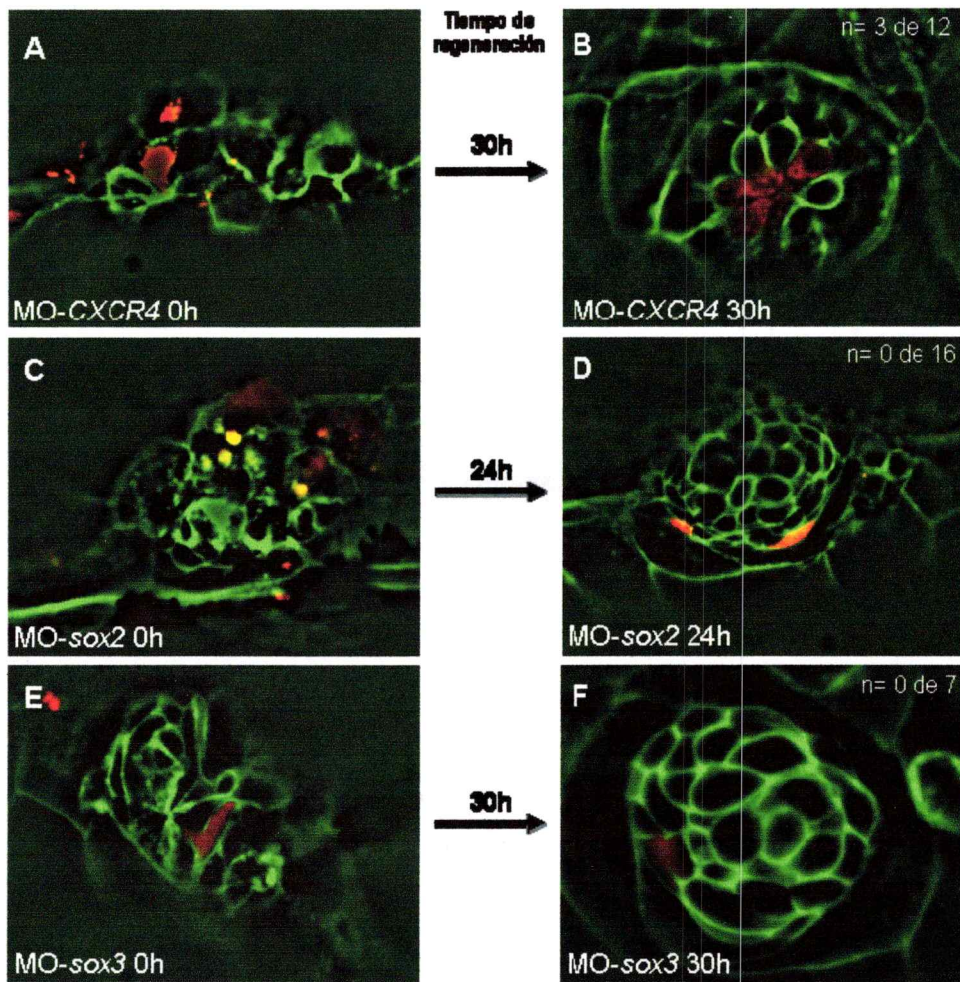
Ya que en trabajos previos se ha relacionado al gen *sox2* con la mantención de células troncales neurales y regulación de la proliferación celular, y debido a que los resultados de re-expresión de *sox2* post-tratamiento de cobre sugieren una participación de *sox2* en regeneración, quisimos evaluar el papel exacto de este gen en el proceso. La microinyección de morfolidos antisentido en el estadio de una célula no es una alternativa para este análisis, ya que, primero, los fenotipos de falta de función de los genes *sox1B* durante el desarrollo no permiten determinar la función de estos genes y, segundo, los morfolidos decaen en sus niveles al tercer día post fertilización lo que impide realizar estudios funcionales una vez formada la línea lateral. Se diseñó una nueva estrategia experimental que consistió en inhibir la función génica en los precursores de las células ciliadas de los neuromastos mediante electroporación de morfolidos acoplados al fluoróforo cargado lisamina. La carga incorporada al morfolido permite el movimiento de este en un campo eléctrico y por lo tanto, la entrada del morfolido a las células próximas a un electrodo. Además, los morfolidos acoplados a lisamina adquieren la fluorescencia roja propia de ésta molécula, lo que permite identificar y seguir fácilmente las células electroporadas. Los morfolidos fueron cargados en una aguja de microinyección que hace las veces de electrodo, la cuál fue posicionada en la base del neuromasto a analizar, y se aplicó un tren de pulsos eléctricos. Luego de 1 hora los neuromastos electroporados fueron expuestos al protocolo de daño por cobre (10 $\mu$ M por 2 horas) para inducir la regeneración. Las células de los

neuromastos fueron visualizadas mediante el uso de distintos peces transgénicos que expresan GFP (*claudinB* y *sqET20*) y electroporadas tanto en células de soporte como en células del manto, con morfolidos fluorescentes (rojos) de *sox2*, *sox3*, *sox2/sox3* y *cxcr4b* (control).

Se decidió electroporar el menor número posible de células por neuromasto ya que la electroporación del neuromasto completo con los morfolidos fue incompatible con la regeneración luego de los tratamientos de cobre (datos no mostrados). Además, un bajo número de células electroporadas facilita el conteo, seguimiento e individualización (a nivel de tipo celular) de las células electroporadas en los neuromastos.

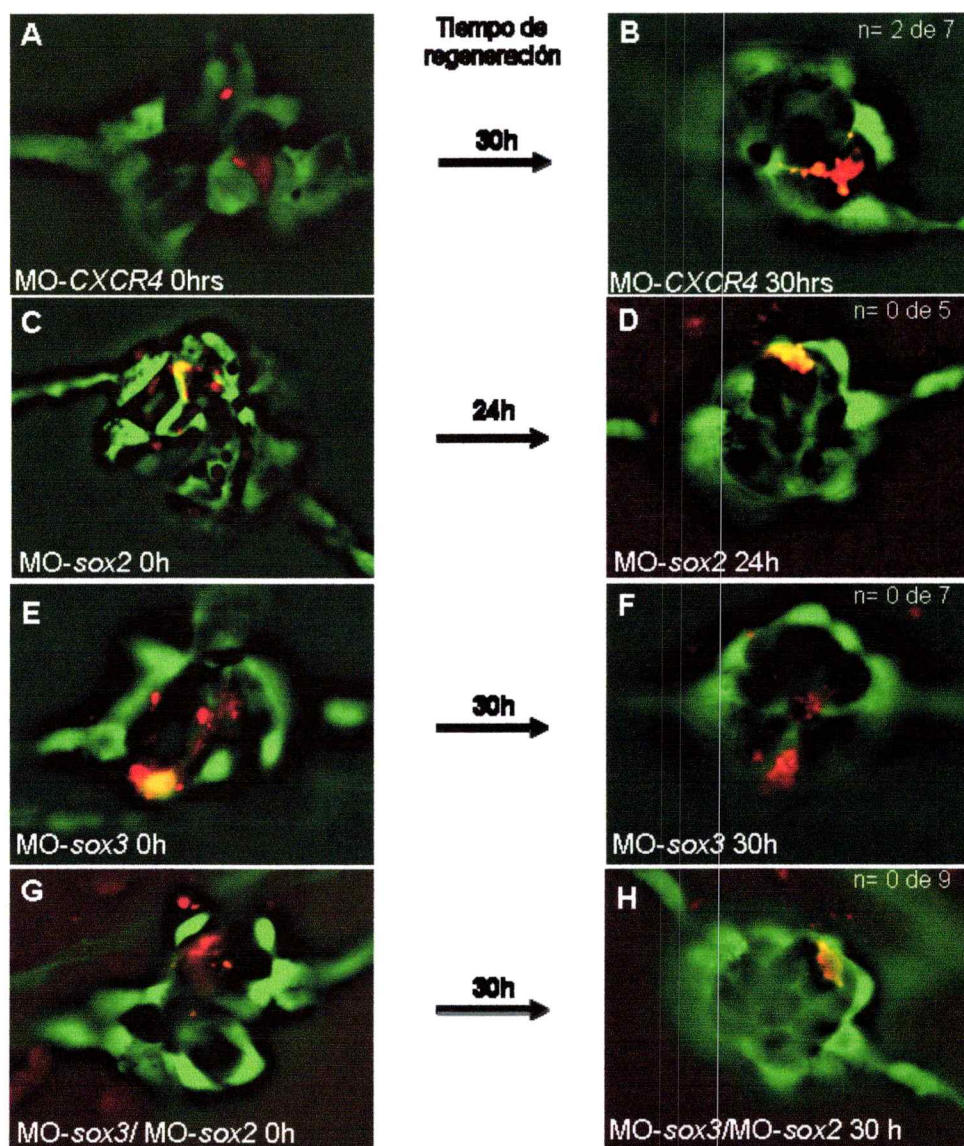
Embriones de 72 hpf fueron electroporados con 1 mM de los distintos morfolidos y luego de 1 h estos embriones fueron expuestos a cobre 10  $\mu$ M por 2 h. Cada neuromasto electroporado y tratado con cobre fué fotografiado inmediatamente y luego de 30 h post-tratamiento, donde finalmente se analizó el destino celular y el grado de proliferación de las células electroporadas.

Se pudo observar que células de los neuromastos electroporados con morfolidos control (MO-*cxcr4b*) aumentan en número durante el proceso de regeneración (**Fig. 20A, B; Fig. 21A, B; Fig. 22**) lo que sugiere que las células electroporadas no pierden la capacidad de dividirse en estos intervalos de tiempo.



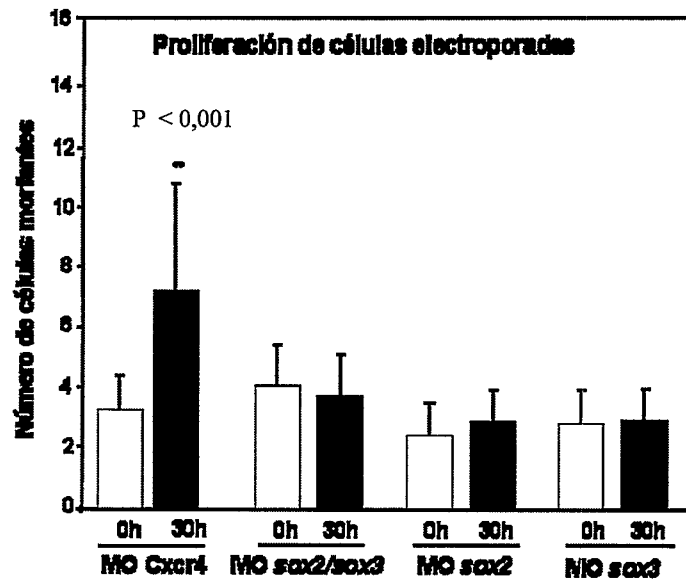
**Figura 20. Células carentes de *sox2* o *sox3* no regeneran normalmente en transgénicos *claudinB*.** (A-F) Células del neuromasto de peces transgénicos *claudinB* (GFP se expresa en todas las células del neuromasto) fueron electroporadas con morfolinios *cxcr4*, *sox2* y *sox3* acoplados a lisamina (rojo) y tratadas con  $10\mu\text{M}$   $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  por 2 horas para observar su comportamiento en el proceso de regeneración. (A, B) Células que fueron electroporadas con MO-*cxcr4b* son capaces de formar tanto células ciliadas como células del manto luego de 30 horas de regeneración (n=3/7). Las células ciliadas se distinguen en el centro del neuromasto ya que adoptan la forma característica de "gota de agua" y se ubican en la parte apical del órgano. (C-F) Las Células que fueron electroporadas con morfolino *sox2* y *sox3* nunca se diferencian a células ciliadas. n: número de neuromastos que presentan células ciliadas regeneradas luego de electroporación con MO del total de neuromastos contados.





**Figura 21. Células carentes de *sox2* y/o *sox3* no regeneran normalmente en transgénicos *sqET20*.** (A-H) Células del neuromasto de peces transgénicos *sqET20* (expresado en células del manto) son electroporadas con morfolinios *cxcr4*, *sox2*, *sox3*, *sox2/sox3* acoplados a lisamina (rojo) y tratadas con  $10\mu\text{M}$   $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  por 2 horas para observar su comportamiento en el proceso de regeneración. (A, B) Células electroporadas con MO-*cxcr4* son capaces de formar tanto células ciliadas como células del manto luego de 30 horas de regeneración (n=2/7). (C-H) Células electroporadas con morfolino *sox2* (C, D), *sox3* (E, F) o *sox2/sox3* (G, H) nunca se diferencian a células ciliadas y gran parte de las células regeneradas son células del manto.

A



B

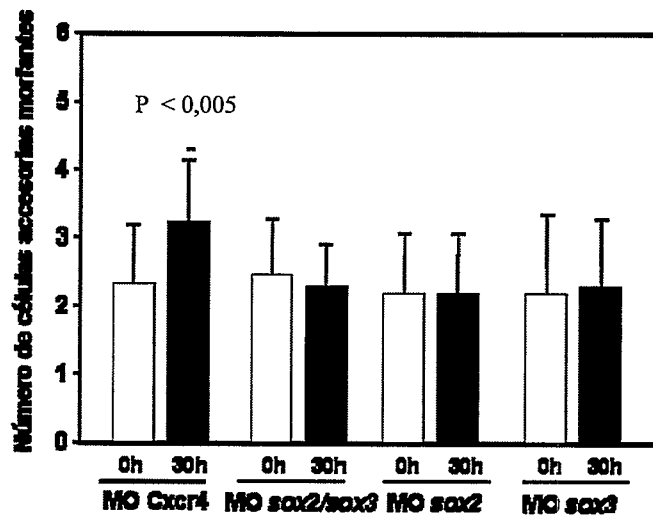


Figura 22. *sox2* y *sox3* son requeridos para el aumento del número de células en neuromastos en regeneración. (A) Células de neuromastos maduros electroporadas con MO-*cxcr4* aumentan aproximadamente al doble luego de 30 h de regeneración, por el contrario, células electroporadas con morfolino de *sox2*, *sox3* o *sox2/sox3* no aumentan su número en la regeneración luego de 30 h post-tratamiento con  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ . (B) Las células del manto de los neuromastos maduros electroporados con MO-*cxcr4* aumentan en aproximadamente un 20%, luego de 30 h de regeneración, por el contrario, células del manto electroporadas con morfolino de *sox2*, *sox3* o *sox2/sox3* marcadas con lisamina no aumentan su número en su proceso de regeneración luego de 30 h post-tratamiento con  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ .

Se analizó el destino celular que alcanzan las células electroporadas con el morfolino control mediante el uso de los transgénicos *sqET20* y *claudinB* luego de 30 horas de recuperación post tratamiento con cobre. Se observó que las células electroporadas derivaron en un 87,3% hacia células del manto y en un 8,2% a células ciliadas (**Fig. 20A, B; Fig. 21A, B**) produciéndose un 4,5% de otros tipos celulares (ni células ciliadas, ni del manto). Estas últimas células se ubican en la parte basal del neuromasto cercanas al centro, por lo que posiblemente sean células de soporte. Por otra parte, las células electroporadas con el morfolino *sox2* y/o morfolino *sox3* a las 30 h del proceso regenerativo se diferencian en un 98,9% (MO-*sox2*), un 99,3% (MO-*sox3*) y un 95,1% (MO-*sox2/sox3*) hacia células de manto, nunca observándose la formación de células ciliadas marcadas con el trazador (**Fig. 20 y Fig. 21**).

Por otro lado, se contabilizaron las células electroporadas inmediatamente luego de la electroporación y luego de finalizada la regeneración a las 30 horas. La marca fluorescente que produce la lisamina es usada en este caso como trazador de linaje. De esta manera, se esperaba evaluar si las células electroporadas con los diversos morfolinicos mantienen una capacidad proliferativa. Mientras se observó un aumento en el número de células marcadas en las electroporaciones control, las células electroporadas con morfolinicos dirigidos contra los diversos genes *sox* no aumentaron en número, lo que sugiere una pérdida de capacidad proliferativa (aunque no se puede descartar la posibilidad de que sí puedan proliferar, pero que tengan una mayor tasa de mortalidad, manteniendo así el número de células constante) (**Fig. 22**). En conclusión, los genes *sox* son necesarios para que las células que sobreviven a tratamientos de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ , presumiblemente las células progenitoras, formen nuevas células ciliadas.

## VII. DISCUSIÓN

Conocer los mecanismos del control genético sobre el proceso de diferenciación celular es fundamental para avanzar hacia la manipulación artificial de los destinos celulares en terapias futuras. En el caso de las células ciliadas mecanosensoriales, este conocimiento adquiere vital importancia puesto que la pérdida de ellas en el ser humano es irreversible y genera un impedimento físico grave a los que padecen de esta deficiencia. Dado que el sistema de la línea lateral presenta estructuras, células y genes altamente homólogos a aquellos presentes en el oído interno, hemos decidido aproximarnos a este objetivo aprovechando la simpleza que ofrece el pez cebra en términos de manipulación y docilidad genética.

Los resultados de esta tesis apuntan a la participación de los genes *soxB1* en el proceso de diferenciación de las células de la línea lateral, la mantención de células progenitoras de células ciliadas y el control sobre la división celular.

A su vez, se comprueba la función de *ath1a* como un regulador maestro e inductor de la diferenciación de las células ciliadas, ejerciendo esta función a través de la activación río abajo de genes de diferenciación como *neuroD*.

Proponemos que ambas funciones génicas (de *soxB1* y *ath1a*) son necesarias tanto para el desarrollo inicial (embrionario) de este sistema mecanosensorial, como para la regeneración de éste luego de un daño. Las funciones de estos genes se complementarían e interactuarían en la formación y regeneración de la línea lateral de pez cebra, controlando esencialmente la diferenciación de los diversos tipos celulares de los neuromastos.

## VII. 1. *ath1a* induce la diferenciación a células ciliadas.

Al igual que en trabajos de sobre-expresión de *ath1a* en oído de mamíferos (Izumikawa y cols., 2005), encontramos que la expresión de *ath1a* por sí misma induce la diferenciación de células ciliadas a partir de otros tipos celulares en los neuromastos de la línea lateral. Es claro el efecto instructivo de *ath1a*, esencialmente controlando la diferenciación hacia células ciliadas, pero también es posible encontrar un pequeño porcentaje de células del manto originadas de precursores electroporados. Es probable que estas células se diferencien a células del manto debido al funcionamiento paralelo de los genes neurogénicos *notch/ delta*, que contribuirían a seleccionar un número restringido de células indiferenciadas hacia células ciliadas en desmedro de sus vecinas. También es posible que la electroporación del mensajero se haya efectuado, en estos casos, en una célula del manto que es incapaz de sufrir trans-diferenciación hacia célula ciliada. En oído de mamífero se observó la factibilidad de trans-diferenciar células de soporte a células ciliadas por la expresión ectópica de *ath1a* en estos tipos celulares (Kawamoto y cols., 2003), sugiriendo que los 2 tipos de células accesorias descritas en los neuromastos de la línea lateral difieren en cuanto a su potencial para adquirir otros destinos, como el de célula ciliada.

Al electroporar neuromastos que presentan células ciliadas al momento de ser electroporados, es posible encontrar dentro de las células ciliadas marcadas, tanto células inducidas a diferenciarse como células previamente diferenciadas. Sin embargo, la probabilidad de que esto ocurra es baja, ya que se electroporan mayoritariamente células

basales (células de soporte), y se observaron diferencias significativas al comparar la electroporación de ARN de *ath1a* con la electroporación solo con fluoróforos.

Con la intención de precisar aun más este punto, se evaluó la inducción de células ciliadas por *ath1a* en neuromastos durante el proceso de regeneración. Neuromastos electroporados con ARNm de *ath1a* se trataron con cobre 10  $\mu$ M para eliminar las células ciliadas y gran parte de las del manto, observándose luego de 24 h de regeneración, un aumento en la proporción de células ciliadas marcadas con el trazador de electroporación respecto a los neuromastos electroporados control. Este resultado corrobora el experimento anterior y ratifica la conservación del fenómeno con el oído de mamífero. Sin embargo, este experimento tiene el problema que si bien todas las células ciliadas son eliminadas a esta concentración de cobre, algunas células del manto sobreviven, lo que genera cierta incertidumbre respecto del efecto de la sobre-expresión de *ath1a* en la diferenciación de las células del manto.

En el futuro sería interesante comparar el número de células ciliadas totales de los neuromastos para analizar si la sobre-expresión de *ath1a* está induciendo a otros tipos celulares a diferenciarse a células ciliadas, disminuyendo su cantidad (células del manto y de soporte), o solo induce diferenciación en células progenitoras, no diferenciadas. Además sería interesante electroporar aisladamente células del manto y evaluar si la sobre-expresión de *ath1a* en este tipo celular induce trans-diferenciación a células ciliadas. De esta forma, se generaría un conocimiento más acabado del efecto de la expresión de *ath1a* sobre todos los tipos celulares en forma independiente.

También sería interesante evaluar si las células electroporadas son capaces de proliferar o si solo se diferencian, ya que datos preliminares sugieren una mantención del número de células totales electroporadas luego del proceso de regeneración, aumentando solamente la proporción de células ciliadas respecto al total de células del neuromasto.

## VII. 2. Jerarquías de regulación en la diferenciación de las células ciliadas.

A fin de determinar un orden de participación en la determinación del destino de célula ciliada, realizamos experimentos de rescate y sobre-expresión. Observamos que el ADN codificante de *neuroD* rescataba la ausencia de *ath1a*, pero que no ocurría lo mismo al co-inyectar el morfolino de *neuroD* junto al ADN codificante de *ath1a* (Tabla 2), lo que sitúa a *neuroD* río-abajo de *ath1a*. Es posible por tanto, que *ath1a* esté especificando el destino de célula ciliada y *neuroD* sólo esté participando en el proceso de diferenciación.

Dado el grado de parentesco entre las células accesorias y ciliadas dentro del neuromasto (Fekete y cols., 1998), uno debiera esperar un aumento de células accesorias en desmedro de las células ciliadas no especificadas. Sin embargo, los marcadores de células de soporte (*claudinB* y *eya1*) y del manto (línea transgénica *sqET20*; datos no mostrados) no mostraron un aumento sustancial en los embriones inyectados con el morfolino de *ath1a*, además de ser indistinguible de lo observado en los embriones morfantes para *neuroD*. En el caso de sobre-expresar *ath1a*, cabía esperar lo contrario:

un aumento de las células ciliadas a expensas del resto de los tipos celulares que componen el neuromasto. Sin embargo, no fué lo que vimos en los embriones transgénicos de la línea sqET4 ni en aquellos tratados con DiAsp, cuando inyectamos el ADN codificante de *ath1a* (datos no mostrados). La sobre-expresión de *ath1a* sí conllevó un aumento de la expresión de *neuroD*, e incluso su expresión ectópica, lo que confirmó la jerarquía de regulación, pero no derivó en un marcado aumento de células ciliadas dentro del neuromasto que fuera posible observar con la tinción vital DiAsp o en la línea transgénica ET4.

### **VII. 3. Genes *sox2* y *sox3* poseen funciones diferentes en el desarrollo de la línea lateral de pez cebra.**

Mediante el análisis de los experimentos de pérdida de función de los genes de la familia *soxB1*, se pudo observar durante el desarrollo de la línea lateral, distintos fenotipos para los dos genes *sox* estudiados, sugiriendo que poseen funciones diferentes. En la literatura se describe la participación de los genes de la familia *soxB1* en diversas etapas de la neurogénesis y mantención de células troncales, actuando de forma complementaria (Zhao y cols., 2004; Kan y cols., 2004; Wang y cols., 2006) o en forma redundante (Schlosser y cols., 2008; Bylund y cols., 2003; Pevny y Placzek, 2005).

En la línea lateral, la pérdida de ambos genes *soxB1* estudiados (*sox2* y *sox3*), parecen tener una función distinta en el desarrollo del pez cebra, ya que sus morfantes presentan fenotipos con características particulares y, dado que el doble morfante



presenta un fenotipo menos severo que el morfante *sox2*, es posible descartar funciones redundantes entre ellos. El morfante de *sox2* presenta una disminución severa del número de células ciliadas funcionales presentes en el neuromasto recién depositado (48hpf) en comparación al control, presentando incluso neuromastos carentes de células ciliadas. Estos neuromastos que carecen de células ciliadas, a su vez, degeneran con el tiempo, siendo indetectables a las 72 hpf, produciéndose un fenotipo de menor número de neuromastos. Por otro lado, el morfante de *sox3* también presenta un menor número de células ciliadas por neuromasto en comparación a embriones normales a las 72 hpf, pero en menor grado que el morfante de *sox2*, evidenciándose, a su vez, una desorganización de las células ciliadas y del manto en los neuromastos. Ya que, ambos morfantes por separado afectan el número de células ciliadas por neuromasto, era esperable encontrar que el doble morfante *sox2/sox3* presentara un fenotipo similar o más severo que los morfantes antes mencionados por separado. Sin embargo, el número de células ciliadas presentes en cada neuromasto es muy similar al número de células ciliadas encontradas en el morfante de *sox3* (el menos severo), descartándose, por tanto, una función redundante de los genes *sox2* y *sox3* en el desarrollo de la línea lateral. La razón por la cuál se genera esta atenuación del fenotipo de falta de función de *sox2* al inhibir simultáneamente *sox3* queda por dilucidarse. Más que funciones antagónicas, nos inclinamos por una explicación relacionada con el frágil balance existente entre proliferación y diferenciación en el neuromasto. Los genes *soxB1* son esenciales para la formación del territorio sensorial en el oído de mamíferos, pero al mismo tiempo, son incompatibles con la diferenciación hacia célula ciliada y sus niveles descienden previo a la diferenciación de este tipo celular. Es posible que *sox2* y *sox3* jueguen roles

ligeramente distintos en este balance y que la inhibición de uno sea parcialmente compensada (en términos del fenotipo resultante) por la inhibición del otro.

#### **VII. 4. Efectos de la falta de función de los genes *soxB1* sobre el número de células ciliadas en los neuromastos de la línea lateral**

Al observar los neuromastos de los distintos morfantes es evidente que existe un contraste en la disminución de las células ciliadas de estos. Los morfantes *sox2* desde las 48 hpf. (neuromastos recientemente depositados) presentan neuromastos con pérdida de cuerpos celulares en su centro (área donde normalmente se ubican las células ciliadas) y en zonas más basales del neuromastos (células de soporte). Por el contrario, los morfantes *sox3* y el doble morfante no presentan en ningún momento esta pérdida celular. La disminución de las células ciliadas en el morfante *sox3*, se puede deber a la pérdida de la organización celular en el neuromasto y el aumento de la movilidad celular. Estas anomalías podrían generar un retraso de la diferenciación de las células ciliadas, lo que generaría un menor número de células ciliadas diferenciadas. Numerosos antecedentes describen controles de la adhesión celular sobre la diferenciación. La adhesión celular ha sido descrita que se requiere para la mantención de los nichos de células totí potenciales y progenitoras y el control de futura diferenciación celular. Recientemente se ha descrito que células totí potenciales requieren una adhesión a la matriz extracelular y contactos con células de soporte vecinas, para mantener su estado indiferenciado (Discher D y cols, 2009) (Raymond K. y cols, 2009), sugiriendo que la

perdida *sox3* podría interferir en la diferenciación de las células ciliadas o/y en la mantención de células totí potenciales y progenitores en los neuromastos depositados.

Para el caso del doble morfante, éste también presentaría un retardo de la diferenciación de los neuromastos, el cual podría generarse por la posteriorización del depósito de estos, ya que estos neuromastos depositados poseen un menor tiempo de maduración y diferenciación que los neuromastos controles, y por ende menor número de células ciliadas diferenciadas. Esta posteriorización podría deberse a la pérdida transiente de la expresión de *ath1a* y *deltaB* en estos morfantes ya que estos genes controlan directamente la diferenciación de las células ciliadas.

Por otra parte, los morfantes *sox2* podrían presentar un defecto que precede a la diferenciación de las células ciliadas y al igual que en ratones mutantes para *sox2*, este gen podría ser requerido para la formación de las células ciliadas, ya que se ha demostrado que ratones mutantes para *sox2* presentan anomalías en la determinación de los dominios pro-sensoriales, acompañado de una pérdida de la expresión de *ath1*, afectando la formación de células ciliadas (Kiernan y cols, 2005).

Por lo tanto, los fenotipos de los morfantes que poseen un menor número de células ciliadas iniciales presentarían anomalías en la formación o desarrollo de la línea lateral y los morfantes que no afectan el número de células iniciales presentarían solo un retraso en la diferenciación de los neuromastos,

## VII. 5. Depósito concentrado y posteriorizado de los neuromastos en dobles morfantes *sox*

La posteriorización del depósito de los neuromastos y el efecto sobre la expresión de genes proneurales y neurogénicos, sugieren que el control de la expresión de estos es regulado por ambos genes *sox*, y los morfantes de *sox2* y *sox3* por separado solo afectarían su expresión parcialmente, generando los diversos fenotipos ya descritos.

Para probar esto último, será necesario analizar el efecto de los morfalinos de *sox2* y *sox3* por separado sobre la expresión de los genes neurogénicos *notch3* y *deltaB* y pro-neurales *ath1a* y *neuroD* en el primordio migratorio, esperando encontrar una correlación entre el efecto sobre la expresión de genes río abajo y los fenotipos encontrados.

A su vez, es interesante notar que el doble morfante presenta un depósito concentrado de neuromastos, anormalmente cercanos unos de otros. ¿Cómo ocurre esto? Existen controles del tiempo y espacio del depósito de los neuromastos de la línea lateral primaria en pez cebra, los cuales son regulados en parte por las glías, que están ubicadas alrededor del nervio de la línea lateral (Lopez-Schier y Hudspeth, 2005). En el trabajo citado, se describen los efectos de la pérdida de las glías sobre los neuromastos de la línea lateral primaria, generándose embriones con neuromastos supernumerarios. La línea lateral de los embriones morfantes de *neurogenina* (que carecen de nervio y, por tanto, de glías) además de presentar un mayor número de neuromastos depositados, tiene una menor distancia entre ellos, al compararlos con larvas controles. El doble morfante *sox2/sox3* presenta similitudes en la disposición de sus neuromastos (próximidad entre

ellos) respecto al morfante de *neurogenina 1*, sugiriendo que este depósito concentrado puede deberse a problemas en las glías del nervio de la línea lateral. No se descarta, por otro lado, que esta proximidad entre neuromastos sea consecuencia un depósito “normal” a partir de un primordio que presenta una velocidad migratoria reducida. Para resolver esta pregunta, sería importante analizar la integridad de las glías del nervio de la línea lateral en el segmento distal del mioseptum horizontal de embriones dobles morfantes de *sox* o examinar la velocidad del proceso migratorio del primordio.

#### **VII. 6. Pérdida de función de *sox3* afecta la cohesión de las células del neuromasto induciendo su migración.**

En neuromastos maduros en peces morfantes de *sox3* se observó una pérdida de la cohesión celular, resultando en una migración anormal e inesperada de las células que lo componen. Este movimiento siempre tendió a apuntar o desplazarse hacia el área ventral de la larva, incluso orientándose en diagonal, hacia la zona del pronefros. Esta área coincide con uno de los sitios de expresión de la quimioquina SDF1. Es posible que la pérdida de *sox3* en estas células favorezca la migración celular, hacia células que producen esta quimioquina, al igual que lo observado en el caso del primordio durante el desarrollo del sistema. Ya se ha observado en otros modelos que la pérdida de la expresión de *sox3* produce cambios en la conducta migratoria de las células, induciendo los movimientos celulares (Abu-Elmagd y cols., 2001). En el caso de las células de la línea lateral, esto podría ocurrir a través de una inducción de la expresión de los

receptores para quimioquinas CXCR4 y/o CXCR7, llevando al desplazamiento de estas células a la zona de expresión de SDF1, como ocurre en el desarrollo inicial de la línea lateral. (David y cols., 2002; Sapede y cols., 2005; Valentin y cols., 2007).

A futuro sería interesante comprobar los niveles de expresión de los receptores de quimioquinas CXCR4 y/o CXCR7 en las células de los neuromastos de embriones morfantes *sox3* para determinar si la migración que exhiben las células morfantes se debe a una expresión *de novo* de estos receptores.

#### **VII. 7. Dinámica de re-expresión de *eyal*, *ath1a* y *sox2* durante la regeneración de las células ciliadas de los neuromastos. ¿Una recapitulación de lo ocurrido en el desarrollo o un proceso independiente?**

Con la intención de correlacionar los eventos de diferenciación que ocurren en el desarrollo de la línea lateral con los que ocurren en el proceso de regeneración luego de un daño, se realizaron experimentos de análisis de expresión de genes importantes para el desarrollo de la línea lateral durante la regeneración.

Se observó que luego de tratamientos de cobre que destruyen las células ciliadas y algunas células del manto de los neuromastos, la mayoría de los transcritos expresados en este sistema no son detectados. En tratamientos con 10  $\mu$ M cobre, se pierde totalmente la expresión tanto de *eyal* como de *ath1a*, al menos en parte debido a una pérdida de las células que expresan estos genes. En el caso de *sox2*, muchas de las células que lo expresan no son destruidas por estas concentraciones de cobre, pero de

igual manera *sox2* disminuye su expresión. La expresión de *sox2* se ve afectada incluso con tratamientos de 1  $\mu$ M de cobre, que solo afecta a las células ciliadas sin afectar las células de soporte y del manto (tipos celulares que lo expresan normalmente) descartando que esta disminución de la expresión sea por la pérdida de las células que lo expresan. (Hernández y cols., 2007). Esta disminución en la expresión de *sox2* en embriones expuestos a Cu podría deberse a la activación del proceso proliferativo en células progenitoras del neuromasto que expresarían este gen. En trabajos recientes se ha planteado que *sox2* debe disminuir su expresión para que algunas de las células descendientes de las *sox2+* progresen hacia el destino de células ciliadas (Kashyap y cols., 2009). Recuperando su expresión normal recién en el momento en que el proceso de regeneración finaliza, generándose nuevamente un stock de células troncales en el neuromasto. De esta manera, la expresión de *sox2* (y posiblemente *sox3*) mantiene a las células progenitoras en un estado quiescente hasta el momento de ser necesario un recambio celular en el neuromasto.

#### **VII. 8. Papel fundamental de *sox2* y *sox3* en la regeneración de las células ciliadas.**

Comprobamos que las células que carecen de *sox2* y/o *sox3* presentes en la base de un neuromasto en regeneración, son incapaces de dividirse y diferenciarse hacia el destino de célula ciliada, en contraste a las células silvestres, que sí lo hacen.

En otros sistemas se ha observado que la expresión de los genes *sox* es necesaria para la mantención del estado indiferenciado y cuando estos genes disminuyen su

expresión, se inicia la expresión de genes neurogénicos y pro-neurales que llevan a una diferenciación de estas células (Bertrand y cols., 2002; Graham y cols., 2003; Bylund y cols., 2003; Davis y cols., 2006; Seo y cols., 2005; Episkopou, 2005). Tomando en cuenta estos datos, las células electroporadas con *MO-sox2* o *MO-sox3* deberían haberse diferenciado formando células ciliadas y posiblemente, otros tipos celulares. Por el contrario, estas células electroporadas son incapaces de diferenciarse a células ciliadas, permaneciendo al margen del proceso de regeneración del neuromasto. Al analizar los destinos celulares de las células electroporadas, luego de un proceso de regeneración, se observó que en su mayoría se ubicaban en la periferia del neuromasto regenerado (datos no mostrados) y en su mayoría eran células del manto. Además, no se observaron células de soporte marcadas. Esto sugiere que las células electroporadas con los antisentidos de los genes *sox* pueden adoptar un destino diferenciado, pero solo hacia células del manto.

Por otra parte, las células que además carecen de *sox2* y/o *sox3*, no aumentan su número durante el proceso de regeneración, sugiriendo un papel de estos genes en el proceso de división celular, el cual ha sido descrito en diferentes sistemas. (Alvarez-Buylla y García-Verdugo 2002; Episkopou, 2005). Estos resultados indican que la sola disminución de los genes *sox* no es suficiente para inducir la diferenciación de estas células a los diversos tipos celulares de los neuromastos y que lo más probable es que se requiera una coordinación con la expresión de genes neurogénicos que induzcan a los genes pro-neurales a gatillar la diferenciación de las células ciliadas. Esta descoordinación de expresiones génicas gatillada por la inhibición de los genes *sox*, podría alterar la normal re-expresión de los genes proneurales en el proceso de regeneración de manera similar a lo que ocurre en el desarrollo de la línea lateral. Los



genes proneurales perderían la coordinación de expresión espacio/temporal, que debería actuar en conjunto con la disminución de los genes *sox* en la regeneración, para llevar a la diferenciación de las células regeneradas a células ciliadas.

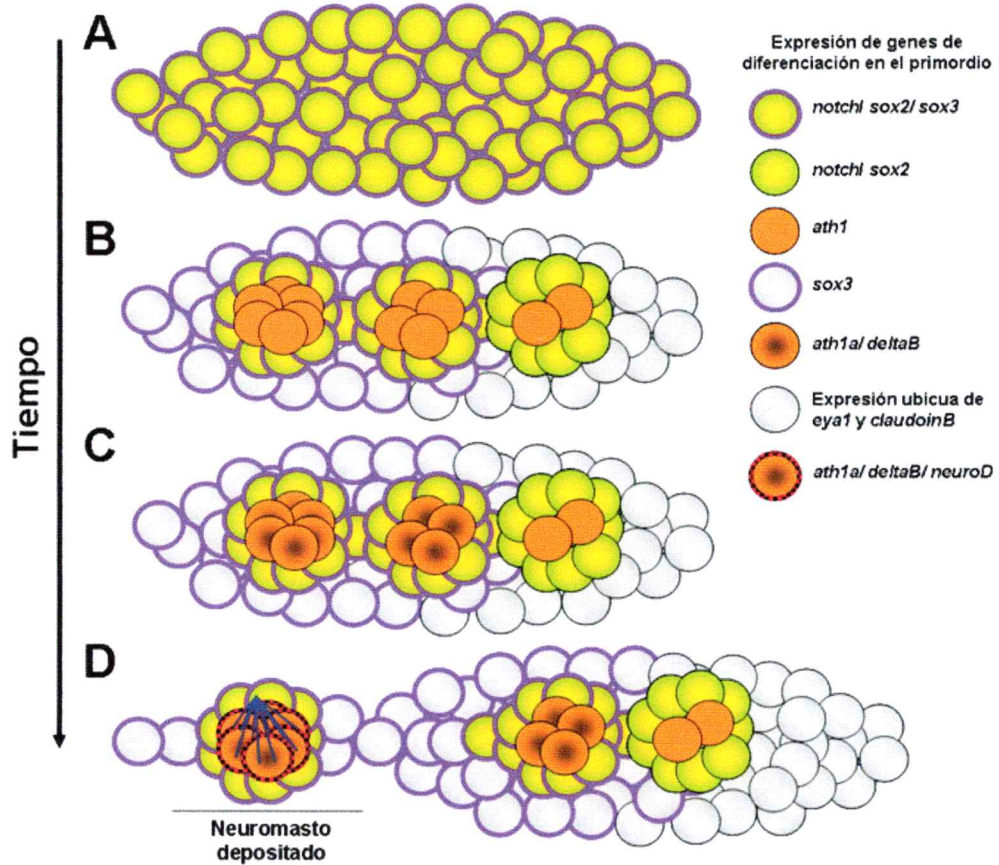
La regeneración dependiente de los genes *sox* de la familia B1 debe continuar funcionando en peces y aves adultas, ya que mantienen una continua regeneración a lo largo de su vida hasta adultos. En estudios recientes se ha estudiado las células accesorias (células del manto y de soporte) del oído de pez cebra con la intención de encontrar los tipos celulares responsables de esta regeneración (Liang J. y Burgess S., 2009) al igual que numerosos estudios en aves y ratas, donde incluso se detecta la expresión de *sox2* en adultos (Oesterle E. y cols. 2007). Pero el solo hecho de que se exprese uno de estos dos genes *sox* en ratas adultas no implica que se produzca regeneración. Las células ciliadas de los mamíferos no tienen la capacidad de regenerarse, pese a que las células de soporte en el oído interno de ratones adultos, expresan *sox2* (Oesterle E. y cols. 2007), o incluso se ha detectado la presencia de progenitores y células madres en la cóclea de ratones adultos (Yerukhimovich M. y cols., 2007).

Por lo tanto es probable que se requiera la presencia de ambos genes *sox* de la familia B1 para una regeneración activa y completa (todos los tipos celulares). *sox2* sería requerido para controlar la formación de los parches sensoriales (Kiernan AE. Y cols., 2005) y para la mantención de las células de soporte en ratones adultos (Oesterle E. y cols., 2007), siendo la función de *sox3* requerida para la regeneración de las células ciliadas.

En la línea lateral, las células que podrían ser las responsables de la regeneración en la línea lateral, deben ser las que co-expresan los genes de la familia *sox* B1, ya que la función de ambos genes es requerida para la regeneración de las células ciliadas (Fig. 20 y 21).

#### **VII.9. Modelos propuestos de la participación de los genes *sox* y *ath1a* en la formación y regeneración de la línea lateral.**

Al analizar la expresión de los genes en estudio, con la intención de buscar correlaciones, se puede notar que la expresión de *sox2* y *sox3* se presentan en regiones diferentes (en cuanto a intensidad de su expresión) en las células del primordio migratorio (Fig. 6C, E). Las células de los pro-neuromastos que expresan más fuertemente *sox2* se ubican hacia el frente de migración del primordio y su expresión decrece hacia posterior. Por el contrario las células que expresan *sox3* presentan una expresión más fuerte en las células traseras del primordio de modo complementario. Al comparar estas expresiones con los genes neurogénicos y proneurales en estudio, se puede correlacionar espacial y temporalmente la mayor expresión de *sox3* con la expresión de *deltaB* y *ath1a* y con la baja expresión de *sox2*. Esto sugiere que la pérdida de la expresión tanto de *deltaB* como de *ath1a*, en el doble morfante, se podría deber a la pérdida de un equilibrio en la expresión de los dos genes *sox* en la parte rostral del primordio migratorio (Fig. 23).

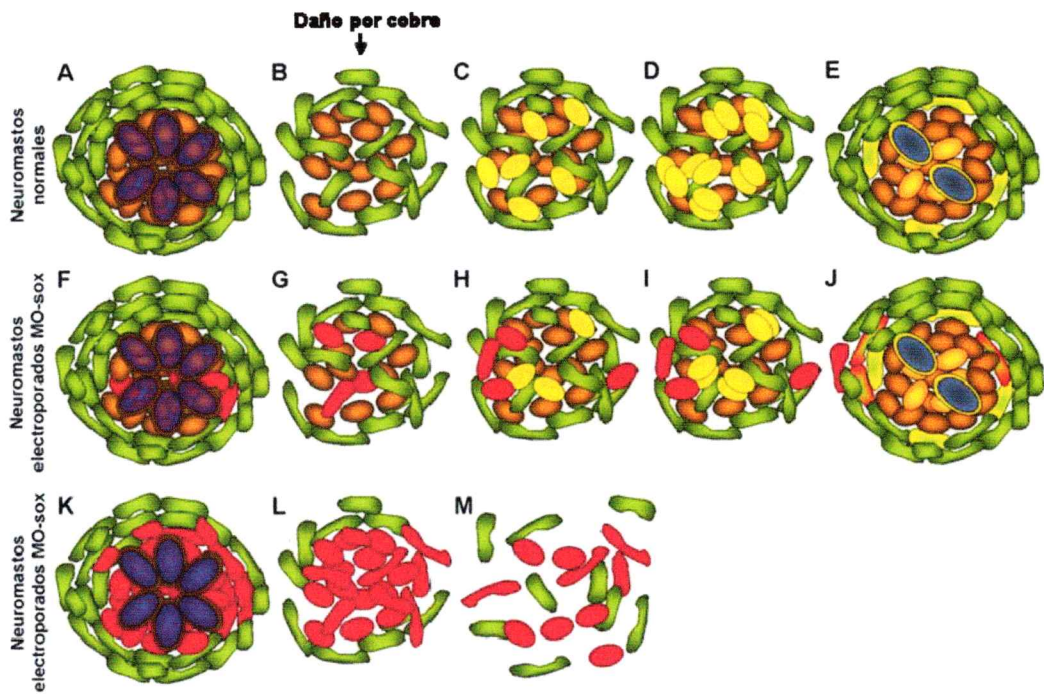


**Figura 23. Modelo de dinámica de expresión de los genes *sox*, la vía *notch/delta* y *ath1a* en la formación de pro-neuromastos y el depósito de neuromastos. (A)** Primordio recientemente formado, se observa la expresión ubicua de *notch3*, *sox2* y *sox3*. **(B, C)** primordio en migración, se caracteriza por la restricción de la expresión de los genes *notch3* y *sox2* a los pro neuromastos, la expresión preponderantemente posterior de *sox3* y el comienzo de la expresión de *ath1a* y *deltaB*. **(D)** Primordio depositando neuromastos, donde se aprecia la expresión de *neuroD*, que lleva a la diferenciación final de las células ciliadas.

Recientemente se mostró que *notch* reprime la expresión de genes pro-neurales para regular el proceso de diferenciación neuronal en el sistema nervioso central y, para controlar la expresión de los genes pro-neurales, requiere de la actividad de *sox3*. Por otra parte, la sobre-expresión de *sox3* no inhibe por sí sola la expresión de los genes proneurales, sugiriendo que los genes *notch* y *sox* pertenecen a dos vías diferentes y complementarias, para controlar la diferenciación normal (Holmberg y cols, 2008). Este resultado contrasta con los obtenidos al reprimir ambos genes *sox*, en que se observa una disminución de la expresión de los genes pro-neurales y un aumento de la expresión de *notch*, sugiriendo una función represora de los genes *sox* sobre la expresión de *notch*. Este resultado se puede deber a un efecto de los genes *sox* sobre la formación y especificación de las rosetas (proneuromastos en formación), las que recientemente se ha reportado que son necesarias para la normal expresión de los genes neurogénicos y proneurales (Nechiporuk y cols., 2008). Tomando en cuenta nuestros resultados y los reportados en la literatura, postulamos un modelo mediante el cual los genes de la familia *soxB1* regulan la diferenciación celular de la línea lateral, mediante el control de la expresión de los genes pro-neurales y la vía *notch*. (Fig. 23).

Por otro lado, en la regeneración, ambos genes *sox* están presentes y son requeridos para una regeneración normal de las células del neuromasto. Las células electroporadas con morfolinis de los genes *sox* presentan un comportamiento anormal, desplazándose hacia la periferia de los neuromastos y a su vez, siendo incapaces de proliferar. La disminución de la expresión de los genes de la familia *soxB1* podría afectar a los genes neurogénicos y proneurales, de manera similar a lo ocurrido en el desarrollo de la línea lateral, inhibiendo su expresión normal. Como consecuencia de

esto, no se generarían células ciliadas a partir de las células electroporadas con morfolidos para los genes *sox*, ya que se sabe que la sola expresión ectópica de *ath1a* en células progenitoras induce la diferenciación a células ciliadas (siendo suficiente y necesaria). Además, en estudios recientes se postula la existencia de dos poblaciones de células de soporte, unas centrales y unas periféricas, las que presentan patrones diferentes de división celular, asignándole a las células centrales un papel protagónico en la regeneración celular en los neuromastos y además reporta el papel fundamental de *notch* en la regulación de su proliferación (Ma y Raible, 2008). Esto concuerda con el comportamiento observado de las células de soporte electroporadas con los morfolidos *sox*, las que migran del centro del neuromasto en regeneración a la periferia de este, restándose de participar en este proceso. Con estos antecedentes, proponemos un modelo de la participación de los genes *sox* en la regeneración de las células ciliadas de los neuromastos de la línea lateral. En este modelo, al activar la regeneración de las células ciliadas y del manto, mediante tratamientos de cobre 10  $\mu$ M por 2 horas (Fig. 24B, G, L), las células de soporte que permanecen intactas y normalmente expresan ambos genes *sox*, disminuyen la expresión de ambos genes *sox*, accionando la división de estas células a través de la vía *notch*. Las células resultantes de la división pueden formar los tres tipos celulares, células del manto guiadas por la expresión activación de la vía *notch*, células ciliadas guiadas por la expresión de *ath1a* y *deltaB* o células de soporte las que presentarían una fuerte expresión de *sox3* y *sox2*. (Fig. 24). También se muestra en el modelo, la incapacidad de las células *sox2* o *sox3* negativas de generar células ciliadas, de dividirse y de diferenciarse a células ciliadas (Fig. 24 G-J).



**N**

	TIPO CELULAR	<i>sox2</i>	<i>sox3</i>	<i>ath1</i>	<i>notch</i>	<i>delta</i>
	Manto diferenciado	+	-	-	+++	-
	Soporte (precursor)	+++	+++	-	+++	-
	Soporte destino ciliada	↓	↓	↑	↓	↑
	Soporte destino manto	↓	-	-	+++	-
	Soporte destino precursor	+++	+++	-	+++	-
	Ciliada diferenciada	-	-	+++	-	+++
	Manto proveniente de soporte (precursor)	+	-	-	+++	-
	Soporte proveniente de soporte (precursor)	+++	+++	-	+++	-
	Ciliada proveniente de soporte (precursor)	-	-	+++	-	+++
	Manto MO-sox	-	-	-	+++	-
	Soporte MO-sox	-	-	-	+++	-
	Manto proveniente de soporte MO-sox	-	-	-	+++	-

**Figura 24. Modelo de la dinámica de expresión de los genes *soxB1*, la vía *notch* y *ath1a* en el proceso de regeneración de los neuromastos de la línea lateral. (A-E) Dinámica de regeneración normal de las células de los neuromastos de la línea lateral, (F-J) Dinámica de células morfantas *sox* en la regeneración de los neuromastos de la línea lateral (K-M) Presencia masiva de células morfantas de los genes de la familia *soxB1*, impiden la regeneración de los neuromastos, provocando su pérdida.**

## VIII. RESUMEN DE RESULTADOS

- 1.- La expresión ectópica de *ath1a* induce diferenciación de células ciliadas en neuromastos de la línea lateral.
- 2.- La expresión de *ath1* induce la expresión de *neuroD*.
- 3.- Expresión de *neuroD*, rescata la falta de función de *ath1a* por lo que *neuroD* esta río abajo de *ath1a* en el proceso de diferenciación de células ciliadas.
- 4.- La pérdida de *sox2* provoca una disminución del número de neuromastos a las 72 horas post fertilización, debido a la pérdida de las células ciliadas.
- 5.- La pérdida de *sox3* produce desorganización en las células del neuromasto e induce migración hacia ventral de ellas.
- 6.- La pérdida de función de *sox2* y *sox3* elimina la expresión de marcadores de diferenciación de células ciliadas como *ath1a* y *deltaB*, además incrementa el número de células que expresan *notch3* en el primordio migratorio.
- 7.- La pérdida de función de *sox2* y *sox3* provoca un depósito posteriorizado de los neuromastos y el inicio de su depósito coincide con la re-expresión normal de *ath1a*, *deltaB* y *notch3*.



8.- La expresión de *eyal* y *ath1a* son inducidas en neuromastos durante la regeneración con una congruencia temporal en relación a su expresión en el desarrollo.

9.- La expresión de *sox2* disminuye en los neuromastos en regeneración, regresando a niveles normales cerca del final de este proceso.

10.- Células carentes de *sox2* o *sox3* no regeneran normalmente y a su vez, estos genes son requeridos para la división de las células de los neuromastos en el proceso de regeneración.

## IX. CONCLUSIONES GENERALES

Los genes *sox* de la familia B1 presentan diferentes funciones en el desarrollo, pero por el contrario, en el proceso de regeneración su función debe ser complementaria para llevar a cabo la regeneración de las células ciliadas, ya que las células que no expresen al menos uno de los genes *sox*, no participan activamente de la regeneración. Su papel en el proceso de desarrollo también parece no ser redundante y los resultados sugieren la participación de estos genes en el control de la diferenciación en el primordio.

Debido a estos datos se puede deducir que existe un mecanismo de regulación muy fina entre la expresión de los genes *sox* y los genes proneurales, ya que, en el proceso de regeneración, inmediatamente luego del daño, *sox2* disminuye su expresión, previo a un aumento de la expresión de *ath1a* en los neuromastos. Pero por otra parte, la expresión de *ath1a* y *deltaB* requiere de una expresión normal de los genes *sox* en el desarrollo de la línea lateral. Por lo tanto la diferenciación celular, depende de una regulación muy fina de la expresión de los genes *sox*, debido a su control sobre la expresión de los genes proneurales como *ath1a*, que son suficientes y necesarios para llevar a la diferenciación de las células ciliadas.

## X. REFERENCIAS

- Abu-Elmagd M, Ishii Y, Cheung M, Rex M, Le Rouédec D, Scotting PJ. 2001. cSox3 expression and neurogenesis in the epibranchial placodes. *Dev Biol.* 2001 Sep 15;237(2):258-69.
- Adamska M, Léger S, Brand M, Hadrys T, Braun T, Bober E. 2000. Inner ear and lateral line expression of a zebrafish nkx5.1 gene and its downregulation in the ears of FGF8 mutant, *acc. Mech Dev* 97: 161-165.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* 22: 629-634
- Baker CV, Bronner-Fraser M. 2001. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol.* 232(1):1-61.
- Bermingham NA, Hassan BA, Price SD, Vollrath MA, Ben-Arie N, Eatock RA, Bellen HJ, Lysakowski A, Zoghbi HY., 1999. Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284(5421):1837-1841
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci.* 3(7):517-530.
- Brugmann SA, Moody SA. 2005. Induction and specification of the vertebrate ectodermal placodes: precursors of the cranial sensory organs. *Biol Cell* 97(5): 303-319.
- Buescher M, Hing FS, Chia W. 2002. Formation of neuroblasts in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster* is controlled by SoxNeuro. *Development* 129(18):4193-4203.

- Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J. 2003. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci.* 6(11):1162-1168.
- Chae JH, Stein GH, Lee JE., 2004. NeuroD: the predicted and the surprising. *Mol Cells* 18(3):271-88.
- Chong SW, Emelyanov A, Gong Z, Korzh V. 2001. Expression pattern of two zebrafish genes, *cxcr4a* and *cxcr4b*. *Mech Dev* 109: 347-354.
- Collazo A, Fraser S, Mabee P. 1994. A dual embryonic origin for the vertebrate mechanoreceptors. *Science* 264: 426-430.
- David NB, Sapède D, Saint-Etienne L, Thisse C, Thisse B, Dambly-Chaudière C, Rosa FM, Ghysen A. 2002. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(25):16297-16302.
- Dabdoub A, Puligillaa Ch, Jonesa JM, Fritzschn B, Cheahc K, Pevnyd LH, Kelleys MW. 2008. Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(47):18396-18401.
- Davis SF, Hood J, Thomas A, Bunnell BA. 2006. Isolation of adult rhesus neural stem and progenitor cells and differentiation into immature oligodendrocytes. *Stem Cells Dev.* 15(2):191-9.
- Episkopou V. 2005. SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci.* 28(5):219-221.

- 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.
- Fekete DM, Muthukumar S, Karagozeos D. 1998. Hair cells and supporting cells share a common progenitor in the avian inner ear. *J Neurosci.* 18(19):7811-7821.
- Ghysen A. 2003. The origin and evolution of the nervous system. *Int J Dev Biol* 47: 555-562.
- Ghysen A, Dambly-Chaudiere C., 2004. Development of the zebrafish lateral line. *Curr Opin Neurobiol.* 14(1):67-73.
- Gilmour D, Knaut H, Maischein HM, Nüsslein-Volhard C. 2004. Towing of sensory axons by their migrating target cells in vivo. *Nat Neurosci* 7: 491-492.
- Gompel N, Cubedo N, Thisse C, Thisse B, Dambly-Chaudière C, Ghysen A. 2001. Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mech Dev* 105: 69-77.
- Graham A, Begbie J. 2000. Neurogenic placodes: a common front. *Trends Neurosci* 23(7):313-316.
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron.* 2003 Aug 28;39(5):749-765
- Haas P, Gilmour D. 2006. Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev Cell.* 10(5):673-680
- Hammond KL, Hill RE, Whitfield TT, Currie PD. 2002. Isolation of three zebrafish dachshund homologues and their expression in sensory organs, the central nervous system and pectoral fin buds. *Mech Dev* 112: 183-189.

- Harris JA, Cheng AG, Cunningham LL, MacDonald G, Raible DW, Rubel EW. 2003. Neomycin-induced hair cell death and rapid regeneration in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*). *J Assoc Res Otolaryngol.* 4(2):219-234.
- Hernández PP, Olivari FA, Sarrazin AF, Sandoval PC, Allende ML. 2007. Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker *sox2* and proliferation-dependent and-independent mechanisms of hair cell renewal. *Dev Neurobiol.* 67(5):637-654.
- Holmberg J, Hansson E, Malewicz M, Sandberg M, Perlmann T, Lendahl U, Muhr J. 2008. SoxB1 transcription factors and Notch signaling use distinct mechanisms to regulate proneural gene function and neural progenitor differentiation. *Development* 135(10):1843-1851.
- Ishibashi M. 2004. Molecular mechanisms for morphogenesis of the central nervous system in mammals. *Anat Sci Int.* 79(4):226-234.
- Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, Brough DE, Raphael Y., 2005. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals. *Nat Med.* 11(3):249-50
- Itoh M, Chitnis AB., 2001. Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts. *Mech Dev.* 102(1-2):263-6.
- Kan L, Israsena N, Zhang Z, Hu M, Zhao LR, Jalali A, Sahni V, Kessler JA. *Dev Biol.* 2004. Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis. *May* 15;269(2):580-94

- Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, Mongan NP. 2009. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the Nanog, OCT4 and SOX2 pluripotency transcription factors with Polycomb Repressive Complexes and Stem Cell micro-RNAs. *Stem Cells Dev.* In press.
- Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, Brough DE, Raphael Y., 2003. Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J Neurosci.* 23(11):4395-4400.
- Kiernan AE, Pelling AL, Leung KK, Tang AS, Bell DM, Tease C, Lovell-Badge R, Steel KP, Cheah KS. 2005. Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* 434(7036):1031-1035.
- Kim P, Helms AW, Johnson JE, Zimmerman K., 1997. XATH-1, a vertebrate homolog of *Drosophila atonal*, induces a neuronal differentiation within ectodermal progenitors. *Dev Biol.* 187(1):1-12.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
- Kobayashi M, Osanai H, Kawakami K, Yamamoto M. 2000. Expression of three zebrafish Six4 genes in the cranial sensory placodes and the developing somites. *Mech Dev* 98 (1-2): 151-155.
- Köster RW, Kuhnlein RP, Wittbrodt J. 2000. Ectopic Sox3 activity elicits sensory placode formation. *Mech Dev* 95 (1-2): 175-187.

- Kozlowski DJ, Whitfield TT, Hukriede NA, Lam WK, Weinberg ES. 2005. The zebrafish dog-eared mutation disrupts *eya1*, a gene required for a cell survival and differentiation in the inner ear and lateral line. *Dev Biol* 277: 27-41.
- Kroese ABA, van Netten SM. 1989. Sensory transduction in lateral line hair cells. Coombs S, Görner P and Münz H. (editors.). *Mechanosensory lateral line: Neurobiology and Evolution*. Springer-Verlag, New York, pp. 265-284.
- Liang J, Burgess SM. 2009. Gross and fine dissection of inner ear sensory epithelia in adult zebrafish (*Danio rerio*). *J Vis Exp*. 2009 (27). pii: 1211. doi: 10.3791/1211.
- López-Schier H, Hudspeth AJ. 2005. Supernumerary neuromasts in the posterior lateral line of zebrafish lacking peripheral glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(5):1496-501.
- Ma EY, Rubel EW, Raible DW. 2008. Notch signaling regulates the extent of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *J Neurosci*. 28(9):2261-2273.
- McCormick CA. 1989. Central lateral line mechanosensory pathways in bony fish. En Coombs S, Görner P and Münz H. (editors.). *Mechanosensory lateral line: Neurobiology and Evolution*. Springer-Verlag, New York, pp. 341-364.
- Metcalf WK, Kimmel CB, Schabtach E. 1985. Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish. *J Comp Neurol*. 233(3):377-389.
- Metscher BD, Northcutt RG, Gardiner DM, Bryant SV. 1997. Homeobox genes in axolotl lateral line placodes and neuromasts. *Dev Genes Evol* 207: 287-295.
- Miyagi S, Saito T, Mizutani K, Masuyama N, Gotoh Y, Iwama A, Nakauchi H, Masui S, Niwa H, Nishimoto M, Muramatsu M, Okuda A. 2004. The *Sox-2* regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells.. *Mol Cell Biol*. 24(10):4207-4220.

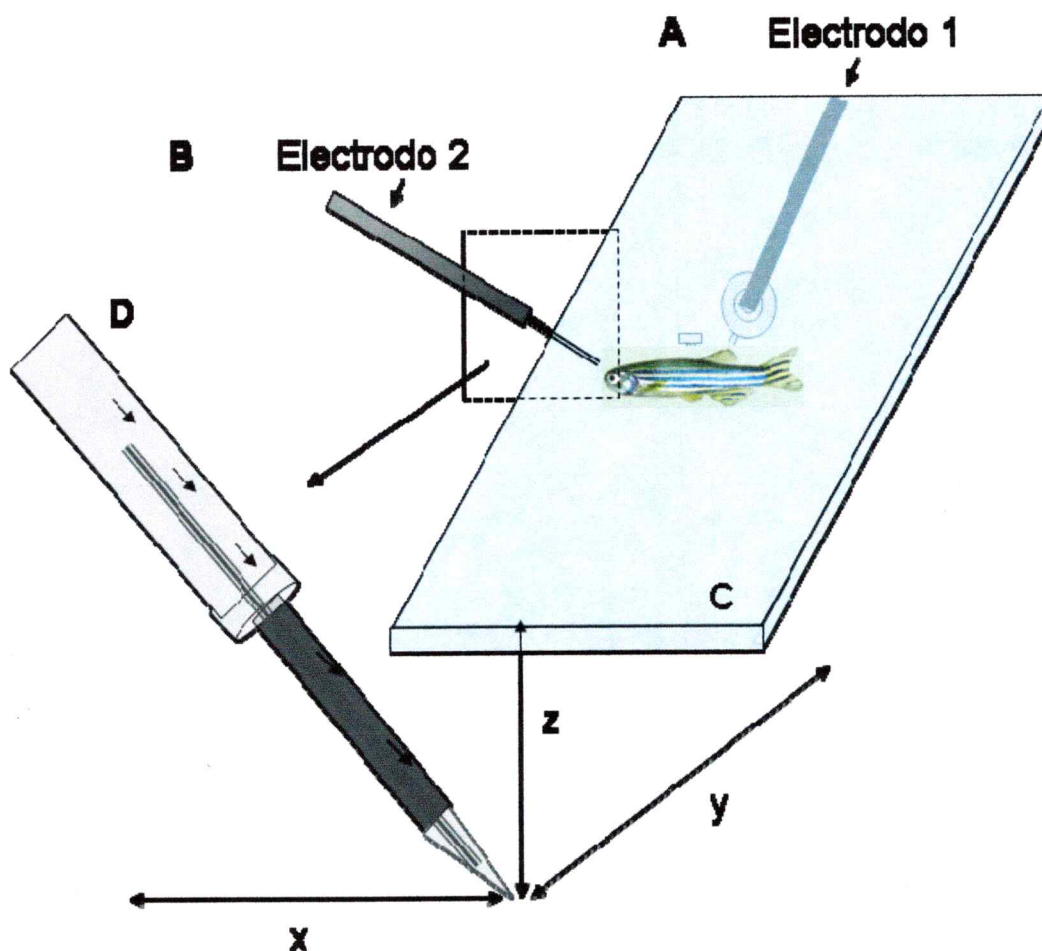


- Mizuseki K, Kishi M, Matsui M, Nakanishi S, Sasai Y. 1998. *Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. Development* 125(4):579-587.
- Murakami SL, Cunningham LL, Werner LA, Bauer E, Pujol R, Raible DW, Rubel EW. 2003. Developmental differences in susceptibility to neomycin-induced hair cell death in the lateral line neuromasts of zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res.* 186(1-2):47-56.
- Moore KB, Schneider ML, Vetter ML., 2002. Posttranslational mechanisms control the timing of bHLH function and regulate retinal cell fate. *Neuron* 34(2):183-95.
- Nasevicius A, Ekker SC. 2001. The zebrafish as a novel system for functional genomics and therapeutic development applications. *Curr Opin Mol Ther.* 3(3):224-228.
- Nechiporuk A, Raible DW. 2008. FGF-dependent mechanosensory organ patterning in zebrafish. *Science* 320(5884):1774-1777.
- Nikaido M, Doi K, Shimizu T, Hibi M, Kikuchi Y, Yamasu K. 2007. Initial specification of the epibranchial placode in zebrafish embryos depends on the fibroblast growth factor signal. *Dev Dyn.* 236(2):564-571
- Northcutt RG., Catania KC, Criley BB. 1994. Development of lateral line organs in the axolotl. *J Comp Neurol* 340(4): 480-514.
- Oesterle EC, Campbell S, Taylor RR, Forge A, Hume CR. Sox2 and JAGGED1 expression in normal and drug-damaged adult mouse inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol.* 9(1):65-89.
- Pevny L, Placzek M. 2005. SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol.* 15(1):7-13.

- Popper AN, Platt C. 1993. Inner ear and lateral line. In Evans, D. H. (editor). *The physiology of fishes*. CRC Press, Florida, USA, pp. 99-136.
- Raymond K, Deugnier M, Faraldo M, Glukhova M. 2009. Adhesion within the stem cell niches. *Curr Opin Cell Biol*. 21(5):623-9.
- Sahly I, Andermann P, Petit C. 1999. The zebrafish *eyal* gene and its expression pattern during embryogenesis. *Dev Genes Evol* 209(7): 399-410.
- Sapède D, Rossel M, Dambly-Chaudière C, Ghysen A. 2005. Role of SDF1 chemokine in the development of lateral line efferent and facial motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(5):1714-1718.
- Sarrazin AF, Villablanca EJ, Nuñez VA, Sandoval PC, Ghysen A, Allende ML. 2006. Proneural gene requirement for hair cell differentiation in the zebrafish lateral line. *Dev Biol* 295(2):534-45.
- Schlosser G, Ahrens K. 2004. Molecular anatomy of placode development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*. 271(2):439-466.
- Schlosser G, Awtry T, Brugmann SA, Jensen ED, Neilson K, Ruan G, Stammler A, Voelker D, Yan B, Zhang C, Klymkowsky MW, Moody SA. 2008. *Eyal* and *Six1* promote neurogenesis in the cranial placodes in a *SoxB1*-dependent fashion. *Dev Biol*. 320(1):199-214.
- Schlosser G, Northcutt RG. 2000. Development of neurogenic placodes in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol*. 418(2):121-46.
- Schlosser G, Northcutt RG. 2001. Lateral line placodes are induced during neurulation in the axolotl. *Dev Biol* 234(1): 55-71.

- Schlosser G. 2006. Induction and specification of cranial placodes. *Dev Biol* 294 (2) 303–351.
- Seo S, Richardson GA, Kroll KL. 2005. The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* 132(1):105-115.
- Shou J, Zheng JL, Gao WQ., 2003. Robust generation of new hair cells in the mature mammalian inner ear by adenoviral expression of Hath1. *Mol Cell Neurosci.* 23(2):169-79.
- Swanson GJ. 1988. Regeneration of sensory hair cells in the vertebrate inner ear. *Trends Neurosci.* 11(8):339-342.
- Valentin G, Haas P, Gilmour D. 2007. The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Curr Biol.* 17(12):1026-1031.
- Wang TW, Stromberg GP, Whitney JT, Brower NW, Klymkowsky MW, Parent JM. 2006. Sox3 expression identifies neural progenitors in persistent neonatal and adult mouse forebrain germinative zones. *J Comp Neurol.* 497(1):88-100.
- Wang VY, Hassan BA, Bellen HJ, Zoghbi HY., 2002. Drosophila atonal fully rescues the phenotype of Math1 null mice: new functions evolve in new cellular contexts. *Curr Biol.* 12(18):1611-6.
- Westerfield M. 1994. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio) Eugene, University of Oregon Press.
- Williams JA, Holder N. 2000. Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear Res.* 143(1-2):171-181.

- Yerukhimovich M, Bai L, Chen DH, Miller RH, Alagramam KN. 2007. Identification and Characterization of Mouse Cochlear Stem Cells. *Dev Neuroscience*. 29:251-260.
- Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. 2009. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. 1: *Science*. 26;324(5935):1673-7
- Zhao S, Nichols J, Smith AG, Li M. 2004. SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol Cell Neurosci*. 27(3):332-42.
- Zheng JL, Shou J, Guillemot F, Kageyama R, Gao WQ. 2000. Hes1 is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation. *Development* 127(21):4551-4560.
- Zygar CA, Cook TL, Grainger RM Jr. 1998. Gene activation during early stages of lens induction in *Xenopus*. *Development* 125(17):3509-3519.



**Figura ANEXO 1. Esquema del sistema de micro-electroporación de pez cebra.**

(A) Electrodo de filamento de plata incrustado en un porta-objetos de acrílico. (B) Electrodo compuesto de una aguja de vidrio de 7,6mm de espesor, cargada con las moléculas a electroporar (morfolinos, ARNm, colorantes) (C) porta-objetos de acrílico. (D) La aguja se dispone sobre el embrión a electroporar mediante un micromanipulador (XYZ).