

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas- Área Biología

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Rol de las cilias primarias en la neurogénesis y
diferenciación de las células ganglionares de la retina en
pez cebra

Mag. Paola Lepanto

Director de tesis: Dr. José Badano

Co-Director de tesis: Dr. Flavio Zolessi

Laboratorio de Genética Molecular Humana y Laboratorio de Biología
Celular del Desarrollo Neural, Institut Pasteur de Montevideo

Fecha de Defensa: 28 de Abril de 2017

Tribunal

Presidente: Dra. Silvia Chifflet

Vocales: Dr. Guillermo Lanuza y Dr. Andrés Kamaid

Comisión de Admisión y Seguimiento

Dra. Silvia Chifflet y Dr. Raúl Russo

Agradecimientos

Muchas personas contribuyeron para llevar adelante este trabajo. Deseo agradecer en primer lugar a Flavio y José que diseñaron el proyecto y me permitieron participar en él, abriéndome las puertas de sus laboratorios. Ellos y todos los compañeros del laboratorio, Florencia, Male, Ceci, Victoria, Belén, Rossina, Matías, Gonzalo y Camila, me han dado un gran apoyo académico y anímico durante los últimos 5 años. A la vez, Paula, Cassandra y Luis han sido fundamentales para llevar adelante el mantenimiento de los peces y el soporte técnico del acuario. Soledad y Marcela también han contribuido con discusiones y ayuda relacionadas a las técnicas de microscopía. A la gente del MET de Facultad de Ciencias, Gabi, Marcie, Mage, Cami y Gaby gracias por la amistad y el apoyo desde hace ya muchos años.

Debo agradecer a la ANII que financió este trabajo a través de un proyecto Clemente Estable y una Beca de Doctorado, y la Comisión Académica de Postgrado de la UDELAR que me apoyó durante el último año de doctorado. El PEDECIBA me financió además de la asistencia a un curso, un congreso y una pasantía en el exterior. Durante esta estadía la Dra. Lucia Poggi me recibió en su laboratorio en Heidelberg, y junto con Anne-Laure Duchemin y Eva Patzel, hicieron de esa una experiencia enriquecedora.

Este trabajo se lo dedico a toda mi familia, mis amigas y amigos. Nada de esto hubiese sido posible sin su apoyo incondicional.

Contenidos

Resumen	1
I. Introducción	3
▪ Estructura y mecanismo de formación de las cilias primarias.....	3
▪ Las cilias primarias son organelos de comunicación intercelular.....	6
▪ Las funciones de las cilias primarias en el organismo.....	9
▪ Rol de las cilias primarias en el desarrollo del sistema nervioso.....	9
▪ Formación y organización de la retina.....	12
▪ Neurogénesis en la retina.....	14
▪ Diferenciación de las células en la retina.....	15
▪ Fundamentación del proyecto e hipótesis de trabajo.....	16
II. Objetivos	18
III. Materiales y Métodos	19
▪ Mantenimiento de los peces adultos.....	19
▪ Líneas de peces utilizadas.....	19
▪ Genotipado.....	20
▪ Reproducción y mantenimiento de embriones.....	21
▪ Inyección de embriones.....	22
▪ Trasplante de blastómeras.....	22
▪ Tratamiento de embriones con drogas y shock térmico.....	23
▪ Morfolinos.....	23
▪ Extracción de ARN a partir de embriones y síntesis de ADNc.....	26
▪ RT-PCR semi-cuantitativa.....	26
▪ Origen y construcción de vectores.....	27
▪ Generación de construcciones utilizando el sistema Tol2.....	30
▪ Síntesis de ARNm.....	31
▪ Observación de embriones <i>in vivo</i>	33
▪ Inmunofluorescencia.....	33
▪ Análisis de imágenes.....	35
▪ Análisis estadístico.....	36
IV. Resultados	37
a. Localización de las cilias primarias durante la diferenciación de las CGRs.....	37
i. Localización de las cilias primarias en embriones fijados.....	37

ii. Localización de las ciliias primarias <i>in vivo</i>	38
b. Función de las ciliias primarias durante la generación y diferenciación de las CGR.....	45
i. Evaluación de métodos para inhibir la formación de las ciliias primarias	
-Morfolinos.....	45
-Expresión de proteínas dominantes negativas.....	52
ii. Efecto de la inhibición de la formación de las ciliias primarias sobre el proceso de neurogénesis en la retina.....	55
iii. Efecto de la inhibición de la formación de las ciliias primarias sobre el proceso de diferenciación de las CGR.....	64
c. Participación de la vía de Shh en los efectos observados en la retina al inhibir la formación de las ciliias primarias.....	73
i. Inhibición de la vía de Shh por medio de ciclopamina.....	73
ii. Inhibición de la vía de Shh a través de la expresión de Gli2DR.....	77
iii. Activación de la vía de Shh mediante el tratamiento con SAG.....	79
iv. Activación de la vía de Shh por medio de la expresión de Gli1.....	81
V. Discusión	84
▪ Localización y dinámica de las ciliias primarias durante la diferenciación de las CGR.....	84
▪ Rol de las ciliias primarias en la generación y diferenciación de las CGR.....	90
- Herramientas para evaluar la función de las ciliias primarias.....	90
- Funciones de las ciliias a nivel de los progenitores neuronales.....	92
- Funciones de las ciliias en la diferenciación de las CGR.....	96
▪ Participación de la vía de Shh en la función de la cilia primaria a nivel de los progenitores y CGR en diferenciación.....	99
VI. Conclusiones	103
VII. Referencias	104
Glosario	117
ANEXO I- Leyendas de videos.....	120

Abreviaturas

CGR: células ganglionares de la retina

dpf: días post-fecundación

EPR: epitelio pigmentario de la retina

hpf: horas post-fecundación

MET: microscopía electrónica de transmisión

NE: neuroepitelio

Shh: Sonic Hedgehog

SNC: sistema nervioso central

Resumen

Las cilias primarias son organelos presentes en todas las células del organismo en vertebrados y que funcionan como centros de recepción y emisión de diferentes señales extracelulares. Las mutaciones que afectan proteínas relacionadas a su formación o mantenimiento dan lugar a defectos en el desarrollo de diferentes partes del organismo, incluyendo el sistema nervioso central (SNC). Estudios previos dirigidos a investigar las causas de algunas de las manifestaciones clínicas de la disfunción ciliar, han destacado la importancia de la cilia durante la neurogénesis. La retina es uno de los modelos más utilizados para el estudio de este proceso, sin embargo se desconoce si las cilias primarias participan en él. En la presente tesis abordamos esta interrogante a través del estudio de la localización *in vivo* y de las funciones de la cilia primaria durante la generación y diferenciación de las células ganglionares de la retina (CGR) en embriones de pez cebra.

Mediante microscopía confocal *in vivo* observamos que tanto los progenitores como las CGR en diferenciación pueden formar una cilia primaria. En los progenitores, este organelo se presentó en forma coordinada con el ciclo celular y en localización apical. Durante la diferenciación temprana de las CGR, la presencia y localización de la cilia fue dinámica, mientras que en estadios posteriores, sólo algunas células en la retina presentaron cilia, indicando que probablemente la cilia cumple funciones durante las primeras etapas de la neurogénesis. Para determinar cuáles son estas funciones, utilizamos como estrategia la inyección de morfolidos dirigidos a inhibir la producción de las proteínas ciliares Elipsa e IFT88. Este tratamiento generó una reducción significativa del largo ciliar en forma específica y reproducible. A nivel de la retina, encontramos que los embriones inyectados con los morfolidos *elipsa-BS/ift88-BS* presentaron una disminución en la proliferación de los progenitores y un aumento en la muerte celular, lo cual podría explicar la reducción del tamaño general de la retina. En estos embriones, también observamos una reducción en la generación de los diferentes tipos celulares de la retina, que además se retrasó con respecto a los controles. Sin embargo, estos efectos fueron más marcados sobre la formación de la capa de CGR, lo cual podría explicarse por un cambio de destino celular y por la alteración de la dinámica de diferenciación de las CGR. Una vía de señalización importante para la proliferación

de progenitores y la diferenciación de las CGR es la de Sonic Hedgehog (Shh), que requiere del funcionamiento ciliar. Si bien encontramos evidencias de que la vía de Shh y la cilia actúan en conjunto durante la formación de la capa de CGR, serán necesarios más experimentos para determinar si esta vía es la responsable de los efectos que observamos en la retina al inhibir la formación de las cilia.

En suma, nuestros resultados sugieren que las cilia primarias son importantes tanto para la proliferación y especificación del destino de los progenitores de la retina, como para la diferenciación de las CGR. Estos datos contribuyen a la comprensión del proceso de neurogénesis en la retina, y esperamos que ayuden a entender las bases celulares de algunas de las manifestaciones clínicas presentes en los pacientes con ciliopatías.

I. Introducción

Estructura y mecanismo de formación de las cilias primarias

Las cilias son organelos presentes en la superficie de la célula, que permiten la detección de señales provenientes del entorno. Están formadas por un axonema de microtúbulos rodeado por la membrana ciliar (fig. 1A). La membrana así como el citoplasma de la cilia tienen continuidad con el resto de la célula, sin embargo es un compartimiento que mantiene una composición particular de lípidos y proteínas. En la base del axonema se encuentra el cuerpo basal, conformado por uno de los centríolos de la célula que ha sido modificado con la asociación de diferentes proteínas. A diferencia de las cilias móviles y flagelos, el axonema de las cilias primarias está conformado por nueve dobletes periféricos sin par central (9+0) y son en general inmóviles debido a que carecen de brazos de dineína. Sin embargo, existen excepciones a esta regla y en el nodo embrionario se pueden encontrar cilias móviles con un axonema de estructura 9+0 (Nonaka et al., 1998). La tubulina del axonema ciliar presenta una serie de modificaciones postraduccionales particulares como acetilación, glutamilación y glicilación (Yu et al., 2015).

La mayoría de las células del organismo presentan una cilia primaria durante las fases G0/G1 y en el inicio de la fase S del ciclo celular. Esta coordinación ha permitido el estudio de los mecanismos de formación y absorción. El primer paso en la formación de las cilias involucra la diferenciación de uno de los centríolos de la célula en cuerpo basal. Esto ocurre a través de la adquisición de estructuras fibrilares que le permiten al centríolo asociarse a membrana (García-Gonzalo y Reiter, 2017). El centríolo modificado se asocia a vesículas derivadas del aparato de Golgi, formando la vesícula ciliar, para luego sufrir un proceso de maduración y extensión que lleva a la fusión con la membrana plasmática (fig. 1B). Previo a la extensión del axonema es necesaria la formación de una estructura que limite el pasaje de componentes a la cilia. Esta estructura está constituida por las fibras de transición y complejos denominados *Y-links* (García-Gonzalo y Reiter, 2017). A nivel de la membrana, un anillo de Septinas limita la difusión lateral entre la membrana plasmática y la membrana ciliar (Takao y Verhey, 2016). Se desconoce el mecanismo molecular que permite el pasaje de componentes a través de la barrera en

la base de la cilia. No obstante, se ha determinado que el transporte de proteínas citosólicas puede ser pasivo o activo dependiendo del tamaño molecular (Breslow et al., 2013). En lo que respecta a proteínas de la membrana ciliar, se han identificado varias vías de transporte de vesículas desde el aparato de Golgi hacia la base de la cilia. En estas vías participan las proteínas BBS (asociadas al Síndrome de Bardet Biedl) y GTPasas de las familias Arf, Arl y Rab (Lee y Chung, 2015). Una vez dentro del compartimiento ciliar, el transporte de componentes se lleva a cabo por la acción de motores moleculares. Éste se denomina transporte intra-flagelar (IFT, del inglés *intraflagellar transport*) y se trata del movimiento de complejos multiproteicos en forma anterógrada por Kinesina-2, o en forma retrógrada por Dineína-2 (fig. 1B) (Taschner y Lorentzen, 2016). El IFT permite la extensión del axonema, al igual que el mantenimiento del largo y composición de la cilia. El IFT también participa en la reabsorción de la cilia, que puede darse en asociación al ciclo celular, durante la diferenciación celular o puede ser inducida por señales del entorno (Liang et al., 2016).

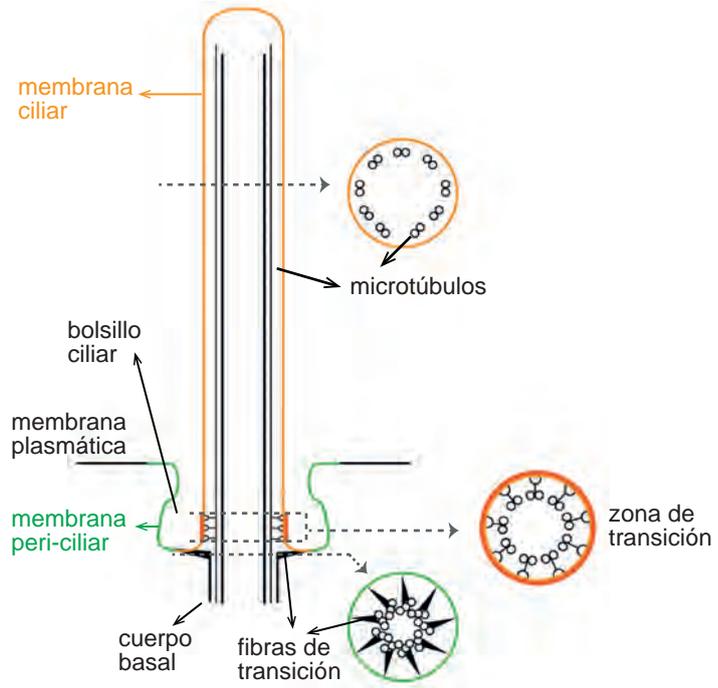
Como mencionamos anteriormente, el ciclo de formación y reabsorción de la cilia está coordinado con el ciclo celular. Esto se debe a que los centríolos tienen un rol dual en la célula, ya que además de formar el cuerpo basal, funcionan como organizadores del uso mitótico durante la división celular. Aunque existen algunas excepciones, en la mayoría de las células esto implica que la división celular y la cilogénesis sean eventos mutuamente excluyentes. De hecho existen varios mecanismos que permiten la regulación de estos procesos en forma recíproca (Izawa et al., 2015). El aspecto más estudiado hasta el momento es la reabsorción de la cilia asociada a la entrada en el ciclo celular. En este sentido se ha propuesto que la reabsorción de la cilia actúa como punto de control en la transición G1-S, y se han identificado varias vías que regulan este proceso previo a la entrada en fase S (Izawa et al., 2015). Por otro lado, la ciliogénesis también está controlada por otros procesos celulares tales como la autofagia y la reorganización del citoesqueleto (Malicki y Johnson, 2017). Los autores de este trabajo proponen que estos mecanismos permitirían el autoajuste de la cilia, a través de la modificación de su largo y forma dependiendo del nivel de la señal.

Figura 1. Principales características de la estructura y formación de las cilia primarias.

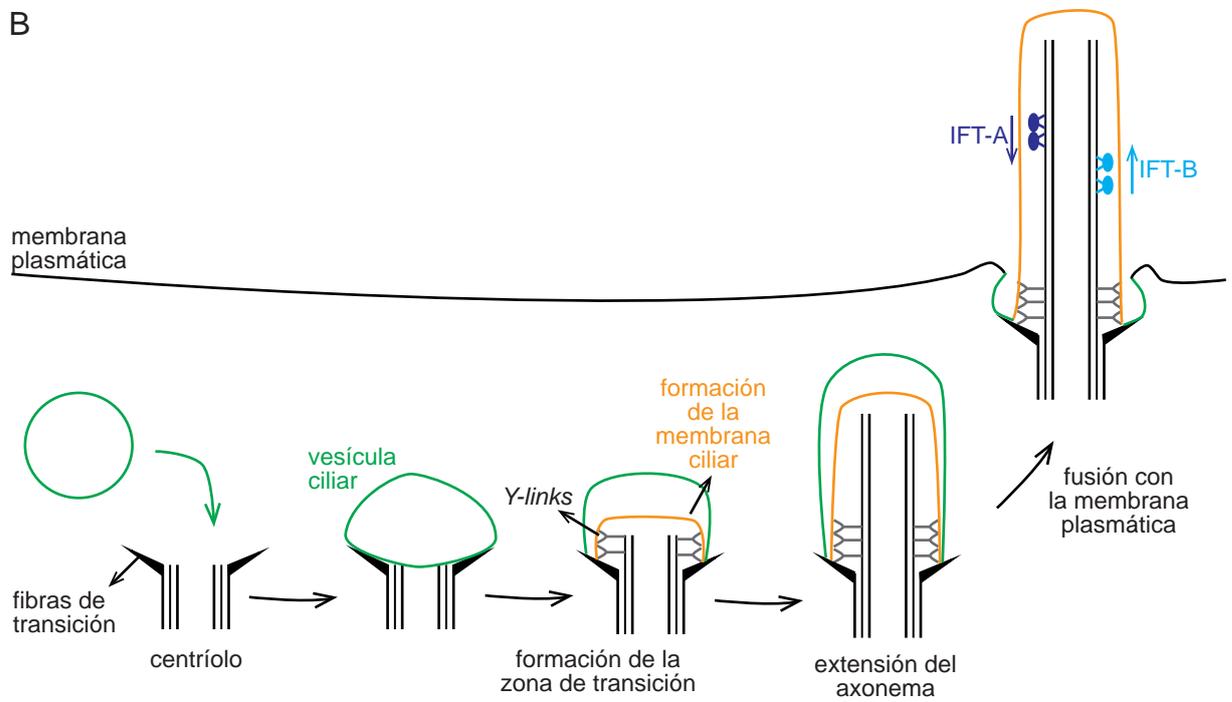
A. Diagrama de las principales características estructurales de las cilia primarias. El axonema de las cilia primarias presenta 9 dobletes de microtúbulos periféricos sin par central que se nuclean en el cuerpo basal. El cuerpo basal es uno de los centríolos de la célula modificado por la asociación de diferentes proteínas. Algunas de ellas forman las fibras de transición que le permiten su asociación a membrana. La membrana ciliar es continua con la membrana de la célula. En la base de la cilia se encuentra una región denominada zona de transición que limita el pasaje de componentes entre la cilia y el resto de la célula. Algunas cilia se encuentran parcialmente inmersas en una invaginación de la membrana celular, llamada bolsillo ciliar. Adaptado de (Lee y Chung, 2015).

B. Esquema que ilustra el modelo más aceptado actualmente para la formación de las cilia primarias. Inicialmente el centríolo materno (el más viejo de la célula) se modifica con la asociación de proteínas que luego maduran formando las fibras de transición. Esto permite la asociación de vesículas derivadas del aparato de Golgi, formando la vesícula ciliar. Luego comienza a formarse la zona de transición constituida por las fibras de transición y complejos denominados *Y-links*, que delimita la membrana que va a formar parte de la membrana ciliar. Finalmente ocurre la extensión del axonema previa y posteriormente a la fusión de la vesícula ciliar con la membrana plasmática. El transporte intraflagelar, con sus componentes anterógrado basado en Kinesina-2 (IFT-B) y retrógrado basado en Dineína-2 (IFT-A), permite el movimiento de componentes hacia y desde la cilia. Adaptado de (Sung y Leroux, 2013).

A



B



Las cilias primarias son organelos de comunicación intercelular

Una de las funciones más conspicuas de las cilias primarias es la de actuar como centro de recepción, transducción y emisión de señales. Parte de esta función la llevan a cabo a través de la emisión y recepción de vesículas. Recientemente se ha reconocido al bolsillo ciliar, localizado en su base (fig. 1A), como un sitio de endocitosis activa (Pedersen et al., 2016). Mientras tanto, se ha observado la formación de exovesículas portadoras de moléculas de señalización a partir de la membrana ciliar (Dubreuil et al., 2007; Nager et al., 2017). No obstante, la cilia se ha asociado históricamente a la recepción y transducción de señales químicas, entre las cuales se encuentran Sonic Hedgehog (Shh) (Gorojankina, 2016), Wingless/Int (Wnt) (Oh y Katsanis, 2013) y la señalización por varios receptores tirosín-quinasa (PDGFR α , IGF-1R, EGFR) (Christensen et al., 2012). Estas vías tienen al menos algún componente que se localiza o requiere del correcto funcionamiento del organelo. No está claro todavía por qué estas vías se asocian a las cilias primarias. A partir de las evidencias experimentales disponibles hasta el momento se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas sugiere que el volumen reducido del compartimiento ciliar permitiría lograr altas concentraciones efectivas de intermediarios. Alternativamente, los componentes ciliares podrían funcionar de andamio para los intermediarios que participan en la transducción de la señal (Nachury, 2014). También se puede pensar en otros motivos para esta asociación. Se puede especular que la organización del citoesqueleto de microtúbulos, asociado a la base de la cilia, facilite el transporte de intermediarios entre el compartimiento ciliar y el citoplasma haciendo más eficiente la señalización. Por otro lado, la concentración de receptores en la cilia podría proveer a las células la capacidad de detectar señales direccionales, así como controlar de qué región del entorno (por ejemplo del dominio basolateral o apical) y en qué momento detecta esa señal.

La interrelación entre la cilia y la transducción de señales se ha estudiado en profundidad en el caso de la vía de señalización de Shh. Esta vía es fundamental durante el desarrollo embrionario ya que participa en la formación de diferentes partes del organismo, entre ellas el sistema nervioso. Shh es una proteína de secreción que funciona en la comunicación intercelular a corta y larga distancia. Su unión al receptor de membrana Patched, puede tener diferentes efectos en la célula (Robbins et al.,

2012). Entre ellos, uno de los más estudiados ha sido el de la inducción de la expresión génica a través de la vía de transducción de señales denominada canónica. Si bien hay detalles de la vía que todavía se desconocen, se ha propuesto un mecanismo para su funcionamiento (Gorojankina, 2016). En líneas generales, en ausencia de ligando el receptor Patched se encuentra en la membrana ciliar e inhibe la activación de Smoothed (fig. 2A). En este contexto, los factores Gli se encuentran formando un complejo con el inhibidor SuFu y son procesados por proteólisis generando las formas represoras de la transcripción. En cambio, cuando Shh se une a Patched lo inactiva, permitiendo la activación de Smoothed (fig. 2B). Esto da lugar al desensamblado del complejo entre los factores Gli y SuFu, y a la inhibición de su proteólisis. La posterior activación de los factores Gli sin procesar induce la transcripción de los genes blanco de Shh. Como se mencionó, varios de los intermediarios de esta vía se localizan en la cilia y los componentes del IFT juegan un rol activo en la señalización (Goetz et al., 2009; Gorojankina, 2016). Esto se pone en evidencia en ratones con mutaciones en los genes asociados al IFT (IFT172 y IFT88), que dan como resultado fenotipos característicos de defectos en Shh, tales como el tubo neural abierto y anomalías en el cerebro y extremidades (Huangfu et al., 2003). Por ejemplo, la proteína Kif7 es necesaria para el transporte de los factores Gli a lo largo de la cilia y es esencial para la producción de las formas represoras y activadoras de estos factores (Cheung et al., 2009).

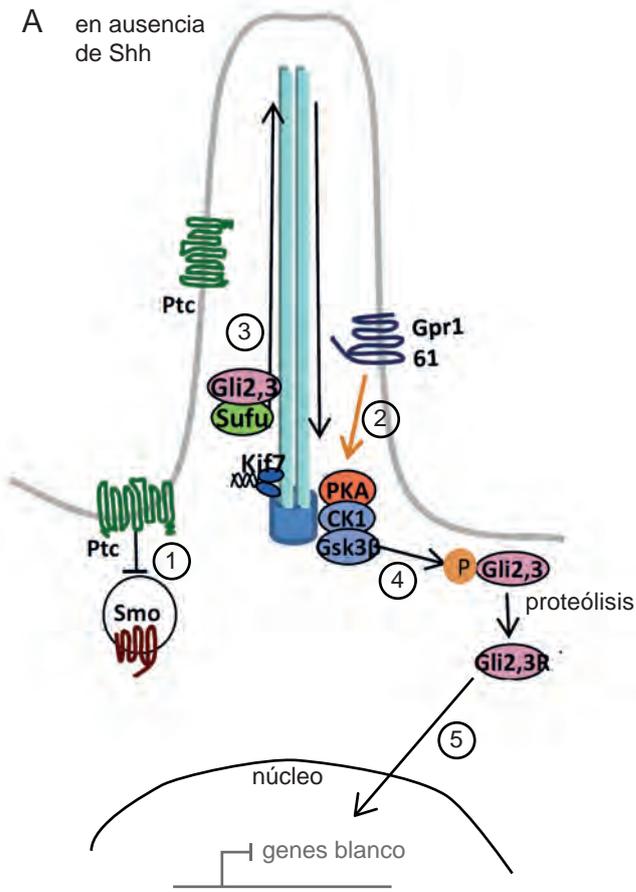
Figura 2. *Esquema de los componentes y los eventos durante la transducción de señales a través de la vía canónica de Shh.*

Los principales intermediarios de la vía canónica incluyen a la proteína Smoothened (una proteína transmembrana acoplada a proteína G) los factores transcripcionales Gli (Gli1, Gli2 y Gli3), y varios reguladores negativos como Gpr161, PKA y SuFu.

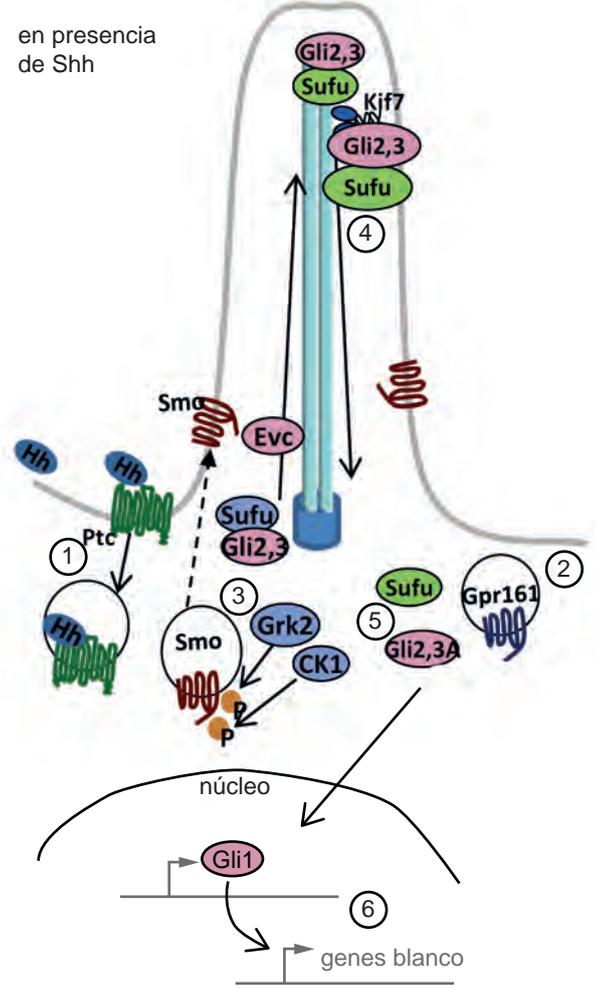
A. En ausencia de ligando, el receptor Patched y el regulador Gpr161 están presentes en la membrana de la cilia. Patched reprime la actividad de Smoothened al inhibir su localización en la membrana ciliar (1), mientras que Gpr161 inhibe la actividad de la vía al activar PKA en la base de la cilia (2). SuFu forma un complejo con los factores Gli2 y Gli3 (Gli2/3), reprimiendo su activación (3). PKA y otras quinasas (CK1 y GSK3 β) fosforilan los factores Gli2/3 que luego son procesados en el proteasoma (4). Este procesamiento genera las formas represoras, Gli2/3R, que inhiben la transcripción (5).

B. En presencia de ligando, Shh se une a Patched, lo cual genera su remoción de la cilia y la liberación de la inhibición sobre Smoothened (1). Gpr161 también es removido de la membrana ciliar (2). Smoothened es fosforilado (por CK1 y GRK2), transportado hacia la cilia por Kif3a y anclado cerca de su base por las proteínas Evc1/Evc2 (3). Smoothened activado inhibe el procesamiento de los factores Gli2/3. Las proteínas Gli2 y Gli3 sin procesar, asociadas a SuFu, entran a la cilia y se acumulan en la punta disociándose de este inhibidor (4). Luego de salir de la cilia, las proteínas Gli en su forma sin procesar, podrían sufrir una activación posterior para generar la forma Gli2/3A que actúa como activador transcripcional (5) (Humke et al., 2010). El tránsito de Gli2 y Gli3 a través de la cilia depende de Kif7 y es esencial para la producción de GliR y GliA. Los factores Gli2/3A activan la transcripción de Gli1 que a su vez induce la transcripción de otros genes blanco de la vía (6). Modificado de (Gorojankina, 2016).

A en ausencia de Shh



B en presencia de Shh



Las funciones de las cilias primarias en el organismo

La importancia de la cilia en el organismo se pone en evidencia en pacientes con mutaciones en proteínas involucradas en la formación o funcionamiento de este organelo o del cuerpo basal. Estas mutaciones dan lugar a una serie de enfermedades que se denominan conjuntamente ciliopatías (Badano et al., 2006; Waters y Beales, 2011; Mitchison y Valente, 2017). Las principales afecciones son degeneración de retina, disfunción renal y anomalías cerebrales, y pueden estar acompañadas de otras manifestaciones incluyendo fibrosis en hígado y páncreas, diabetes, obesidad y malformaciones del esqueleto. Como se puede apreciar, varios órganos y sistemas se ven afectados, principalmente por defectos en su formación durante el desarrollo embrionario.

A nivel del sistema nervioso, los defectos observados incluyen problemas estructurales, hidrocefalia, degeneración de retina, y manifestaciones funcionales como déficit cognitivos y obesidad (Lee y Gleeson, 2011). En algunos de estos casos se ha podido avanzar en el establecimiento de una relación entre la disfunción ciliar y el fenotipo observado. Por ejemplo, la degeneración de retina se asocia a la muerte de los fotorreceptores, ya que su segmento externo es una cilia modificada que utiliza el IFT para su mantenimiento (Mockel et al., 2011; Wheway et al., 2014). A su vez, distintos trabajos han avanzado en la identificación de funciones de las cilias primarias que podrían explicar algunas de las manifestaciones clínicas que involucran al sistema nervioso. Sin embargo, resta mucho para entender completamente el rol de las cilias en este contexto.

Las funciones de las cilias primarias en el desarrollo del sistema nervioso

Las funciones de las cilias primarias en el desarrollo del sistema nervioso se han estudiado principalmente en ratones con mutaciones en proteínas del IFT que participan en la formación y el mantenimiento de la cilia. Por ejemplo, en ratones que presentan mutaciones en genes como *ift88* (un componente de IFT complejo B) o *kif3a* (el motor molecular para el transporte anterógrado) se observaron defectos en la morfogénesis de la corteza, incluyendo la presencia de células organizadas en rosetas (Willaredt et al., 2008; Wilson et al., 2012; Gazea et al., 2016). Esto puede indicar que las cilias primarias

participan en el mantenimiento de la polaridad celular. En favor de esta hipótesis, se mostró que la eliminación de Arl13b (una GTPasa necesaria para el transporte de proteínas de membrana) en el neuroepitelio, causa la reversión de la polaridad de la glía radial (Higginbotham et al., 2013).

La cilia primaria participa en la regulación de la proliferación de los progenitores neuronales tanto en el cerebelo embrionario como en el hipocampo postnatal (Chizhikov et al., 2007; Breunig et al., 2008; Han et al., 2008; Spassky et al., 2008). Estos trabajos mostraron además que esta función se lleva a cabo a través de la señalización por Shh. En los progenitores, la cilia primaria también puede influir en la decisión entre seguir proliferando y diferenciar. Por ejemplo, en progenitores corticales, así como en células embrionarias en cultivo, la inhibición de la reabsorción de la cilia resulta en la salida prematura del ciclo celular y el inicio de la diferenciación (Li et al., 2011; Gabriel et al., 2016). Esta función podría estar dada por la transducción de una señal que afecte la permanencia en el ciclo celular. En este sentido, se ha reportado que IGF-1, presente en el líquido ventricular, induce la proliferación de la glía radial en la corteza de ratón (Yeh et al., 2013). La señalización a través del receptor de IGF-1 requiere la participación de la cilia primaria y al inhibir su activación se observó una disminución de la proliferación y un aumento en la generación de neuronas.

La cilia primaria también cumple funciones durante la migración y diferenciación neuronal. Por ejemplo, participan en la migración de interneuronas inhibitorias en la corteza de ratón (Baudoin et al., 2012; Higginbotham et al., 2012). En estos trabajos los autores sugieren que la cilia ejerce esta función a través de la recepción de señales del entorno, como por ejemplo Shh, que actúan de guía en la migración. Otro caso son las células granulares del hipocampo generadas en estadios postnatales y que deben migrar hacia su posición definitiva en el giro dentado. Inmediatamente después de la neurogénesis estas células carecen de cilia, pero éstas se vuelven a formar una vez que las nuevas neuronas alcanzan su destino (Kumamoto et al., 2012). La inhibición de la formación de la cilia generó defectos en el refinamiento del árbol dendrítico y el establecimiento de las conexiones sinápticas, probablemente por un aumento en la señalización de la vía de Wnt y β -catenina (Kumamoto et al., 2012). De forma similar, en la corteza cerebral, se observó que las células en migración carecen de cilia, mientras

que aquellas que están terminando su migración sí la presentan (Arellano et al., 2012). Los autores de este trabajo observaron además, que el largo ciliar aumentó durante la maduración neuronal y la sinaptogénesis.

También existen trabajos que han buscado determinar el rol de la cilia primaria en el funcionamiento neuronal. En este sentido, Berbari y colaboradores mostraron que la eliminación de *ift88* en la corteza e hipocampo de ratón, generó defectos en la transmisión sináptica y un déficit en ciertos tipos de memoria (Berbari et al., 2014). Aparte de estas funciones es posible que las cilias primarias participen en otros procesos celulares no explorados todavía. Por ejemplo, en pacientes con la ciliopatía denominada síndrome de Joubert, se han encontrado problemas en la decusación de axones aferentes y eferentes en el cerebro, lo cual indicaría que defectos a nivel ciliar pueden causar problemas en el proceso de guía axonal (Poretti et al., 2007).

Los resultados de estos estudios sugieren que las cilias primarias participan en diferentes aspectos de la neurogénesis y funcionamiento neuronal en varias regiones del sistema nervioso central. Sin embargo, la información es fragmentaria en cuanto a su presencia y localización a lo largo del proceso de diferenciación de una célula en particular. También queda por determinar cuál es su función en cada paso durante este proceso. Para contestar estas preguntas sería necesario utilizar un modelo que permita la observación *in vivo* de la diferenciación neuronal. Esto se puede realizar en la retina de vertebrados, uno de los modelos más utilizados para el estudio de la neurogénesis debido a su accesibilidad y su organización relativamente simple. En las siguientes secciones nos centramos en la descripción de sus principales características.

Formación y organización de la retina

La retina forma parte del sistema nervioso central, ya que se genera a partir de una evaginación a ambos lados de la región anterior del tubo neural. Inicialmente se forma una vesícula que luego se reorganiza dando lugar a la copa óptica, constituida por dos capas: la retina neural y el epitelio pigmentario de la retina (fig. 3B). La región distal de la copa óptica interactúa con el ectodermo para formar el cristalino y la córnea, mientras que de la interacción con el mesénquima periocular se generan el iris y cuerpo ciliar (Graw, 2010).

La organización general de la retina neural sigue un patrón común en vertebrados (Hoon et al., 2014). Los diferentes tipos celulares se ordenan en tres capas, separadas por otras dos donde se establecen las conexiones (fig. 3A). En la capa más interna se ubican las células ganglionares de la retina (CGR) cuyos axones conforman el nervio óptico y que inervan células en el tectum óptico a nivel del cerebro medio. En la capa nuclear interna se encuentran células amácrinas, bipolares y horizontales, así como los núcleos de la glía de Müller. En la capa más externa se encuentran los fotorreceptores (conos y bastones). Entre las tres capas nucleares se desarrollan las capas plexiformes interna y externa, en las que se encuentran las dendritas y los axones de los diferentes tipos celulares, estableciendo conexiones. Los axones de las CGR que salen del ojo y la vasculatura se desarrollan a través de la fisura coroidea, una estructura transitoria en la región ventral de la copa óptica.

Figura 3. Estructura y formación de la retina.

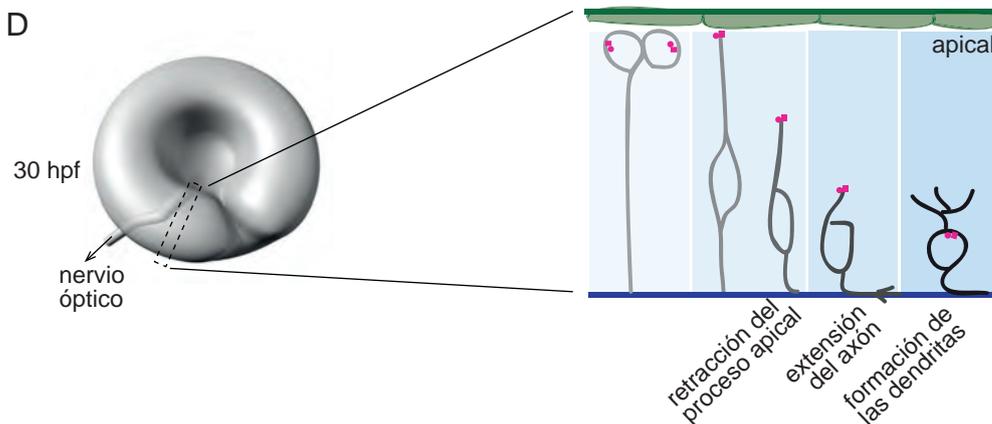
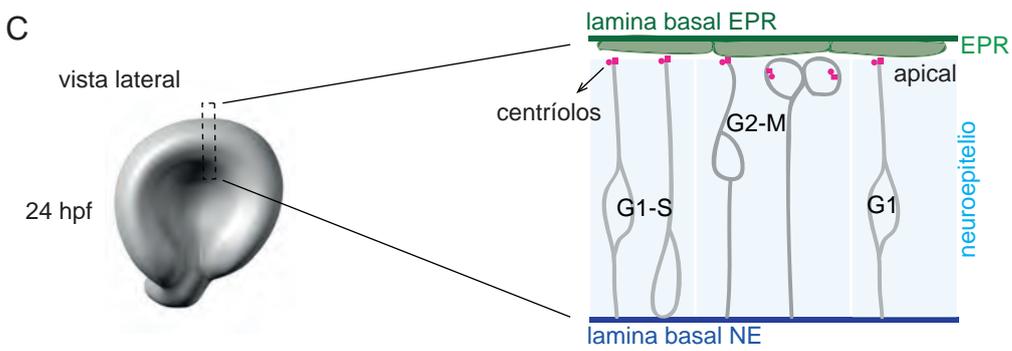
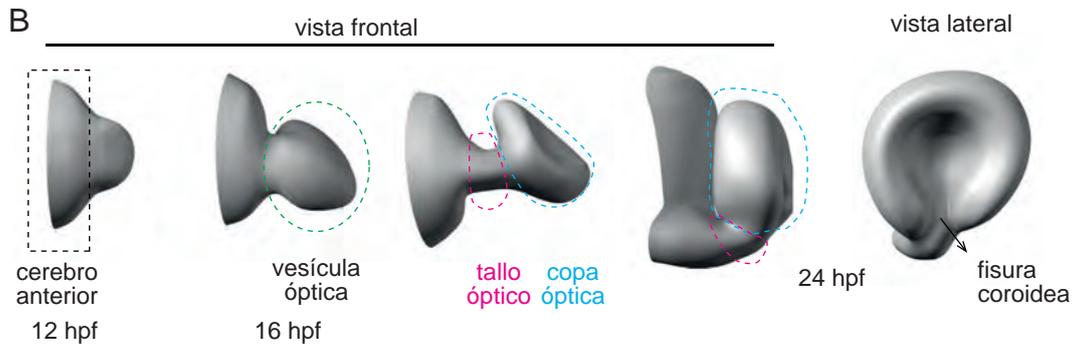
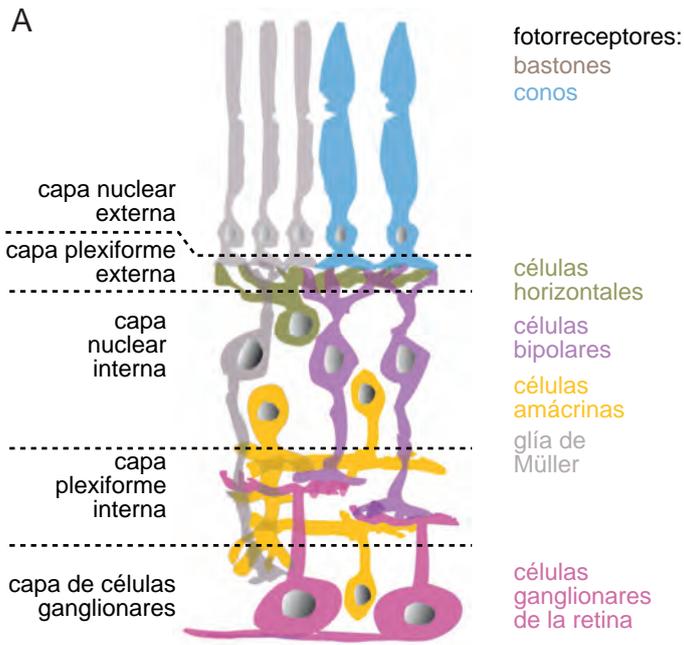
A. Estructura general de la retina de vertebrados. Indicamos las diferentes capas de la retina y los tipos celulares presentes en cada capa. Modificado de (Hoon et al., 2014).

B-D. Esquema de la formación de la retina en embriones de pez cebra.

B. A las 12 hpf comienza la evaginación de la vesícula óptica. A las 16 hpf la vesícula óptica se vuelve más achatada y se mantiene unida al cerebro embrionario a través del tallo óptico. Luego la vesícula óptica rota y se invagina, formando la copa óptica. En la región ventral de la copa óptica se encuentra la fisura coroidea. Modificado de (Bibliowicz et al., 2011).

C. A las 24 hpf se ha formado la copa óptica, que consta de dos capas: la capa externa dará lugar al epitelio pigmentario de la retina (EPR), mientras que la interna dará lugar al neuroepitelio (NE) y posteriormente a la retina neural. Cada capa posee su propia lámina basal. A las 24 hpf las células neuroepiteliales se encuentran en proliferación y sus núcleos se mueven a lo largo del eje ápico-basal (migración nuclear intercinética).

D. A las 28 hpf comienza la neurogénesis en la región ventro-nasal de la retina, con la generación y diferenciación de las primeras células ganglionares. A las 30 hpf la diferenciación ha avanzado y se ha comenzado a formar el nervio óptico. En esta etapa el neuroepitelio está formado por progenitores que continúan en el ciclo celular pero además por células en diferenciación. En el esquema representamos los principales pasos en la diferenciación de las CGR en pez cebra. Luego de la salida de mitosis la célula hija se encuentra asociada a ambas superficies del neuroepitelio. Mientras el núcleo de la CGR comienza a migrar hacia la región basal, la célula se desprende de la superficie apical y comienza a retraer el proceso apical. Luego comienza la extensión del axón sobre la lámina basal del neuroepitelio en dirección a la fisura coroidea. Cuando la célula se encuentra localizada en la región basal, comienza la formación de las dendritas en la región apical de la célula.



Neurogénesis en la retina

Al igual que el resto de las neuronas del sistema nervioso central, los diferentes tipos celulares de la retina se originan a partir del neuroepitelio. Este se trata de un epitelio pseudoestratificado y las células que lo conforman, denominadas neuroepiteliales, contactan la luz del tubo neural por la región apical, mientras que en la región basal se asocian a una lámina basal (Zolessi, 2016). Las células neuroepiteliales son altamente proliferativas. A medida que atraviesan las diferentes fases del ciclo celular, sus núcleos se mueven a lo largo del eje ápico-basal, lo que se denomina migración nuclear intercinética. Durante la fase G1 el núcleo migra hacia la región basal, donde entra en fase S. Luego vuelve a desplazarse hacia la región apical mientras atraviesa la fase G2. Durante la fase M la célula se encuentra en la región apical del neuroepitelio (fig. 3C)

Eventualmente los progenitores pasan por su última división celular dando lugar a células que comienzan el proceso de diferenciación. En la retina de vertebrados los diferentes tipos neuronales nacen en forma secuencial pero con cierto grado de superposición y desde la región central hacia la periferia (Stenkamp, 2015). Por ejemplo, en pez cebra, la neurogénesis comienza a las 28 hpf con la generación de las primeras CGR en la región ventro-nasal de la retina, adyacente a la fisura coroidea (Schmitt y Dowling, 1999) (fig. 3D). Inmediatamente después, en la misma región aparecen las células amácrinas y horizontales, seguidas de los fotorreceptores. Las células bipolares y la glía de Müller son las últimas en nacer (Schmitt y Dowling, 1999). Siguiendo la misma secuencia, la generación de células postmitóticas progresa hacia la región dorso-temporal.

Los progenitores de la retina son células multipotentes. La expresión consecutiva de una serie de reguladores transcripcionales, determina en forma paulatina la generación de los diferentes tipos celulares (Stenkamp, 2015). Estos factores pro-neurales que especifican el destino celular interactúan con proteínas que regulan el ciclo celular (Ciclinas, CDKs y CDKIs), de forma tal que el inicio de la diferenciación y la salida del ciclo celular y están coordinadas (Bilitou y Ohnuma, 2010). Además, factores extrínsecos pueden influir sobre la salida del ciclo celular y el destino de las células hijas. Por ejemplo, la interacción entre células adyacentes a través de las proteínas de

membrana Delta-Notch permite mantener a las células en estado proliferativo, inhibiendo la diferenciación. Sin embargo, Del Bene y colaboradores demostraron que en el neuroepitelio existe un gradiente de activación de la señalización de Notch, y que las células que migran hasta posiciones más basales durante la fase S logran escapar de la inhibición y diferenciarse (Del Bene et al., 2008).

También se han descrito señales positivas que dan lugar al inicio de la neurogénesis, como Fgf proveniente del tallo óptico, que da lugar a la generación de las primeras neuronas (Martinez-Morales et al., 2005). Luego, hay una ola de diferenciación cuya propagación depende de la presencia de Shh (Neumann y Nusslein-Volhard, 2000; Wang et al., 2005). El patrón de expresión de este factor es complejo. Inicialmente las CGRs y células amácrinas en diferenciación producen Shh (Neumann y Nusslein-Volhard, 2000; Shkumatava, 2004). Luego es liberado a partir del epitelio pigmentario de la retina (Stenkamp et al., 2000). En el período neurogénico, Shh tiene diferentes efectos. Por un lado, induce la proliferación de los progenitores de la retina a través de la regulación de proteínas relacionadas al ciclo celular (Locker et al., 2006; Wallace, 2008). Eventualmente, también promueve la salida de mitosis de los progenitores, induciendo la diferenciación de los diferentes tipos celulares de la retina (Stenkamp et al., 2000; Shkumatava, 2004; Masai et al., 2005; Shkumatava y Neumann, 2005). Estos datos sugieren que las células deben atravesar distintos estados que le permitan generar comportamientos diferentes frente a la misma señal.

Diferenciación de las células en la retina

Luego de la última división del progenitor, la neurona recién generada entra en el proceso de diferenciación, a través del cual adquiere ubicación, orientación, morfología y conexiones particulares. Las características morfológicas básicas de las neuronas, como la generación de dendritas y un axón, pueden ser adquiridas en cultivo, en ausencia de señales extracelulares (Dotti et al., 1988). Esto indica que las neuronas poseen un programa intrínseco de diferenciación (Barnes y Polleux, 2009). Sin embargo, tanto la proliferación de los progenitores como la diferenciación ocurren en un tejido polarizado -el neuroepitelio-, en presencia de gradientes de moléculas y en contacto con otras células (Zolessi, 2016).

El estudio de la retina ha dado varias pistas sobre el rol de las señales extracelulares durante la diferenciación neuronal (Randlett, Norden, et al., 2011). Por ejemplo, en pez cebra los mutantes *has* y *nok* (en los que se ven afectados los genes de polaridad *aPKCλ* y *pals1*, respectivamente), presentan el epitelio pigmentario de la retina interrumpido, mientras que en la retina neural se altera la laminación y los diferentes tipos celulares se ubican en forma desorganizada (Pujic y Malicki, 2004). En estos mutantes, una parte de las CGR se ubican en la región apical del neuroepitelio e incluso extienden axones apicales (Zolessi et al., 2006). Posteriormente se demostró que la laminina presente en la lámina basal es una señal instructiva para la localización de las CGR y para la extensión axonal en dirección basal (Randlett, Poggi, et al., 2011). La disrupción de la retina pigmentaria en el mutante *nok*, permite que la lámina basal del epitelio pigmentario afecte el posicionamiento de las CGR. Sin embargo, en ausencia de laminina las CGR no se encuentran invertidas, sugiriendo que hay otras señales que intervienen en su orientación (Randlett, Poggi, et al., 2011).

Fundamentación del proyecto e hipótesis de trabajo

Los estudios llevados a cabo hasta el momento indican que las cilias primarias son necesarias para el correcto desarrollo y funcionamiento neuronal, actuando principalmente a través de la recepción de señales extracelulares. Sin embargo, la información es fragmentaria en cuanto a la localización y el rol de las cilias primarias durante el nacimiento y la diferenciación neuronal.

Uno de los modelos más utilizados para el estudio de la neurogénesis es la retina de vertebrados. La mayor parte de los estudios que abordan la función de las cilias en la retina se centran en el mantenimiento del segmento externo de los fotorreceptores (Whewey et al., 2014). Las células neuroepiteliales de la retina presentan una cilia primaria al igual que las CGR en diferenciación, y en ambos casos se localiza en el extremo apical de la célula (Hinds y Hinds, 1974; Clark et al., 2012; Davison, 2014). Sin embargo, se desconoce si la cilia está presente durante todo el proceso o si muestra siempre la misma localización. De forma similar, se reconoce la participación de Shh en la generación de las CGR pero no se ha estudiado la participación de la cilia en la neurogénesis y diferenciación de estas células.

Por lo tanto, proponemos que las cilias primarias participan en la neurogénesis y la diferenciación de las CGR. De tener una función, al menos parte de ella podría estar mediada por la recepción de señales extracelulares como por ejemplo Shh.

Como estrategia de trabajo decidimos analizar la diferenciación de las CGR *in vivo* en la retina de embriones de pez cebra. Este modelo cuenta con varias ventajas desde el punto de vista práctico, incluyendo la existencia de una serie de herramientas celulares y moleculares que permiten el marcado *in vivo*, de todo el embrión o de células específicas, así como la manipulación de la expresión génica. Estas herramientas y la transparencia de los embriones en etapas tempranas del desarrollo permiten el análisis de la diferenciación *in vivo* por medio de microscopía óptica.

II. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la ubicación espacio-temporal y la función de las cilias primarias durante la neurogénesis y diferenciación de CGR de pez cebra *in vivo*.

Objetivos específicos

1. Caracterizar la presencia y localización de las cilias primarias durante la neurogénesis de las CGR.
2. Determinar el rol de las cilias primarias durante la proliferación de los progenitores y la diferenciación de las CGR.
3. Determinar el rol de las cilias primarias en la señalización por Shh durante la generación de las CGR.

III. Materiales y métodos

Mantenimiento de los peces adultos

En este trabajo utilizamos como modelo experimental embriones de pez cebra (*Danio rerio*). Mantuvimos los adultos en el sistema ZebTec Stand Alone o Active Blue de Tecniplast (Italia), con el agua a 28 °C (máximo 30 °C, mínimo 26 °C), conductividad de 500 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ (máximo 600 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$, mínimo 400 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$) y pH 7.5 (máximo 8.5, mínimo 6.5). También controlamos la concentración de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (máximo 0.5 ppm), NO_2 (máximo 0.25 ppm) y NO_3 (máximo 50 ppm). El ciclo luz:oscuridad fue de 14:10 h. La alimentación fue a base de comida seca (generalmente TetraMin en escamas; Tetra, Alemania) y viva (larvas nauplio de *Artemia salina* de 24-48 h post-eclosión) de dos a tres veces por día. Para la manipulación de los adultos seguimos el protocolo aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales de Institut Pasteur de Montevideo (CEUA), y contamos con la acreditación personal otorgada por CHEA y CNEA.

Líneas de peces utilizadas

Utilizamos las siguientes líneas de peces:

<i>Línea</i>	<i>Referencia</i>
SAT (línea salvaje)	(Howe et al., 2013)
Tg (actb2:Arl13b-GFP) hsc5	(Borovina et al., 2010)
Tg (atoh7:gap-GFP) cu1	(Zolessi et al., 2006)
Tg (atoh7:gap-mRFP) cu2	(Zolessi et al., 2006)
Tg (actb2:Arl13b-GFP) hsc5 x Tg (atoh7:gap-mRFP) cu2	este trabajo
SoFa1 (atoh7:gap-mRFP/ptf1:GFP/crx:gap-CFP)	(Almeida et al., 2014)
Tg (hsp:Gli1-GFP)	(Shen et al., 2013)

La línea transgénica tg (actb2:Arl13b-GFP) hsc5 (de ahora en más mencionada como Arl13b-GFP) expresa la proteína de fusión Arl13b-GFP bajo el control transcripcional de la región promotora del gen *bactin2*, codificante para β -actina (5.3 kb en 5' del codón de inicio) (Borovina et al., 2010). Este gen se expresa en forma constitutiva y en todas las células del organismo. La proteína Arl13b es una GTPasa pequeña, involucrada en el transporte de membrana, que se localiza específicamente

en la membrana ciliar y es necesaria para el transporte de proteínas hacia este compartimiento (Duldulao et al., 2009; Gotthardt et al., 2015).

Las líneas tg (atoh7:gap-GFP) cu1 y tg (atoh7:gap-mRFP) cu2 (de ahora en más mencionadas como atoh7:gap-GFP y atoh7:gap-RFP, respectivamente), expresan GFP o mRFP fusionadas a la señal N-terminal de palmitilación de GAP43 (gap). En estos transgénicos la región promotora corresponde a una secuencia de 5 kb en 5' de la región codificante para Atoh7 (Zolessi et al., 2006). Atoh7 es un factor transcripcional requerido para la formación de las CGR (Kay et al., 2001). Se expresa en forma transitoria en progenitores previo a su última división y posteriormente en CGRs en diferenciación (Masai et al., 2000; Poggi et al., 2005). Sin embargo tanto mRFP como GFP son proteínas estables, por lo tanto son heredadas en otras células que derivan del progenitor que expresa atoh7 incluyendo, además de CGR, células amácrinas, células horizontales y fotorreceptores.

La línea SoFa1, además de atoh7:gap-RFP, permite expresar GFP de localización citoplasmática y gap-CFP bajo el control transcripcional de las regiones promotoras de los factores Ptf1 y Crx, respectivamente (Almeida et al., 2014). Ptf1 es un factor transcripcional cuya expresión es requerida para la formación de células amácrinas y horizontales (Godinho, 2005; Jusuf et al., 2011). Crx también es un factor transcripcional que se expresa en células bipolares y fotorreceptores (Shen y Raymond, 2004).

La línea tg (hsp70l:Gli1-EGFP) (de ahora en más hsp:Gli1-EGFP) permite expresar la proteína de fusión Gli1-EGFP en todo el embrión bajo el control de la región promotora de Hsp70 (1.5 kb) (Shen et al., 2013). El gen *hsp70* presenta muy baja expresión a 28.5 °C pero se induce al incubar los embriones a 37 °C (Lele et al., 1997; Halloran et al., 2000).

Genotipado

Genotipamos la línea hsp:Gli1-EGFP por medio de PCR para detectar la presencia de EGFP. Para ello obtuvimos ADN genómico a partir de tejido de la cola de peces de tres meses de edad, siguiendo protocolos utilizados previamente (Shen et al., 2013; Xing et al., 2014). Los peces fueron anestesiados en 100 mL de agua de acuario conteniendo 0.02 % MS222 (Sigma, A5040) (a partir de una solución de 0.4 % MS222 en 20 µM Tris-

HCl pH 7.5). Monitoreamos los peces durante el pasaje por las diferentes etapas de la anestesia: primero cesaron el nado y perdieron el equilibrio quedando de costado sobre el fondo del recipiente, luego el movimiento de los opérculos se volvió arrítmico (Matthews y Varga, 2012). Este punto se alcanzó dentro de los 5 min de colocarlos en la solución con MS222, aunque de forma variable dependiendo del peso de cada individuo. Luego los colocamos sobre papel humedecido, y cortamos un trozo pequeño de cola utilizando un bisturí. Pusimos este tejido en tubos de 1.5 mL individuales conteniendo 60 µL de la solución para la extracción de ADN (50 µM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.3 % Tween-20, 0.3 % NP40, 1 mg/mL Proteínasa K - agregada el día de uso). Inmediatamente después, regresamos los peces a una pecera con agua de acuario, en donde recuperaron el nado en 1-2 min, y fueron mantenidos por separado hasta saber el resultado del genotipado. Para la extracción de ADN calentamos el tejido en buffer de lisis por 4 h a 55 °C. Luego inactivamos la Proteínasa K incubando a 98 °C por 10 min. Diluimos la solución obtenida 1/20 en agua.

Luego realizamos una PCR con cebadores específicos para GFP: Fwd: CCT GAA GTT CAT CTG CAC CA; Rv: GGG TGC TCA GGT AGT GGT TG (tamaño esperado del producto de PCR: 500 pb), utilizando la polimerasa Taq (Invitrogen), en reacciones de 25 µL con las siguientes condiciones:

Buffer Taq	1X	desnaturalización inicial	94 °C – 3 min	1 ciclo
MgCl ₂	1.5 mM	desnaturalización	94 °C – 30 s	38 ciclos
dNTPs	0.2 mM	hibridación	55 °C – 30 s	
cebadores	0.4 µM	extensión	72 °C – 45 s	
molde	5 µL	extensión final	72 °C – 10 min	1 ciclo
Taq	0.75 U	mantenimiento	4 °C	∞

Evaluamos el tamaño del producto de PCR por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE con bromuro de etidio, utilizando un marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen #15628-019).

Reproducción y mantenimiento de embriones

Para obtener embriones, apartamos machos y hembras del resto del grupo en la tarde anterior al día de reproducción. Los colocamos en parideras conteniendo agua del sistema, en cantidades acordes al tamaño de la paridera (máximo 4 peces/L) y separados

por sexo mediante un tabique. A la mañana siguiente, retiramos el tabique y cambiamos el agua, dejándola a un nivel mínimo. Luego del desove, recolectamos los embriones y los colocamos en una placa de 10 cm de diámetro con agua de acuario con 0.2 mg/L de azul de metileno para prevenir el crecimiento de hongos (medio de embriones). Incubamos los embriones a una temperatura estándar de 28.5 °C, o en caso de desear modificar la velocidad del desarrollo, a un mínimo de 26 °C y un máximo de 32 °C (Kimmel et al., 1995). Realizamos la datación de acuerdo al trabajo de Kimmel et al. (Kimmel et al., 1995). Para inhibir la pigmentación incubamos los embriones desde las 8 hpf con 30 mg/L PTU (1-phenyl 2-thiourea, Sigma P7629) en medio de embriones.

Inyección de embriones

Colocamos los embriones a ser inyectados en el ángulo generado por un portaobjetos en la tapa de una placa de 10 cm, manteniendo una mínima cantidad de agua. Para realizar la microinyección utilizamos agujas estiradas en un *puller* Sutter (P-97) a partir de capilares de borosilicato con filamento (WPI #1B100F-4), micromanipulador y un microinyector neumático, utilizando aire comprimido a aproximadamente 50 psi (ASI, modelo MPPI-3). Inyectamos entre 0.5 y 5 nL de la solución de morfolino o ARNm en el vitelo de embriones de entre 1 a 8 células. Cuando inyectamos ADN, descargamos un volumen de 0.5 o 1 nL de la solución en el citoplasma de embriones de una célula.

Trasplante de blastómeras

Decorionamos manualmente los embriones a ser utilizados como donantes o receptores de trasplante a las 3 hpf en una placa con fondo de agarosa al 1.5 % en medio E3M (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄) con 10 mM Hepes pH 7.2 y 0.2 mg/L azul de metileno. Luego incluimos el embrión donante y los embriones aceptores (entre 3 y 4 embriones) en 2.5 % metilcelulosa (Sigma, M0387) colocada previamente sobre un cubreobjetos y los posicionamos en la orientación deseada. Realizamos la manipulación de blastómeras utilizando un microinyector manual utilizando aceite como medio de transferencia de la presión (WPI, MMP) y una aguja generada a partir de capilares sin filamento, con punta en bisel de alrededor de 40-50

µm de diámetro. Colocamos las blastómeras del donante en el polo animal del receptor, región que va a dar lugar al sistema nervioso central. Luego de finalizado el trasplante, pasamos el cubreobjetos con los embriones incluidos en metilcelulosa a placas de 6 pocillos, con fondo de agarosa y medio de embriones suplementado con 100 U/mL penicilina/estreptomicina (Invitrogen #15140-122) y 30 mg/L PTU.

Tratamiento de embriones con drogas y shock térmico

Resuspendimos las drogas SAG (Enzo, ALX-270-426-M001) y ciclopamina (StemRD, #CYC-05) en DMSO (Sigma) en concentraciones de 4 mM y 9 mM respectivamente. Para tratar los embriones, primero los decorionamos manualmente en el estadio deseado y luego los colocamos de a 5 por pocillo en placas de 6 pocillos. Realizamos las incubaciones con la droga deseada o el mismo volumen de DMSO diluido en agua de acuario.

Para realizar el shock térmico preparamos tubos de 50 mL con aproximadamente 25 mL de agua del sistema y los pre-incubamos a 37 °C, monitoreando la temperatura del agua dentro del tubo. Luego colocamos los embriones de 22 hpf sin decorionar en el tubo con agua a 37 °C por 1 h, agitando periódicamente. Al culminar ese período, pasamos los embriones nuevamente a una placa con agua a 28.5 °C.

Morfolinos

Los oligómeros de morfolino son moléculas sintéticas conformadas por las bases de los ácidos nucleicos (A, T, C, G) asociadas a anillos de morfolino que se unen a través de grupos fosfodiamidato (fig. 4A) (Bill et al., 2009). Estos grupos no poseen carga a pH fisiológico y no son degradados por nucleasas. En general tienen 25 pares de bases de largo y se unen a secuencias complementarias en el ARNm, inhibiendo su procesamiento o el inicio de la traducción (Bill et al., 2009). Los morfolinos que utilizamos en este trabajo fueron sintetizados por la compañía Gene Tools. Las secuencias fueron diseñadas por nuestro equipo con el servicio de diseño de Gene Tools u obtenidas a partir de la literatura:

Nombre	Secuencia	Referencia
<i>ift88</i> -BT	GCCTTATTAAACAGAAATACTCCCA	(TsujiKawa y Malicki, 2004)
<i>elipsa</i> -BT	GGCTACCGATTTCGTTTCATGGCATCA	(Omori et al., 2008)
<i>ift88</i> -BS	AACAGCAGATGCAAAATGACTCACT	este trabajo
<i>elipsa</i> -BS	CTGTTTTAATAACTCACCTCGCTGA	este trabajo
control	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA	Gene Tools
p53	GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG	(Robu et al., 2007)

Para este trabajo diseñamos morfolinós que están dirigidos a bloquear el procesamiento del pre-ARNm de los genes *ift88* o *elipsa*. *D. rerio* tiene una única copia del gen *ift88* en el cromosoma 9, a partir de la cual se pueden generar dos transcritos. A partir del transcrito NM_001001725.1 analizamos la composición de exones e intrones utilizando la herramienta BLAT (Kent, 2002). Diseñamos el morfolino *ift88*-BS de forma tal que se una en la región donadora de *splicing* entre el exón 3 e intrón 3 (fig. 4B), en ambos transcritos. El bloqueo de este sitio da lugar a un ARNm que retiene el intrón 3, el cual tiene un codón STOP prematuro y genera una proteína truncada (fig. 4C y D). Parte del morfolino *ift88*-BS (20 nucleótidos) se une además a una región no codificante en el cromosoma 5.

El gen *elipsa* (*traf3ip1*) de *D. rerio* existe en una única copia en el cromosoma 9 y codifica para tres transcritos identificados hasta el momento. A partir del transcrito NM_200600.1 analizamos la composición de exones e intrones y diseñamos el morfolino *elipsa*-BS que se une en la región donadora de *splicing* entre el exón1 y el intrón1 (fig. 4E). El bloqueo de este sitio genera un ARNm que retiene el primer intrón generando un codón STOP prematuro (fig. 4F, G). Este morfolino no hibrida con otras regiones en el genoma de pez cebra.

Resuspendimos los morfolinós liofilizados en agua ultrapura a una concentración de 2 mM, incubando a 65 °C por 15 min, los alicuotamos y almacenamos a -20 °C. Realizamos las diluciones de trabajo en agua ultrapura y las almacenamos a -20 °C. Previo a ser utilizadas, incubamos las soluciones a 65 °C por 15 min y las centrifugamos a aproximadamente 8000 x g por 5 min.

Figura 4. Inhibición de la expresión de las proteínas *lft88* y *Elipsa* mediante oligómeros de morfolino.

A. Diagrama de la estructura de las subunidades y enlaces que componen los oligómeros de morfolino y su comparación con el ADN. Modificado de (Eisen y Smith, 2008).

B. Esquema de la composición de exones (ex) e intrones (int) en el pre-ARNm codificante para *lft88*. Indicamos la posición en que hibridan los morfolinos utilizados en este trabajo: *lft88-BT* y *lft88-BS*.

C. Esquema de la región inicial del ARNm de *lft88* procesado correctamente. En esta situación, la lectura a partir del codón de inicio de la traducción (AUG) da lugar a la proteína *lft88* salvaje. Indicamos la posición en que hibridan los cebadores utilizados para detectar esta variante por RT-PCR.

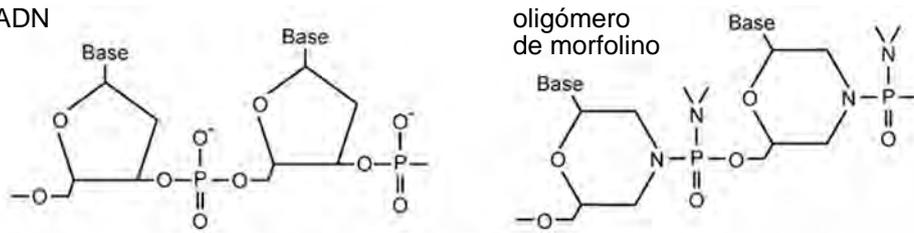
D. Esquema de la región inicial del ARNm de *lft88* que retiene el intrón3 (al que llamamos mal procesado) debido a la acción del morfolino *lft88-BS*. En esta situación, la lectura a partir del codón de inicio de la traducción (AUG) termina prematuramente por la presencia de un codón de terminación (STOP) en el intrón 3. Indicamos la posición en que hibridan los cebadores utilizados para detectar esta variante por RT-PCR.

E. Esquema de la composición de exones e intrones en el pre-ARNm codificante para *Elipsa*. Indicamos la posición en que hibridan los morfolinos utilizados en este trabajo: *elipsa-BT* y *elipsa-BS*.

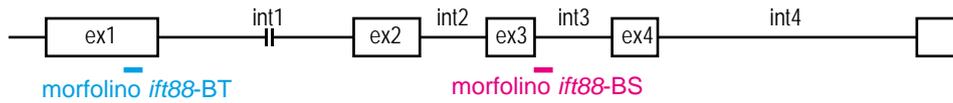
F. Esquema de la región inicial del ARNm de *Elipsa* procesado correctamente. En esta situación, la lectura a partir del codón de inicio de la traducción (AUG) da lugar a la proteína *Elipsa* salvaje. Indicamos la posición en que hibridan los cebadores utilizados para detectar esta variante por RT-PCR.

G. Esquema de la región inicial del ARNm de *Elipsa* que retiene el intrón 1 (forma mal procesada) debido a la acción del morfolino *elipsa-BS*. En esta situación, la lectura a partir del codón de inicio de la traducción (AUG) termina prematuramente por la presencia de un codón de terminación (STOP) en el intrón 1. Indicamos la posición en que hibridan los cebadores utilizados para detectar esta variante por RT-PCR.

A ADN



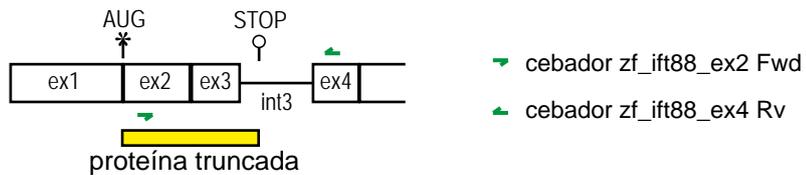
B pre-ARNm *ift88*



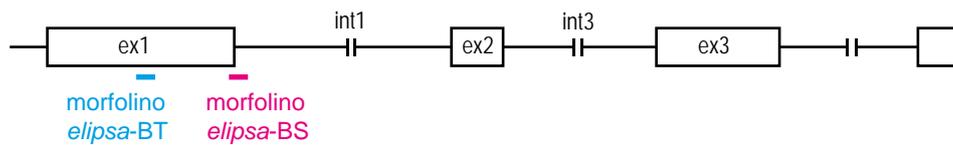
C ARNm *ift88* procesado



D ARNm *ift88* mal procesado



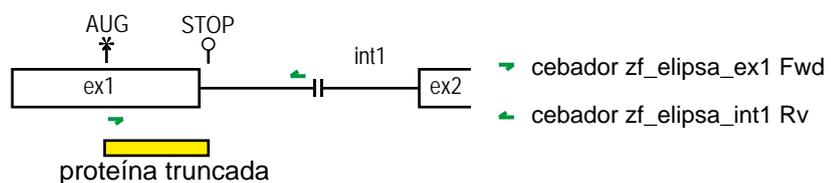
E pre-ARNm *elipsa*



F ARNm *elipsa* procesado



G ARNm *elipsa* mal procesado



Extracción de ARN a partir de embriones y síntesis de ADNc

Realizamos la extracción de ARN total de aproximadamente 30 embriones por condición. Los embriones fueron recolectados a las 30 hpf, retirando el exceso de medio. Luego los sumergimos en nitrógeno líquido y los guardamos a -80 °C hasta el momento de la extracción. Realizamos la extracción utilizando Trizol (50 µL por tubo) y homogeneizando en forma mecánica con un micro-homogeneizador (*micropestle*) y vórtex. Luego de incubar 5 min a temperatura ambiente, agregamos 10 µL de cloroformo agitando vigorosamente. Luego de incubar 5 min a temperatura ambiente centrifugamos a 12000 x g, por 15 min a 4 °C. Recuperamos el sobrenadante al que le agregamos 25 µL de isopropanol, mezclando e incubando 10 min a temperatura ambiente. Luego centrifugamos a 12000 x g 10 min a 4 °C. Descartamos el sobrenadante y lavamos el pellet con 50 µL de EtOH al 75%, mezclando. Luego de centrifugar a 7500 x g por 5 min a 4 °C, removimos el sobrenadante y dejamos secar el pellet. Finalmente, resuspendimos el ARN en 10 µL de agua libre de nucleasas (Gibco) incubando a 55-60 °C por 10 min. Determinamos la concentración de la solución de ARN midiendo la absorbancia a 260 nm (NanoDrop, Thermo).

Previo a la síntesis de ADNc, tratamos 2.2 µg de ARN con 2.2 U de DNasa I (Sigma, #4716728001) por 30 min a 37 °C, inactivando luego por incubación a 65 °C por 15 min y a -80 °C por 15 min. Luego realizamos la retro-transcripción a partir de 1 µg de ARN utilizando hexámeros aleatorios y el kit SuperScript First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen, #11904-018).

RT-PCR semi-cuantitativa

Utilizamos RT-PCR semi-cuantitativa para evaluar la eficiencia de los morfolinios *elipsa*-BS e *ift88*-BS así como los niveles de *patched2*. El diseño de cebadores se llevó a cabo utilizando el programa Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>). En el primer caso, diseñamos cebadores para detectar tanto la forma procesada correctamente como la forma mal procesada (por acción del morfolino) de cada transcrito, utilizando las secuencias codificantes y genómicas mencionadas anteriormente. Los sitios de hibridación de los cebadores en cada transcrito se muestran en la figura 4. Para determinar los niveles de *patched2* diseñamos cebadores específicos para la región

central del transcrito NM_130988. Evaluamos los niveles de *gapdh* como control. Los cebadores que utilizamos fueron los siguientes:

Cebador	secuencia	tamaño del producto de PCR
zf_elipsa_ex1 Fwd	GAACGAATCGGTAGCCAAAA	ARNm procesado: 256 pb ARNm mal procesado: 260 pb
zf_elipsa_ex3 Rv	CTCTCCGCTGACTAGCATCA	
zf_elipsa_int1 Rv	AGACTACGCGCAGGCTACAT	
zf_ift88_ex2 Fwd	TCCCAGAGGAAGAGGAGGAT	ARNm procesado: 157 pb ARNm mal procesado: 259 pb
zf_ift88_ex4 Rv	GCAGTGCCAGGATATTTTGC	
zf_ptch2_Fwd	CCATCCATGGTCCTATCCAC	510 pb
zf_ptch2_Rv	CTGGAAGTAGTGCAGCCACA	
zf_gapdh Fwd	TTAAGGCAGAAGGCGGCAAA	300 pb
zf_gapdh Rv	AAGGAGCCAGGCAGTTGGTG	

Utilizamos 2 μ L de la solución de ADNc para hacer reacciones de PCR estándar con los cebadores específicos para el gen deseado y para *gapdh* utilizando 0.75 U de Taq polimerasa (Invitrogen) por reacción. El protocolo de amplificación constó de un *touch down* de 10 pasos (65 °C a 55 °C) para favorecer la amplificación de productos específicos, y luego una amplificación estándar con temperatura de hibridación de 55 °C y 20 ciclos. Analizamos los productos de PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

Origen y construcción de vectores

Para el manejo de secuencias utilizamos el software Serial Cloner (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html). Muchos de los vectores que utilizamos en este trabajo fueron proporcionados amablemente por otros grupos de investigación:

Kit tol2 ; p5E:atoH7	Dra. K. Kwan, University of Utah, EEUU
pCS2+Arl13b-GFP	Dr. B. Ciruna, The University of Toronto, Canadá
barhl1.2:GAL4	Dra. L. Poggi, COS-Heidelberg, Alemania
pME:Gli1 ; pME:Gli2DR	Dr. R. Karlstrom, University of Massachusetts, EEUU
pTX7-ift88 ; pTX7-elipsa	Dr. J. Malicki, The University of Sheffield, Reino Unido

Los vectores pME-Rab8A-ns y pME-Rab8A[T22N]-ns fueron generados a partir de pENTR-fishRab8A (Addgene, # 24904) y pENTR-fishRab8A[T22N] (Addgene, #24906) por PCR. Diseñamos los siguientes cebadores en los que reemplazamos la primera base del

codón STOP (T) de Rab8A por dos bases (GC) (ver más adelante), eliminando de esta forma el codón de terminación:

Rab8A_T717gc_Fwd	AGATGCGTGCTGCTGGCAAACCCAGCTTTC
Rab8A_T717gc_Rv	GAAAGCTGGGTTTGCCAGCAGCACGCATCT

Con estos cebadores realizamos una PCR utilizando la polimerasa de ADN de alta fidelidad Phusion (Finnzymes, F-530S) en reacciones de 50 μ L con las siguientes condiciones:

Buffer HF	1X	desnaturalización inicial	98 °C – 30 s	1 ciclo
dNTPs	0.2 μ M c/u	desnaturalización	98 °C – 10 s	30 ciclos
cebadores	0.5 μ M c/u	hibridación/extensión	72 °C – 93 s	
molde	10 ng	extensión final	72 °C – 10 min	
Phusion (2 U/ μ L)	1U	mantenimiento	4 °C	∞

Luego de finalizada la reacción de PCR, digerimos con 20 U de *DpnI* (NEB, R0176S), 1 h a 37 °C para retirar el ADN molde. Corroboramos la presencia del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. Luego transformamos 40 μ L de células DH5 α competentes químicamente con 4 μ L del producto de PCR siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen, #18265-017). A partir de las colonias resultantes realizamos cultivos líquidos en LB (medio Luria Bertani) para almacenar y para realizar extracciones de ADN plasmídico a pequeña escala (minipreps; Invitrogen, #K210010). Confirmamos la secuencia de los plásmidos obtenidos por medio de secuenciación con los cebadores genéricos M13F y M13R.

El vector pME-Arl13b(1-190) fue generado por clonado basado en PCR (*restriction free cloning o RF Cloning*) (van den Ent y Löwe, 2006; Unger et al., 2010). Realizamos una primera PCR para aislar la secuencia del dominio terminal de Arl13b (que comprende los aminoácidos 1 al 190) de pez cebra, a partir de una preparación de ADNc realizada con oligo-dT. Para ello utilizamos los siguientes cebadores:

pME-MCS_Arl13b-zf_Fwd	TAATACGACTCACTATAGGGCGAATGAAATGTTCAATCTGATGGCGAACTGTTGC
pME-MCS_Arl13b-zf_Rv	GCCAACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAATGTTATTTAGGAGCCAGTTAAGGCC

El cebador Fwd tiene una región complementaria al extremo 5' del dominio Nt de Arl13b, mientras que el cebador Rv tiene una región complementaria al extremo 3' del dominio Nt de Arl13b (subrayado). Realizamos la reacción de PCR por duplicado en un volumen de 50 μ L cada una:

Buffer HF	1X	desnaturalización inicial	98 °C – 30 s	1 ciclo
dNTPs	0.2 μ M c/u	desnaturalización	98 °C – 10 s	35 ciclos
cebadores	0.5 μ M c/u	hibridación	60 °C – 30 s	
molde (ADNc)	2 μ L	extensión	72 °C – 20 s	
Phusion (2 U/ μ L)	1U	extensión final	72 °C – 10 min	
		mantenimiento	4 °C	∞

Luego realizamos una electroforesis en gel de agarosa y purificamos el producto de PCR a partir del gel.

El otro extremo de ambos cebadores es complementario a la región en que se desea insertar el dominio Nt de Arl13b en el vector pME-MCS del kit Tol2. Para llevar a cabo esta inserción, realizamos una segunda PCR (en volumen de 50 μ L) utilizando como cebadores el producto de la primera PCR.

Buffer HF	1X	desnaturalización inicial	98 °C – 30 s	1 ciclo
dNTPs	0.2 μ M c/u	desnaturalización	98 °C – 10 s	20 ciclos
cebadores (PCR #1)	250 ng	hibridación	60 °C – 60 s	
molde (pME-MCS)	20 ng	extensión	72 °C – 100 s	
Phusion (2 U/ μ L)	1U	extensión final	72 °C – 10 min	
		mantenimiento	4 °C	∞

Purificamos el producto de la segunda PCR por adsorción en columna (Invitrogen, K310001) y lo digerimos con 1 μ L *DpnI*-FD (Thermo, FD1703) 1 h a 37 °C seguido de inactivación a 80 °C por 10 min. Luego transformamos 50 μ L de células competentes DH5 α (Invitrogen, #18258012) con 5 μ L del producto de PCR digerido. Testeamos las colonias que portaban el plásmido por medio de PCR a partir de colonia con los cebadores genéricos M13F y M13R. Encontramos colonias positivas, a partir de las cuales realizamos una miniprep para almacenar y secuenciar.

Generación de construcciones utilizando el sistema Tol2

El kit Tol2 (Kwan et al., 2007) es una colección de plásmidos con sitios de recombinación del sistema Gateway (Invitrogen) que permite el ensamblaje de construcciones en forma rápida y eficiente. Existen cuatro tipos de plásmidos diferentes (pDestiny, p5'Entry, pMiddle-entry y p3'Entry), cada uno con una combinación particular de sitios de recombinación. Esto permite el ensamblado direccional de construcciones (fig. 5A). Nosotros utilizamos este sistema para generar el siguiente grupo de construcciones:

a	SP6:Rab8A-P2A-EGFP-CAAXpA
b	SP6:Rab8A[T22N]-P2A-EGFP-CAAXpA
c	SP6:EGFP-CAAXpA
d	SP6:Arl13b(1-190)-P2A-EGFP-CAAXpA
e	atoh7:EGFP-CAAXpA
f	UAS:EGFP-CAAXpA
g	SP6:Gli1-EGFP
h	atoh7:Gli2DR-P2A-EGFP-CAAXpA

En todos los casos utilizamos como vector de destino pDestTol2pA2. Los vectores p5'Entry contenían la secuencia de diferentes regiones promotoras de la transcripción: SP6 (para síntesis de ARNm *in vitro* a partir de la polimerasa de ARN SP6), atoh7 (para expresión en progenitores y CGR) o UAS (activable por Gal4). Los vectores pMiddle-entry contenían las secuencias codificantes para Rab8A, Rab8A[T22N], EGFP-CAAX, Gli1-EGFP o Gli2DR. EGFP-CAAX indica una versión de EGFP fusionada a un sitio de palmitilación, lo que permite la asociación del EGFP a la membrana plasmática. En el caso de los vectores (a), (b), (d) y (h) realizamos la recombinación con vectores p3'Entry con la secuencia codificante para el péptido viral P2A fusionada a la secuencia de EGFP-CAAX. Como ejemplo, en la figura 5B esquematizamos la construcción y el producto de su transcripción y traducción en el caso del vector (d). A partir de estas construcciones se genera un único ARNm con la secuencia codificante para la proteína de interés, P2A y EGFP-CAAX. Debido a que la secuencia de la proteína de interés carece de codón de terminación, la traducción comienza en el AUG y continúa con la secuencia del péptido P2A. Sin embargo, durante la traducción, la secuencia P2A da lugar a un evento de *ribosomal skipping* en C-terminal de esta secuencia (Szymczak-Workman et al., 2012).

Por lo tanto se generan dos proteínas: la proteína de interés con un agregado de 27 aminoácidos en C-terminal y EGFP-CAAX, lo que nos permite distinguir las células que expresan la primera proteína a través de la presencia de EGFP-CAAX.

Para generar estas construcciones, seguimos el protocolo indicado en la página web del kit (http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/Main_Page). Las reacciones de recombinación consistieron en combinar 20 fmol de cada plásmido en TE (10 mM Tris pH 8- 1mM EDTA) y 2 µL de la enzima LR Clonase Plus II (Invitrogen) e incubar por 16 h a 25 °C. Finalizamos la reacción mediante la incubación con Proteinasa K (Invitrogen) a 37 °C durante 15 min. Para recuperar las construcciones, utilizamos 3 µL del producto de esta reacción para transformar células competentes TOP10 (Invitrogen). Luego confirmamos la presencia de la construcción correcta por medio de miniprep, digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. Los clones positivos fueron almacenados en glicerol 15 % a -80 °C.

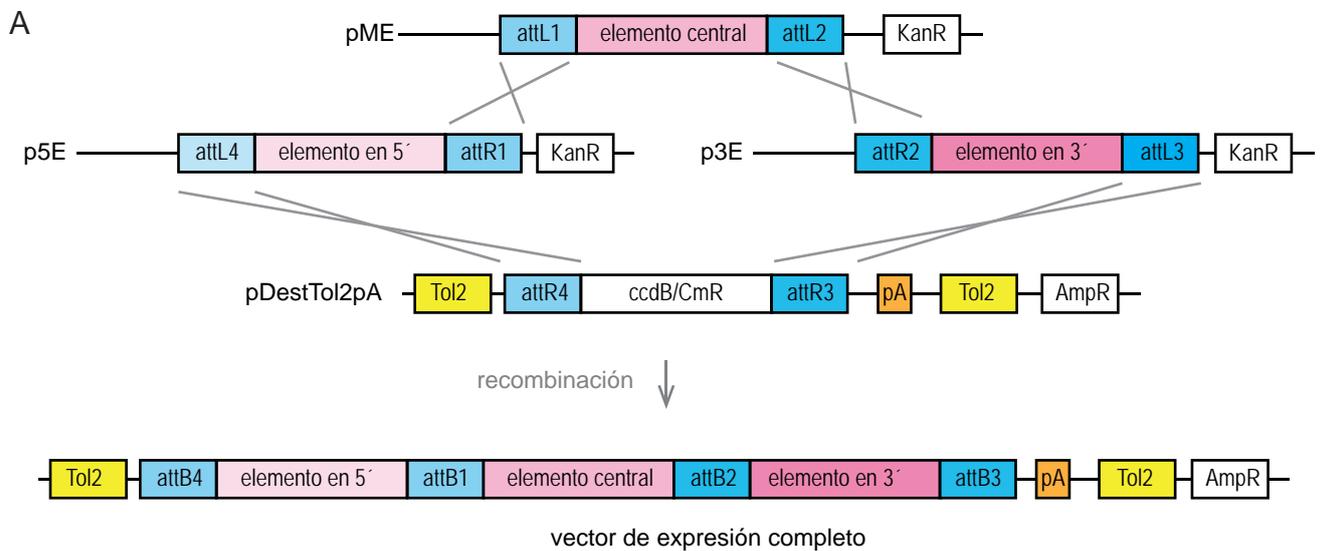
Síntesis de ARNm

Para la síntesis de ARNm, linearizamos el vector correspondiente por corte con la enzima de restricción adecuada durante una noche. Luego purificamos el plásmido lineal, ya sea por adsorción en columna (Invitrogen, K10001) o por electroforesis en gel de agarosa y extracción a partir de gel (Invitrogen, K210012). La síntesis de ARNm fue llevada a cabo utilizando el kit mMessage mMachine (Thermo) siguiendo las instrucciones del proveedor. Luego de la síntesis purificamos el ARNm utilizando columnas G-50 (GE, #27-5330-01).

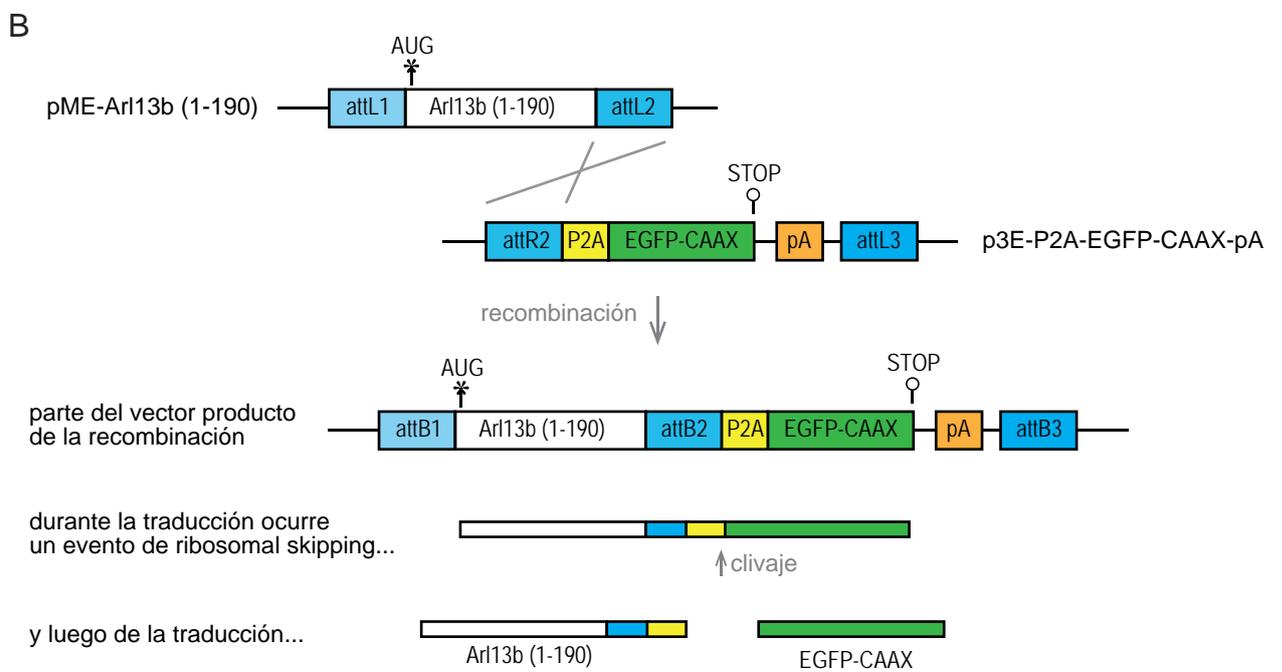
Figura 5. Esquema de la construcción de vectores con el kit Tol2 y de la co-expresión de proteínas mediante el péptido viral P2A.

A. Esquema general del kit Tol2, que permite la construcción de vectores de expresión transitoria y transgénesis. Modificado de (Kwan et al., 2007).

B. Esquema de los vectores pMiddle-entry y p3'Entry utilizados para generar la región codificante en el vector SP6: Arl13b(1-190)-P2A-EGFP-CAAXpA. Arl13b(1-190) tiene un sitio de inicio de la traducción (AUG) pero carece de sitio de terminación. Luego de la recombinación, Arl13(1-190) queda en el mismo marco abierto de lectura que el péptido P2A y EGFP-CAAX. De esta forma, durante la traducción la secuencia P2A da lugar a un evento de *ribosomal skipping* en su región C-terminal generando dos proteínas: Arl13b(1-190) con un agregado de 27 aminoácidos en Ct y EGFP-CAAX.



- attL1-4 y attR1-4 - sitios de recombinación del sistema Gateway
- Tol2 - sitios para inserción en el genoma por transposición
- ccdB/CmR - gen codificante para toxina ccdB y gen de resistencia a cloranfenicol
- pA - señal de poliadenilación (SV40 late polyA)
- KanR y AmpR - gen de resistencia a Kanamicina o Ampicilina



Observación de embriones in vivo

Realizamos la observación y registro de imágenes macroscópicas de los embriones utilizando una lupa asociada a una cámara Nikon EOS T3i-Rebel. Observamos los embriones ya sea en el medio de incubación o luego de ser montados en 3 % metilcelulosa para restringir el movimiento.

Para realizar las observaciones microscópicas *in vivo*, seleccionamos los embriones a las 30 hpf en la lupa utilizando iluminación UV. Luego los anestesiamos en 0.04 mg/mL MS222 diluido en E3M y los montamos en una placa de 3.5 mm con fondo de vidrio n°0 (MaTek), utilizando agarosa de bajo punto de fusión (Invitrogen, #16520) al 0.8 % (previamente fundida a 70 °C y enfriada a 39-40 °C), suplementada con 0.04 mg/mL MS222 y 30 mg/L PTU. Orientamos los embriones de forma tal que la región ventro-nasal de la retina quedara lo más cerca posible del vidrio. Durante el período de adquisición mantuvimos los embriones en Ringer (116 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂) o E3M suplementado con 5 mM Hepes pH 7.2, 0.04 mg/mL MS222 y 30 mg/L PTU a una temperatura de 29-30 °C.

Realizamos el seguimiento *in vivo* de la diferenciación de la retina utilizando el microscopio confocal Leica TCS SP5, utilizando el objetivo 20x de apertura numérica 0.7 e inmersión en glicerol. Adquirimos series de planos focales cada 1-1.5 µm a lo largo de 50-60 µm de profundidad de tejido. Realizamos un escaneo bidireccional a una resolución de 512 x 512 píxeles cada 10 o 15 minutos. Mantuvimos la intensidad de laser al mínimo requerido para la detección de señal.

Inmunofluorescencia

Fijamos embriones del estadio deseado en PFA 4 % durante una noche a 4 °C. Al día siguiente lavamos el fijador por medio de varias incubaciones con 1 % Tritón-PBS (PBS-T) a temperatura ambiente con agitación. En el caso de embriones de 8 somites, utilizados para la observación de la vesícula de Kupffer, realizamos una post-fijación con metanol. Para esto, deshidratamos los embriones por medio de dos lavados en metanol:PBS-T 50:50 de 5 min cada uno, un lavado en metanol 100 % de 5 min y una incubación con metanol 100 % a -20 °C por 20 min. Luego los re-hidratamos nuevamente, por medio de un lavado en metanol:PBS-T 50:50 de 5 min y dos lavados

en PBS-T de 5 min. En el caso de embriones en estadio de 30 hpf o posteriores, realizamos una permeabilización con 0.25 % Tripsina-EDTA a 4 °C por 15 a 30 min dependiendo del estadio (30 hpf: 15 min; 48 hpf: 20 min; 72 hpf: 30 min). Posteriormente realizamos un lavado con PBS-T por 10 min en hielo.

Para llevar a cabo el inmunomarcado, bloqueamos los sitios inespecíficos incubando los embriones con 0.1 % BSA en PBS-T durante 30-60 min. Realizamos la incubación con anticuerpos, ya sea primario o secundario, en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en agitación. Retiramos el anticuerpo primario no unido por medio de varios lavados en 0.1 % BSA en PBS-T con agitación. Retiramos el anticuerpo secundario no unido por medio de dos lavados con PBS-T de 15 min cada uno y un lavado final con PBS de 15 min a temperatura ambiente con agitación. En algunos casos junto con el anticuerpo secundario incluimos 0.2 µg/mL faloidina-TMR (Sigma P1951) o verde de metilo (1/2500) (Prieto et al., 2014). Finalmente montamos los embriones en glicerol:Tris pH 7.4 3:1.

En el caso de embriones de 5 dpf, lavamos con PBS y los incubamos en 30 % sacarosa en PBS a 4 °C por 1 h. Luego los incluimos en OCT para realizar cortes en criostato. Realizamos cortes de 7 µm de espesor que colocamos en portaobjetos cubiertos con gelatina y fijamos por incubación con 4 % PFA en PBS por 10 min. Luego de lavar el PFA, incubamos los cortes con verde de metilo en PBS por 1 h, lavamos y montamos en glicerol:Tris pH 7.4 3:1.

Los anticuerpos que utilizamos así como las diluciones de trabajo fueron las siguientes:

anticuerpo	compañía y número	dilución de trabajo
zn8 (anti-neurolin/DM-Grasp)	DSHB	1/100
anti-p-Histona H3	Santa Cruz (sc-8656-R)	1/300
anti-caspasa 3 activada	Abcam (ab13847)	1/100
anti-tubulina acetilada	Sigma (T7451)	1/750
anti-gama tubulina	Sigma (T6557, T5192)	1/500
anti-IgG ratón-488	Invitrogen (A21202)	1/1000
anti-IgG conejo-TMR	Invitrogen (T2769)	1/1000
anti-IgG1 ratón-488	Invitrogen (A21121)	1/1000
anti-IgG2b ratón-568	Invitrogen (A21144)	1/1000

Observamos tanto los embriones montados enteros como los cortes utilizando el microscopio confocal Leica TCS SP5 con objetivos 20x de AN 0.7 de inmersión en glicerol y el objetivo 63x de AN 1.4 de inmersión en aceite, o el microscopio confocal Zeiss LSM 800 con el objetivo 63x de AN 1.3 de inmersión en glicerol. En ambos casos adquirimos series de planos confocales ajustando los parámetros de adquisición de acuerdo a cada situación.

Análisis de imágenes

Analizamos las imágenes obtenidas por microscopía confocal utilizando el programa Fiji (Schindelin et al., 2012). Para medir el largo ciliar en la vesícula de Kupffer, realizamos selecciones lineales manuales sobre las proyecciones en z de la intensidad máxima. Realizamos las medidas de volumen, tanto de la retina como de la región positiva para zn8, mediante la selección de regiones en base a intensidad, ajustadas a mano. Luego, determinamos el volumen utilizando las herramientas 3D Roi Manager y 3D Object Counter (Bolte y Cordelières, 2006; Ollion et al., 2013). El conteo de células marcadas con los anticuerpos anti-pHistona H3 o anti-Caspasa 3 activada fue realizado manualmente con la ayuda del plugin MTrackJ (Meijering et al., 2012).

Para el análisis de intensidad de fluorescencia en las retinas de los embriones SoFa, utilizamos proyecciones en z de la intensidad promedio en una profundidad de 10 μm . Luego delimitamos una región transversal de 100 μm de largo y 20 μm abarcando el espesor de la retina. Determinamos el perfil de intensidad de los diferentes canales utilizando las herramientas del Intensity Toolset del Imperial College of London FLIM facility (<http://www.imperial.ac.uk/medicine/facility-for-imaging-by-light-microscopy/equipment/software---fiji/>). En algunos casos detectamos el traspaso de señal del GFP a los canales del CFP y RFP. En estos casos corregimos las imágenes de la siguiente forma: 1) calculamos un factor de normalización para el canal de GFP (intensidad de GFP máxima / intensidad de RFP máxima debida al traspaso - (menos) intensidad de RFP promedio en el canal del RFP); 2) dividimos la imagen del canal de GFP utilizando el factor de normalización calculado en (1), generando una nueva imagen correspondiente a la señal que se está traspasando al canal de RFP; 3) le restamos al canal del RFP la imagen correspondiente a la señal traspasada obtenida en (2). La misma

operación fue realizada para el canal de CFP cuando fue necesario. A partir de las curvas de intensidad delimitamos las regiones correspondientes a cada capa en el punto de la curva en que la intensidad era el 50 % de la intensidad máxima. Determinamos el porcentaje de la señal correspondiente a cada capa de la retina como el área bajo la curva correspondiente a esa capa dividida el área bajo la curva correspondiente a la señal de todo el canal.

Análisis estadístico

Realizamos el análisis de los datos siguiendo los lineamientos en (Sokal y Rohlf, 1979) y usando el software Past (Hammer et al., 2001). En todos los casos corroboramos normalidad utilizando el test de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas utilizando el test de Levene. En el caso de datos normales y homogéneos, realizamos el test *t* de Student para la comparación de las medias. Para datos no homogéneos, realizamos la transformación a rangos (Conover y Iman, 1981). En el caso de datos no normales, comparamos la mediana por medio del test de Mann-Whitney.

IV. Resultados

a. Localización de las cilia primarias durante la diferenciación de las CGRs

a.i. Localización de las cilia primarias en embriones fijados

En primer lugar analizamos la presencia de las cilia primarias en la retina mediante la observación de embriones fijados en diferentes estadios. Usualmente, para identificar la ubicación de la cilia se utilizan anticuerpos anti-tubulina acetilada, que se encuentra enriquecida en el axonema ciliar. Sin embargo, las CGR presentan tubulina acetilada en el citoplasma desde estadios tempranos de la diferenciación (Icha et al., 2016). Por este motivo decidimos utilizar la línea transgénica tg (actb2:Arl13b-GFP) que expresa la proteína ciliar Arl13b fusionada a GFP (Borovina et al., 2010). Con el fin de determinar si Arl13b-GFP marca las cilia en la retina, realizamos una inmunomarcación *in toto* para tubulina acetilada en embriones Arl13b-GFP de 26 hpf, estadio en que todavía no ha comenzado la neurogénesis. En estos embriones las cilia primarias se localizaron principalmente en la región apical del neuroepitelio (fig. 6A). A mayor aumento observamos que todas las cilia marcadas por Arl13b-GFP eran positivas para tubulina acetilada (fig. 6B).

Con el fin de analizar la ubicación de la cilia durante la diferenciación de las CGR, cruzamos peces de las líneas Arl13b-GFP y atoh7:gap-RFP. El promotor atoh7 se activa durante el último ciclo celular de los progenitores de las CGR y la expresión de la proteína fluorescente se puede observar incluso en etapas avanzadas de la diferenciación (Poggi et al., 2005). Fijamos los embriones Arl13b-GFP/atoh7:gap-RFP a las 35 hpf y los analizamos por microscopía confocal. Al igual que a las 26 hpf, las retinas de embriones de 35 hpf también presentaron cilia primarias en la región apical del neuroepitelio (fig. 6C). Observamos células con expresión de gap-RFP en diferentes estadios. Por un lado, encontramos células con baja expresión de gap-RFP, de forma alargada, que presentaban el núcleo en la región central del neuroepitelio. Estas características corresponden a progenitores o células postmitóticas que todavía no se desprendieron de la superficie apical (fig. 6D). También observamos células con mayor expresión de gap-RFP, con el núcleo ubicado en la región basal del neuroepitelio y el extremo del proceso apical en la región central (fig. 6E). Según estas características,

estas células eran CGR en etapas tempranas de la diferenciación (Zolessi et al., 2006). En aquellos casos en que observamos la presencia de una cilia, ésta se presentaba en el extremo apical de la célula (fig. 6D y E).

Para evaluar la presencia de la cilia primaria en etapas más avanzadas de la diferenciación de las CGR, analizamos la retina de embriones Arl13b-GFP fijados a las 48 hpf (preparados *in toto*) o a los 5 dpf (por medio de cortes de criostato). En imágenes de microscopía confocal pudimos observar un número pequeño de cilias primarias, ya sea en la capa de las CGR u otras capas, tanto en retinas de embriones de 48 hpf como de 5 dpf (fig. 6F y G).

Estos resultados indican que Arl13b-GFP marca las cilias primarias en la retina. Además, comprobamos que las células neuroepiteliales poseen cilias primarias en la región apical al igual que las CGR durante el inicio de la diferenciación. Sin embargo, nuestros resultados mostraron un número reducido de cilias en las retinas de embriones de 48 hpf y 5 dpf.

a.ii. Localización de las cilias primarias in vivo

Para evaluar la dinámica de las cilias primarias en progenitores y durante la diferenciación de las CGR pasamos al análisis de embriones *in vivo* utilizando la línea *atoh7:gap-RFP/Arl13b-GFP*. Al ser una línea estable, todas las CGR expresan *gap-RFP*, y todas las células del organismo expresan *Arl13b-GFP*. Para lograr individualizar las CGR y asignarles la cilia que le corresponde, realizamos trasplantes de blastómeras de embriones dobles transgénicos *atoh7:gap-RFP/Arl13b-GFP* a embriones salvajes. Luego del trasplante, seleccionamos aquellos embriones que presentaron células marcadas con *atoh7:gap-RFP* a las 30 hpf y seguimos la diferenciación de la retina por medio de microscopía confocal con adquisiciones periódicas a lo largo del tiempo (*time-lapse*).

En la retina de estos embriones observamos tanto progenitores como CGR en diferenciación. Al igual que en las imágenes de embriones fijados, observamos células con baja expresión de *RFP* y forma alargada. Sin embargo, a partir del seguimiento *in vivo* podemos asegurar que estas células eran progenitores, probablemente en fase S tardía o el comienzo de G2, ya que el núcleo se encontraba en migración hacia la región

Figura 6. Localización de las cilias primarias en la retina de embriones de pez cebra en diferentes estadios.

A. Sección óptica a través de la región ventro-nasal de la retina de un embrión de la línea Arl13b-GFP de 26 hpf, marcado con un anticuerpo anti-tubulina acetilada, faloidina-TRITC y verde de metilo.

B. Magnificación de la región apical del neuroepitelio (mostramos una proyección de la intensidad máxima de secciones ópticas en un espesor de 3 μm de tejido). Las flechas indican algunas cilias primarias en las que coincide la marca de anti-tubulina acetilada y Arl13b-GFP.

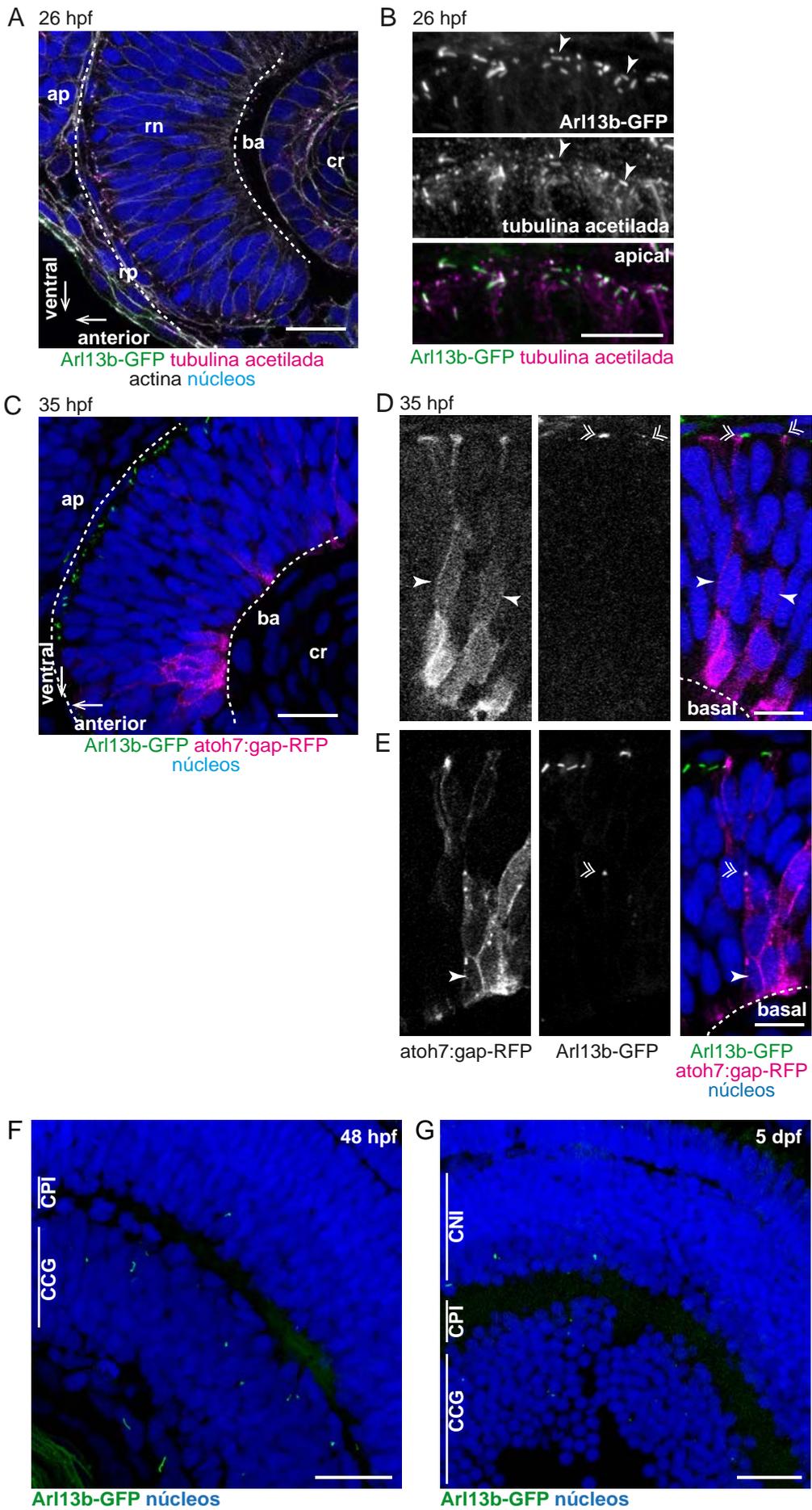
C. Imagen de la región ventro-nasal de la retina en un embrión de la línea Arl13b-GFP/atoh7:gap-RFP fijado a las 35 hpf. Mostramos una proyección 3D de la intensidad máxima a través de una región de 3 μm de espesor.

D-E. Detalle de células con expresión de RFP en embriones de 35 hpf. Las flechas (Δ) indican los somas de las células que presentan cilia primaria (\gg).

F. Imagen de la retina de un embrión de la línea Arl13b-GFP fijado a las 48 hpf y montados *in toto*. Mostramos la proyección en z de la intensidad máxima en un espesor de tejido de 1.5 μm .

G. Imagen de una criosección de la retina de un embrión de la línea Arl13b-GFP fijado a los 5 dpf. Mostramos la proyección en z de la intensidad máxima en un espesor de tejido de 15 μm .

ap: apical; ba: basal; rn: retina neural; cr: cristalino; rp: retina pigmentaria; CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna. Barras de escala: A y C: 20 μm , B, D y E: 10 μm , F y G: 20 μm .



apical del neuroepitelio. En algunos casos observamos una cilia primaria localizada en el extremo de la célula que estaba en contacto con el borde apical del neuroepitelio (fig. 7A, video 1). Sin embargo, momentos antes de que el núcleo alcanzara la superficie, la cilia primaria dejó de ser visible y la célula se redondeó para entrar en mitosis. En el ejemplo que mostramos en la figura 7A, luego de la mitosis se volvió a ver una cilia en la región apical asociada a una de las células hijas.

En el caso de las CGRs en diferenciación observamos un total de 24 células en diferentes períodos. En la figura 7B y C y los videos 2 y 3 mostramos algunos ejemplos de la dinámica ciliar en células en retracción y en la figura 8 un esquema con la dinámica ciliar en cada célula observada. Luego de la última división del progenitor, las CGRs permanecen asociadas a la región apical del neuroepitelio. Posteriormente, mientras el núcleo comienza a migrar hacia la superficie basal, el proceso apical se desprende y comienza a retraer hasta alcanzar el cuerpo celular (Zolessi et al., 2006). Pudimos observar un total de 15 células desde el momento de inicio de la retracción y en 6 de ellas observamos la presencia de una cilia primaria en el extremo apical previo al inicio de la retracción. En 4 de estas células la cilia desapareció antes del desprendimiento (fig. 7B, fig. 8, video 2), mientras que en los otros 2, la cilia se observó en forma ininterrumpida (fig. 7C, video 3). En estos últimos dos casos observamos además un cambio en localización ya que la cilia primaria se movió en dirección basal antes de comenzar la retracción.

En el resto de las células que observamos desde el inicio de la retracción (9/15), la cilia reapareció en el extremo del proceso apical luego de transcurrido cierto tiempo desde el desprendimiento. Al cuantificar la posición relativa del neuroepitelio en que la cilia primaria reapareció y el tiempo que demoró en hacerlo luego del inicio de la retracción, encontramos una gran variabilidad entre células (fig. 7D y E). Sin embargo, en la mayoría de los casos esto ocurrió en la región central del neuroepitelio, y dentro de los 90 min luego del desprendimiento del borde apical.

Figura 7. Localización de la cilia primaria en progenitores y CGR en las primeras etapas de la diferenciación.

Serie de imágenes a lo largo del tiempo de la retina de embriones salvajes a los que se les trasplantaron blastómeras *atoh7:gap-RFP/Arl13b-GFP*. Mostramos proyecciones 3D de intensidad máxima.

A. División de un progenitor con expresión de RFP (indicado con un círculo blanco). La cilia se localizó en posición apical previo a la entrada en mitosis (dejó de verse en $t = 4$ h). Luego de la división celular se volvió a ver una cilia asociada a una de las células hijas.

B. CGR en diferenciación con una cilia primaria que desapareció previo al desprendimiento de la superficie del neuroepitelio. La cilia volvió a ser visible luego del inicio de la retracción.

C. CGR en diferenciación cuya cilia primaria comenzó a desplazarse hacia el soma previo al inicio de la retracción.

D. Gráfica que ilustra la posición en el eje ápico-basal del neuroepitelio en la que observamos la reaparición de la cilia primaria durante la retracción del proceso apical de las CGR. Indicamos los valores individuales (o), la mediana de los datos (línea negra) y el límite apical de la región en la que se observa la posición final del soma (línea punteada).

E. Gráfica que ilustra el tiempo transcurrido entre el desprendimiento del proceso apical y la reaparición de la cilia primaria. Mostramos los valores individuales (o) y la mediana de los datos (línea negra).

(») extremo del proceso apical; (◼) presencia y posición de la cilia primaria; (▲) inicio de la extensión del axón. Escalas: A-C: 10 μm . El tiempo está indicado en h:min.

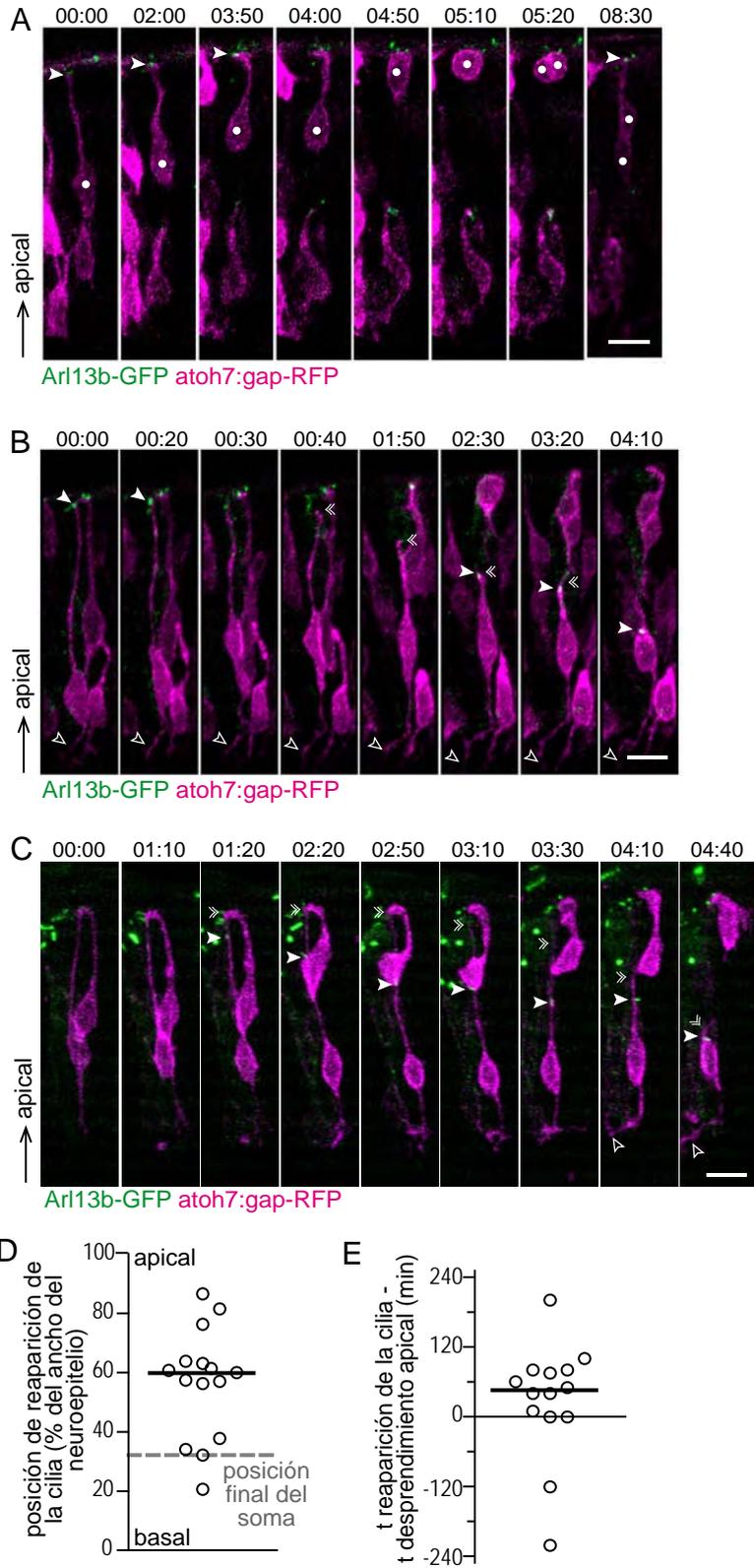


Figura 8. Esquema de la dinámica ciliar durante la diferenciación de las CGR.

En este esquema representamos a cada célula observada *in vivo* en una fila individual. En cada caso indicamos el período en que se observó la cilia primaria (verde) en relación a los eventos que ocurren durante la diferenciación de la CGR: la retracción del proceso apical (cian), inicio del crecimiento axonal (gris oscuro) e inicio de la formación de las dendritas (magenta). Las regiones rayadas diagonalmente en los esquemas indican los intervalos en que la cilia primaria se localizó en posiciones no-apicales. Las células que presentaron comportamientos similares se indican en las columnas de la derecha: (a) células en las que se observó la presencia de cilia primaria previo al inicio de la retracción del proceso apical (●: la cilia desapareció previo al desprendimiento; ○: la cilia permaneció y se movió hacia la región basal previo al desprendimiento); (b) células en las que se observó una cilia primaria en el extremo del proceso apical en retracción (■); (c) células en que observamos, aunque sea de forma intermitente, una cilia durante el inicio de la formación de las dendritas (▲) y células en las que no se observó cilia durante este período (Δ); (d) células en las que la cilia primaria ocupó posiciones no-apicales al menos durante 20 min (NA) o se mantuvo apical durante toda la diferenciación (A). Analizamos un total de 24 células provenientes de 14 embriones en 12 experimentos diferentes.

- periodo de observación
- cilia primaria
- ▨ cilia primaria en posición no apical
- retracción del proceso apical
- crecimiento del axón
- formación de las dendritas

- (a) presencia de cilia primaria previo al inicio de la retracción del proceso apical
- (b) presencia de cilia primaria durante la retracción del proceso apical
- (c) presencia de cilia primaria durante el inicio de la formación de las dendritas
- (d) localización apical vs no-apical de la cilia primaria



Durante la mayor parte del período de retracción todas las células presentaron una cilia primaria ubicada en el extremo apical (fig. 8, fig. 9A, video 2 y 4). Sin embargo, encontramos células en que la cilia primaria dejó de ser visible por cierto tiempo luego de finalizada la retracción (fig. 8, fig. 9A y C, video 4). En otras células la cilia se mantuvo presente durante este período, en algunos casos permaneciendo en posición apical, pero en otros con cambios rápidos de localización entre la región basal y apical de la célula (fig. 8, fig. 9C, video 5).

Luego de finalizada la retracción, las CGRs comienzan a extender filopodios en diferentes direcciones (fig. 9B, video 4) hasta que eventualmente algunas de estas prolongaciones se estabilizan en la región apical y comienza la formación del árbol dendrítico (Choi et al., 2010). En las células que presentaron cilia primaria en este período, ésta permaneció o se reubicó hacia la región apical de la célula, aproximadamente en el momento en que comenzaba a formarse las dendritas en la región apical (fig. 8, fig. 9C, video 5).

Estos resultados muestran que las cilia primarias están presentes en forma dinámica en progenitores y CGR en diferenciación. A continuación exploramos su función en la generación y diferenciación de este tipo celular.

Figura 9. Localización de la cilia primaria en las CGR luego de finalizada la retracción del proceso apical.

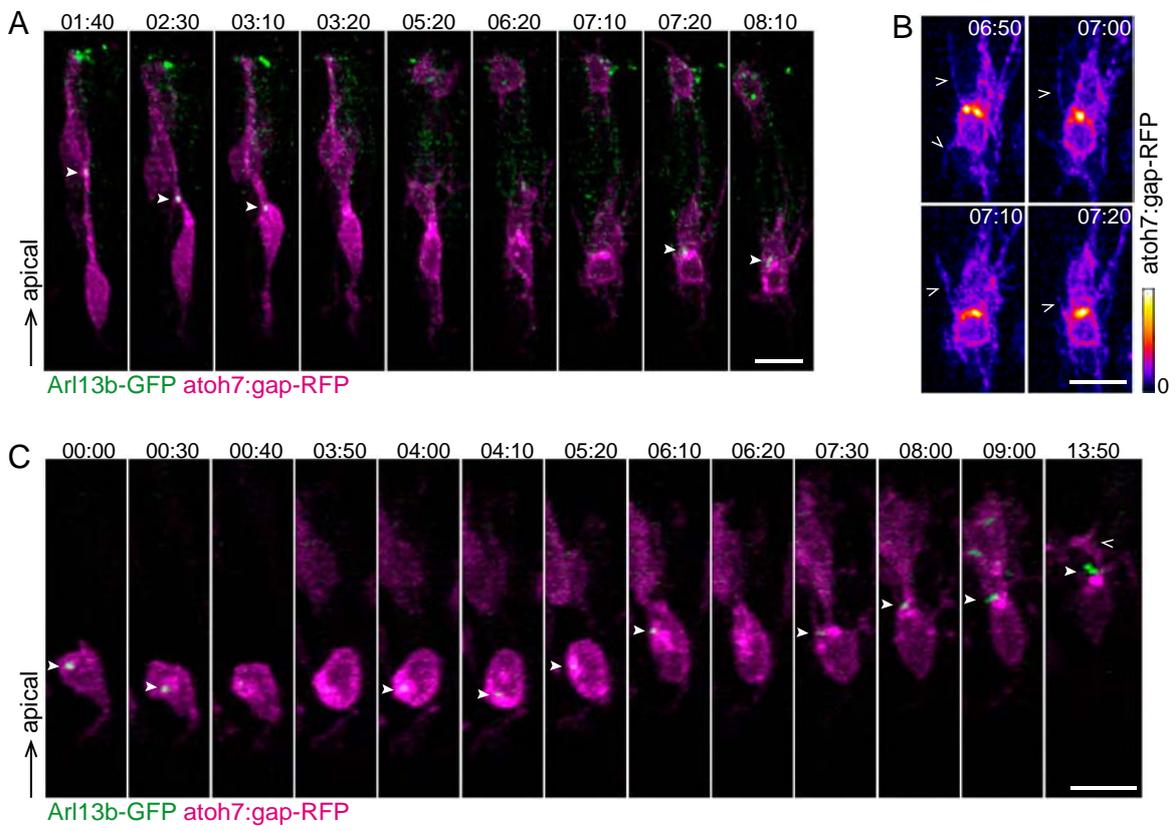
Serie de imágenes a lo largo del tiempo de la retina de embriones con células atoh7:gap-RFP/Arl13b-GFP. Las imágenes son proyecciones 3D de la intensidad máxima.

A. Imágenes de una CGR que observamos durante la finalización de la retracción del proceso apical y el inicio de la formación de las dendritas. La cilia primaria desapareció durante aproximadamente 4 h luego de finalizada la retracción.

B. Detalle de la célula que mostramos en (A) en la que se observa la extensión de filopodios (>) previo al inicio de la formación de las dendritas. De forma tal de mejorar el contraste, utilizamos una rampa de color para la señal de RFP.

C. Imágenes de una CGR en posición basal que mostró una cilia primaria altamente dinámica previo al inicio de la formación de las dendritas. Al final del período de observación la cilia se localizó en posición apical justo en la base de la dendrita en formación (>).

(▲) presencia y posición de la cilia primaria. Escalas: A-C: 10 μ m. El tiempo está indicado en h:min.



b. Función de las cilias primarias durante la generación y diferenciación de las CGR

b.i. Evaluación de métodos para inhibir la formación de las cilias primarias

Existen varias estrategias experimentales que se pueden utilizar para evaluar el rol de las cilias primarias en la diferenciación de las CGR. Optamos por dos complementarias entre sí: 1) disminuir la expresión de proteínas requeridas para su formación por medio del uso de oligómeros de morfolino y 2) la expresión de proteínas mutadas que funcionan como dominantes negativos inhibiendo el proceso de formación de la cilia.

Morfolinos

En relación a la primera estrategia, decidimos inhibir la expresión de las proteínas Ift88 y Elipsa, ambas relacionadas al transporte intraflagelar anterógrado. Ift88 está compuesta por dominios TRP que permiten su interacción con otras proteínas, mientras que Elipsa media la interacción entre la partícula de IFT y la GTPasa Rab8 de membrana (Omori et al., 2008; Taschner y Lorentzen, 2016). En ambos casos existen líneas de peces (denominadas *oval* y *elipsa* respectivamente) que presentan mutaciones en los genes codificantes para estas proteínas y que han sido caracterizadas previamente (Tsujikawa y Malicki, 2004; Omori et al., 2008). Los embriones de estas líneas presentan curvatura ventral del cuerpo, hidrocefalia, quistes renales y problemas en la formación de los otolitos, defectos que denominaremos en conjunto “fenotipo ciliar” (Tsujikawa y Malicki, 2004; Omori et al., 2008). Utilizamos estas características para evaluar la eficiencia de diferentes oligómeros de morfolino en lograr la inhibición de la formación de cilias primarias. Comenzamos el trabajo probando dos morfolinos que ya habían sido utilizados en otros trabajos, *ift88*-BT y *elipsa*-BT (inhiben la traducción a partir de ARNm tanto maternos como cigóticos) (Tsujikawa y Malicki, 2004; Omori et al., 2008). Inyectamos embriones salvajes de la línea SAT con diferentes cantidades de cada morfolino y los analizamos a las 48 hpf. La inyección de 3 ng del morfolino *ift88*-BT generó embriones con curvatura ventral leve e hidrocefalia (fig. 10A). Al aumentar la cantidad de morfolino a 4 ng observamos mayor mortalidad de los embriones durante las primeras 48 hpf, mientras que los sobrevivientes mostraron alteraciones morfológicas que no corresponden al fenotipo ciliar. Estas alteraciones pueden deberse

a efectos no específicos del morfolino, generados por la activación de la vía de muerte celular por p53, que por lo tanto pueden inhibirse con la co-inyección de morfolino para p53 (Robu et al., 2007). Sin embargo, la co-inyección de *ift88*-BT con morfolino para p53 no generó un aumento en la sobrevivencia o cambios significativos en el fenotipo. Ya que con este morfolino obtuvimos embriones con fenotipos no deseados, pasamos a evaluar el morfolino *elipsa*-BT. Los embriones inyectados con *elipsa*-BT, incluso en cantidades elevadas, sólo presentaron curvatura ventral moderada, sugiriendo que este morfolino fue poco eficiente (fig. 10B). El fenotipo externo obtenido luego de la inyección de *elipsa*-BT o *ift88*-BT fue diferente del reportado previamente para estos morfolinos y para los mutantes de proteínas ciliares (Tsujikawa y Malicki, 2004; Omori et al., 2008). Creemos que esta discrepancia se puede deber a diferencias en el contexto genético de las líneas de peces.

Para mejorar la eficacia del bloqueo decidimos generar morfolinos para bloquear el procesamiento del ARNm codificante para las mismas proteínas ciliares, a los que denominamos *ift88*-BS y *elipsa*-BS. Al inhibir el procesamiento del ARNm, estos morfolinos afectan únicamente a los ARNm cigóticos, evitando la disminución de la expresión de estas proteínas y sus efectos en etapas tempranas del desarrollo. Los embriones inyectados con estos morfolinos en dosis intermedias presentaron algunas de las características del fenotipo ciliar, curvatura ventral e hidrocefalia, aunque en forma leve (fig. 10C). Con el objetivo de generar fenotipos más marcados, probamos la inyección combinada de *ift88*-BS y *elipsa*-BS. Al inyectar embriones con diferentes cantidades de *ift88*-BS y *elipsa*-BS, encontramos que utilizando 6 ng de cada morfolino por embrión, a las 48 hpf la mayor parte de los embriones que sobrevivieron (80%) presentaron curvatura ventral marcada junto con hidrocefalia o defectos en la formación de la vesícula óptica (fig. 10D y E).

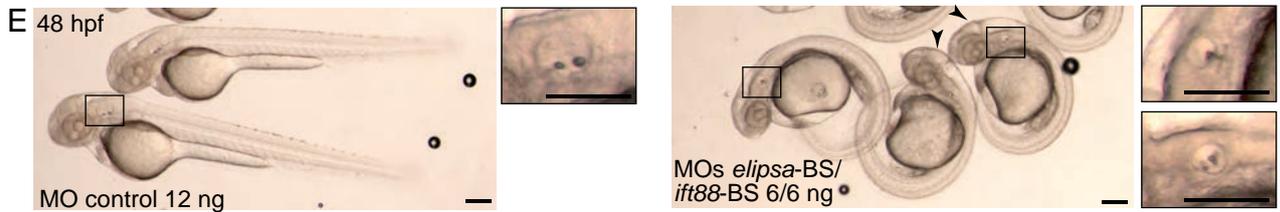
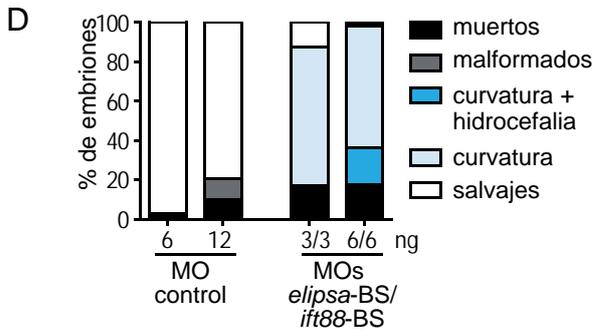
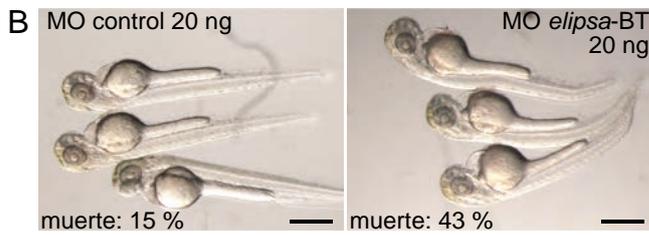
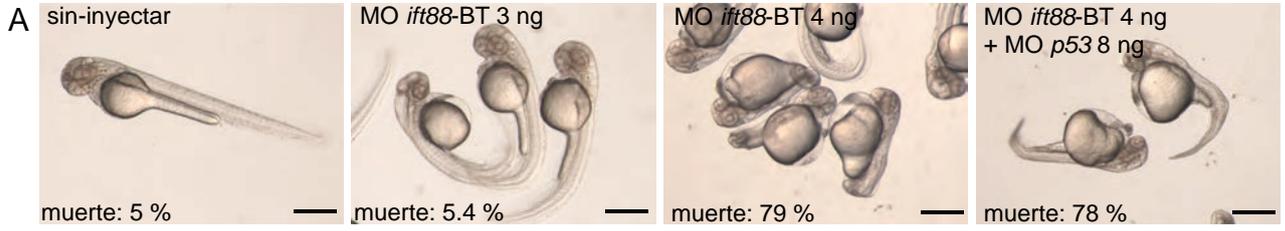
Dado que logramos obtener un fenotipo externo marcado y reproducible evaluamos la eficiencia de esta combinación de morfolinos en bloquear el procesamiento del ARNm codificante para Elipsa e Ift88. Para ello realizamos la extracción del ARN total de embriones de 35 hpf ya sea sin inyectar o inyectados con cada morfolino por separado o en combinación. Luego realizamos la retro-transcripción con cebadores aleatorios y una PCR con cebadores específicos para detectar la variante

Figura 10. Evaluación del fenotipo generado por la inyección de diferentes oligómeros de morfolino.

A-C. Imágenes del fenotipo externo de embriones de 48 hpf inyectados con diferentes cantidades de morfolinós destinados a inhibir la expresión de las proteínas ciliares Elipsa e Ift88: morfolinós traduccionales *ift88*-BT (A) y *elipsa*-BT (B); morfolinós para bloquear el procesamiento del pre-ARNm *ift88*-BS y *elipsa*-BS (C). En cada caso indicamos el porcentaje de embriones muertos a partir de las 8 hpf.

D. Gráfica comparando el porcentaje de embriones inyectados con diferentes cantidades de la combinación *ift88*-BS/*elipsa*-BS o morfolino control, que a las 48 hpf presentaron una morfología externa similar a los embriones salvajes, un fenotipo ciliar (curvatura, curvatura + hidrocefalia), malformaciones (“malformados” hace referencia a alteraciones morfológicas que no corresponden al fenotipo ciliar típico) o que murieron luego de las 8 hpf.

E. Principales características morfológicas de los embriones inyectados con *ift88*-BS/*elipsa*-BS en la dosis utilizada en el resto del trabajo (6 ng de cada uno). Los recuadros indican la vesícula ótica, magnificada a la derecha. Las cabezas de flecha negras (▲) indican embriones con ventrículos cerebrales agrandados (hidrocefalia). Escalas: A-C: 500 μm; E: 200 μm.



procesada del ARNm y la variante sin procesar causada por el bloqueo de cada morfolino (ver Materiales y Métodos). Tanto los morfolinicos en forma individual como cuando se usaron en combinación generaron un aumento de la variante del mensajero sin procesar, así como una disminución de la variante procesada (fig. 11A). Estos resultados muestran que los morfolinicos *elipsa*-BS y *ift88*-BS inhiben el correcto procesamiento de al menos una fracción de los pre-ARNm endógenos codificantes para Elipsa e Ift88. Sin embargo, puede ser que el fenotipo observado en los embriones se deba a efectos inespecíficos. Para evaluar esta posibilidad, realizamos un ensayo de rescate inyectando los ARNm codificantes para Elipsa e Ift88 generados por transcripción *in vitro*. Los morfolinicos BS están diseñados para unirse al sitio donador de *splicing* en el pre-ARNm, por lo tanto no son capaces de unirse al ARNm generado *in vitro* que carece de intrones. Inyectamos embriones salvajes con morfolino control o *elipsa*-BS/*ift88*-BS y diferentes cantidades de ARNm codificante para Elipsa e Ift88, y analizamos el fenotipo externo de los embriones a las 48 hpf. Observamos embriones con diferentes morfologías, por lo que los clasificamos en cuatro categorías: salvajes (sin fenotipo ciliar visible), con curvatura leve (con un poco de curvatura ventral del eje corporal), con curvatura e hidrocefalia (la curvatura ventral es más pronunciada y presentan hidrocefalia) y malformados (embriones con defectos en desarrollo no compatibles con el fenotipo ciliar) (fig. 11B). La mayoría de los embriones inyectados únicamente con ARNm o en combinación con morfolino control lucían como embriones salvajes. Sin embargo, observamos entre un 10 % y 30 % de embriones malformados cuando se inyecta 100 pg o más de cada ARNm (fig. 11B). Aproximadamente el 90% de los embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS presentaron curvatura e hidrocefalia. Al combinar la inyección de estos morfolinicos con 50 y 75 pg de ARNm observamos una disminución de la proporción de embriones con curvatura e hidrocefalia y un aumento de la proporción de embriones con curvatura leve o del tipo salvaje. Sin embargo, al inyectar 100 pg o más de ARNm observamos un aumento de la proporción de embriones malformados y muertos, indicando un efecto tóxico de la co-inyección de morfolinicos y ARNm a estas dosis (fig. 11B).

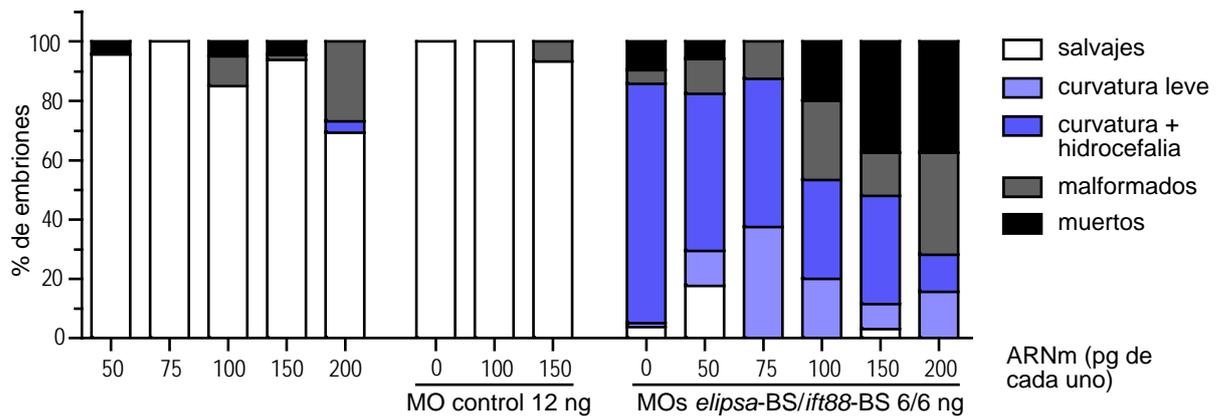
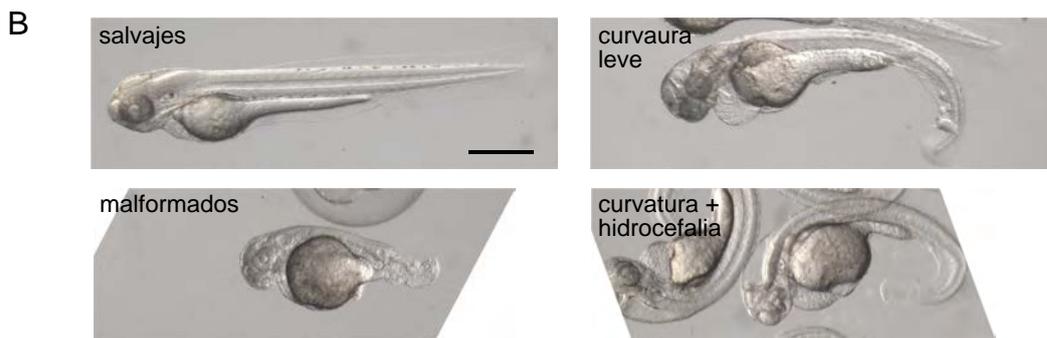
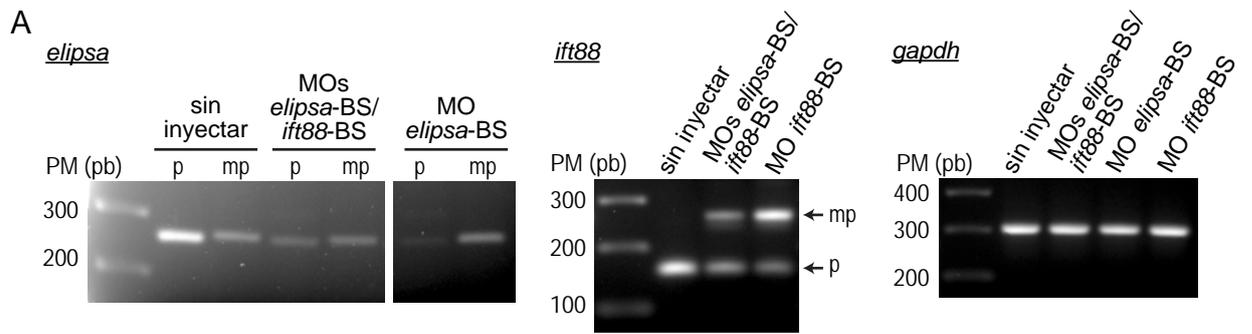
Finalmente, analizamos la presencia y largo de las cilias primarias en algunos de los órganos de embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS. Entre los estadios de 6 y 15 somites se forma la vesícula de Kupffer, un órgano transitorio, involucrado en el

Figura 11. Evaluación de la especificidad de los morfolinios *ift88*-BS y *elipsa*-BS.

A. Comparación de los niveles de ARNm de *elipsa* e *ift88* en embriones de 35 hpf sin inyectar o inyectados con *ift88*-BS (6 ng), *elipsa*-BS (6 ng) o *elipsa*-BS/*ift88*-BS (6/6 ng) (“p”: forma procesada del ARNm; “mp”: forma del ARNm mal procesada por la acción del morfolino). Como control, evaluamos los niveles del ARNm de *gapdh*.

B. Resultados del ensayo de rescate del fenotipo externo generado por la inyección de *elipsa*-BS/*ift88*-BS por medio de la co-inyección de ARNm codificante para Elipsa e Ift88. Las imágenes son ejemplos del fenotipo externo de los embriones clasificados como: salvajes, con curvatura leve, con curvatura e hidrocefalia y malformados. En la gráfica se representa la proporción de cada una de estas categorías y la de embriones muertos en cada condición.

Escala: 500 μ m.



establecimiento de la asimetría izquierda-derecha. Las células de la vesícula de Kupffer cuentan con cilias primarias de aproximadamente 3-4 μm espaciadas regularmente, lo cual facilita la cuantificación de su largo y número (Jaffe et al., 2010). En embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS observamos una disminución significativa en el largo de las cilias primarias de la vesícula de Kupffer con respecto a embriones inyectados con morfolino control. Sin embargo, no observamos cambios significativos en el número total de cilias por vesícula (fig. 12A).

En embriones de 48 hpf se pueden encontrar otros órganos ciliados, tales como el tubo neural, la vesícula ótica, pronefros y la fosita olfatoria. Las células de estos órganos presentan cilias pequeñas (de aproximadamente 1 μm) distribuidas densamente, lo cual, si bien impide el análisis de cilias individuales, permite evaluar cualitativamente el estado de ciliación. En estos tejidos pudimos observar un menor número de cilias primarias, más cortas y desorganizadas en embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS con respecto a los controles (fig. 12B).

Los experimentos anteriores indican que la combinación de morfolinós *elipsa*-BS/*ift88*-BS inhibe la formación de las cilias primarias en forma específica y reproducible, lo cual avala su uso como herramienta para determinar la función de las cilias en la neurogénesis de las CGR. Una vez determinada la especificidad de los morfolinós, realizamos un ensayo piloto para evaluar su efectividad a nivel de retina. Para esto inyectamos embriones de la línea *atoh7:gap-GFP* con diferentes cantidades de *elipsa*-BS/*ift88*-BS y los analizamos en la lupa a las 48 hpf. En algunos de los casos encontramos embriones con menor fluorescencia de GFP en la retina (fig. 12C). A éstos los clasificamos como embriones con fenotipo en la retina. Con la inyección de 6 ng de cada morfolino o cantidades mayores, aproximadamente la mitad de los embriones presentaron disminución de la fluorescencia en la retina (fig. 12D). Al utilizar cantidades mayores de los morfolinós aumentó la proporción de embriones muertos. Basándonos en éste y los resultados anteriores decidimos seguir trabajando con 6 ng de cada morfolino ya que fue la dosis mínima que generó la mayor proporción de embriones con fenotipo en la retina.

Figura 12. Efecto de la inyección de *elipsa-BS/ift88-BS* sobre las cilias de diferentes órganos del embrión.

Comparamos la presencia y el largo de las cilias de diferentes órganos en embriones de la línea SAT inyectados con morfolino control o *elipsa-BS/ift88-BS*.

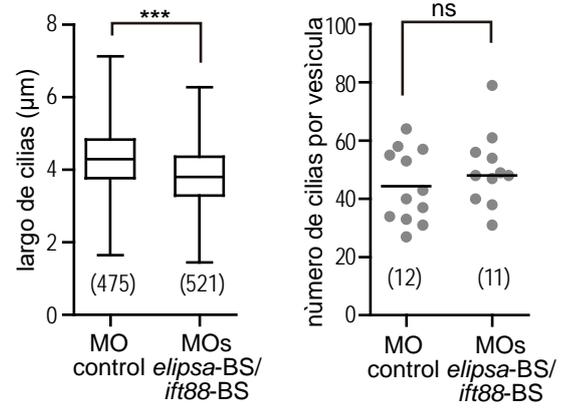
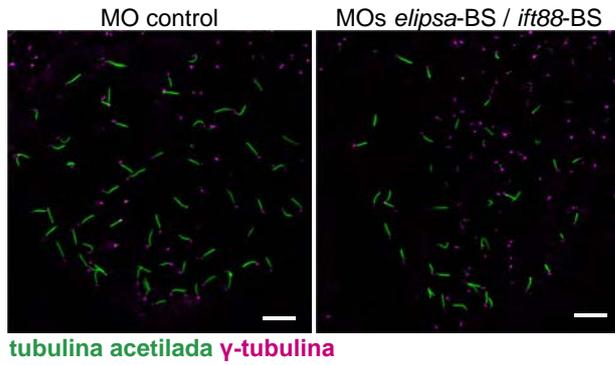
A. Proyecciones en z de máxima intensidad de vesículas de Kupffer en embriones de 8 somites (aproximadamente 12 hpf). Los cuerpos basales fueron marcados con un anticuerpo anti- γ tubulina y las cilias primarias con un anticuerpo anti-tubulina acetilada. A la derecha mostramos gráficas con la comparación del largo de las cilias primarias y el número de cilias por vesícula en ambas condiciones. Entre paréntesis indicamos el número de cilias (izquierda) o embriones (derecha) analizados respectivamente.

B. Imágenes de microscopía confocal de diferentes órganos ciliados en embriones de 48 hpf. Las cilias primarias fueron marcadas con un anticuerpo anti-tubulina acetilada y la F-actina con faloidina-TRITC.

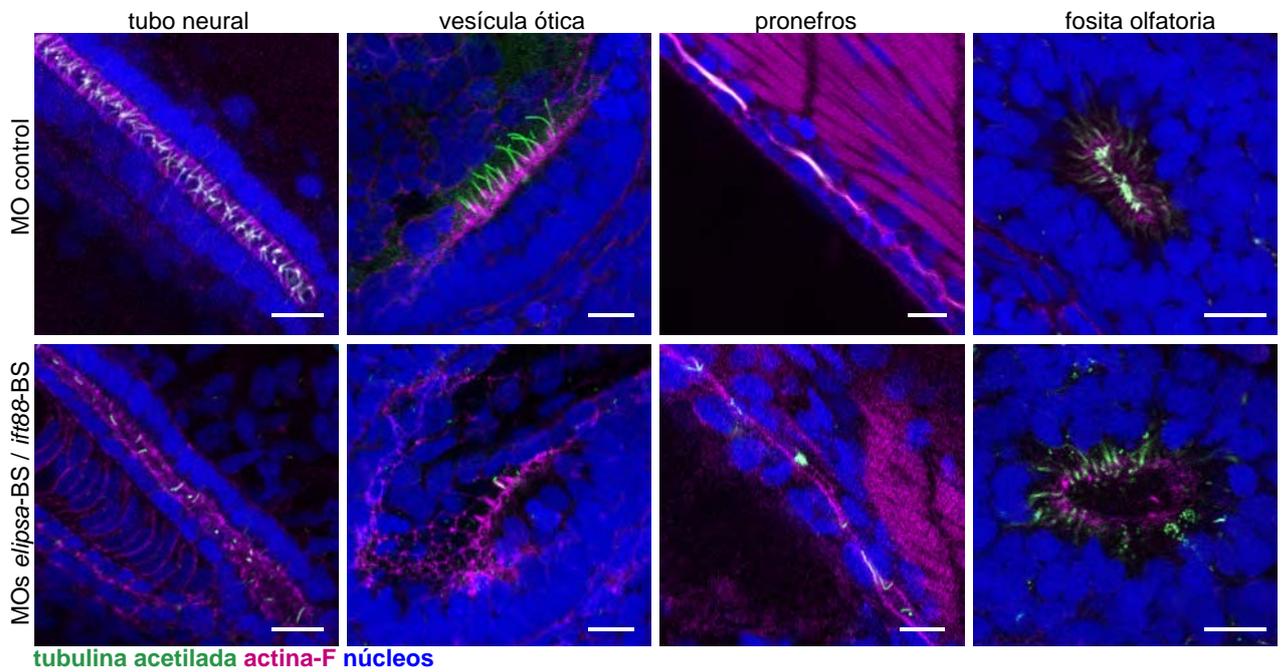
C. Imágenes con ejemplos de embriones *atoh7:gap-GFP* clasificados como con o sin fenotipo en la retina basándonos en la extensión de la fluorescencia del GFP.

D. Cuantificación del porcentaje de embriones *atoh7:gap-GFP* inyectados con diferentes cantidades de morfolino control o *ift88-BS/elipsa-BS* y que muestran reducción de la fluorescencia en la retina a las 48 hpf (“con fenotipo en la retina”). La comparación del largo ciliar la realizamos utilizando el test de Mann Whitney; (***) $p < 0.001$; la comparación del número de cilias por vesícula la realizamos utilizando el test *t* de Student; ns: diferencia no significativa. Escalas: A y B: 10 μm ; C: 200 μm .

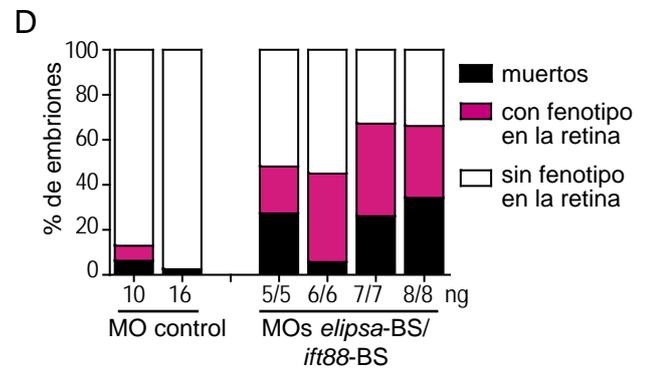
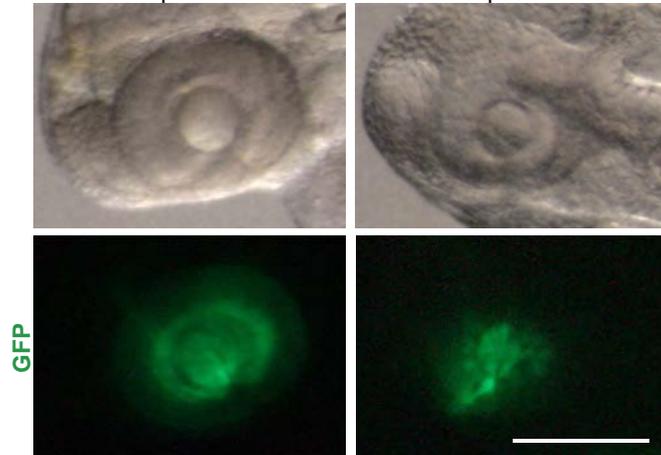
A vesícula de Kupffer - 8 somites



B 48 hpf



C sin fenotipo en la retina con fenotipo en la retina



Expresión de proteínas dominantes negativas.

Al utilizar morfolinos no se puede controlar espacial ni temporalmente su acción. Por lo tanto, para llevar a cabo la inhibición de las cilias primarias en células específicas y estadios particulares del desarrollo, decidimos utilizar la expresión de proteínas mutadas que funcionen como dominantes negativos. En trabajos previos otros autores han utilizado dominantes negativos de las proteínas Arl13b y Rab8a, ambas GTPasas pequeñas requeridas para la formación de las cilias primarias. Rab8a participa en el tráfico de vesículas hacia la base de la cilia (Keeling et al., 2016). Normalmente, se encuentra localizada en el axonema. Sin embargo, la mutación de una treonina en la posición 22 ([T22N]), genera una variante de la proteína que permanece unida a GDP y es incapaz de entrar a la cilia (Nachury et al., 2007). La expresión de Rab8a[T22N] en embriones de zebrafish genera embriones con vesícula de Kupffer más pequeñas (Nachury et al., 2007). Arl13b se localiza en la membrana de las cilias primarias y participa en la localización de proteínas hacia este compartimento (Duldulao et al., 2009; Gotthardt et al., 2015). La expresión del dominio N terminal (entre los aminoácidos 1 y 190) inhibe la formación de las cilias primarias en células en cultivo (Hori et al., 2008).

Con el fin de determinar si estas proteínas mutadas mantienen su función de dominante negativo en embriones de pez cebra, decidimos inyectar ARNm de forma tal de lograr su expresión en todo el embrión. Para ello generamos vectores con el promotor viral SP6 que permiten la transcripción *in vitro* del gen de interés. En la misma construcción, en posición 3' de la secuencia codificante para la proteína a expresar, incluimos la secuencia necesaria para co-expresar EGFP-CAAX a partir del mismo sitio de inicio de la traducción (por más detalles sobre estas construcciones ver Materiales y Métodos). Inyectamos el ARNm en el vitelo de embriones salvajes de la línea SAT en el estadio de una a cuatro células, y evaluamos la presencia y largo de las cilias en la vesícula de Kupffer en el estadio de 8 somites (12 hpf). Las vesículas de Kupffer de embriones inyectados con el ARNm codificante para Arl13b(1-190) y EGFP-CAAX presentaron fluorescencia para EGFP, indicando la expresión de Arl13b(1-190) (fig. 13A). En estas vesículas cuantificamos el número y largo de las cilias primarias. Encontramos que la expresión de Arl13b(1-190) disminuyó en forma significativa el largo de las cilias

primarias respecto al control (fig. 13B). Sin embargo, los embriones de 48 hpf inyectados con 200 o 300 pg de ARNm, mostraron una morfología similar a los embriones salvajes, sugiriendo que el nivel de afectación de las cilias en distintos tejidos y órganos fue menor al alcanzado con el uso de morfolinós (fig. 13C).

Para testear la eficiencia de Rab8a[T22N] en inhibir la formación de las cilias, inyectamos ADN plasmídico conteniendo distintas construcciones que permitieron expresar tanto el gen mutado (Rab8a[T22N]) como el gen intacto (Rab8a), de manera aislada o en conjunto con la expresión de un gen reportero (EGFP-CAAX). Como control general, inyectamos un plásmido conteniendo solamente el gen reportero (EGFP-CAAX). En aquellos casos en que inyectamos las construcciones para co-expresar EGFP, pudimos observar fluorescencia, lo cual indica la expresión de la primera proteína (fig. 13D). En embriones que expresaban Rab8a[T22N] junto con EGFP-CAAX, el largo de las cilias en las vesículas de Kupffer fue similar al de embriones control expresando EGFP-CAAX, Rab8a[T22N], o Rab8a co-expresado con EGFP-CAAX (fig. 13E). Además, a las 48 hpf, no encontramos diferencias en la morfología entre los embriones inyectados con el ARNm de Rab8[T22N] y los no inyectados.

En resumen, la expresión de Arl13b(1-190) generó la disminución del largo de las cilias de la vesícula de Kupffer, mientras que la expresión de Rab8a[T22N] no afectó el largo ciliar. Sin embargo, en ninguno de los dos casos observamos embriones con fenotipo ciliar a las 48 hpf. Los resultados indican que estas construcciones no fueron efectivas en nuestras condiciones experimentales. Por lo tanto, decidimos continuar el trabajo utilizando la combinación de morfolinós *elipsa-BS/ift88-BS*.

Figura 13. *Expresión de proteínas dominantes negativas y su evaluación como herramienta para inhibir la formación de las cilias primarias.*

A. Imágenes de vesículas de Kupffer de embriones inyectados con ARNm codificante para Arl13b(1-190) junto con EGFP-CAAX o EGFP-CAAX únicamente.

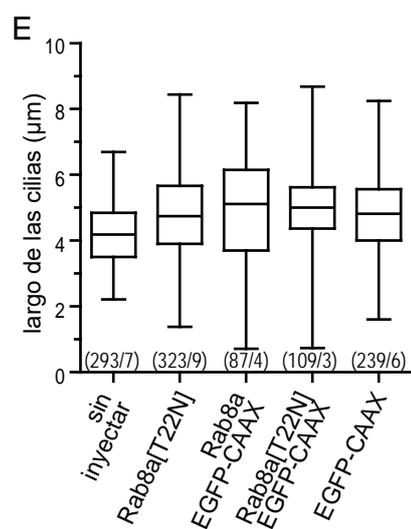
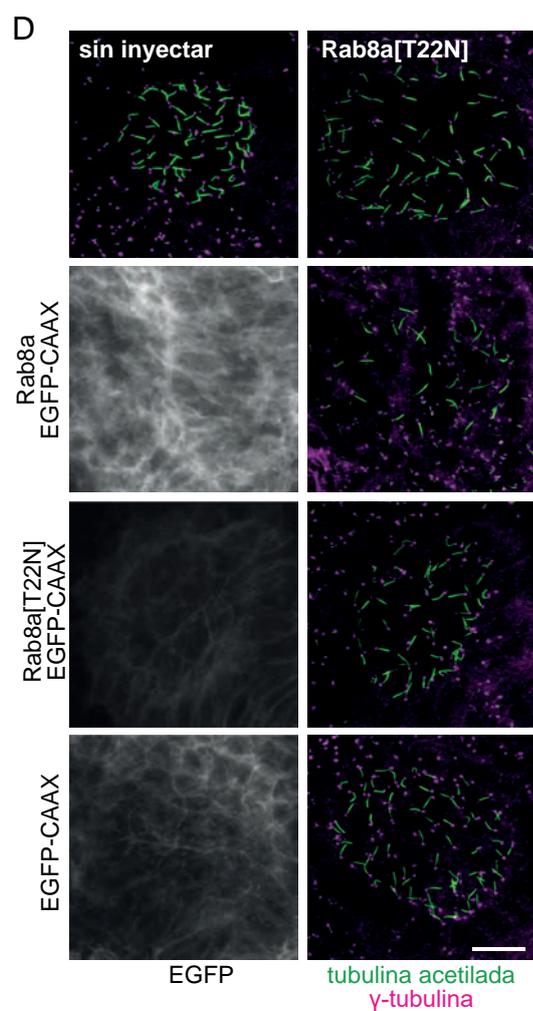
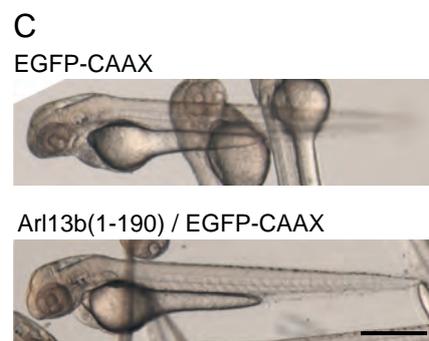
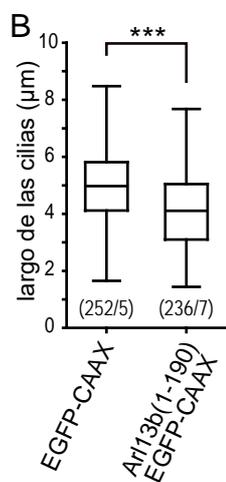
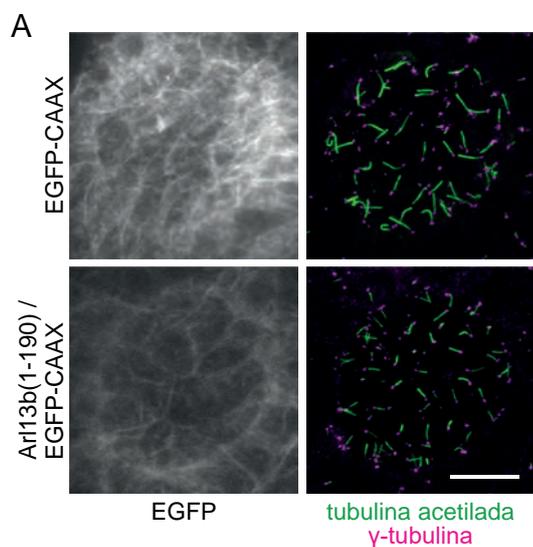
B. Gráfica con la comparación del largo ciliar en las condiciones mencionadas en A.

C. Imágenes de embriones de las condiciones mencionadas anteriormente en el estadio de 48 hpf.

D. Imágenes de vesículas de Kupffer de embriones inyectados con el ARNm codificante para Rab8a[T22N], Rab8a junto con EGFP-CAAX, Rab8a[T22N] junto con EGFP-CAAX o EGFP-CAAX.

E. Gráfica con la comparación del largo ciliar en las diferentes condiciones mencionadas en D. No encontramos diferencias significativas entre ninguna de las condiciones.

Mostramos el canal de GFP como la proyección en z de la intensidad promedio, mientras que utilizamos una proyección en z de la intensidad máxima para la señal de tubulina acetilada y γ -tubulina. El número entre paréntesis representa el número de cilias y vesículas analizadas. (***) $p < 0.001$ en test de Mann Whitney. Escalas: A y D: 20 μm ; C: 500 μm .



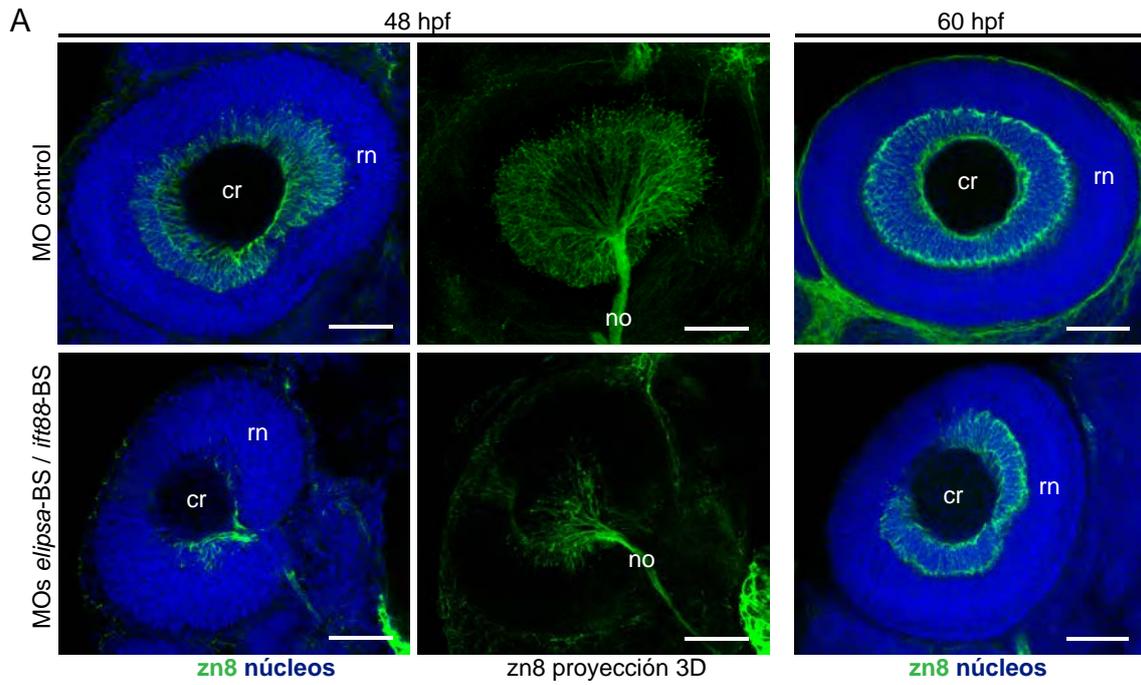
b.ii. Efecto de la inhibición de la formación de las cilias primarias sobre el proceso de neurogénesis en la retina.

Con el fin de determinar cuál es el efecto de inhibir la formación de las cilias primarias en la generación y diferenciación de las CGR, inyectamos embriones salvajes (de la línea SAT) con morfolino control o la combinación de morfolinios *elipsa-BS/ift88-BS* y analizamos la retina en embriones fijados a las 48 y 60 hpf. Para poner en evidencia la capa de CGR marcamos los embriones con el anticuerpo zn8 que reconoce a la proteína DM-Grasp, presente en la superficie de estas células (Laessing y Stuermer, 1996). En embriones de 48 hpf inyectados con morfolino control, observamos que la capa de CGR se extendía sobre toda la superficie basal de la retina (fig. 14A). Mientras tanto, en ese estadio los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* presentaron retinas más pequeñas, con la capa de CGR menos extendida, y el nervio óptico más delgado, lo cual indicaría un menor número de células. Para cuantificar estas observaciones, determinamos el volumen total de la retina y el volumen de la capa de CGR a partir de las imágenes de microscopía confocal utilizando el programa Fiji (ver Materiales y Métodos). Encontramos que el volumen de la retina en embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* fue 38.4 % más pequeño que en embriones control (media de dos experimentos independientes: 34.6 % y 42.1 %; fig. 14B). Mientras tanto el volumen de la capa de CGR fue 95.4 % menor que en controles (media de dos experimentos independientes: 93.7 % y 97.1 %; fig. 14C). A las 60 hpf, las retinas de los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* también presentaron un tamaño reducido respecto a los controles, sin embargo en ambos casos observamos que la capa de CGR se extendía por toda la retina (fig. 14A). Al cuantificar encontramos que en este estadio el volumen de la retina neural era 26.8 % menor en embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* que en los controles (media de dos experimentos independientes: 18.7 % y 35 %; fig. 14D), mientras que el volumen de la capa de CGR era 40.4 % más pequeña (media de dos experimentos independientes: 32.6 % y 48.1 %; fig. 14E). En suma, los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* presentaron menor volumen general de la retina y de la capa de CGR que los embriones control. A las 60 hpf la capa de CGR se formó independientemente del tratamiento, sugiriendo que la reducción del volumen de la capa de CGR se pudo deber a una disminución o demora en la generación de células post-mitóticas.

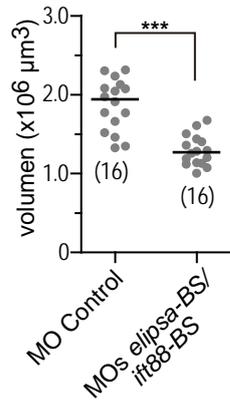
Figura 14. Efecto de la inhibición de la formación de las cilias primarias en la retina.

A. Imágenes de microscopía confocal de retinas de embriones de 48 y 60 hpf inyectados con morfolino control o con *elipsa*-BS/*ift88*-BS. Para marcar las CGR utilizamos el anticuerpo zn8.

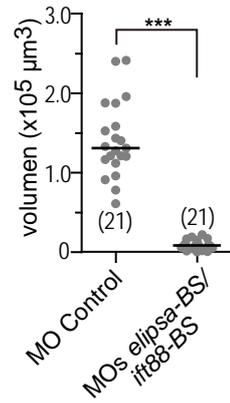
B-E. Comparación del volumen de la retina y de la capa de CGR (volumen marcado con el anticuerpo zn8) en las diferentes situaciones. Realizamos dos experimentos independientes con resultados similares; mostramos los resultados de uno de ellos. cr: cristalino, rn: retina neural, no: nervio óptico. El número entre paréntesis representa el número de embriones analizados (cuantificamos una retina por embrión). Realizamos la comparación de los datos utilizando la transformación a rangos y el test *t* de Student; (***) $p < 0.001$. Escala: 50 μm .



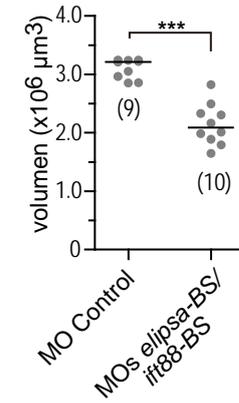
B 48 hpf - volumen retina



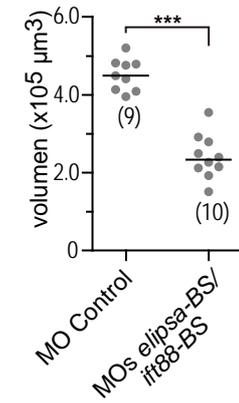
C 48 hpf - volumen zn8



D 60 hpf - volumen retina



E 60 hpf - volumen zn8



El tratamiento con morfolinós afecta a todo el embrión, por lo tanto es posible que la inhibición de la formación de las cilias en el resto de las células del entorno afecte indirectamente la formación de las CGR. Para evaluar esta posibilidad, realizamos experimentos de trasplante de blastómeras de manera de poder determinar si el efecto observado se debía al déficit en la formación de las cilias en las células afectadas (efecto autónomo de la célula) o en las células del entorno (efecto no autónomo de la célula). En primer lugar, inyectamos embriones de la línea *atoh7:gap-RFP* con los morfolinós *elipsa-BS/ift88-BS* o con morfolino control y los utilizamos como donantes de blastómeras, mientras que embriones sin inyectar de la línea *atoh7:gap-GFP* sirvieron de receptores del trasplante. Analizamos los embriones resultantes del trasplante por medio de microscopía confocal *in vivo*. Al trasplantar blastómeras *atoh7:gap-RFP* con morfolino control encontramos que todos los embriones presentaron células del donante y que las células trasplantadas se integraron al mismo tiempo que las células del receptor en la capa de ganglionares (5 embriones de un total de 5 analizados; fig. 15A, video 6 y 7). Sin embargo, al trasplantar blastómeras *atoh7:gap-RFP* con *elipsa-BS/ift88-BS* 6/6 ng, solo 2 embriones de un total de 34 analizados mostraron células del donante a 32 o 48 hpf. Al disminuir la cantidad de *elipsa-BS/ift88-BS* a 5/5 ng pudimos encontrar un mayor número de embriones con células con RFP a las 32 hpf (6 embriones de 17 totales). Analizamos 5 de estos embriones por microscopía confocal *in vivo*, en los que encontramos clones pequeños de células con RFP. En tres de estos embriones las células con RFP se incorporaron al mismo tiempo que las células del receptor a la capa de CGR. Sin embargo, en dos embriones encontramos además células con alta expresión de RFP que permanecieron por fuera de la capa de CGR durante el período de observación (fig. 15B, video 8).

Realizamos también el experimento complementario en el que trasplantamos células de embriones *atoh7:gap-GFP* sin inyectar a embriones *atoh7:gap-RFP* inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* 6/6 ng. En los embriones resultantes encontramos dos situaciones: de 7 embriones analizados 4 presentaron retinas con clones pequeños de células GFP positivas, mientras que 3 presentaron retinas con un gran número de células GFP positivas. En el primer caso observamos que las células con GFP se generaron y diferenciaron normalmente, en general más rápido que las células del receptor (fig. 15C,

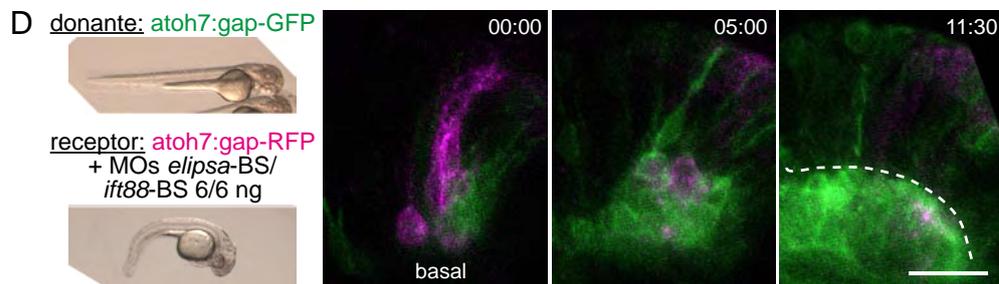
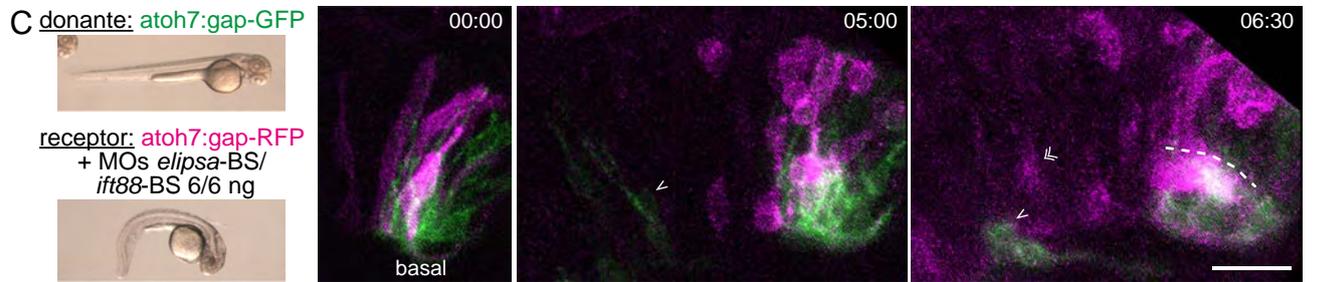
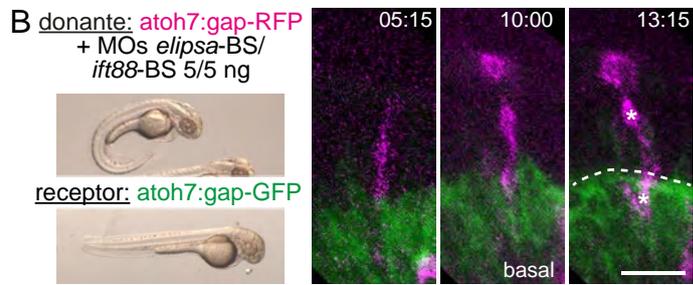
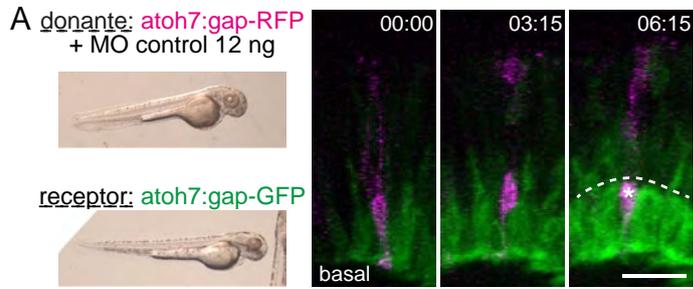
Figura 15. Análisis de la contribución del entorno en el fenotipo observado al inhibir la formación de las ciliias primarias.

Analizamos los embriones resultantes de los trasplantes de blastómeras utilizando microscopía confocal *in vivo*. Mostramos secuencias de imágenes de la retina a lo largo del tiempo, así como la morfología general de los embriones utilizados como donantes y receptores a las 48 hpf.

A-B. Trasplante de blastómeras de embriones *atoh7:gap-RFP* inyectados con morfolino control o la combinación *elipsa-BS/ift88-BS* a receptores *atoh7:gap-GFP* sin inyectar. Los asteriscos indica la ubicación de las células del donante. La línea punteada indica el límite apical de la capa de CGR del receptor.

C-D. Trasplante de blastómeras de embriones *atoh7:gap-GFP* sin inyectar a embriones *atoh7:gap-RFP* inyectados con la combinación *elipsa-BS/ift88-BS*. Mostramos imágenes de retinas con un clon pequeño (C) o grande (D) de células con expresión de GFP. (>) indica el células del donante y (») indica células del receptor. La línea punteada indica el límite apical de la capa de CGR.

Escalas: A-D: 20 μ m. El tiempo está indicado en h:min.



video 9). En los casos en que encontramos un gran número de células con GFP, éstas sobrepasaron en número a las células del receptor y formaron una capa CGR casi sin contribución de células con RFP (fig. 15D, video 10).

Esta última observación sugiere que las células de embriones sin inyectar proliferan más que las células de embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*. Esto podría explicar la disminución general del volumen de la retina que caracteriza a nuestros morfantes (figura 14). Alternativamente, la disminución del volumen podría ser el resultado del aumento en la muerte celular. Para evaluar ambas posibilidades, fijamos embriones inyectados con morfolino control o *elipsa-BS/ift88-BS* en diferentes estadios y marcamos las células mitóticas y apoptóticas utilizando anticuerpos anti-pHistona H3 o anti-caspasa 3 activada respectivamente. Los estadios que analizamos fueron: 24 hpf, previo al inicio de la neurogénesis; 36 hpf, luego de iniciada la neurogénesis; 48 hpf, las diferentes células en la región central de la retina se han generado y se encuentran en diferenciación. En el caso de los embriones marcados con anti-pHistona H3, determinamos el índice mitótico contando el número de células mitóticas por unidad de volumen en la región ventro-nasal de la retina (fig. 16A, B). Observamos una disminución del índice mitótico en embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* con respecto a los controles, únicamente a las 36 hpf. En el caso de los embriones marcados con anti-caspasa 3 activada, contamos el número de células positivas en cada retina. Los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* presentaron un aumento del número de células apoptóticas a las 48 hpf, pero no en etapas previas.

Estos resultados sugieren que la inhibición de la formación de la cilia primaria disminuye la proliferación de los progenitores, por lo que es probable que esto repercuta en la generación de los diferentes tipos celulares además de las CGR. Para evaluar esta hipótesis utilizamos la línea SoFa1, que permite individualizar cada tipo neuronal en la retina mediante la expresión de diferentes proteínas fluorescentes bajo el control de promotores específicos: *atoh7:gap-RFP* (RGCs, células amácrinas, fotorreceptores), *ptf1:citGFP* (células amácrinas y horizontales), *crx:gap-CFP* (fotorreceptores, células bipolares). Las principales características de esta línea se describieron en la sección de Materiales y Métodos.

Figura 16. Evaluación del índice mitótico y muerte celular en la retina cuando se inhibe la formación de las cilias primarias.

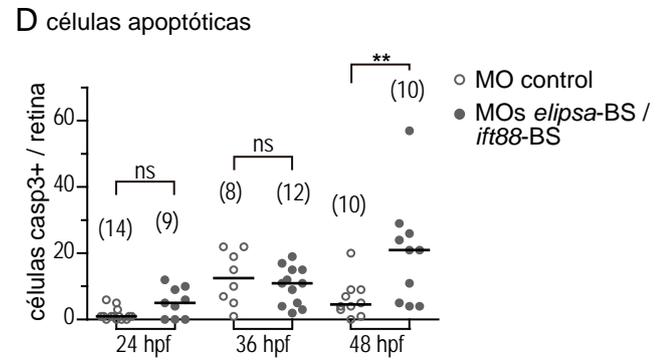
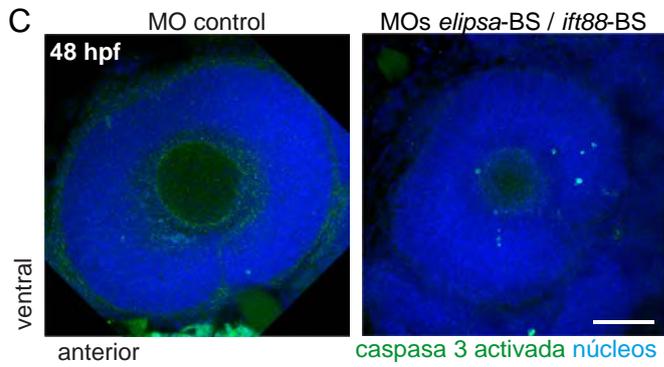
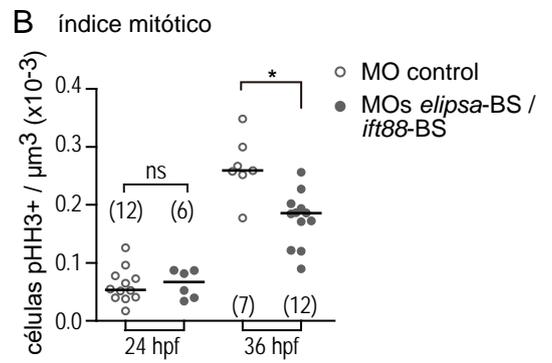
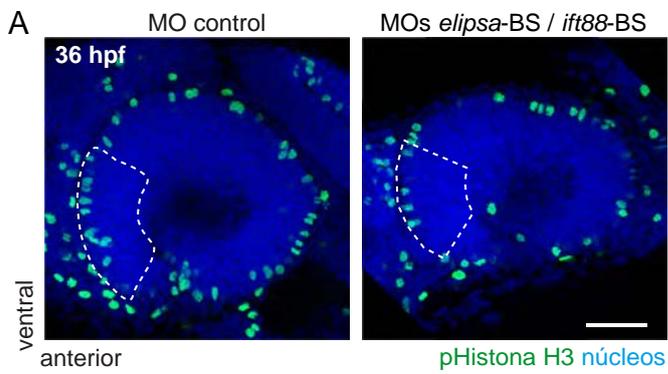
A. Imágenes de microscopía confocal de la retina de embriones de 36 hpf marcados con el anticuerpo anti-pHistona H3. Mostramos las proyecciones en z de la intensidad máxima correspondiente a secciones confocales a través de 10 μm de profundidad. La línea punteada delimita la región utilizada para determinar el índice mitótico.

B. Comparación del índice mitótico (número de células marcadas con el anticuerpo anti-pHistona H3 por unidad de volumen) en retinas de embriones de 24 y 36 hpf.

C. Imágenes de microscopía confocal de la retina de embriones de 48 hpf marcados con el anticuerpo anti-Caspasa 3 activada. Mostramos proyecciones en z de la intensidad máxima correspondiente a secciones confocales a través de 10 μm de profundidad.

D. Comparación del número de células marcadas con el anticuerpo anti-Caspasa 3 activada por retina en embriones de 24, 36 y 48 hpf.

Repetimos los experimentos dos veces, y obtuvimos resultados similares, por lo que mostramos los resultados de uno de ellos. Realizamos la comparación de los datos utilizando la transformación a rangos y el test *t* de Student; ns: diferencia no significativa; (*) $p=0.0014$; (**) $p=0.009$. Escalas: 50 μm .



Por lo tanto inyectamos morfolino control o *elipsa-BS/ift88-BS* en embriones de la línea SoFa1, y los analizamos por microscopía confocal. Al observar las retinas de embriones fijados a las 48 hpf notamos una disminución general en el número de todos los tipos celulares en aquellos tratados con *elipsa-BS/ift88-BS* respecto a los controles (fig. 17A). Para analizar en más detalle la formación de cada capa de la retina, obtuvimos los perfiles de intensidad de fluorescencia para cada canal en una sección perpendicular al plano de la retina (fig. 17A; ver Materiales y Métodos). Los perfiles de intensidad mostraron valores de intensidad de fluorescencia menores en los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* con respecto a los controles, confirmando nuestra observación inicial. Por otro lado, a partir de estos perfiles determinamos la contribución relativa de cada tipo celular a la señal de fluorescencia de cada fluoróforo (fig. 17B). Los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* mostraron cambios en la fracción de señal correspondiente a cada capa en comparación con los inyectados con morfolino control. En embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* la señal asociada a la capa de CGR fue menor que en los controles, mientras que observamos un aumento en la señal asociada a la capa de fotorreceptores (tanto en el canal correspondiente a RFP como en el de CFP) (fig. 17C). Sin embargo, la fracción de señal correspondiente a la capa de células amácrinas no se vio afectada (fig. 17C). Observamos una disminución en la señal asociada a la capa de células bipolares, mientras que a las 48 hpf la señal dada por las células horizontales fue muy baja. Ambos tipos celulares son de nacimiento tardío, y si consideramos que la generación de células postmitóticas en los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* se retrasó, su contribución debería ser analizada en etapas posteriores. En resumen, la inhibición de la formación de las cilias primarias generó una disminución en la producción de todos los tipos neuronales de la retina. Además, notamos una disminución en la proporción de células en la capa de CGR y un aumento en la proporción de células en la capa de fotorreceptores.

A continuación, analizamos algunos de los embriones de la línea SoFa1 inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* o con morfolino control por medio de microscopía confocal *in vivo* a partir de las 30 hpf. En las retinas de embriones inyectados con morfolino control la primera señal que apareció fue en el canal de RFP asociada a la capa de CGR y en menor medida a la capa de células amácrinas. En estadios posteriores observamos la señal correspondiente a la capa de fotorreceptores y un aumento de la

señal en la capa de células amácrinas (fig. 17D, video 11). Sin embargo, en las retinas de los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*, la señal asociada a la capa de CGR demoró más tiempo en aparecer y fue equivalente a la señal observada para las células amácrinas. Más adelante observamos la señal correspondiente a la capa de fotorreceptores, con intensidad comparable a la señal en la capa de CGR y células amácrinas (fig. 17D, video 11). Estos resultados indican que, cuando inhibimos la formación de las cilias primarias, ocurre una disminución en la cantidad de células postmitóticas generadas, así como un retraso en su generación. Esto es particularmente evidente para las CGR, que aparecieron más lentamente que otros tipos celulares tempranos como los fotorreceptores y las células amácrinas.

Figura 17. Evaluación de la generación de diferentes tipos celulares en la retina cuando se inhibe la formación de las cilias primarias.

A. Imágenes de embriones de la línea SoFa1 (ptf1:citGFP, atoh7:gap-RFP, crx:gap-CFP) de 48 hpf, inyectados con morfolino control o *elipsa-BS/ift88-BS*, y perfil de intensidad de los diferentes canales en ambas condiciones. Las imágenes corresponden a las proyecciones en z de la intensidad promedio en una profundidad de 10 μm . La línea punteada delimita la región a partir de la cual realizamos los perfiles de intensidad que graficamos a la derecha.

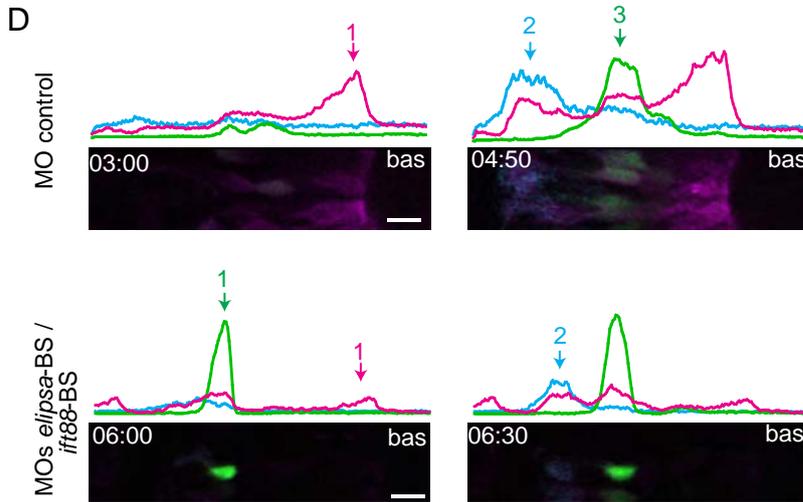
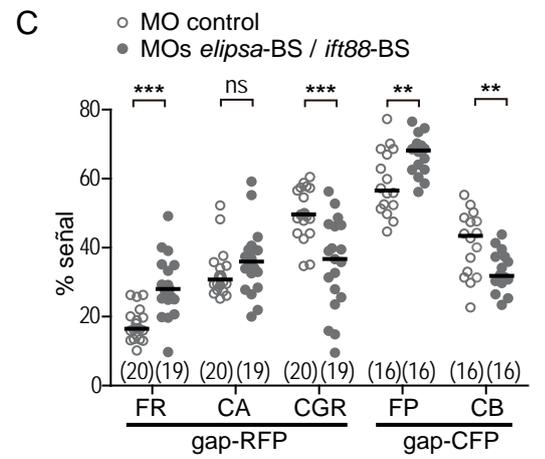
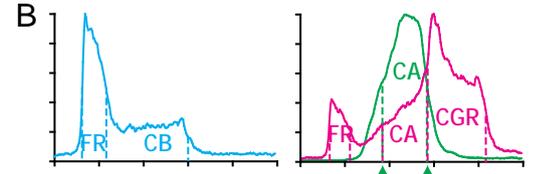
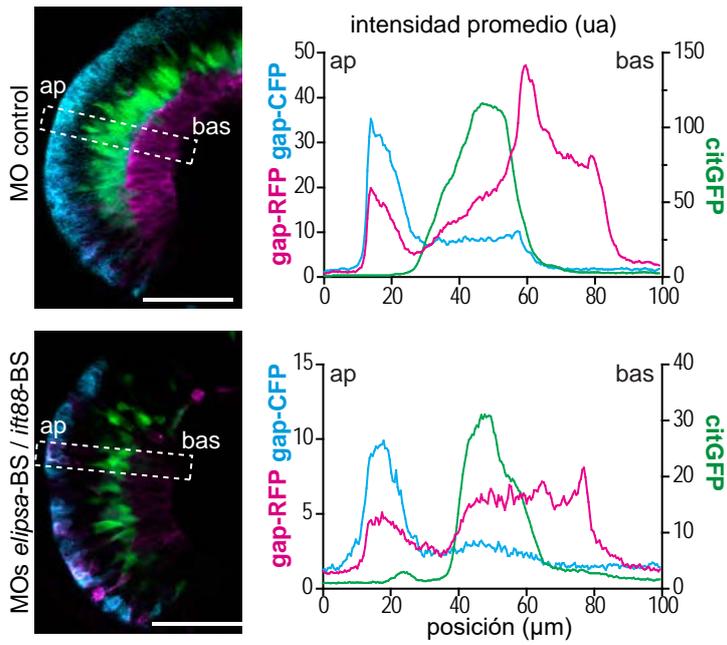
B. Diagrama de los perfiles de intensidad de cada canal y de las regiones utilizadas para la cuantificación de la contribución relativa de cada tipo celular. Fijamos los límites de cada región en la posición en que la fluorescencia corresponde al 50 % del máximo. El canal del GFP lo utilizamos únicamente para determinar la extensión de la capa de células amácrinas en el canal correspondiente a RFP.

C. Gráfica del porcentaje de señal en el canal de RFP y CFP correspondiente a cada tipo celular.

D. Imágenes a lo largo del tiempo de embriones que fueron analizados *in vivo* a partir de las 30 hpf. Sobre la imagen mostramos el perfil de intensidades de fluorescencia correspondiente a cada tiempo. Las flechas con número indican el orden de aparición de los diferentes tipos celulares.

ap: apical; bas: basal; ua: unidades arbitrarias; FR: fotorreceptores; CA: células amácrinas; CGR: células ganglionares de la retina; CB: células bipolares. El número entre paréntesis indica la cantidad de embriones analizados en cada caso. Para comparar los datos realizamos una transformación a rangos y utilizamos el test *t* de Student; (***) $p < 0.001$, (**) $p < 0.01$, ns: diferencia no significativa. Escala: 50 μm . El tiempo está indicado en h:min.

A *ptf1::citGFP* *atoh7::gap-RFP* *crx::gap-CFP*



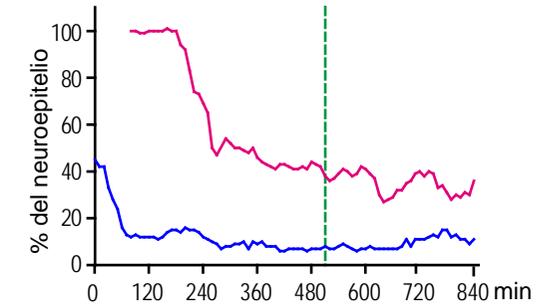
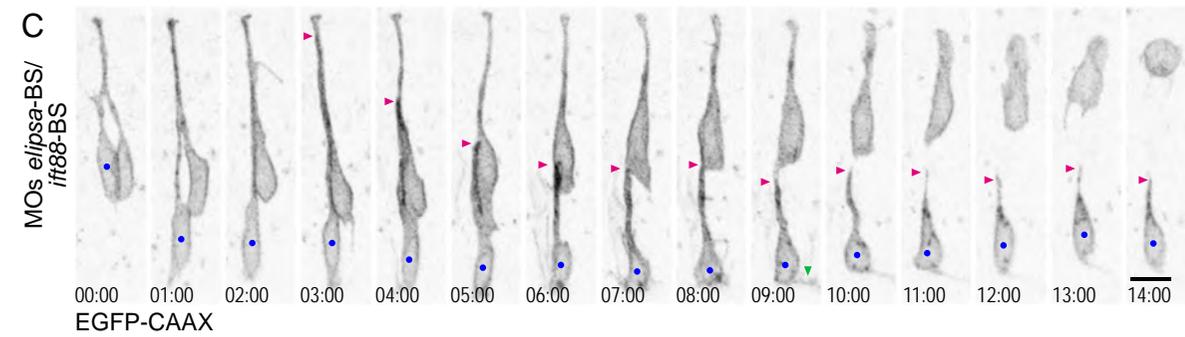
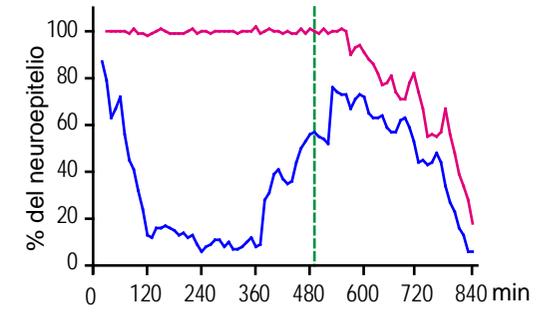
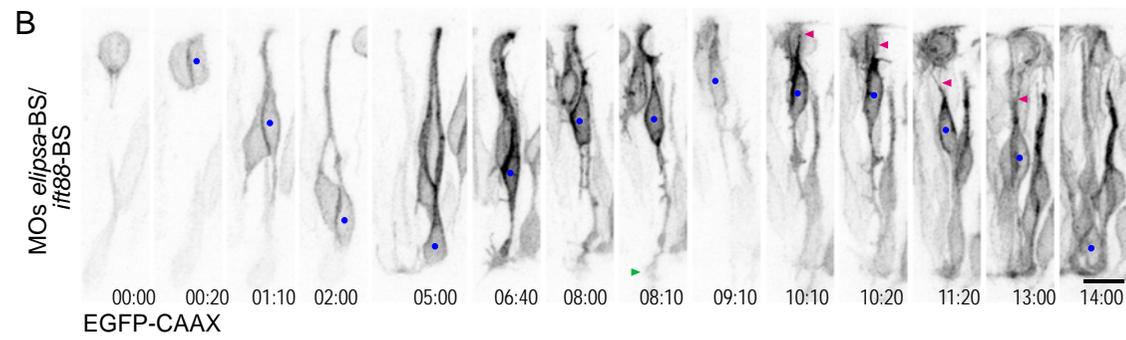
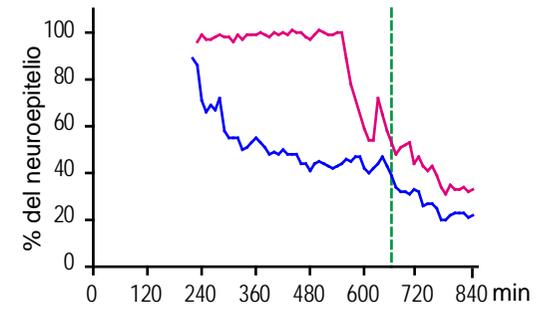
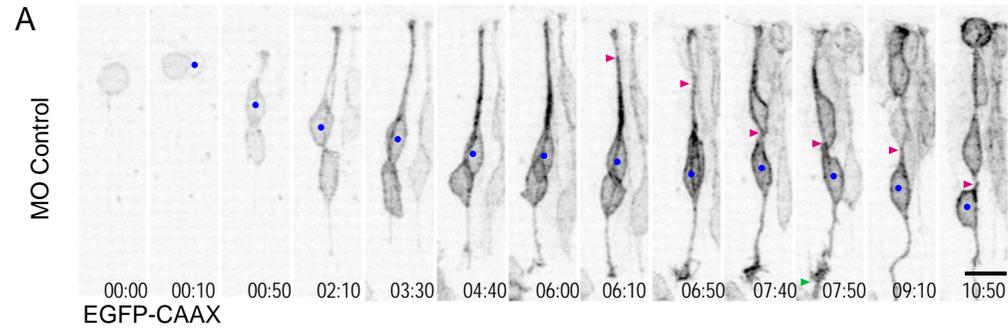
b.iii. Efecto de la inhibición de la formación de las cilias primarias sobre el proceso de diferenciación de las CGR.

Si bien nuestros resultados mostraron una disminución en la proliferación celular, algunos de los efectos observados sobre la formación de la capa de CGR no se pueden explicar únicamente por una disminución del número de células generadas. Por ejemplo, las células presentes en las retinas de los embriones tratados con *elipsa-BS/ift88-BS* estaban más retrasadas en el desarrollo (fig. 14) y la capa de ganglionares demoró más tiempo que otras capas en formarse (fig. 17). Estas observaciones sugieren que la inhibición de la formación de las cilias primarias podría generar un defecto en el proceso de diferenciación de las CGR.

Con el fin de evaluar esta hipótesis, analizamos el comportamiento individual de las CGR en diferenciación por microscopía confocal *in vivo*. Para marcar células en forma individual, inyectamos embriones salvajes en estadio de una célula con un vector plasmídico conteniendo la construcción *atoh7:EGFP-CAAX*. Luego inyectamos morfolino control o *elipsa-BS/ift88-BS* en el estadio de dos a cuatro células. A las 30 hpf comenzamos a registrar el comportamiento de las células adquiriendo imágenes de la retina a intervalos regulares de tiempo por medio de microscopía confocal. Pudimos observar células individuales en diferentes etapas entre la salida de la mitosis y el final de la retracción del proceso apical. En la retina de embriones control observamos células con el patrón esperado de comportamiento: luego de la salida de mitosis el núcleo de la CGR en diferenciación comenzó a migrar hacia la superficie basal del neuroepitelio mientras la célula permanecía asociada a la superficie apical; a continuación el proceso apical se desprendió, el soma terminó de posicionarse en la superficie basal y comenzó la extensión del axón sobre la lámina basal del neuroepitelio (fig. 18A, video 12). Sin embargo, en la retina de embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* encontramos células con comportamientos atípicos, como los que se documentan en la figura 18B (video 13). El comportamiento de estas células se diferenció de las controles principalmente en el movimiento del núcleo: luego de la mitosis el núcleo se desplazó hacia la superficie basal del neuroepitelio, pero en vez de mantenerse en esa posición, se trasladó en dirección apical y luego de cierto tiempo volvió a posicionarse en la región basal. En estas células el axón comenzó a extenderse previo al inicio de la retracción del

Figura 18. Ejemplo de CGR en diferenciación en embriones control o inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*.

Serie de imágenes a lo largo del tiempo de embriones inyectados con el plásmido *atoh7:EGFP-CAAX* y morfolino control (A) o *elipsa-BS/ift88-BS* (B y C). Indicamos el extremo del proceso apical (flecha roja), la posición del núcleo (punto azul) y el inicio de la formación del axón (flecha verde). A la derecha mostramos las gráficas correspondientes a cada condición, con la posición relativa del proceso apical (rojo) y del núcleo (azul) en el eje ápico-basal del neuroepitelio a lo largo del tiempo. La línea punteada verde indica el momento en que inició la extensión del axón. Escala: 10 μm . El tiempo está indicado en h:min.



— posición del proceso apical
 — posición del núcleo
 - - - inicio de la formación del axón

proceso apical. Otras células, si bien mostraron comportamientos típicos, demoraron más tiempo entre que se desprendieron de la superficie apical y el momento en que finalizaron la retracción (fig. 18C, video 14).

Para determinar si existen diferencias en la dinámica de diferenciación del conjunto de células observadas, decidimos observar y evaluar tres parámetros básicos en el proceso de diferenciación mediante seguimiento manual y utilizando el plugin de Fiji MTrackJ. Evaluamos 1) la posición del soma, 2) la retracción del proceso apical y 3) la extensión del axón. En la figura 18 presentamos ejemplos del seguimiento del extremo del proceso apical y del núcleo. A partir de estos datos determinamos el tiempo transcurrido entre la salida de mitosis y el inicio de la retracción del proceso apical, así como el período entre el inicio de la retracción y el inicio de la extensión del axón (fig. 19A y B). No observamos cambios significativos en ninguno de los dos períodos entre las diferentes condiciones. A continuación comparamos las trayectorias nucleares de aquellas células en las que pudimos observar la salida de mitosis (usamos este evento para comparar los recorridos, asignándole el $t=0$; fig. 19C). En el caso de las células de embriones control (inyectados con *atoh7:EGFP-CAAX*, o con *atoh7:EGFP-CAAX* y morfolino control), los recorridos nucleares fueron similares, por lo que los analizamos en forma conjunta. Estas células mostraron un comportamiento típico con dos fases (Icha et al., 2016): una fase de movimiento direccional del núcleo y una fase de posicionamiento fino. No encontramos diferencias significativas entre los controles y los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* al comparar la velocidad de movimiento del núcleo durante el movimiento direccional (fig. 19D). Al analizar el recorrido de los núcleos durante la fase de posicionamiento fino, observamos trayectorias similares entre las diferentes células de los embriones control. En cambio, las células de embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* presentaron recorridos individuales más variables (con mayor dispersión), si bien la trayectoria promedio se mantuvo en la región basal del neuroepitelio (fig. 19C).

Finalmente, comparamos las trayectorias del extremo del proceso apical durante la retracción. El promedio y la variación en las trayectorias fueron similares entre los embriones inyectados con morfolino control o con *elipsa-BS/ift88-BS* (fig. 19E), al igual que la velocidad de retracción del proceso apical (fig. 19F).

Figura 19. Comparación de la dinámica de diferenciación de las CGR entre embriones control e inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*.

A partir del seguimiento del núcleo y el proceso apical indicado en la figura 18, comparamos diferentes características del movimiento de las CGR durante su diferenciación.

A. Gráfica del tiempo transcurrido entre la salida de mitosis y el inicio de la retracción del proceso apical.

B. Comparación del período entre el inicio de la retracción del proceso apical y el inicio de la formación del axón.

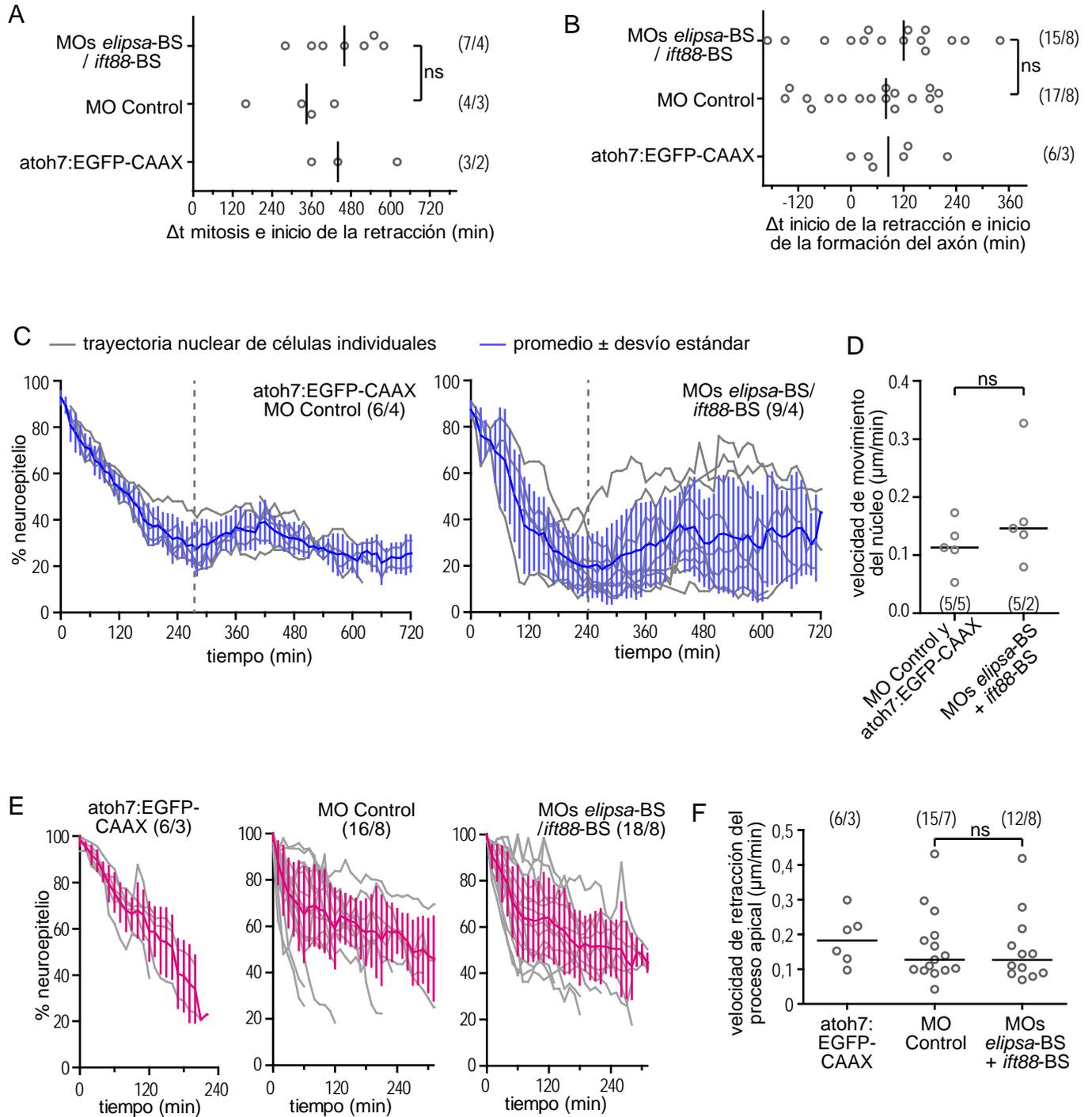
C. Gráficas de las trayectorias nucleares de células en las condiciones indicadas. En gris graficamos las trayectorias individuales, en azul la trayectoria promedio y las barras verticales indican el desvío estándar en cada tiempo. La línea gris punteada indica el final del movimiento direccional del núcleo y el inicio de la fase de posicionamiento fino en la región basal.

D. Comparación de la velocidad del núcleo durante el movimiento direccional hacia la superficie basal.

E. Gráfica de las trayectorias del proceso apical durante su retracción en las diferentes condiciones. En gris graficamos las trayectorias individuales, en magenta la trayectoria promedio y las barras verticales indican el desvío estándar en cada tiempo.

F. Comparación de la velocidad de retracción del proceso apical.

Las cifras entre paréntesis son el número de células/embriones analizados en cada caso. Para comparar los datos utilizamos el test de Mann-Whitney; ns: diferencias no significativas.



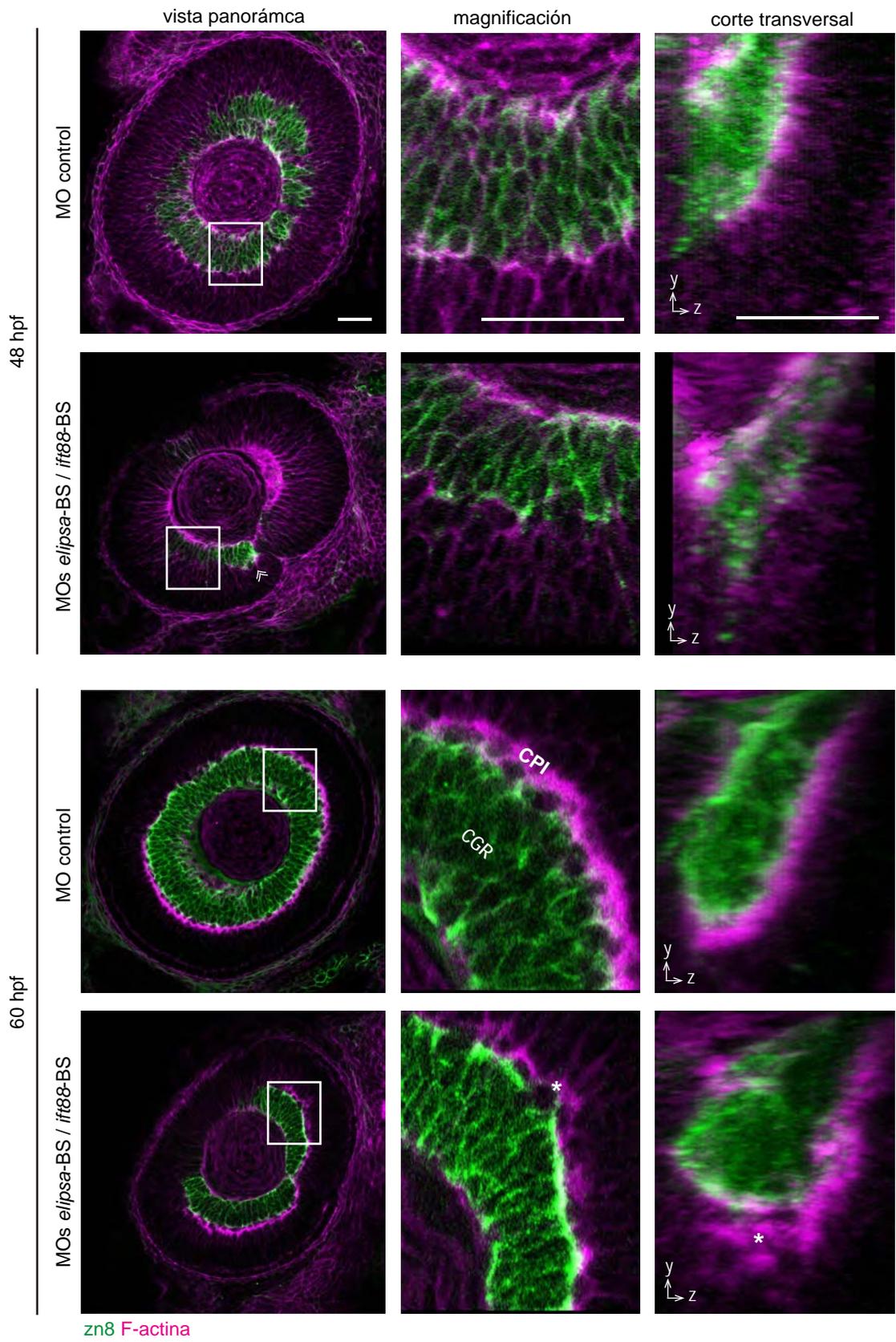
En resumen, cuando inhibimos la formación de las cilias primarias, encontramos que el núcleo de las CGR presenta recorridos significativamente más variables durante la fase de posicionamiento fino en la región basal del neuroepitelio.

Luego de que las CGR se posicionaron en la región basal del neuroepitelio y el axón ha comenzado a extenderse, da inicio la formación de las dendritas en la región apical de la célula (Choi et al., 2010). Los resultados de nuestros experimentos *in vivo* mostraron que, en las células que presentaron cilia durante éste período, ésta también se localizó en la región apical de la célula. Esta observación resulta interesante ya que en otros tipos neuronales se ha descrito una localización similar y en células de hipocampo se ha demostrado que la cilia tiene funciones en el refinamiento de las dendritas (Arellano et al., 2012; Kumamoto et al., 2012). Entonces, cabe la posibilidad de que la cilia cumpla alguna función en la formación de las dendritas de las CGR.

Para evaluar esta hipótesis comenzamos analizando el inicio de la formación de la capa plexiforme interna, en donde las CGR extienden sus dendritas y generan conexiones con las células amácrinas y bipolares. Inyectamos embriones de la línea SAT con morfolino control o *elipsa-BS/ift88-BS*, los fijamos a las 48 y 60 hpf, y marcamos la capa plexiforme interna por medio de faloidina-TRITC. En los embriones control observamos que la capa plexiforme interna comenzó a formarse a las 48 hpf y se extendió por toda la región nasal de la retina (fig. 20). Sin embargo en los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* observamos sólo una pequeña región de capa plexiforme en la zona adyacente a la fisura coroidea, donde se encuentran las primeras CGR generadas (fig. 20, flecha doble). En embriones de 60 hpf, tanto inyectados con morfolino control o *elipsa-BS/ift88-BS*, observamos que la capa plexiforme se extendió en toda la retina. No obstante, en algunos embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* notamos zonas desorganizadas (fig. 20, asterisco). Estos resultados indican que la inyección de *elipsa-BS/ift88-BS* afectó el desarrollo de la capa plexiforme interna, la cual no solo demoró más tiempo en formarse, sino que una vez formada también presentó regiones desorganizadas.

Figura 20. Formación de la capa plexiforme interna en embriones inyectados con morfolino control o con *elipsa-BS/ift88-BS*.

Imágenes de microscopía confocal de retinas de embriones inyectados con morfolino control o con *elipsa-BS/ift88-BS* y fijados a las 48 o 60 hpf. Luego, marcamos estos embriones con el anticuerpo zn8 y faloidina-TRITC. Las imágenes de la columna izquierda son planos confocales panorámicos. Las regiones recuadradas se muestran amplificadas en las imágenes de la columna central. En la columna de la derecha se observan proyecciones de intensidad máxima a partir de secciones ortogonales de 15 μm de espesor en la región observada en la columna central. (») indica una región de capa plexiforme interna adyacente a la salida del nervio óptico. Los asteriscos indican una zona de la capa plexiforme interna que se encuentra desorganizada. CPI: capa plexiforme interna; CGR: células ganglionares de la retina. Escala: 30 μm .



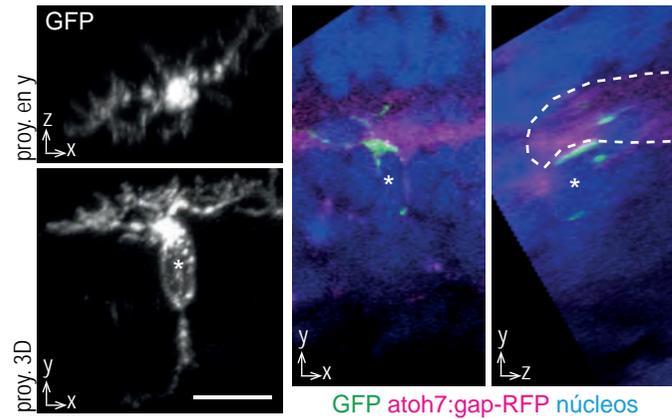
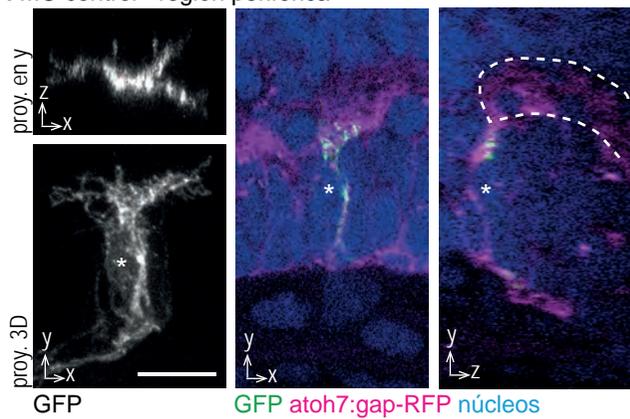
A continuación, analizamos la formación de las dendritas en células individuales. Para ello, inyectamos embriones de la línea *atoh7:gap-RFP* con los vectores *barhl1.2:GAL4* y *UAS:EGFP-CAAX*, y luego con morfolino control o *elipsa-BS/ift88-BS*. A diferencia de *Atoh7*, *Barhl1.2* se expresa exclusivamente en un subgrupo de CGR en diferenciación pero no en sus progenitores (Schuhmacher et al., 2011; Aljand, 2013). Por lo tanto la expresión de *EGFP-CAAX* bajo el control transcripcional del promotor de *barhl1.2* permite el marcado de algunas CGR. A las 72 hpf fijamos los embriones inyectados con estos plásmidos y los analizamos por microscopía confocal. En este estadio la región central de la retina de pez cebra se encuentra más desarrollada que la región periférica o marginal, en donde la diferenciación celular continúa incluso en la etapa larvaria. Por lo tanto, observamos células en diferentes etapas de la diferenciación. Al analizar los embriones inyectados con morfolino control, las células que encontramos en la región marginal de la retina presentaron un árbol dendrítico poco extendido y poco ramificado (fig. 21A). Estas células se encontraban en una región en que la capa plexiforme interna es delgada, indicando un menor grado de desarrollo. En regiones centrales de la retina, donde la capa plexiforme interna posee un espesor mayor, encontramos células con árboles dendríticos de extensión variable, pero en general más elaborados (fig. 21B). Al analizar las imágenes de embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* encontramos células en la región marginal de la retina muy similares a las que observamos en los controles, con dendritas poco extendidas y poco ramificadas (fig. 21C). En regiones centrales de la retina de estos embriones observamos células con dendritas más extendidas en la capa plexiforme interna, muy similares a las que encontramos en los embriones control (fig. 21D).

En suma, un déficit en la formación de las cilias primarias generó problemas en la diferenciación de las CGR, principalmente durante el posicionamiento del núcleo en la región basal del neuroepitelio. Sin bien notamos un retraso en la formación de la capa plexiforme interna y regiones desorganizadas a las 60 hpf, no encontramos diferencias notorias en la forma de las dendritas entre embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* y los controles a las 72 hpf.

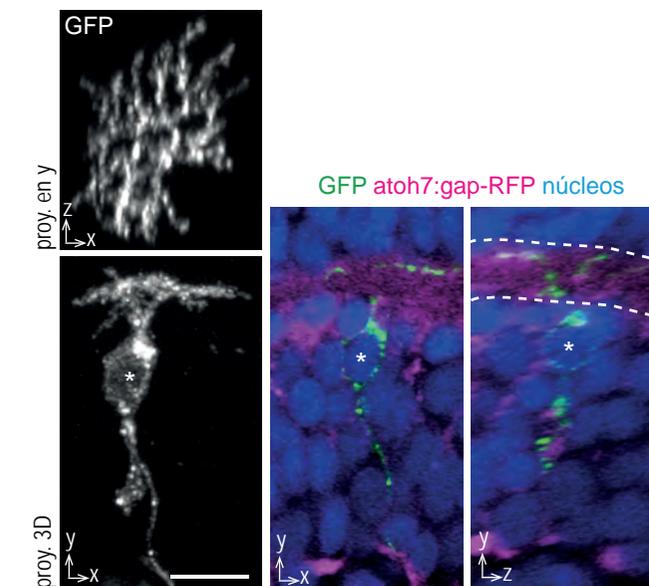
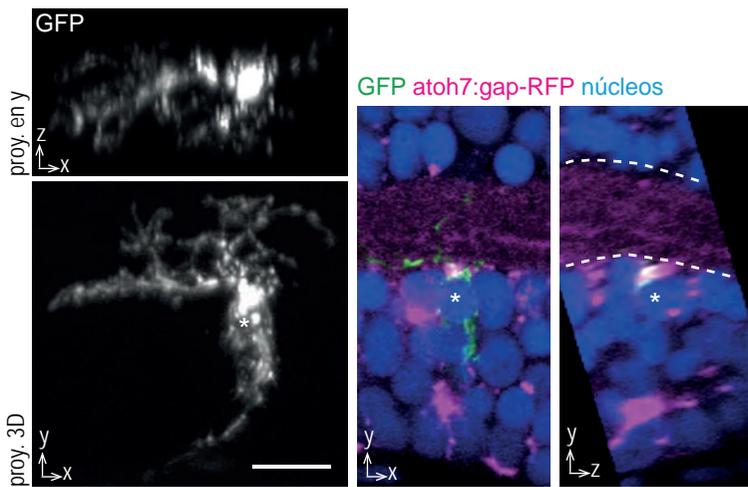
Figura 21. Evaluación de la morfología dendrítica en embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*.

Imágenes de células marcadas con *barhl1.2: GAL4 / UAS: EGFP-CAAX* en embriones de 72 hpf inyectados con morfolino control (A y B) o *elipsa-BS/ift88-BS* (C y D). Mostramos células ubicadas en la región marginal o central de la retina. La morfología general de la célula se puede observar en las proyecciones en 3D de intensidad máxima (proy. 3D), la extensión de las dendritas en la capa plexiforme interna se muestra a través de proyecciones en y de la intensidad máxima (proy. en y), y la ubicación del soma dentro de la capa se puede ver en la secciones frontales (plano x-y) y ortogonales (plano y-z). Los asteriscos indican la posición del soma de la célula en las diferentes vistas y la línea punteada indica el límite apical y basal de la capa plexiforme interna. Escala: 10 μm .

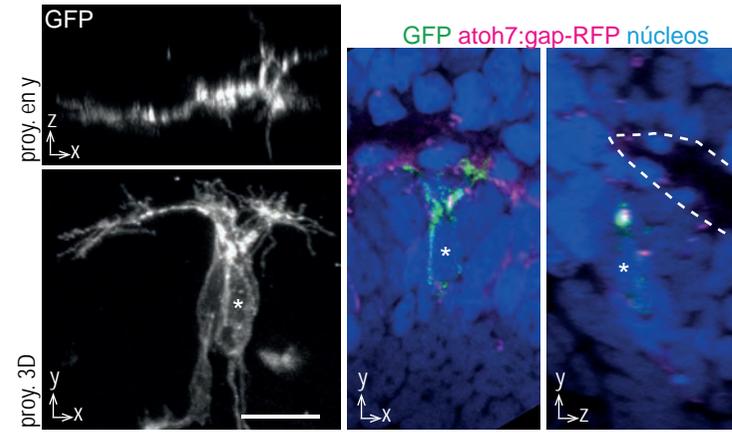
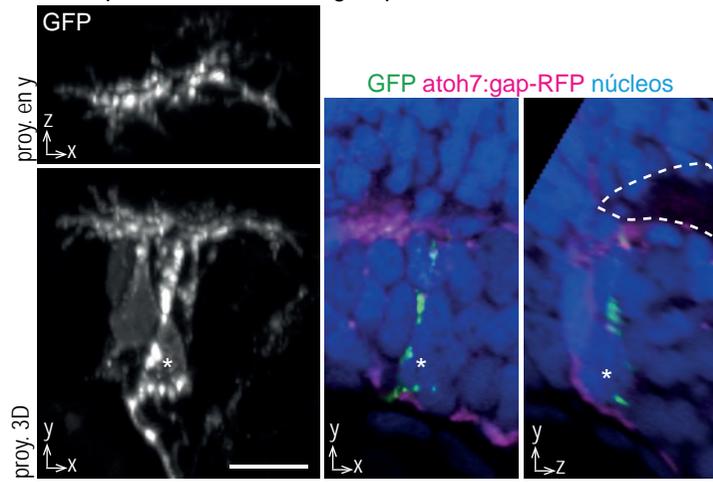
A MO control - región periférica



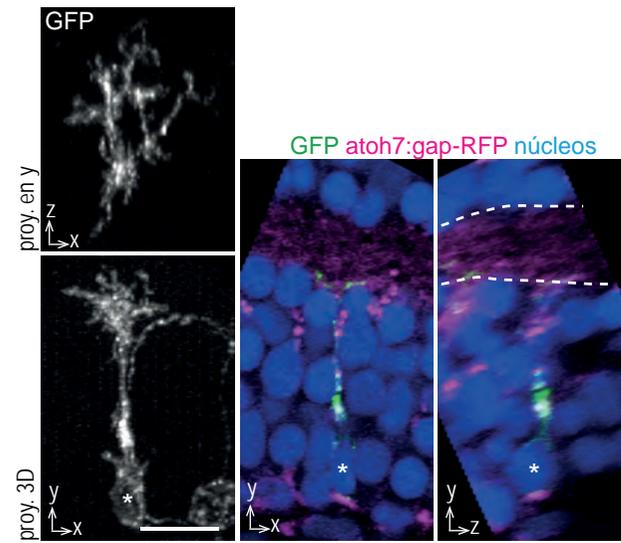
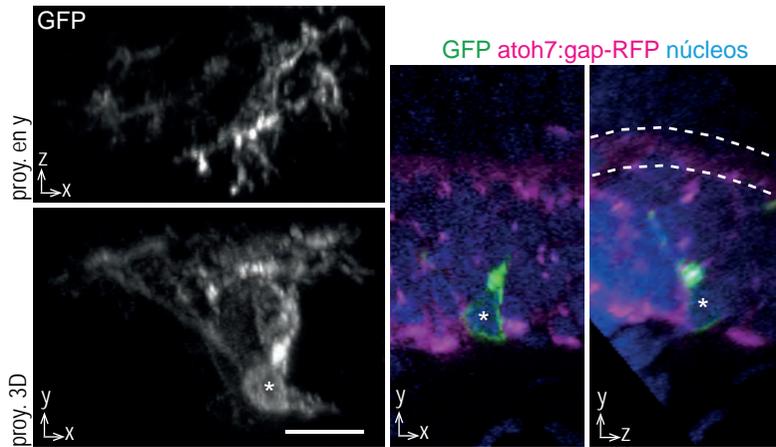
B MO control - región central



C MOs *elipsa*-BS / *ift88*-BS - región periférica



D MOs *elipsa*-BS / *ift88*-BS - región central



c. Participación de la vía de Shh en los efectos observados en la retina al inhibir la formación de las cilias primarias.

La formación y neurogénesis en la retina es influenciada por diferentes moléculas provenientes del entorno, entre ellas Shh (Stenkamp, 2015). Como se mencionó en la Introducción, existe amplia evidencia experimental que indica que la recepción y transducción de la señal generada por Shh depende del funcionamiento de la cilia primaria en vertebrados. Por lo tanto es posible que los efectos que observamos en la retina del pez cebra al inhibir la formación de la cilia se deban a la inactivación de esta vía de señalización.

c.i. Inhibición de la vía de Shh por medio de ciclopamina

Si la inhibición de vía de señalización de Shh participa de los efectos que observamos al inhibir la formación de la cilia, entonces el tratamiento con drogas que tiendan a disminuir la señalización a través de esta vía debería exacerbar el fenotipo que se genera por el tratamiento con *elipsa*-BS/*ift88*-BS. Para testear esta hipótesis, utilizamos la droga ciclopamina, un antagonista de la proteína Smoothened (Chen et al., 2002). Como mencionamos en la introducción, la unión de Shh al receptor Patched induce la activación de Smoothened, lo cual inhibe el procesamiento de los factores Gli (Gorojankina, 2016). Por lo tanto, con el uso de ciclopamina estaríamos inhibiendo uno de los primeros pasos en la transducción de señales de la vía de Shh.

Shh participa en varios estadios durante la formación de la retina de pez cebra. En estadio de vesícula óptica, Shh interviene en la delimitación del territorio destinado a tallo óptico y retina neural (Stadler et al., 2005). Luego de formada la copa óptica, participa en la neurogénesis de muchos de los tipos celulares de la retina (Shkumatava, 2004). Por lo tanto, probamos diferentes condiciones de tratamiento buscando afectar únicamente la neurogénesis y no el desarrollo temprano de la retina. Para ello, incubamos embriones de la línea *atoh7:gap-GFP* a partir de las 8 hpf o las 22 hpf, con diferentes concentraciones de droga y los analizamos a las 48 hpf. En la bibliografía, la dosis de ciclopamina necesaria para generar la inhibición de la vía de Shh en embriones de pez cebra se encuentra en el entorno de los 100 μ M (Masai et al., 2005). El tratamiento desde estadios tempranos (8 hpf) con estas concentraciones de droga

generó embriones con curvatura ventral, tamaño del cerebro y ojos reducido (fig. 22A). Estos efectos fueron similares a los descritos previamente para mutantes en el receptor Smoothened (Chen et al., 2001), y se tornaron más leves al disminuir la concentración de droga a 25 μ M o 2 μ M (fig. 22A). Cuando analizamos la retina de los embriones incubados con ciclopamina 2 μ M por medio de microscopía confocal, encontramos que la capa de CGR presentaba un volumen reducido y axones que quedaron retenidos dentro de la retina en lugar de dirigirse hacia el nervio óptico (fig. 22B). Este fenotipo se atenuó al comenzar el tratamiento a las 22 hpf. El efecto del tratamiento con ciclopamina sobre la formación de la capa de CGR es similar al reportado previamente por otros investigadores (Masai et al., 2005), y se asemeja al fenotipo que observamos al inhibir la formación de las cilias primarias. Por otro lado, la localización de axones dentro de la retina se podría explicar por la participación de Shh en la regionalización del tallo óptico en estadios tempranos y por lo tanto, en forma indirecta, en la guía de los axones de las CGR hacia la salida del nervio óptico (Sanchez-Camacho y Bovolenta, 2008; Horndli y Chien, 2012).

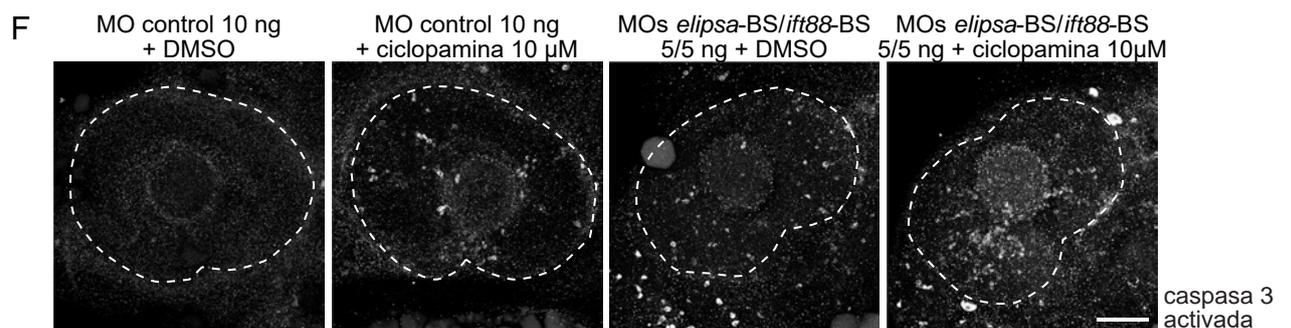
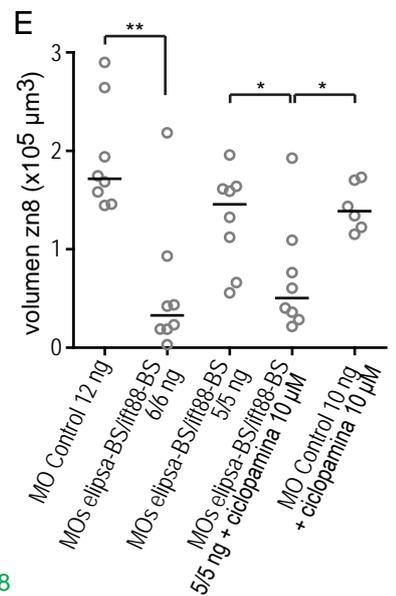
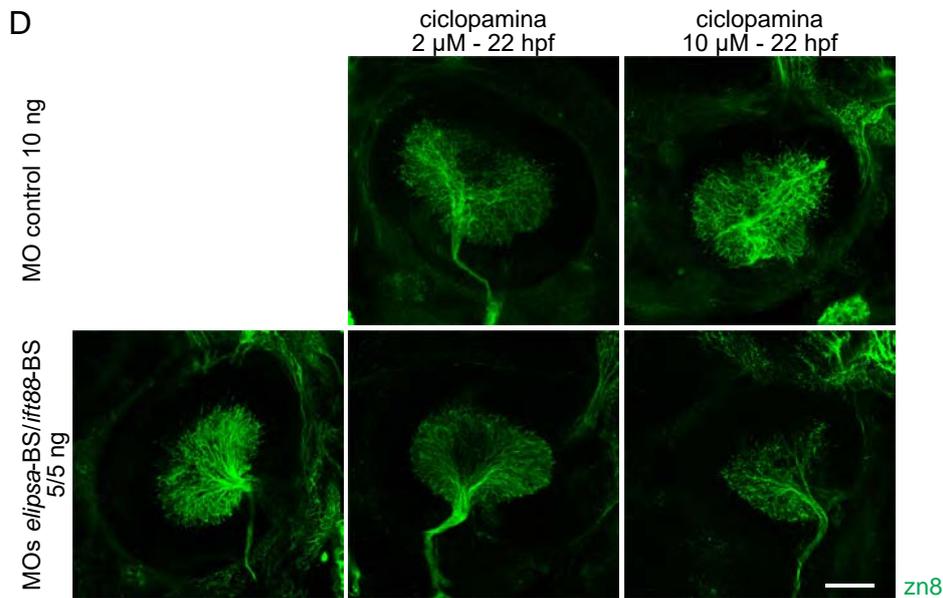
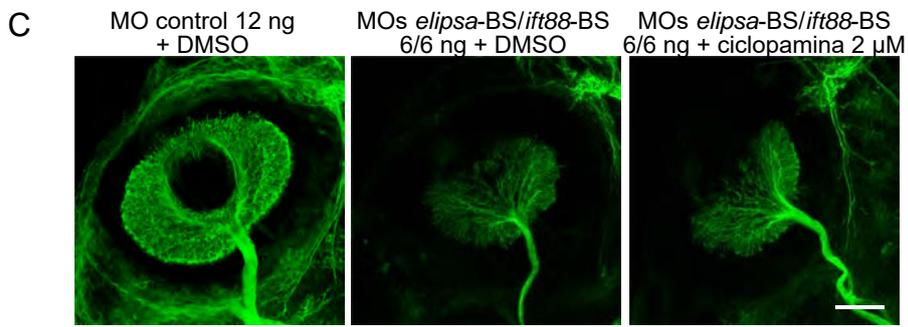
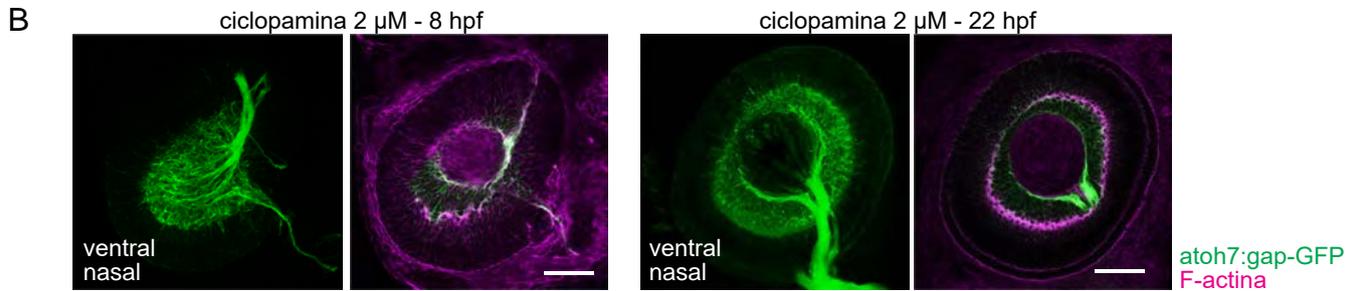
A continuación razonamos que si la vía de señalización de Shh se asocia a la cilias, el tratamiento con ciclopamina debería exacerbar el efecto que observamos al inhibir la formación de las cilias primarias. Para realizar este experimento es necesario utilizar un tratamiento con ciclopamina que afecte en forma sutil la formación de la capa de CGR. Basándonos en los resultados expuestos anteriormente, decidimos utilizar la ciclopamina en la concentración de 2 μ M a partir de las 22 hpf. Inyectamos embriones con morfolino control o *elipsa*-BS/*ift88*-BS en las cantidades utilizadas hasta el momento (6/6 ng) y a las 22 hpf los tratamos con DMSO o con ciclopamina 2 μ M. A las 48 hpf fijamos los embriones y evaluamos la extensión de la capa de CGR marcándolos con el anticuerpo zn8. Como esperábamos, el tratamiento con *elipsa*-BS/*ift88*-BS generó una disminución en el volumen de la capa de CGR. Sin embargo, no observamos diferencias al combinar los morfolinicos con el tratamiento con ciclopamina 2 μ M (fig. 22C). Este resultado podría deberse a que el tratamiento con morfolino tuvo un efecto muy marcado o a que la concentración de ciclopamina no fue suficiente como para inhibir la vía de Shh. Por lo tanto realizamos otro experimento inyectando cantidades de *elipsa*-BS/*ift88*-BS que tuvieran un efecto menor sobre la extensión de la capa de CGR (5/5 ng). Estos embriones los tratamos desde las 22 hpf con dos concentraciones de ciclopamina,

2 μM y 10 μM . En la figura 22D mostramos imágenes representativas de las retinas de embriones en las diferentes condiciones y en la figura 22E la cuantificación del volumen ocupado por la marca de zn8. La inyección con las cantidades habituales de *elipsa-BS/ift88-BS* (6/6 ng) generó la disminución del volumen de la capa de CGR respecto a los controles. Al reducir la cantidad de *elipsa-BS/ift88-BS* a 5/5 ng observamos que no hubo reducción en el volumen de la capa de CGR respecto al control (MO Control 12 ng). Sin embargo, el co-tratamiento con ciclopamina 10 μM generó la reducción del volumen ocupado por zn8 con respecto a embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* 5/5 ng únicamente. El tratamiento de embriones inyectados con morfolino control con la misma dosis de ciclopamina no tuvo efecto. Estos resultados indicarían que la vía de Shh actúa en conjunto con la cilia primaria durante la formación de la capa de CGR.

Como se mostró previamente, la inhibición de la formación de las cilias primarias dio lugar a un aumento de la cantidad de células apoptóticas en la retina (fig. 16). Por lo tanto analizamos la muerte celular en el experimento de interacción por medio del marcado con el anticuerpo anti-Caspasa 3 activada. Notamos un aumento importante en el número de células apoptóticas en las retinas de los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* y tratados con ciclopamina 10 μM , con respecto a los embriones inyectados con morfolino control o a los embriones tratados con ciclopamina únicamente (fig. 22F). El tratamiento con ciclopamina también generó un aumento del número de células apoptóticas con respecto al control incubado con DMSO. Si bien este aumento puede ser un efecto específico, también puede deberse a toxicidad generada por el co-tratamiento con morfolinos y ciclopamina.

Figura 22. *Inhibición de la vía de Shh por medio de la droga ciclopamina.*

- A.** Imágenes en las que se observa el fenotipo externo de embriones de 48 hpf tratados desde las 8 hpf con diferentes dosis de ciclopamina.
- B.** Imágenes de microscopía confocal de embriones *atoh7:gap-GFP* de 48 hpf tratados con ciclopamina 2 μ M a partir de las 8 o 22 hpf y marcados con faloidina-TRITC. En cada condición, mostramos la proyección en z de la intensidad máxima para el canal de GFP y una sección óptica con la señal de GFP y la marcación de la faloidina-TRITC.
- C.** Imágenes de embriones de la línea SAT de 48 hpf inyectados con morfolino control (12 ng) o *elipsa-BS/ift88-BS* (6/6 ng), tratados desde las 22 hpf con ciclopamina 2 μ M o el mismo volumen de vehículo (DMSO). Luego de fijados, marcamos los embriones con el anticuerpo zn8 para poner en evidencia la capa de CGR. Mostramos la proyección en z de la intensidad máxima a través de la retina.
- D.** Imágenes de embriones de la línea SAT de 48 hpf inyectados con morfolino control (10 ng) o *elipsa-BS/ift88-BS* (5/5 ng), tratados desde las 22 hpf con ciclopamina 2 μ M, 10 μ M o el mismo volumen de vehículo (DMSO). Luego de fijados, marcamos los embriones con el anticuerpo zn8. Mostramos la proyección en z de la intensidad máxima a través de la retina.
- E.** Comparación del volumen ocupado por el marcador zn8 en retinas de embriones tratados como en (D).
- F.** Imágenes de la retina de embriones tratados como en (D), marcados con el anticuerpo anti-Caspasa 3 activada.
- Comparamos los datos utilizando el test de Mann-Whitney; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.
Escala: A: 500 μ m; B, C, D y F: 50 μ m.
-



c.ii. Inhibición de la vía de Shh a través de la expresión de Gli2DR

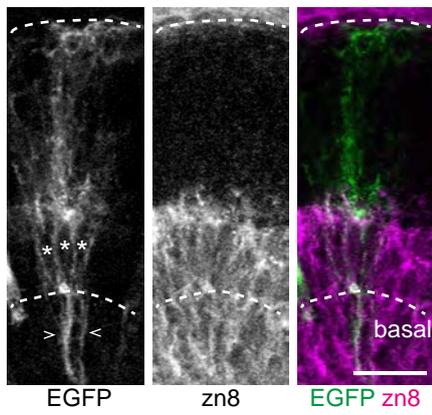
La unión de Shh al receptor Patched induce la activación de Smoothed, lo cual puede dar lugar a efectos en la célula en forma independiente de la cilia primaria (vía no-canónica) (Robbins et al., 2012). El tratamiento con ciclopamina no nos permite distinguir entre las vías canónica y no canónica. Por lo tanto, decidimos utilizar una estrategia alternativa para testear si la vía canónica de Shh participa en los efectos que observamos al inhibir la formación de las cilias. La vía de señalización de Shh asociada a la cilia primaria implica la generación de Gli1 y el procesamiento post-traduccionales de las proteínas Gli2 y Gli3, efectores de la vía. La línea mutante *yot* cuenta con una versión truncada de la proteína Gli2 (Gli2DR). Esta variante actúa como inhibidor transcripcional, y los embriones de esta línea muestran una reducción en la activación de genes blanco de la vía de Shh (Karlstrom, 2003). Entonces, decidimos evaluar la expresión de Gli2DR como herramienta para inhibir la transcripción de al menos parte de los genes inducidos por la señalización de Shh. Con este fin, generamos una construcción para expresar Gli2DR en los progenitores y las CGR en diferenciación (*atoh7:Gli2DR-P2A-EGFP-CAAX*), y como control utilizamos *atoh7:EGFP-CAAX*. Inyectamos estos vectores en embriones de una célula, los fijamos a las 48 hpf, los marcamos con el anticuerpo zn8 y analizamos las retinas por medio de microscopía confocal. En el caso de los embriones inyectados con *atoh7:Gli2DR-P2A-EGFP-CAAX* la intensidad de EGFP fue muy baja por lo que estos embriones fueron marcados además con un anticuerpo anti-GFP.

En embriones inyectados con la construcción control, las células con mayor expresión de EGFP se localizaron en la capa de CGR así como en la de fotorreceptores, mientras que la capa nuclear interna presentó células con menor expresión (fig. 23A). Este patrón es el esperado para la construcción *atoh7:EGFP-CAAX*. En embriones inyectados con *atoh7:Gli2DR-P2A-EGFP-CAAX* encontramos dos situaciones. Por un lado, observamos células con expresión de EGFP ubicadas en la capa de CGR, al igual que en los embriones control (fig. 23B). Alternativamente, encontramos grupos de células con el núcleo en la capa nuclear interna, pero con prolongaciones que llegaban a la superficie basal de la retina y que en algunos casos continuaban en dirección a la salida del nervio óptico (fig. 23C y D). Sin embargo estas células no presentaron marca de zn8. Estos resultados sugieren que la expresión de Gli2DR afectó el posicionamiento

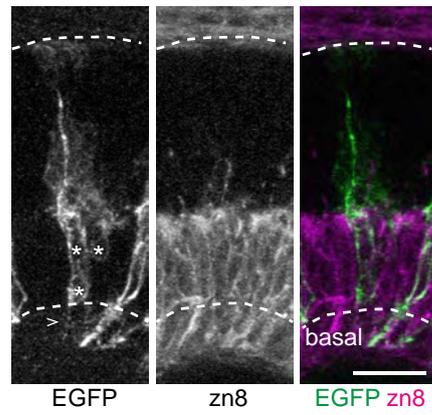
Figura 23. Efecto de la expresión de *Gli2DR* en progenitores y CGR.

Detalle de la retina de embriones de 48 hpf inyectados con *atoh7:EGFP-CAAX* (A) o *atoh7:Gli2DR-P2A-EGFP-CAAX* (B-D). Las retinas fueron analizadas por microscopía confocal y se muestran proyecciones en 3D de la intensidad máxima generadas a partir de planos en un espesor de 10-30 μm de tejido. Los asteriscos indican la posición del núcleo de las células marcadas con EGFP, mientras que las cabezas de flecha indican los axones correspondientes estas a células. Escalas: A-D: 20 μm .

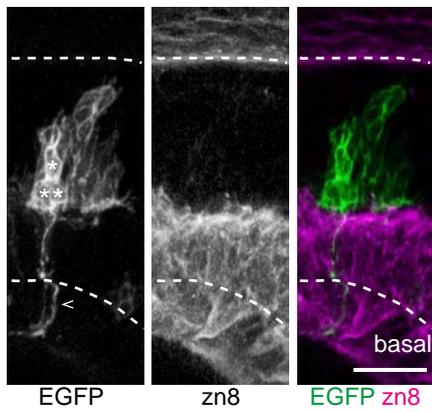
A *atoh7*:EGFP-CAAX



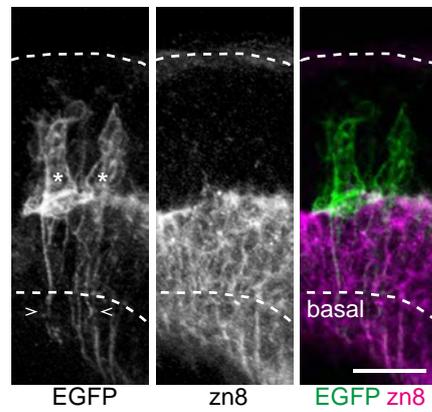
B *atoh7*:Gli2DR-P2A-EGFP-CAAX



C *atoh7*:Gli2DR-P2A-EGFP-CAAX



D *atoh7*:Gli2DR-P2A-EGFP-CAAX



de las CGR en la región basal del neuroepitelio y la expresión de DM-Grasp (molécula de superficie que reconoce el anticuerpo zn8).

c.iii. Activación de la vía de Shh mediante el tratamiento con SAG

Como se mencionó anteriormente, la inyección de *elipsa*-BS/*ift88*-BS generó la disminución del largo y número de cilias en diferentes regiones del embrión. Sin embargo, éstas no desaparecieron completamente, por lo que es posible que mantengan cierta funcionalidad. Teniendo esto en cuenta, razonamos que al estimular la vía de Shh exógenamente podríamos rescatar el defecto que observamos al inhibir la formación de las cilias. Para evaluar esta posibilidad, utilizamos la droga SAG, un agonista de la proteína Smoothened (Chen et al., 2002), que se sabe es capaz de activar la vía de señalización de Shh en células en cultivo (Torrado et al., 2016).

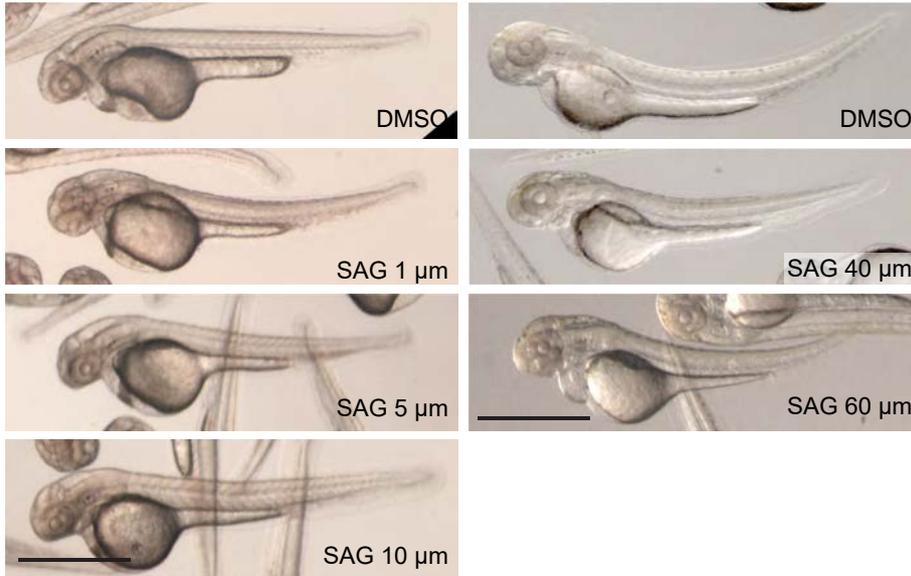
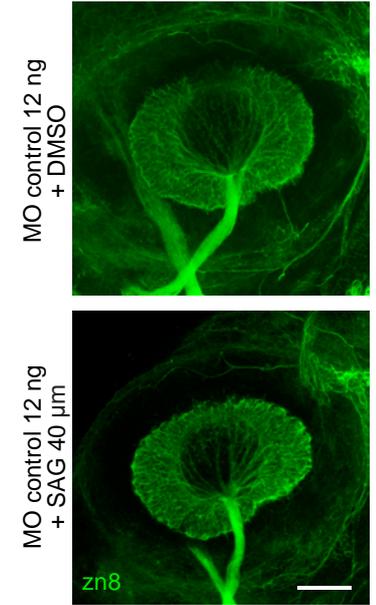
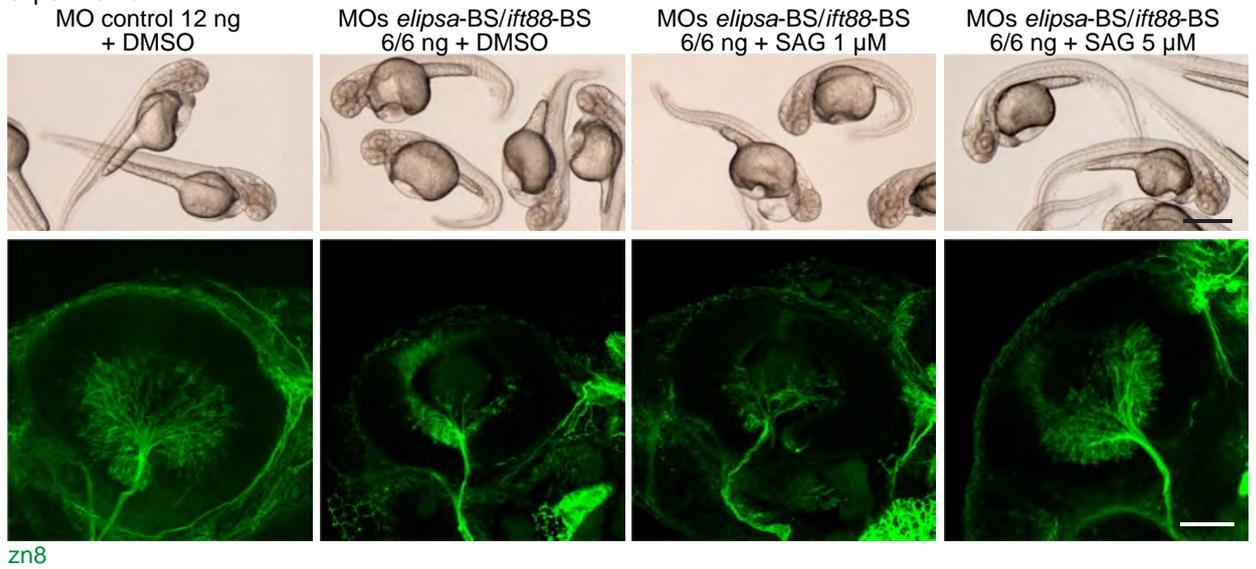
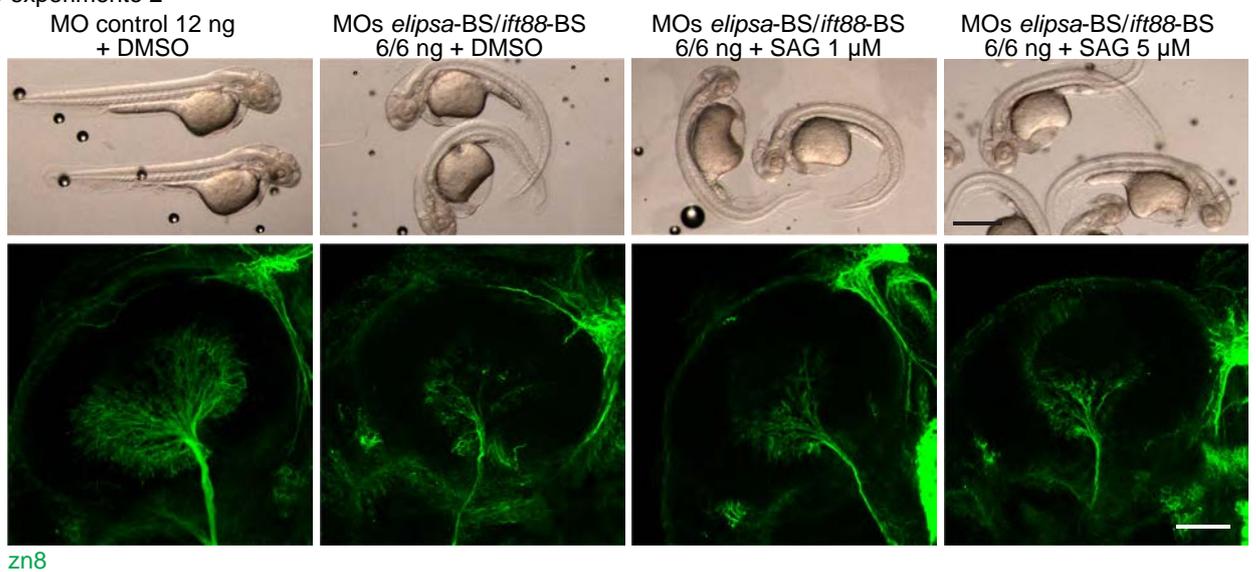
Inyectamos embriones con morfolino control o *elipsa*-BS/*ift88*-BS, y a las 22 hpf los tratamos con vehículo (DMSO) o con diferentes concentraciones de SAG (1, 5, 10, 40 y 60 μ M). A las 48 hpf evaluamos la morfología general de los embriones y los fijamos para analizar la extensión de la capa de CGR por medio del marcado con el anticuerpo zn8. El experimento fue repetido dos veces. Los embriones inyectados con morfolino control y tratados con diferentes concentraciones de SAG mostraron una morfología similar a los embriones tratados con DMSO (fig. 24A). Asimismo, los embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS presentaron un fenotipo ciliar, pero la morfología externa fue similar entre los tratados con DMSO y con SAG (fig. 24C y D). Por lo tanto, el tratamiento con SAG no tuvo un efecto marcado sobre la morfología externa de los embriones de pez cebra. Al analizar la retina de los embriones inyectados con morfolino control por microscopía confocal, encontramos que la extensión de la capa de CGR fue similar en aquellos tratados con SAG y con DMSO (fig. 24B). Esto indica que el tratamiento con SAG por sí sólo no tuvo efecto sobre la formación de la capa de CGR. Al analizar los embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS del primer experimento, notamos un aumento en la extensión de la capa de CGR en la retina de los embriones tratados con SAG 5 μ M en comparación con los tratados con DMSO (fig. 24C). Sin embargo, al repetir el experimento este resultado no pudo ser reproducido (fig. 24D).

Figura 24. Activación de la vía de *Shh* utilizando el agonista SAG.

A. Imágenes de embriones de 48 hpf inyectados con morfolino control y tratados con DMSO o con diferentes concentraciones de SAG a partir de las 22 hpf. Cada columna corresponde a un experimento diferente con su respectivo control.

B. Imágenes de la retinas de embriones inyectados con morfolino control y tratados con DMSO o con SAG 40 μ M, fijados a las 48 hpf y marcados con el anticuerpo zn8 para poner en evidencia la capa de CGR. Mostramos proyecciones de la intensidad máxima a partir de imágenes de microscopía confocal.

C y D. Resultados representativos de dos experimentos realizados con diferentes dosis de SAG (1 y 5 μ M). Embriones inyectados con morfolino control o con *elipsa-BS/ift88-BS*, fueron incubados con DMSO, SAG 1 μ M o 5 μ M a partir de las 22 hpf. Mostramos imágenes de bajo aumento de embriones de 48 hpf o imágenes de microscopía confocal de sus retinas. Escalas: A: 500 μ m; B: 50 μ m; C y D: 500 μ m (imágenes de bajo aumento), 50 μ m (imágenes de confocal).

A**B****C experimento 1****D experimento 2**

En suma, el tratamiento con SAG no generó un efecto reproducible sobre la formación de la capa de CGR o sobre la morfología externa de los embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS. Esto puede deberse a que SAG no tuvo efecto en las condiciones en que lo estamos utilizando, o a que la inyección de *elipsa*-BS/*ift88*-BS haya afectado el funcionamiento de la cilia de forma tal que no es posible activar la vía de Shh.

c.iv. Activación de la vía de Shh por medio de la expresión de Gli1

Otra estrategia para probar la participación de Shh en los efectos generados al inhibir la formación de las cilias primarias, es restaurar la señalización de la vía en etapas posteriores a aquellas en las que participa la cilia. Una forma de lograrlo sería sobre-expresando el factor transcripcional Gli1. En el embrión, la expresión de Gli1 es inducida por la activación de la vía, y este factor a su vez activa la transcripción de varios de los genes blancos de Shh (Karlstrom, 2003; Wang et al., 2013). Por lo tanto, generamos el vector SP6:Gli1 que permite sintetizar ARNm codificante para Gli1 *in vitro*. Inyectamos diferentes cantidades de ARNm en el vitelo de embriones salvajes (12, 25, 50 y 100 pg) y evaluamos la posible toxicidad de este tratamiento. A las 48 hpf el 50 % de los embriones inyectados con 25 pg o más de ARNm mostraron alteraciones en la forma del cuerpo que difieren de lo reportado para la expresión de Gli1 (fig. 25A) (Shen et al., 2013). En estas mismas condiciones encontramos una cantidad creciente de embriones que no sobrevivieron al tratamiento (fig. 25A). Decidimos seguir trabajando con la dosis de 12 pg, en que un 80% de los embriones lucieron como embriones salvajes. En estos embriones, evaluamos la eficiencia de la inducción de blancos de la vía de Shh, utilizando como reportero la expresión del ARNm codificante para Patched2 analizada mediante RT-PCR. Encontramos así una inducción leve del mensajero de Patched2 en los embriones inyectados con ARNm de Gli1 respecto a embriones sin inyectar (15 %).

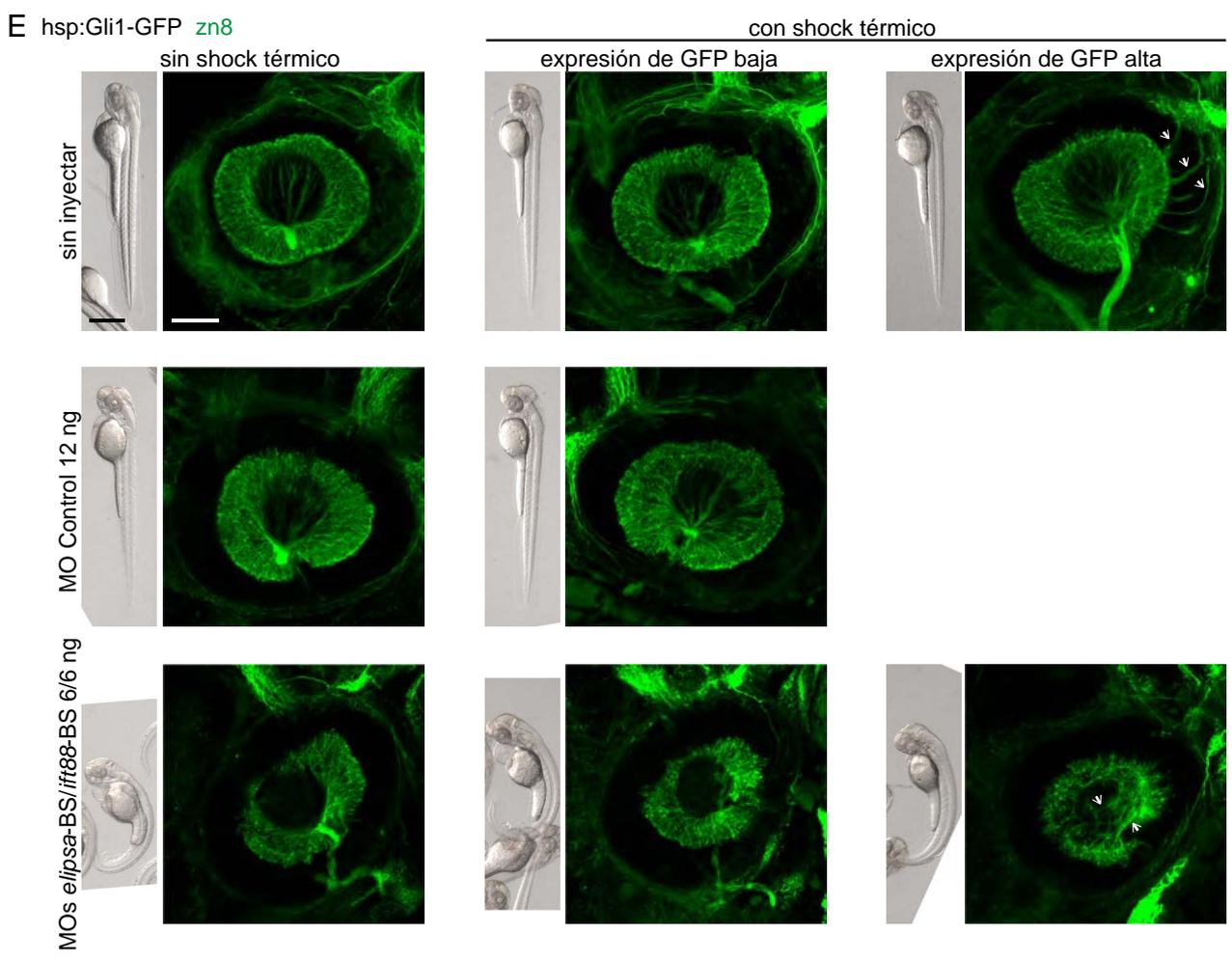
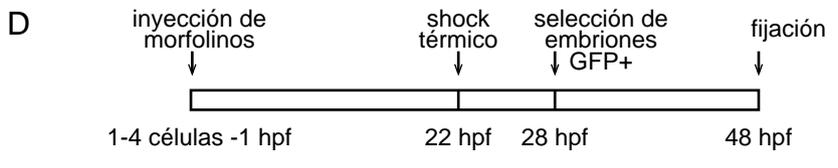
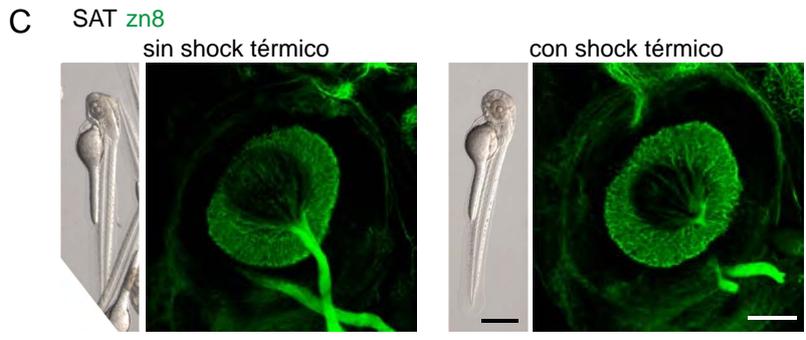
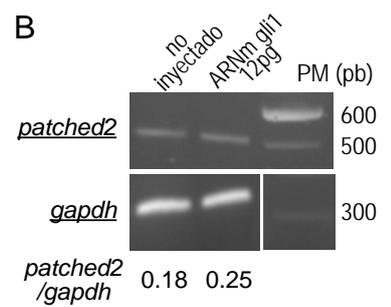
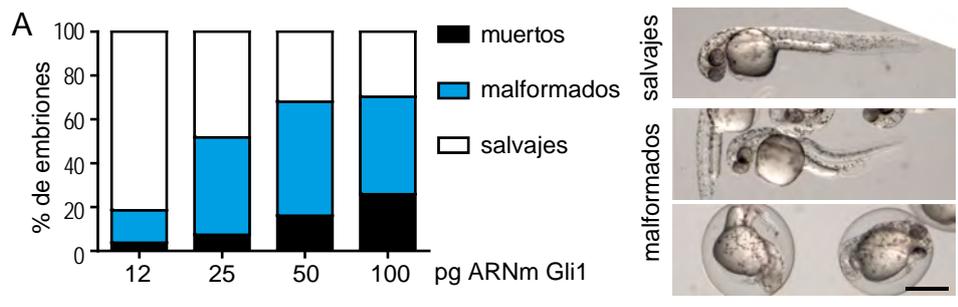
Debido a la poca eficiencia y efectos deletéreos observados tras este tratamiento, decidimos utilizar una línea transgénica previamente generada por otro grupo de trabajo (*hsp:Gli1-EGFP*), que permite expresar la proteína de fusión Gli1-EGFP bajo un promotor activable por shock térmico (Shen et al., 2013). La expresión del transgén es máxima 6 h luego de realizado un shock térmico de 1 h a 37°C (Shen et al., 2013). Teniendo en cuenta que la neurogénesis en la retina comienza a las 28 hpf,

realizamos el shock térmico a las 22 hpf. Otros grupos de trabajo han reportado que este tratamiento puede generar la reabsorción de las cilias primarias en células de mamífero (Prodromou et al., 2012). Para descartar esta posibilidad, comparamos embriones salvajes de la línea SAT sometidos o no a shock térmico. No encontramos diferencias en la morfología externa o en la extensión de la capa de CGR en la retina de estos embriones (fig. 25C), lo cual sugiere que el shock térmico no genera defectos significativos por sí solo.

A continuación, inyectamos embriones de la línea *hsp:Gli1-EGFP* con morfolino control o *elipsa-BS/ift88-BS* y realizamos el shock térmico a las 22 hpf (fig. 25D). A las 30 hpf seleccionamos los embriones y los separamos en dos grupos según la expresión de EGFP. A las 48 hpf los fijamos y marcamos la capa de CGR con el anticuerpo zn8 para luego analizarlos por microscopía confocal. Los resultados del experimento se observan en la figura 25E. La morfología externa y la extensión de la capa de ganglionares fue similar en los embriones sin inyectar e inyectados con morfolino control, independientemente del tratamiento con shock térmico o el nivel de expresión de GFP. Lo mismo sucedió en los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*. Si bien presentaron morfología externa compatible con el fenotipo ciliar y la capa de CGR se encontraba reducida respecto a los inyectados con morfolino control, no encontramos diferencias entre los embriones a los que se les realizó el shock térmico y a los que no. Es posible que Gli1 se estuviese expresando en forma no funcional. Sin embargo, en el grupo de embriones con expresión de EGFP alta a las 30 hpf, encontramos algunos que presentaron axones ubicados dentro del neuroepitelio de la retina, en lugar de dirigirse hacia el nervio óptico. Este fenotipo es similar a que observamos con el tratamiento con ciclopamina y al reportado previamente cuando se inhibe la señalización de Shh en el tallo óptico (Horndli y Chien, 2012). Teniendo en cuenta que Gli1 puede activar la expresión de Patched (Karlstrom, 2003), un regulador negativo de la vía, la presencia de axones ubicados ectópicamente en el neuroepitelio sugiere que Gli1 se expresó en forma funcional. Por lo tanto, la expresión de Gli1 funcional no generó cambios en la formación de la capa de CGR en la retina de embriones inyectados con los morfolinios *elipsa-BS/ift88-BS*.

Figura 25. Activación de la vía de *Shh* por medio de la expresión de *Gli1*.

- A.** Gráfica con la comparación del porcentaje de embriones muertos, con malformaciones o fenotipo salvaje observados luego de la inyección de diferentes cantidades de ARNm codificante para *Gli1*.
- B.** Determinación de los niveles de ARNm de *Patched2* en embriones inyectados con 12.5 pg del ARNm de *Gli1*. *gapdh* se usó como control. Por debajo de los geles se indica la relación entre los niveles de *patched2* respecto a *gapdh* en cada condición.
- C.** Imágenes del fenotipo externo y de la retina en embriones salvajes (de la línea SAT) sometidos o no a shock térmico. Los embriones fueron marcados con el anticuerpo zn8 para poner en evidencia la capa de CGR.
- D.** Esquema del protocolo utilizado para los experimentos en la línea hsp:*Gli1*-EGFP.
- E.** Imágenes del fenotipo externo y de la retina en embriones de la línea hsp:*Gli1*-EGFP inyectados con morfolino control o *elipsa*-BS/*ift88*-BS, con o sin shock térmico. Las flechas indican axones ubicados en forma ectópica dentro de la retina.
- Escalas: A: 500 μ m; C y E: 500 μ m (imágenes de baja magnificación), 50 μ m (imágenes de confocal).
-



V. Discusión

Localización y dinámica de las cilias primarias durante la diferenciación de las CGR

En este trabajo analizamos la localización y dinámica de las cilias primarias en la retina de pez cebra en diferentes estadios de su desarrollo, abarcando desde momentos previos al inicio de la neurogénesis (26 hpf) hasta etapas más avanzadas en la diferenciación de la retina (5 dpf). Realizando una inmunomarcación para tubulina acetilada así como utilizando la línea transgénica que expresa Arl13b-GFP, observamos la presencia de numerosas cilias primarias en la región apical del neuroepitelio tanto a las 26 hpf como a las 35 hpf. Tanto las células neuroepiteliales como las células del epitelio pigmentario de la retina son ciliadas, y dado que estos tejidos se encuentran estrechamente asociados, no pudimos definir por medio de microscopía óptica a qué epitelio correspondían. Un análisis más detallado utilizando microscopía electrónica de transmisión fue realizado por Camila Davison durante su tesina de grado (Davison, 2014). A partir de ese trabajo, se determinó que muchas de las cilias en esta región correspondían a las células del neuroepitelio. Estas cilias presentaron un axonema de microtúbulos organizados en nueve dobletes periféricos sin par central (9+0) y un largo promedio de 1.8 μm a las 26 hpf. En retinas de 26 hpf y 35 hpf, el análisis por MET reveló además la presencia de cilias en vesículas o centríolos asociados a la membrana plasmática sin axonema visible en la región apical del neuroepitelio. Las cilias que se observaron se encontraban en el extremo apical de la célula, extendiéndose desde la superficie apical o basolateral de las células neuroepiteliales. Estas observaciones sugieren que las cilias en la región apical del neuroepitelio pueden presentarse en diferentes estadios de su formación o reabsorción así como orientadas hacia dominios diferentes de la célula, tanto en estadios previos como posteriores al inicio de la neurogénesis (estos resultados fueron incluidos en (Lepanto et al., 2016)).

En la etapa pre-neurogénica el neuroepitelio de la retina está conformado por progenitores multipotentes. Éstas son células en proliferación que poseen una cilia primaria durante la interfase. En la retina de pez cebra pudimos observar progenitores con cilias primarias en el extremo apical hasta momentos antes del inicio de la fase M. Esta dinámica es similar a la reportada previamente en el tubo neural de pollo, donde

se describió la presencia de una cilia apical en células que se encontraban durante las fases S y parte de G2 del ciclo celular, siendo reabsorbida hacia el final de G2 (Spear y Erickson, 2012). Nuestros resultados indican que luego de finalizada la mitosis, al menos una de las células hijas formó una cilia en la región apical. En otros sistemas experimentales, la re-formación de la cilia luego de la mitosis ocurre primero en la célula hija que hereda el centríolo materno (Anderson y Stearns, 2009; Paridaen et al., 2013). La herencia del centríolo materno y la re-formación de la cilia a la salida de mitosis podría ser importante para definir el destino de las células hijas. Por ejemplo, en la corteza de ratón la herencia del centríolo materno asociada a una vesícula ciliar se ha correlacionado con el mantenimiento del estado proliferativo (Paridaen et al., 2013). En cambio, en el tubo neural de ratón, la re-formación de la cilia en una de las células hijas llevaría a la activación de la vía de Shh y a su diferenciación (Piotrowska-Nitsche y Caspary, 2012). Aunque no se ha descrito la existencia de mecanismos similares en la retina, esto se podría determinar analizando el destino de las células que heredan el centríolo materno y que forman la cilia luego de mitosis tanto en el período proliferativo como en el neurogénico.

En estadios posteriores al inicio de la neurogénesis, además de progenitores, el neuroepitelio también contiene células postmitóticas en diferenciación. Inmediatamente después de la salida de mitosis, las CGR permanecen asociadas transitoriamente a la superficie apical del neuroepitelio (Zolessi et al., 2006). En los experimentos *in vivo* observamos algunas células con cilias primarias previo al desprendimiento de la superficie apical. Algunas de ellas presentaron cilia durante el inicio de la retracción, sin embargo, la mayoría de las células inició la retracción del proceso apical en ausencia de cilia. En concordancia con nuestros resultados, en el tubo neural de pollo se han identificado diferentes situaciones durante el inicio de la retracción. Por un lado, se ha observado que la cilia puede mantenerse presente durante el desprendimiento de la célula de la superficie apical (Spear y Erickson, 2012). Por otro lado, se ha descrito un mecanismo de escisión del extremo apical de la célula que deja a la cilia primaria en el extremo escindido y los centríolos en el extremo apical de la célula (Das y Storey, 2014). En conjunto nuestras observaciones en la retina de pez cebra y éstas en el tubo neural de pollo, indican que la pérdida de la cilia primaria no sería un pre-requisito para el desprendimiento de la superficie apical del neuroepitelio. Sin

embargo, datos de estudios anteriores (Wilsch-Brauninger et al., 2012; Das y Storey, 2014) y los que presentamos en este trabajo, indicarían que previo al desprendimiento de la superficie apical, la mayoría de las neuronas muestran una cilia dinámica con cambios en su presencia o localización. La pérdida de la cilia en estas etapas podría ser un mecanismo de la célula para evitar la recepción de señales del entorno. De igual forma, su redireccionamiento hacia la superficie subapical, podría permitirle a la célula seleccionar de qué compartimiento del entorno recibe la señal.

En nuestros experimentos *in vivo* también pudimos observar el comportamiento de las cilias primarias en CGR en diferentes estadios de la diferenciación. Durante la retracción del proceso apical, la mayor parte de las células presentó una cilia primaria en posición apical. Esto coincide con la observación realizada previamente por MET en la retina en diferenciación de ratón (Hinds y Hinds, 1974). Luego de finalizada la retracción, observamos que en muchas de las CGR, las cilias primarias se tornaron altamente dinámicas durante un breve período, con momentos en que no son detectables por microscopía óptica y presentando cambios de posición. Si bien desconocemos la localización de los centríolos durante estas etapas, es de esperar que también muestren cambios de posición. En estudios previos se han reportado cambios en la localización de los centríolos en las CGR en diferenciación en diferentes condiciones experimentales. Por ejemplo, cuando se inhibe la expresión de Laminina $\alpha 1$, las CGR atraviesan una etapa multipolar previo a la extensión del axón y los centríolos se mueven ocupando diferentes posiciones en la célula (Randlett, Poggi, et al., 2011). En un estudio más reciente se reportó que cuando se desestabilizan los microtúbulos presentes en el proceso apical mediante la sobre-expresión de la proteína Stathmin1, las CGR adquieren un aspecto multipolar y nuevamente los centríolos se trasladan alrededor de la célula (Icha et al., 2016). Tomando estas observaciones en conjunto, podemos hipotetizar que en la diferenciación normal de las CGR existe un período transitorio de desorientación que termina al comenzar la dendritogénesis. Los tratamientos descritos en los trabajos mencionados podrían estar causando, entonces, una prolongación de este comportamiento al alterar la capacidad de polarizar de la célula.

En otros tipos neuronales también se han reportado cilias primarias dinámicas, con cambio en posición, largo y rotaciones, por ejemplo, en interneuronas de la corteza cerebral en migración tanto *in vivo* como *in vitro* (Baudoin et al., 2012; Higginbotham et al., 2012). El análisis de la migración *in vitro* de estas células mostró, además, que la cilia se expone en la superficie en ciertos momentos del proceso de migración y que la organización del citoesqueleto de microtúbulos asociado al cuerpo basal cambia en forma dinámica con la posición de la cilia (Baudoin et al., 2012). Mientras tanto, en otros tipos celulares se ha demostrado que la posición de la cilia está determinada por la organización y la dinámica del citoesqueleto de actina (Yan y Zhu, 2013; Antoniadis et al., 2014). Dados estos antecedentes, cabe la posibilidad de que los cambios de posición de la cilia en las CGR así como su presencia intermitente, puedan estar asociados a la reorganización del citoesqueleto durante la transición de una morfología de tipo epitelial a una neuronal.

En las CGR que presentaban una cilia cuando comenzaron la extensión de filopodios, previo a la formación de las dendritas, la cilia se localizó en la región apical de la célula. Esta zona luego se transforma en la base de la dendrita apical. Esta localización de la cilia es análoga a la observada en otros tipos neuronales como células granulares del hipocampo o neuronas piramidales de la corteza (Arellano et al., 2012; Kumamoto et al., 2012). En el caso de las neuronas de hipocampo, se mostró que la cilia primaria comienza a formarse hacia el final de la migración neuronal, localizándose en la base de la dendrita apical (Kumamoto et al., 2012). Los autores encontraron además que, en estas células, la cilia participa en el refinamiento de las dendritas y la formación de sinapsis. Este antecedente sugiere la posibilidad de que la localización apical de la cilia en las CGR no sea casual sino que pueda tener un rol activo en la orientación o formación de las dendritas.

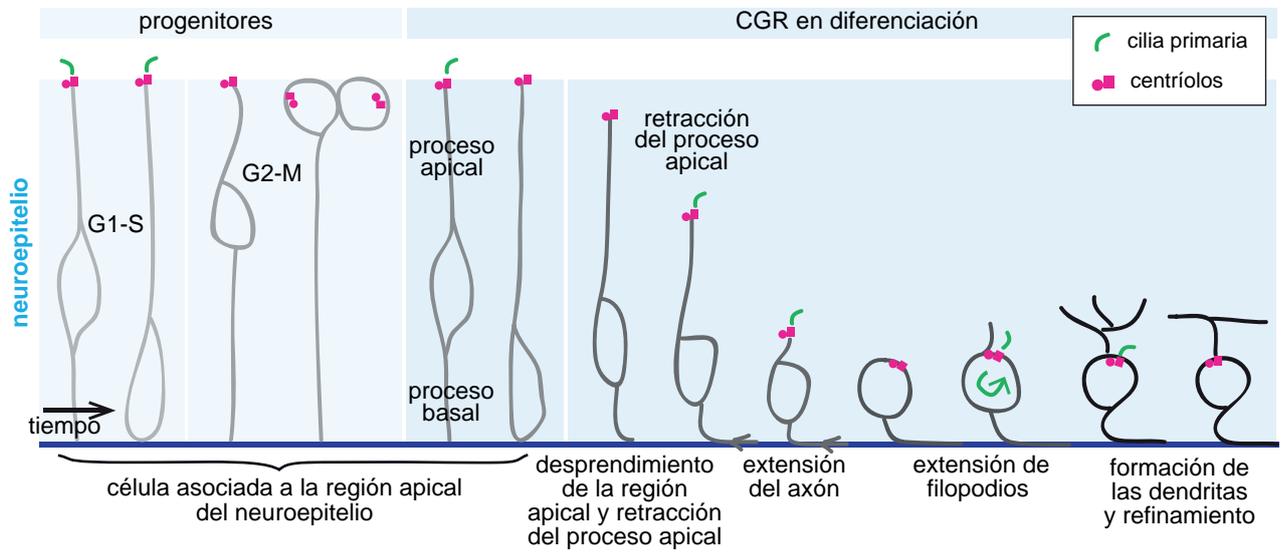
La cilia primaria está presente en forma dinámica durante el período inicial de diferenciación de la mayoría de las CGR. Sin embargo, en parte de las células que observamos *in vivo* (6/16), la cilia desapareció justo antes del inicio de la actividad de filopodios que precede la formación de dendritas y no volvió a aparecer durante el resto del período de observación. Este resultado indica que la presencia de cilia puede no ser requerida para el inicio de la formación de las dendritas, al menos hasta el momento en

que nosotros pudimos observar. En estadios más avanzados de la diferenciación (embriones de 48 hpf y 5 dpf) observamos muy pocas cilias primarias. Una posible explicación a esta observación podría ser que el límite de resolución que impone la microscopía óptica no permitió distinguir cilias muy pequeñas. Sin embargo, utilizando MET se encontró que en la capa de CGR de embriones de 48 hpf solo el 10 % de los centríolos nucleares cilias primarias (Davison, 2014). Estas observaciones sugieren que este organelo tiende a perderse en la mayor parte de las CGR luego de la fase inicial de diferenciación. Hay varios tipos celulares que experimentan la reabsorción de la cilia primaria durante su diferenciación, incluyendo los miofibroblastos, los osteoblastos y los adipocitos (Liang et al., 2016). Esto puede ser un mecanismo para evitar la recepción de ciertos estímulos. Por ejemplo, en el caso de la diferenciación de los miofibroblastos, la reabsorción de la cilia resulta en la disminución de la señalización por PDGF y Shh (Rozycki et al., 2014). Por otro lado, se ha reportado que la señalización por leptina o prostaglandinas regula el largo ciliar (Jin et al., 2014; Kang et al., 2015). Si bien en estos casos el efecto es de alargamiento, es posible que existan otras señales que tiendan a disminuir el largo ciliar. Ya sea en forma endógena o inducida, la dinámica ciliar en las CGR en diferenciación puede interpretarse como un mecanismo para regular la recepción de estímulos luego de culminada cada etapa de la diferenciación.

En la figura 26 presentamos un esquema del comportamiento promedio de la cilia primaria durante la proliferación de los progenitores y la diferenciación de las CGR. Si bien hay algunos patrones en común entre las células que observamos, debemos destacar una gran variabilidad entre células, especialmente luego de finalizada la retracción del proceso apical. Una hipótesis para esta variabilidad es que existan singularidades en la diferenciación de las diferentes clases de CGR. Sin embargo estas observaciones podrían reflejar la complejidad de la diferenciación en la retina, en que múltiples factores participan para lograr el correcto posicionamiento y orientación de las CGR en la región basal de la retina, y donde la ciliogénesis podría ser sólo uno de ellos.

Figura 26. Esquema de la presencia y localización de la cilia primaria durante la proliferación de los progenitores y diferenciación de las CGR en la retina de pez cebra.

En base a los datos obtenidos de las observaciones *in vivo*, confeccionamos un diagrama con el comportamiento promedio de la cilia primaria en progenitores y CGR en diferenciación. Los progenitores presentaron una cilia en posición apical hasta momentos antes del inicio de la mitosis. Luego de finalizada esta etapa, volvimos a observar una cilia primaria en posición apical en asociación a una de las células hijas. En las CGR, algunas presentaron una cilia apical previo al desprendimiento de la superficie del neuroepitelio, sin embargo en la mayoría de las células observamos que el inicio de la retracción apical se dio en ausencia de una cilia. Ésta reapareció en todos los casos en el extremo apical de la célula y se mantuvo hasta el final de la retracción. En células localizadas en la superficie basal del neuroepitelio el comportamiento de la cilia fue muy dinámico, con períodos en que dejó de verse y en otros casos cambió de posición incluso a regiones basales de la célula. Las células en etapas más avanzadas de la diferenciación (48 hpf- 5 dpf) carecen en la mayoría de los casos de cilia primaria.



Rol de las cilias primarias en la generación y diferenciación de CGRs

Herramientas para evaluar la función de las cilias primarias

En la segunda parte de este trabajo buscamos determinar la función de las cilias primarias en las diferentes etapas de la neurogénesis de las CGR. Una de las estrategias que probamos fue la inyección de oligómeros de morfolino dirigidos a inhibir la expresión de proteínas ciliares *Elipsa* e *Ift88*. Si bien existen líneas de peces mutantes para estas proteínas, decidimos utilizar oligómeros de morfolinos por las ventajas que presentan en la práctica. Por un lado, permiten inhibir parcialmente la expresión génica en la línea de peces deseada. Por otro lado, se puede combinar fácilmente la inyección de morfolinos dirigidos a inhibir la expresión de varias proteínas y de esta forma aumentar la posibilidad de afectar la función celular que éstas tienen en común.

Ya que los morfolinos publicados previamente, *elipsa*-BT e *ift88*-BT, mostraron un efecto leve o que no se correspondía con un fenotipo ciliar, diseñamos y validamos el uso de dos morfolinos destinados a inhibir el procesamiento del pre-ARNm codificante para las mismas proteínas ciliares. Encontramos que la combinación de morfolinos *elipsa*-BS/*ift88*-BS generó un fenotipo ciliar típico asociado a la disminución del número y largo de cilias primarias en diferentes órganos en embriones de 48 hpf. Confirmamos además la reducción del largo ciliar en la región apical de la retina de embriones de 35 hpf inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS utilizando MET (realizado en colaboración con C. Davison). Utilizando RT-PCR comprobamos que los morfolinos *elipsa*-BS e *ift88*-BS generaron la aparición del ARNm correspondiente con el intrón retenido. Esto se observó tanto al inyectar los morfolinos por separado como cuando se los utiliza en conjunto. Sin embargo, quedó un remanente de ARNm salvaje codificante para *Elipsa* e *Ift88*, lo cual explica que hayamos encontrado algunas cilias en los órganos analizados. Este resultado era previsible ya que la eficacia de las moléculas antisentido depende de la afinidad de unión, la accesibilidad al ARN y de las características de la proteína (actividad, vida media), generando sólo un bloqueo parcial de la expresión génica (Eisen y Smith, 2008; Bill et al., 2009).

Por otro lado, los morfolinos pueden presentar efectos inespecíficos, entre los cuales el más común es la muerte celular temprana en el tejido neural en desarrollo (Robu et al., 2007). Si bien no observamos muerte generalizada en los embriones

inyectados con *elipsa*-BS e *ift88*-BS, intentamos comprobar la especificidad del fenotipo observado por medio del rescate. La inyección del ARNm codificante para Elipsa y/o Ift88 en cantidades bajas dio lugar a un rescate del fenotipo externo en embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS. La inyección de cantidades mayores de ARNm generó toxicidad que se exacerbó al combinarse con la inyección de los morfolinós. Por otro lado, tanto IFT88 como Elipsa intervienen en otros procesos celulares en forma independiente de su función ciliar. IFT88 participa en la orientación del uso mitótico (Delaval et al., 2011; Borovina y Ciruna, 2013), mientras que Elipsa regula la dinámica de microtúbulos (Bizet et al., 2015). En este contexto, es posible que parte de los efectos que observamos al inhibir su expresión se deban a funciones extra-ciliares de estas proteínas. Sin embargo, en el resto del trabajo utilizamos la combinación de morfolinós en cantidades que individualmente no generan un fenotipo marcado. Consideramos que con esta estrategia aumentamos la probabilidad de que los efectos que observamos se deban a la afectación de las funciones comunes entre las dos proteínas, es decir su función en la formación y mantenimiento de las ciliás primarias.

Los morfolinós, al ser inyectados en el vitelo de embriones tempranos, se distribuyen en todas las células del organismo. Esto implica que el fenotipo observado se podría deber a su acción sobre las células de interés o sobre el resto de las células del entorno. Además, la acción de los morfolinós que inhiben el procesamiento de los mensajeros comienza a las 3 hpf aproximadamente, momento en que da inicio la transcripción del genoma del embrión (Kane y Kimmel, 1993), y dura en la mayoría de los casos hasta los 3 dpf (Bill et al., 2009). Esto implica que efectos en el desarrollo temprano de la estructura pueden complicar el análisis del proceso de interés que ocurre en un estadio posterior. Por lo tanto, como alternativa al uso de morfolinós, probamos la expresión de proteínas que funcionaran como dominantes negativos (Arl13b(1-190) y Rab8a[T22N]). Como la expresión puede ser dirigida por el uso de promotores particulares, permitirían inhibir la formación de la cilia de manera condicional en tipos celulares o momentos específicos.

Inicialmente evaluamos la eficacia de Arl13b(1-190) y Rab8a[T22N] en la inhibición de la formación de las ciliás. Observamos una disminución estadísticamente significativa del largo de las ciliás en la vesícula de Kupffer en embriones inyectados con

el ARNm de *Arl13b*(1-190). Sin embargo, la morfología de los embriones a las 48 hpf fue similar a la de los controles. Esto difiere de lo esperado ya que los mutantes y morfantes de *Arl13b* presentan un fenotipo ciliar típico (Duldulao et al., 2009). La expresión de *Rab8a*[T22N] no tuvo efecto en el largo de las cilias de la vesícula de Kupffer o en la morfología general del embrión. Si bien no evaluamos el largo de las cilias en la retina, estos resultados sugieren que la expresión de los dominantes negativos no fue suficientemente marcada y/o duradera como para generar un efecto a nivel del embrión. Por lo tanto, decidimos continuar el trabajo utilizando la combinación de morfolidos *ift88*-BS/*elipsa*-BS que mostraron ser eficaces y específicos en la inhibición de la formación de las cilias primarias. Parte de la problemática asociada al análisis de los experimentos con morfolidos que mencionábamos anteriormente, fue solucionada a través de experimentos de trasplante. Éstos nos permitieron distinguir si el efecto que observamos se trataba de la inhibición de las cilias primarias en las CGR o en el embrión en general.

Funciones de las cilias a nivel de los progenitores neuronales

Trabajos previos han mostrado que en embriones que presentan mutaciones en diferentes proteínas ciliares (*Elipsa*, *IFT88*, *IFT57* y *IFT172*) uno de los órganos afectados es la retina, con una disminución en su tamaño y la degeneración de los fotorreceptores a partir de los 3 dpf (Doerre y Malicki, 2002; Tsujikawa y Malicki, 2004; Omori et al., 2008; Sukumaran y Perkins, 2009). Al igual que en los estudios mencionados anteriormente, nosotros observamos una reducción en el volumen general de la retina en embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS respecto a los controles, pero desde etapas más tempranas (48 y 60 hpf). Este efecto se podría explicar en parte por un aumento en la muerte celular a las 48 hpf. No encontramos diferencias significativas en estadios previos, sugiriendo que el aumento de la muerte celular es un efecto específico y no debido a toxicidad generada por el morfolino. Por otra parte, la disminución del volumen general de la retina se podría explicar por una reducción en la proliferación de los progenitores. En los experimentos de trasplante las células de embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS siempre se mantuvieron en un número bajo en el entorno salvaje. En cambio, las células salvajes no solo sobrevivieron en un entorno con déficit de cilias

primarias, sino que en algunos casos superaron en número a las células del embrión receptor. Estos resultados sugieren que la inhibición de la formación de la cilia afecta a las células en forma autónoma, y que las células que tienen la formación o mantenimiento de la cilia comprometida proliferan menos que las células salvajes.

Apoyando las observaciones realizadas a partir de los experimentos de trasplante, en embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* encontramos una disminución en el índice mitótico a las 36 hpf con respecto a embriones control. Sin embargo no observamos diferencias en estadios previos al inicio de la neurogénesis. Por lo tanto, el déficit en la formación de la cilia parece afectar particularmente a los progenitores en el estadio pre-neurogénico, probablemente al progenitor durante su última división. En las retinas de embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* observamos, además, un retraso en la generación de células postmitóticas. La generación de todos los tipos celulares se vió afectada y especialmente la de las CGR, como observamos en las retinas de embriones de la línea SoFa1. En la retina de pez cebra, al igual que en otros sistemas experimentales, hay un aumento en la proliferación asociada al inicio de la neurogénesis (Li et al., 2000; He et al., 2012). En un estudio previo se reportó que el bloqueo de la transición G1-S en los mutantes que carecen de la proteína Retinoblastoma funcional, genera una disminución del número de células en mitosis y un retraso en la diferenciación de las CGR (Gyda et al., 2012). Los autores de este trabajo proponen que el retraso pudo deberse a la prolongación del último ciclo celular. En este contexto y en base a nuestros resultados, especulamos que la disminución en el número de células mitóticas que observamos al inhibir la formación de las cilias primarias podría asociarse al alargamiento de los últimos ciclos celulares que en la etapa neurogénica deberían ser muy cortos. Esto podría explicar, además, el retraso en la salida del ciclo celular.

¿De qué forma la inhibición de la formación de la cilia primaria podría estar generando una disminución en la proliferación y el retraso en la generación de neuronas? Podría tratarse de un efecto directo sobre el ciclo celular, ya que éste y el ciclo de formación/reabsorción de la cilia están coordinados e interconectados. Como se mencionó en la introducción, la presencia de la cilia se considera actualmente como un punto de control durante la transición G1-S (Izawa et al., 2015). La inhibición de la

reabsorción de la cilia retrasa la entrada en S de los progenitores neuronales favoreciendo la diferenciación neuronal (Li et al., 2011; Gabriel et al., 2016). Entonces, la inhibición de la formación de la cilia debería tener el efecto opuesto, es decir, favorecer la entrada en fase S y, en consecuencia, la proliferación. Sin embargo, nuestros resultados al igual que los de varios trabajos previos en el sistema nervioso de ratón, hemos observamos el efecto opuesto, es decir una disminución en la proliferación de los progenitores neuronales y el retraso en la generación de células postmitóticas (Chizhikov et al., 2007; Breunig et al., 2008; Spassky et al., 2008; Gazea et al., 2016). Esta discrepancia respecto al comportamiento esperado, podría deberse a que la presencia de la cilia además de influir directamente sobre la progresión en el ciclo celular, le confiere a la célula la capacidad de ser influenciada por señales del entorno. Esta hipótesis se apoya en los resultados de los trabajos mencionados anteriormente, en que se determinó que el rol de la cilia en la proliferación dependía de la señalización por Shh. Incluso en el trabajo de Spassky y colaboradores se encontró que en los progenitores del cerebelo una de las proteínas inducidas por esta vía es Ciclina D1, lo cual explicaría el efecto sobre la proliferación (Spassky et al., 2008).

De forma similar, en la retina se ha observado que la proliferación de los progenitores es inducida por Shh (Locker et al., 2006; Wallace, 2008). Sin embargo también existen trabajos que indican que Shh induce la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal en la retina (Shkumatava, 2004; Shkumatava y Neumann, 2005). Estas observaciones que parecen inconsistentes entre sí, podrían explicarse por un cambio en el estado celular que permita una respuesta diferencial frente a la misma señal extracelular. Entonces la inhibición de la formación de la cilia en nuestro sistema experimental, pudo generar que los progenitores fueran incapaces de responder frente a una o varias señales del entorno necesarias para la proliferación y/o la diferenciación. En este sentido se ha propuesto que la inhibición de la formación cilia primaria tiene diferentes efectos según las señales presentes en el entorno en que se encuentra la célula (Izawa et al., 2015). Por ejemplo, en la glía radial de ratón la señalización por IGF-1 favorece la transición G1-S, y en consecuencia, la división de los progenitores (Yeh et al., 2013). Los autores de este trabajo encontraron que la señalización por IGF-1 no solo requiere la presencia de la cilia, sino que favorece su reabsorción, influenciando de esta forma la entrada en el ciclo celular (Yeh et al., 2013). Por lo tanto, cuando inhibieron

la formación de la cilia, las células de la glía radial perdieron la capacidad de responder a IGF-1 y proliferaron más que en la situación control, probablemente por la acción de otros factores mitogénicos (Yeh et al., 2013).

Los resultados de los experimentos en los embriones SoFa1 indicaron además, que en embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*, la proporción de células en la capa de CGR disminuyó a expensas de un aumento del número de fotorreceptores, sugiriendo un cambio de destino en las células derivadas de los progenitores neuronales. Esto sería posible ya que las CGR surgen principalmente de una división asimétrica que además da lugar a otro progenitor, y éste a su vez, puede generar diferentes tipos celulares incluyendo fotorreceptores (He et al., 2012). La especificación de destinos se realiza durante el último ciclo celular y por lo tanto es posible que el enlentecimiento de los últimos ciclos celulares pueda generar cambios en el destino de la progeñie. Existen algunas evidencias que indican que en la retina la especificación de destinos está asociada a la regulación de la proliferación. Por ejemplo, la expresión de Ciclina E en la retina de *Xenopus* mantiene las células ciclando por más tiempo. En esta condición se observó un aumento de la generación de tipos celulares tardíos (células bipolares) a expensas de tipos celulares tempranos (CGR) (Ohnuma et al., 2002). Otra explicación posible para nuestros resultados es que la afectación de la cilia haya generado una disminución en la expresión de *Atoh7* específicamente en las CGR. *Atoh7* es uno de los principales factores transcripcionales que especifican el destino de las CGR y en embriones mutantes de la línea *lakritz* que carecen de la expresión de *Atoh7* (y que por lo tanto no generan CGR), los progenitores continúan dividiéndose dando lugar a otros tipos celulares (Kay et al., 2001; He et al., 2012).

Puede haber otra explicación posible para el cambio de destino que observamos en las retinas de embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*. La especificación de destinos en el neuroepitelio está relacionada a la geometría de la última división y a la asimetría en la herencia de determinantes. La membrana ciliar constituye uno de estos determinantes. En la corteza en desarrollo de ratón, la membrana ciliar es heredada en asociación al centríolo materno preferentemente en la célula hija que se mantiene en proliferación (Paridaen et al., 2013). Hasta el momento desconocemos si existe un mecanismo similar en la retina de pez cebra. En este modelo, los progenitores que se

dividen en forma asimétrica heredan el dominio apical a la célula que diferencia (Paolini et al., 2015). La herencia asimétrica, es a su vez, una consecuencia directa de la distribución polarizada de los determinantes en la célula madre durante mitosis (Taverna et al., 2014). Cabe la posibilidad de que el cuerpo basal y la cilia primaria afecten la distribución de estos determinantes. En los progenitores, el cuerpo basal se encuentra asociado a la superficie apical de la célula. En este dominio podría interactuar con el citoesqueleto cortical de actina, como se ha demostrado previamente en células multiciliadas (Yan y Zhu, 2013; Antoniades et al., 2014). Además, se ha reportado la interacción física entre Nephrocystin1, una proteína relacionada a la zona de transición, y componentes del complejo de polaridad epitelial presentes en el dominio basolateral (Delous et al., 2009). Esta interacción podría implicar un rol de la cilia en el establecimiento de la polaridad epitelial. En este sentido resulta interesante que la alteración del funcionamiento de la cilia llevó a la reversión de la polaridad de la glía radial en la corteza de ratón (Higginbotham et al., 2013). Incluso en un estudio reciente se ha reportado que MACF1, una proteína que media la interacción entre el citoesqueleto de actina y microtúbulos, y que es necesaria para el asociación del cuerpo basal a la membrana plasmática, es requerida para el mantenimiento de la polaridad de los fotorreceptores en la retina de ratón (May-Simera et al., 2016). Teniendo todo esto en cuenta, sería interesante estudiar si existe alguna relación entre la presencia y localización de la cilia con el establecimiento de la polaridad del neuroepitelio y la herencia de determinantes que puedan afectar el destino celular.

En suma, las cilias primarias son necesarias para la proliferación de los progenitores así como para su salida del ciclo celular y la especificación de destinos de las células hijas. Estas funciones podrían estar asociadas a la regulación del ciclo celular en forma directa o indirecta, así como a la detección de señales del entorno que interactúan con el programa de diferenciación de la célula. Cabe la posibilidad de que la influencia sobre la especificación de destinos esté dada por la influencia de la cilia en la geometría de la mitosis y la herencia de determinantes. Sin embargo se requieren más experimentos para determinar cuáles son los mecanismos que relacionan a la cilia con estos hitos de la neurogénesis.

Funciones de las ciliias en la diferenciación de las CGR

Varios de los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las ciliias primarias tienen funciones no sólo en la generación de las CGR sino además en su diferenciación. Primero, a las 48 hpf, la capa de CGR y la capa plexiforme interna de embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS estaban en estadios previos de diferenciación en comparación con los embriones control. En segundo lugar, observamos que cuando se trasplantan células de embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS a embriones salvajes, las células del donante quedan al menos transitoriamente por fuera de la capa de CGR. Finalmente, cuando analizamos la retina de los embriones SoFa1 por medio de microscopía *in vivo*, encontramos que la capa de CGR demora más tiempo en formarse en embriones inyectados con *elipsa*-BS/*ift88*-BS respecto a los controles.

Teniendo esto en mente, realizamos experimentos para analizar directamente la diferenciación de las CGR *in vivo*. Luego de la salida de mitosis, el núcleo de las CGR se mueve hacia la región basal del neuroepitelio en dos etapas: una de movimiento direccional y otra de posicionamiento fino (Icha et al., 2016). Al inhibir la formación de las ciliias primarias, encontramos que aunque el movimiento direccional del núcleo no parecía estar afectado, el movimiento durante la fase de posicionamiento fino fue más variable que en los controles. Además, en las células que presentaron los comportamientos más atípicos (como la que se muestra en la figura 18B), notamos que la retracción del proceso apical se retrasó, y que el núcleo se posicionó en la región basal luego de que el proceso apical logró desprenderse. En estas células, el axón comenzó a formarse previo al inicio de la retracción del proceso apical, cuando lo habitual es lo inverso. Algo similar se ha descrito en trabajos previos, en los que al inhibir la expresión de *Slit1b*, que media el desprendimiento de la superficie apical, las CGR demoraron más tiempo en comenzar a retraer y el núcleo quedó posicionado en la región central del neuroepitelio, generando un retraso importante en la formación de la capa de CGR (Zolessi et al., 2006; Wong et al., 2012). Sin embargo, el axón se extendió de forma normal. Por lo tanto, las ciliias primarias podrían ser necesarias para el desprendimiento de las CGR de la superficie apical, ya sea a través de la recepción de alguna señal extracelular o por un mecanismo endógeno de la célula.

En trabajos de otros grupos se ha demostrado que las cilias primarias participan en la conformación de la morfología dendrítica *in vivo* e *in vitro* (Kumamoto et al., 2012; Guadiana et al., 2013). Durante la caracterización de la localización de las cilias primarias, observamos que muchas de las CGR presentaban una cilia cuando comenzaron a formar las dendritas, y que ésta se localizó en la región apical de la célula. Además, en embriones de 60 hpf inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* observamos que algunas regiones de la capa plexiforme interna se encontraban desorganizadas. Sin embargo, cuando analizamos la morfología del árbol dendrítico de células individuales, no encontramos diferencias notorias. Este análisis es dificultoso por varios motivos. En primer lugar las dendritas de las CGR son altamente elaboradas y ramificadas, y existe una gran diversidad de morfologías (Mumm et al., 2006). Por otro lado, en pez cebra, su desarrollo comienza en la etapa embrionaria (antes de las 48 hpf) pero continúa durante varias semanas, con modificaciones importantes en la laminación y extensión lateral (Mumm et al., 2006). Por lo tanto, considerando que sólo pudimos analizar un número reducido de células, no podemos descartar que la inhibición de la formación de la cilia primaria tenga efectos sobre la formación del árbol dendrítico de las CGR. Como perspectiva, sería interesante analizar la etapa inicial de la formación de dendritas *in vivo* y su dinámica, así como analizar las diferentes morfologías celulares en etapas más avanzadas del desarrollo utilizando aproximaciones metodológicas que permitan la observación de tejidos más gruesos, como la excitación con dos fotones.

En resumen, por medio del análisis de la diferenciación de células individuales, encontramos evidencias que indican que las CGR que tienen comprometida la formación de la cilia pueden presentar comportamientos atípicos durante el inicio de su diferenciación. Estos comportamientos podrían ser resultado de la demora en la retracción del proceso apical, que influye en el posicionamiento fino del núcleo en la región basal del neuroepitelio. En este sentido, hay un estudio que ha reportado que los receptores Robo1 y 2, que reconocen al factor Slit2, pueden localizarse en la cilia primaria en interneuronas de la corteza de ratón durante su migración (Higginbotham et al., 2012). Los autores reportaron además que la inhibición del tráfico de estos receptores a la cilia a través de la delección de *Arl13b*, generó defectos en el proceso de migración de estas interneuronas. Por lo tanto, en el futuro sería interesante determinar

si el receptor de Slit1b, Robo 3, también se localiza en la cilia primaria en las CGR en etapas previas al desprendimiento de la superficie apical.

Participación de la vía de Shh en la función de la cilia primaria a nivel de progenitores y CGR en diferenciación.

Una de las funciones relativamente bien caracterizadas de las cilias primarias es la transducción de señales a partir del entorno. Entre ellas se encuentran varias asociadas al desarrollo de la retina, tales como los factores peptídicos FGF, Wnt y Shh. En mutantes del gen que codifica para Shh se ven afectadas la proliferación y sobrevivencia de los progenitores, así como la salida de mitosis y la diferenciación de las CGR, lo cual es llamativamente similar al fenotipo que observamos al inhibir la formación de la cilia (Masai et al., 2005; Shkumatava y Neumann, 2005; Prykhozhij, 2010). Por lo tanto, es posible que los efectos que evidenciamos al inhibir la formación de la cilia primaria se debieran a la inhibición de vía de Shh.

Inicialmente analizamos el efecto de inhibir la vía de Shh a través del tratamiento con ciclopamina, un antagonista de Smoothed. El tratamiento de los embriones con ciclopamina desde estadios tempranos generó un fenotipo externo similar al reportado previamente (Büttner et al., 2012), confirmando que la droga tenía efecto en nuestras condiciones experimentales. De forma similar a lo que observamos al inyectar *elipsa-BS/ift88-BS*, en las retinas de los embriones tratados con ciclopamina encontramos una reducción del volumen de la capa de CGR. Esto coincide además con los resultados obtenidos en estudios previos (Masai et al., 2005). Observamos además axones localizados ectópicamente, que probablemente se deba a la inhibición de la vía de Shh en el tallo óptico. En esta región, la señalización por Shh induce la secreción de una quimioquina necesaria para la guía axonal (Horndli y Chien, 2012).

A continuación, intentamos determinar si la vía de Shh y la cilia actúan en conjunto mediante la combinación del tratamiento con *elipsa-BS/ift88-BS* y subdosis de ciclopamina. Los embriones tratados en forma conjunta con *elipsa-BS/ift88-BS* (5/5 ng) y ciclopamina 10 μ M mostraron una reducción del volumen de la capa de CGR con respecto a los tratados individualmente con los morfollinos o con el antagonista. En estos embriones también observamos un aumento en la muerte celular. Previamente se ha

reportado que los mutantes de la vía de Shh presentan un aumento de la muerte celular en la retina (Prykhozhij, 2010). Por lo tanto, el aumento de la muerte celular puede ser un efecto específico y no simplemente debido a la toxicidad generada por el co-tratamiento. Estos resultados sugieren entonces, que la vía de Shh y la cilia actúan en conjunto en la formación de la capa de CGR. Sin embargo esto no aporta información sobre si la vía de Shh actúa a través de la cilia en la formación de la capa de CGR.

En presencia de Shh, la activación de Smoothened puede derivar tanto en la activación de la transcripción en forma dependiente de la cilia, como en la modificación del citoesqueleto o en cambios en los niveles de calcio, acciones en las que no participa la cilia (Robbins et al., 2012). Para distinguir entre estas dos posibilidades, decidimos comparar los resultados obtenidos hasta el momento con los que se obtendrían al expresar Gli2DR, un inhibidor transcripcional de la vía de Shh (Karlstrom, 2003). La expresión de esta proteína en los progenitores y CGR en diferenciación, generó células cuyos somas se ubicaron en la capa nuclear interna, con la particularidad de que presentaron prolongaciones con aspecto de axón. Estas prolongaciones se extendían hasta la superficie basal y en muchos de los casos continuaban dirigiéndose hacia el nervio óptico. No obstante, estas células ubicadas de forma ectópica, no presentaron inmunorreactividad detectable para el anticuerpo zn8. Este anticuerpo reconoce la molécula de superficie DM-Grasp, que se expresa únicamente en CGR y cumple funciones en la fasciculación de los axones (Laessing y Stuermer, 1996). La falta de expresión de este marcador, podría indicar que estas células se diferenciaron como otro tipo celular. Esto se contradice con sus características morfológicas, ya que las CGR son las únicas células capaces de extender un axón que se prolongue hacia la salida del nervio óptico. No podemos excluir la posibilidad de que se trate de otro tipo celular ya que también observamos cambios de destino en los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*. Entonces, resta confirmar si estas células son efectivamente CGR. Esto se podría llevar a cabo a través del marcado retrógrado por inyección de algún colorante en regiones alejadas de la retina donde pueden encontrarse los axones de las CGR, tales como el quiasma o el tectum óptico. Si estas células fuesen CGR, el efecto de la expresión de Gli2DR se asemejaría al efecto que obtuvimos al inhibir la formación de las cilias primarias. Se podría especular que la demora en su generación así como el defecto en la diferenciación, podría haber generado que las células expresando Gli2DR quedaran

por fuera de la capa de CGR constituida por células que no expresan esta construcción. En este sentido, sería interesante determinar si las células con expresión de Gli2DR presentan un comportamiento similar al observado durante la diferenciación *in vivo* de las CGR en los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*. Más allá de las características de estas células, los resultados de este experimento indican que el bloqueo de la transcripción de algunos de los genes blanco de la vía de Shh, generan cambios en las características moleculares y el posicionamiento de las CGR en la retina que se asemejan a lo observado cuando inhibimos la formación de la cilia.

Como aproximación alternativa, intentamos rescatar el defecto generado por el déficit en la formación de las cilias por medio de la activación o expresión de intermediarios de la vía de Shh. Basados en la observación de que los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* no pierden completamente las cilias, intentamos inducir la actividad de la vía a través de la droga SAG, agonista de Smoothened (Chen et al., 2002). Esperábamos ver un rescate del defecto generado por la inyección de *elipsa-BS/ift88-BS* en la formación de la capa de CGR. En cambio, observamos que el tratamiento con SAG no modificó en forma reproducible la extensión de la capa de CGR en embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS* o con morfolino control. Tampoco observamos cambios en la morfología externa de los embriones. Considerando que el lote de SAG que utilizamos funcionó en células en cultivo (Torrado et al., 2016), nuestros resultados pueden deberse a que el agonista SAG no tuvo efecto en las condiciones experimentales que utilizamos. Hasta el momento no encontramos bibliografía sobre el uso de esta droga en embriones o células de pez cebra en cultivo. Otro agonista de Smoothened, purmorfamina, no tiene efecto sobre la morfología general de los embriones pero sí en la expresión génica (Aanstad et al., 2009). Por lo tanto la evaluación de la eficiencia de SAG en la activación de la vía debería realizarse por otros métodos, por ejemplo evaluando la inducción de la expresión de genes blanco. Alternativamente, estos resultados pueden tener otra explicación. Es posible que aunque queden cilias cortas en los embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*, éstas no fuesen funcionales. La acción de Smoothened y los pasos siguientes a su activación requieren del funcionamiento de la cilia (Gorojankina, 2016). Por lo tanto es posible que la inhibición de la formación de la cilia primaria haya sido suficientemente efectiva como para que no sea posible activar la vía utilizando SAG.

La vía canónica de Shh, da lugar a la activación de la transcripción de Gli1 (Wang et al., 2013). Esta proteína es un factor de transcripción que media la activación de parte del programa transcripcional inducido por Shh (Karlstrom, 2003; Milla et al., 2012). En pez cebra, a diferencia de lo que sucede en mamíferos, Gli1 es el principal activador transcripcional de la vía (Karlstrom, 2003). Si los defectos que observamos en la retina al inhibir la formación de las cilias primarias son consecuencia de la inactivación de este programa transcripcional, deberíamos poder rescatarlos a través de la expresión de Gli1. Utilizando la línea transgénica *hsp:Gli1-GFP* (Shen et al., 2013), indujimos la expresión de Gli1 en el período en que inicia la neurogénesis en la retina. Sin embargo, en embriones inyectados con *elipsa-BS/ift88-BS*, no observamos diferencias en la extensión de la capa de ganglionares entre aquellos con y sin expresión de Gli1. El único efecto que observamos en retinas con alta expresión de GFP fue la presencia de axones ubicados dentro de la retina. Gli1 puede inducir la expresión de Patched, un regulador negativo de la vía (Karlstrom, 2003). Por lo tanto, es posible que la presencia de axones ectópicos se deba a la inhibición de la vía de Shh en el tallo óptico (Horndli y Chien, 2012). Esto sugiere que Gli1 pudo haberse sintetizado en forma activa, pero que no tuvo efecto sobre la formación de la capa de CGR. En la retina de pez cebra se ha reportado que el principal mediador transcripcional de la vía canónica de Shh es Gli3 (Tyurina et al., 2005). En embriones con mutaciones en la proteína Gli3, se observó una disminución en la expresión de *Atoh7* y un déficit en la generación de CGR. En cambio las mutaciones en Gli1 y Gli2 no tuvieron efecto aparente sobre la formación de la capa CGR (Karlstrom et al., 1996). Por lo tanto será importante a futuro poder evaluar si la expresión de la forma activa de Gli3 es capaz de rescatar el efecto que observamos al inhibir la formación de las cilias en la retina.

En suma estos resultados indican que la cilia actúa en conjunto con la señalización a través de Shh en la generación de las CGR. Los resultados de la expresión de Gli2DR sugieren que la inactivación de la vía canónica de Shh genera efectos en la diferenciación de las CGR compatibles con los observados al inhibir la cilia. Finalmente, encontramos que la expresión de Gli1 no tiene efectos en la formación de la capa de CGR.

VI. Conclusiones

Con los resultados de esta tesis realizamos aportes significativos a la descripción de la localización *in vivo* y de la funcionalidad de las cilias primarias durante el desarrollo de la retina en embriones de pez cebra.

En primer lugar confirmamos que los progenitores de la retina presentan una cilia primaria en posición apical durante interfase, lo cual está en sintonía con trabajos ultraestructurales previos en otras especies. Además, pudimos identificar varias funciones de la cilia en estas células, incluyendo su participación en la proliferación y la especificación de destinos de las células derivadas de los progenitores tempranos.

En segundo lugar, evidenciamos que las CGR en diferenciación poseen cilias dinámicas. Luego de la salida de mitosis, la nueva neurona presenta una cilia previo al desprendimiento de la superficie del neuroepitelio y en posición apical. En la mayoría de los casos la retracción del proceso apical comenzó en ausencia de una cilia, que luego reapareció y estuvo presente durante el resto de la retracción. Durante la retracción del proceso apical la cilia se mantuvo apical, pero en etapas posteriores se volvió dinámica, con cambios de posición alrededor de la célula y momentos en que dejó de ser detectable. Durante este período, pudimos comprobar que la cilia puede influir en la diferenciación de las CGR, afectando el posicionamiento del núcleo en la región basal del neuroepitelio. La presencia de la cilia fue variable durante el inicio de la formación de las dendritas.

Finalmente, nuestros resultados y los que se han reportado en otros trabajos, sugieren que la inhibición de la formación de la cilia genera efectos similares a los observados al inhibir la señalización por Shh. Esto no excluye la posibilidad que la presencia de la cilia afecte por sí misma la generación y diferenciación de las CGR, o que haya otras vías de señalización que operen a través de la cilia y que tengan influencia en estos procesos. Entender en profundidad el rol de las cilias en la diferenciación de las CGR representará un paso importante no solo para determinar el rol de este organelo en el desarrollo de la retina sino que seguramente brinde pistas sobre procesos comunes a otros tipos neuronales, datos que serán críticos para ahondar en las bases celulares de los fenotipos neurológicos y cognitivos que caracterizan a las ciliopatías.

VII. Referencias

- Aanstad, P., Santos, N., Corbit, K.C., Scherz, P.J., Trinh, L.A., Salvenmoser, W., Huisken, J. et al. 2009. The Extracellular Domain of Smoothed Regulates Ciliary Localization and Is Required for High-Level Hh Signaling. *Current Biology* 19: 1034-1039.
- Aljand, T. 2013. *Characterization of the zebrafish transcription factor Barhl1.2 in retinal development*. Tesis de Maestría. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Alemania.
- Almeida, A.D., Boije, H., Chow, R.W., He, J., Tham, J., Suzuki, S.C., Harris, W.A. 2014. Spectrum of Fates: a new approach to the study of the developing zebrafish retina. *Development* 141: 2912-2912.
- Anderson, C.T., Stearns, T. 2009. Centriole Age Underlies Asynchronous Primary Cilium Growth in Mammalian Cells. *Current Biology* 19: 1498-1502.
- Antoniades, I., Stylianou, P., Skourides, P.A. 2014. Making the Connection: Ciliary Adhesion Complexes Anchor Basal Bodies to the Actin Cytoskeleton. *Developmental Cell* 28: 70-80.
- Arellano, J.I., Guadiana, S.M., Breunig, J.J., Rakic, P., Sarkisian, M.R. 2012. Development and distribution of neuronal cilia in mouse neocortex. *The Journal of Comparative Neurology* 520: 848-873.
- Badano, J.L., Mitsuma, N., Beales, P.L., Katsanis, N. 2006. The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 7: 125-148.
- Barnes, A.P., Polleux, F. 2009. Establishment of Axon-Dendrite Polarity in Developing Neurons. *Annual review of neuroscience* 32: 347-381.
- Baudoin, J.-P., Viou, L., Launay, P.-S., Luccardini, C., Espeso Gil, S., Kiyasova, V., Irinopoulou, T. et al. 2012. Tangentially Migrating Neurons Assemble a Primary Cilium that Promotes Their Reorientation to the Cortical Plate. *Neuron* 76: 1108-1122.
- Berberi, N.F., Malarkey, E.B., Yazdi, S.M.Z.R., McNair, A.D., Kippe, J.M., Croyle, M.J., Kraft, T.W., Yoder, B.K. 2014. Hippocampal and Cortical Primary Cilia Are Required for Aversive Memory in Mice. *PLoS ONE* 9: e106576.
- Bibliowicz, J., Tittle, R.K., Gross, J.M. 2011. Toward a Better Understanding of Human Eye Disease. En *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pp. 287-330. Elsevier.
- Bilitou, A., Ohnuma, S. 2010. The role of cell cycle in retinal development: Cyclin-dependent kinase inhibitors co-ordinate cell-cycle inhibition, cell-fate

determination and differentiation in the developing retina. *Developmental Dynamics* 239: 727-736.

- Bill, B.R., Petzold, A.M., Clark, K.J., Schimmenti, L.A., Ekker, S.C. 2009. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 6: 69–77.
- Bizet, A.A., Becker-Heck, A., Ryan, R., Weber, K., Filhol, E., Krug, P., Halbritter, J. et al. 2015. Mutations in TRAF3IP1/IFT54 reveal a new role for IFT proteins in microtubule stabilization. *Nature Communications* 6: 8666.
- Bolte, S., Cordelières, F.P. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy* 224: 213-232.
- Borovina, A., Ciruna, B. 2013. IFT88 Plays a Cilia- and PCP-Independent Role in Controlling Oriented Cell Divisions during Vertebrate Embryonic Development. *Cell Reports* 5: 37-43.
- Borovina, A., Superina, S., Voskas, D., Ciruna, B. 2010. Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nature Cell Biology* 12: 407-412.
- Breslow, D.K., Koslover, E.F., Seydel, F., Spakowitz, A.J., Nachury, M.V. 2013. An in vitro assay for entry into cilia reveals unique properties of the soluble diffusion barrier. *The Journal of Cell Biology* 203: 129-147.
- Breunig, J.J., Sarkisian, M.R., Arellano, J.I., Morozov, Y.M., Ayoub, A.E., Sojitra, S., Wang, B. et al. 2008. Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 13127.
- Büttner, A., Busch, W., Klüver, N., Giannis, A., Scholz, S. 2012. Transcriptional responses of zebrafish embryos exposed to potential sonic hedgehog pathway interfering compounds deviate from expression profiles of cyclopamine. *Reproductive Toxicology* 33: 254-263.
- Chen, J.K., Taipale, J., Young, K.E., Maiti, T., Beachy, P.A. 2002. Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 14071-14076.
- Chen, W., Burgess, S., Hopkins, N. 2001. Analysis of the zebrafish smoothed mutant reveals conserved and divergent functions of hedgehog activity. *Development* 128: 2385–2396.
- Cheung, H.O.-L., Zhang, X., Ribeiro, A., Mo, R., Makino, S., Puvindran, V., Law, K.K.L. et al. 2009. The Kinesin Protein Kif7 Is a Critical Regulator of Gli Transcription Factors in Mammalian Hedgehog Signaling. *Sci. Signal.* 2: ra29-ra29.
- Chizhikov, V.V., Davenport, J., Zhang, Q., Shih, E.K., Cabello, O.A., Fuchs, J.L., Yoder, B.K., Millen, K.J. 2007. Cilia Proteins Control Cerebellar Morphogenesis by

- Promoting Expansion of the Granule Progenitor Pool. *Journal of Neuroscience* 27: 9780-9789.
- Choi, J.-H., Law, M.-Y., Chien, C.-B., Link, B.A., Wong, R.O. 2010. In vivo development of dendritic orientation in wild-type and mislocalized retinal ganglion cells. *Neural development* 5: 29.
- Christensen, S.T., Clement, C.A., Satir, P., Pedersen, L.B. 2012. Primary cilia and coordination of receptor tyrosine kinase (RTK) signalling. *The Journal of Pathology* 226: 172-184.
- Clark, B.S., Cui, S., Miesfeld, J.B., Klezovitch, O., Vasioukhin, V., Link, B.A. 2012. Loss of Llg1 in retinal neuroepithelia reveals links between apical domain size, Notch activity and neurogenesis. *Development* 139: 1599-1610.
- Conover, W.J., Iman, R.L. 1981. Rank Transformations as a Bridge Between Parametric and Nonparametric Statistics. *The American Statistician* 35: 124.
- Das, R.M., Storey, K.G. 2014. Apical Abscission Alters Cell Polarity and Dismantles the Primary Cilium During Neurogenesis. *Science* 343: 200-204.
- Davison, C. 2014. *Análisis ultraestructural de la cilia primaria durante la diferenciación neuronal en la retina del pez cebra (Danio rerio)*. Tesina de Grado. Universidad de la Republica, Uruguay.
- Del Bene, F., Wehman, A.M., Link, B.A., Baier, H. 2008. Regulation of Neurogenesis by Interkinetic Nuclear Migration through an Apical-Basal Notch Gradient. *Cell* 134: 1055-1065.
- Delaval, B., Bright, A., Lawson, N.D., Doxsey, S. 2011. The cilia protein IFT88 is required for spindle orientation in mitosis. *Nature Cell Biology* 13: 461-468.
- Delous, M., Hellman, N.E., Gaude, H.-M., Silbermann, F., Le Bivic, A., Salomon, R., Antignac, C., Saunier, S. 2009. Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6. *Human Molecular Genetics* 18: 4711-4723.
- Doerre, G., Malicki, J. 2002. Genetic analysis of photoreceptor cell development in the zebrafish retina. *Mechanisms of development* 110: 125-138.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., Banker, G.A. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 8: 1454-1468.
- Dubreuil, V., Marzesco, A.-M., Corbeil, D., Huttner, W.B., Wilsch-Bräuninger, M. 2007. Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *The Journal of Cell Biology* 176: 483-495.

- Duldulao, N.A., Lee, S., Sun, Z. 2009. Cilia localization is essential for in vivo functions of the Joubert syndrome protein Arl13b/Scorpion. *Development* 136: 4033-4042.
- Eisen, J.S., Smith, J.C. 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* 135: 1735-1743.
- van den Ent, F., Löwe, J. 2006. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 67: 67-74.
- Gabriel, E., Wason, A., Ramani, A., Gooi, L.M., Keller, P., Pozniakovsky, A., Poser, I. et al. 2016. CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. *The EMBO Journal* 35: 803-819.
- Garcia-Gonzalo, F.R., Reiter, J.F. 2017. Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9: a028134.
- Gazea, M., Tasouri, E., Tolve, M., Bosch, V., Kabanova, A., Gojak, C., Kurtulmus, B. et al. 2016. Primary cilia are critical for Sonic hedgehog-mediated dopaminergic neurogenesis in the embryonic midbrain. *Developmental Biology* 409: 55-71.
- Godinho, L. 2005. Targeting of amacrine cell neurites to appropriate synaptic laminae in the developing zebrafish retina. *Development* 132: 5069-5079.
- Goetz, S.C., Ocbina, P.J.R., Anderson, K.V. 2009. The primary cilium as a Hedgehog signal transduction machine. *Methods in cell biology* 94: 199-222.
- Gorojankina, T. 2016. Hedgehog signaling pathway: a novel model and molecular mechanisms of signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 1317-1332.
- Gotthardt, K., Lokaj, M., Koerner, C., Falk, N., Gieseler, A., Wittinghofer, A. 2015. A G-protein activation cascade from Arl13B to Arl3 and implications for ciliary targeting of lipidated proteins. *Elife* 4: e11859.
- Graw, J. 2010. Eye Development. En *Current Topics in Developmental Biology*, pp. 343-386. Elsevier.
- Guadiana, S.M., Semple-Rowland, S., Daroszewski, D., Madorsky, I., Breunig, J.J., Mykytyn, K., Sarkisian, M.R. 2013. Arborization of Dendrites by Developing Neocortical Neurons Is Dependent on Primary Cilia and Type 3 Adenylyl Cyclase. *Journal of Neuroscience* 33: 2626-2638.
- Gyda, M., Wolman, M., Lorent, K., Granato, M. 2012. The Tumor Suppressor Gene Retinoblastoma-1 Is Required for Retinotectal Development and Visual Function in Zebrafish. *PLoS Genetics* 8: e1003106.
- Halloran, M.C., Sato-Maeda, M., Warren, J.T., Su, F., Lele, Z., Krone, P.H., Kuwada, J.Y., Shoji, W. 2000. Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development* 127: 1953-1960.

- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: art.4:9pp.
- Han, Y.-G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J.-M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S., Alvarez-Buylla, A. 2008. Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nature Neuroscience* 11: 277-284.
- He, J., Zhang, G., Almeida, A.D., Cayouette, M., Simons, B.D., Harris, W.A. 2012. How Variable Clones Build an Invariant Retina. *Neuron* 75: 786-798.
- Higginbotham, H., Eom, T.-Y., Mariani, L.E., Bachleda, A., Hirt, J., Gukassyan, V., Cusack, C.L. et al. 2012. Arl13b in Primary Cilia Regulates the Migration and Placement of Interneurons in the Developing Cerebral Cortex. *Developmental Cell* 23: 925-938.
- Higginbotham, H., Guo, J., Yokota, Y., Umberger, N.L., Su, C.-Y., Li, J., Verma, N. et al. 2013. Arl13b-regulated cilia activities are essential for polarized radial glial scaffold formation. *Nature Neuroscience* 16: 1000-1007.
- Hinds, J.W., Hinds, P.L. 1974. Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: An electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Developmental Biology* 37: 381-416.
- Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., Wong, R.O.L. 2014. Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 42: 44-84.
- Hori, Y., Kobayashi, T., Kikko, Y., Kontani, K., Katada, T. 2008. Domain architecture of the atypical Arf-family GTPase Arl13b involved in cilia formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373: 119-124.
- Horndli, C.S., Chien, C.-B. 2012. Sonic hedgehog is indirectly required for intraretinal axon pathfinding by regulating chemokine expression in the optic stalk. *Development* 139: 2604-2613.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E. et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498-503.
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., Anderson, K.V. 2003. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426: 83-87.
- Humke, E.W., Dorn, K.V., Milenkovic, L., Scott, M.P., Rohatgi, R. 2010. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes & Development* 24: 670-682.

- Icha, J., Kunath, C., Rocha-Martins, M., Norden, C. 2016. Independent modes of ganglion cell translocation ensure correct lamination of the zebrafish retina. *The Journal of Cell Biology* 215: 259-275.
- Izawa, I., Goto, H., Kasahara, K., Inagaki, M. 2015. Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia* 4: 12.
- Jaffe, K.M., Thiberge, S.Y., Bisher, M.E., Burdine, R.D. 2010. Imaging Cilia in Zebrafish. En *Methods in Cell Biology*, pp. 415-435. Elsevier.
- Jin, D., Ni, T.T., Sun, J., Wan, H., Amack, J.D., Yu, G., Fleming, J. et al. 2014. Prostaglandin signalling regulates ciliogenesis by modulating intraflagellar transport. *Nature Cell Biology* 16: 841-851.
- Jusuf, P.R., Almeida, A.D., Randlett, O., Joubin, K., Poggi, L., Harris, W.A. 2011. Origin and Determination of Inhibitory Cell Lineages in the Vertebrate Retina. *Journal of Neuroscience* 31: 2549-2562.
- Kane, D.A., Kimmel, C.B. 1993. The zebrafish midblastula transition. *Development* 119: 447-456.
- Kang, G.M., Han, Y.M., Ko, H.W., Kim, J., Oh, B.C., Kwon, I., Kim, M.-S. 2015. Leptin Elongates Hypothalamic Neuronal Cilia via Transcriptional Regulation and Actin Destabilization. *Journal of Biological Chemistry* 290: 18146-18155.
- Karlstrom, R.O. 2003. Genetic analysis of zebrafish gli1 and gli2 reveals divergent requirements for gli genes in vertebrate development. *Development* 130: 1549-1564.
- Karlstrom, R.O., Trowe, T., Klostermann, S., Baier, H., Brand, M., Crawford, A.D., Grunewald, B. et al. 1996. Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Development* 123: 427-438.
- Kay, J.N., Finger-Baier, K.C., Roeser, T., Staub, W., Baier, H. 2001. Retinal Ganglion Cell Genesis Requires lakritz, a Zebrafish atonal Homolog. *Neuron* 30: 725-736.
- Keeling, J., Tsiokas, L., Maskey, D. 2016. Cellular Mechanisms of Ciliary Length Control. *Cells* 5: 6.
- Kent, W.J. 2002. BLAT—the BLAST-like alignment tool. *Genome research* 12: 656-664.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310.
- Kumamoto, N., Gu, Y., Wang, J., Janoschka, S., Takemaru, K.-I., Levine, J., Ge, S. 2012. A role for primary cilia in glutamatergic synaptic integration of adult-born neurons. *Nature Neuroscience* 15: 399-405.

- Kwan, K.M., Fujimoto, E., Grabher, C., Mangum, B.D., Hardy, M.E., Campbell, D.S., Parant, J.M. et al. 2007. The Tol2kit: A multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Developmental Dynamics* 236: 3088-3099.
- Laessing, U., Stuermer, C.A. 1996. Spatiotemporal pattern of retinal ganglion cell differentiation revealed by the expression of neurolin in embryonic zebrafish. *Journal of Neurobiology* 29: 65-74.
- Lee, J., Chung, Y.D. 2015. Ciliary subcompartments: how are they established and what are their functions? *BMB Reports* 48: 380-387.
- Lee, J.E., Gleeson, J.G. 2011. Cilia in the nervous system: linking cilia function and neurodevelopmental disorders. *Current opinion in neurology* 24: 98.
- Lele, Z., Engel, S., Krone, P.H. 1997. hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress-and tissue-specific manner in zebrafish embryos. *Developmental genetics* 21: 123–133.
- Lepanto, P., Davison, C., Casanova, G., Badano, J.L., Zolessi, F.R. 2016. Characterization of primary cilia during the differentiation of retinal ganglion cells in the zebrafish. *Neural Development* 11: 10.
- Li, A., Saito, M., Chuang, J.-Z., Tseng, Y.-Y., Dedesma, C., Tomizawa, K., Kaitsuka, T., Sung, C.-H. 2011. Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nature Cell Biology* 13: 402-411.
- Li, Z., Hu, M., Ochocinska, M.J., Joseph, N.M., Easter, S.S. 2000. Modulation of cell proliferation in the embryonic retina of zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Dynamics* 219: 391–401.
- Liang, Y., Meng, D., Zhu, B., Pan, J. 2016. Mechanism of ciliary disassembly. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 1787-1802.
- Locker, M., Agathocleous, M., Amato, M.A., Parain, K., Harris, W.A., Perron, M. 2006. Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes & Development* 20: 3036-3048.
- Malicki, J.J., Johnson, C.A. 2017. The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends in Cell Biology* 27: 126-140.
- Martinez-Morales, J.-R., Del Bene, F., Nica, G., Hammerschmidt, M., Bovolenta, P., Wittbrodt, J. 2005. Differentiation of the Vertebrate Retina Is Coordinated by an FGF Signaling Center. *Developmental Cell* 8: 565-574.
- Masai, I., Stemple, D.L., Okamoto, H., Wilson, S.W. 2000. Midline signals regulate retinal neurogenesis in zebrafish. *Neuron* 27: 251–263.

- Masai, I., Yamaguchi, M., Tonou-Fujimori, N., Komori, A., Okamoto, H. 2005. The hedgehog-PKA pathway regulates two distinct steps of the differentiation of retinal ganglion cells: the cell-cycle exit of retinoblasts and their neuronal maturation. *Development* 132: 1539-1553.
- Matthews, M., Varga, Z.M. 2012. Anesthesia and Euthanasia in Zebrafish. *ILAR Journal* 53: 192-204.
- May-Simera, H.L., Gumerson, J.D., Gao, C., Campos, M., Cologna, S.M., Beyer, T., Boldt, K. et al. 2016. Loss of MACF1 Abolishes Ciliogenesis and Disrupts Apicobasal Polarity Establishment in the Retina. *Cell Reports* 17: 1399-1413.
- Meijering, E., Dzyubachyk, O., Smal, I. 2012. Chapter nine - Methods for Cell and Particle Tracking. En conn, P. M. (ed.), *Methods in Enzymology, Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells* Optical and Spectroscopic Techniques, pp. 183-200. Academic Press.
- Milla, L.A., Cortés, C.R., Hodar, C., Oñate, M.G., Cambiazo, V., Burgess, S.M., Palma, V. 2012. Yeast-based assay identifies novel Shh/Gli target genes in vertebrate development. *BMC genomics* 13: 2.
- Mitchison, H.M., Valente, E.M. 2017. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes: Motile and non-motile ciliopathies. *The Journal of Pathology* 241: 294-309.
- Mockel, A., Perdomo, Y., Stutzmann, F., Letsch, J., Marion, V., Dollfus, H. 2011. Retinal dystrophy in Bardet–Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies. *Progress in Retinal and Eye Research* 30: 258-274.
- Mumm, J.S., Williams, P.R., Godinho, L., Koerber, A., Pittman, A.J., Roeser, T., Chien, C.-B. et al. 2006. In vivo imaging reveals dendritic targeting of laminated afferents by zebrafish retinal ganglion cells. *Neuron* 52: 609-621.
- Nachury, M.V. 2014. How do cilia organize signalling cascades? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369: 20130465-20130465.
- Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peränen, J., Merdes, A., Slusarski, D.C. et al. 2007. A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell* 129: 1201-1213.
- Nager, A.R., Goldstein, J.S., Herranz-Pérez, V., Portran, D., Ye, F., Garcia-Verdugo, J.M., Nachury, M.V. 2017. An Actin Network Dispatches Ciliary GPCRs into Extracellular Vesicles to Modulate Signaling. *Cell* 168: 252-263.e14.
- Neumann, C.J., Nusslein-Volhard, C. 2000. Patterning of the Zebrafish Retina by a Wave of Sonic Hedgehog Activity. *Science* 289: 2137-2139.

- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., Hirokawa, N. 1998. Randomization of left–right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95: 829–837.
- Oh, E.C., Katsanis, N. 2013. Context-Dependent Regulation of Wnt Signaling through the Primary Cilium. *Journal of the American Society of Nephrology* 24: 10-18.
- Ohnuma, S., Hopper, S., Wang, K.C., Philpott, A., Harris, W.A. 2002. Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development* 129: 2435–2446.
- Ollion, J., Cochenec, J., Loll, F., Escudé, C., Boudier, T. 2013. TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* 29: 1840-1841.
- Omori, Y., Zhao, C., Saras, A., Mukhopadhyay, S., Kim, W., Furukawa, T., Sengupta, P. et al. 2008. elipsa is an early determinant of ciliogenesis that links the IFT particle to membrane-associated small GTPase Rab8. *Nature Cell Biology* 10: 437-444.
- Paolini, A., Duchemin, A.-L., Albadri, S., Patzel, E., Bornhorst, D., Gonzalez Avalos, P., Lemke, S. et al. 2015. Asymmetric inheritance of the apical domain and self-renewal of retinal ganglion cell progenitors depend on Anillin function. *Development* 142: 832-839.
- Paridaen, J.T.M.L., Wilsch-Bräuninger, M., Huttner, W.B. 2013. Asymmetric Inheritance of Centrosome-Associated Primary Cilium Membrane Directs Ciliogenesis after Cell Division. *Cell* 155: 333-344.
- Pedersen, L.B., Mogensen, J.B., Christensen, S.T. 2016. Endocytic Control of Cellular Signaling at the Primary Cilium. *Trends in Biochemical Sciences* 41: 784-797.
- Piotrowska-Nitsche, K., Caspary, T. 2012. Live imaging of individual cell divisions in mouse neuroepithelium shows asymmetry in cilium formation and Sonic hedgehog response. *Cilia* 1: 6.
- Poggi, L., Vitorino, M., Masai, I., Harris, W.A. 2005. Influences on neural lineage and mode of division in the zebrafish retina in vivo. *The Journal of Cell Biology* 171: 991-999.
- Poretti, A., Boltshauser, E., Loenneker, T., Valente, E.M., Brancati, F., Il'Yasov, K., Huisman, T.A.G.M. 2007. Diffusion Tensor Imaging in Joubert Syndrome. *American Journal of Neuroradiology* 28: 1929-1933.
- Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P.E., Zolessi, F.R. 2014. A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and Cell Biology* 142: 335-345.

- Prodromou, N.V., Thompson, C.L., Osborn, D.P.S., Cogger, K.F., Ashworth, R., Knight, M.M., Beales, P.L., Chapple, J.P. 2012. Heat shock induces rapid resorption of primary cilia. *Journal of Cell Science* 125: 4297-4305.
- Prykhozhij, S.V. 2010. In the Absence of Sonic Hedgehog, p53 Induces Apoptosis and Inhibits Retinal Cell Proliferation, Cell-Cycle Exit and Differentiation in Zebrafish. *PLoS ONE* 5: e13549.
- Pujic, Z., Malicki, J. 2004. Retinal pattern and the genetic basis of its formation in zebrafish. En *Seminars in cell & developmental biology*, pp. 105–114.
- Randlett, O., Norden, C., Harris, W.A. 2011. The vertebrate retina: A model for neuronal polarization in vivo. *Developmental Neurobiology* 71: 567-583.
- Randlett, O., Poggi, L., Zolessi, F.R., Harris, W.A. 2011. The Oriented Emergence of Axons from Retinal Ganglion Cells Is Directed by Laminin Contact In Vivo. *Neuron* 70: 266-280.
- Robbins, D.J., Fei, D.L., Riobo, N.A. 2012. The hedgehog signal transduction network. *Science signaling* 5: re6.
- Robu, M.E., Larson, J.D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S.A., Ekker, S.C. 2007. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet* 3: e78.
- Rozycki, M., Lodyga, M., Lam, J., Miranda, M.Z., Fátýol, K., Speight, P., Kapus, A. 2014. The fate of the primary cilium during myofibroblast transition. *Molecular biology of the cell* 25: 643–657.
- Sanchez-Camacho, C., Bovolenta, P. 2008. Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* 135: 3531-3541.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S. et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9: 676-682.
- Schmitt, E.A., Dowling, J.E. 1999. Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: light and electron microscopic analyses. *Journal of Comparative Neurology* 404: 515–536.
- Schuhmacher, L.-N., Albadri, S., Ramialison, M., Poggi, L. 2011. Evolutionary relationships and diversification of barhl genes within retinal cell lineages. *BMC evolutionary biology* 11: 340.
- Shen, M.-C., Ozacar, A.T., Osgood, M., Boeras, C., Pink, J., Thomas, J., Kohtz, J.D., Karlstrom, R. 2013. Heat-shock-mediated conditional regulation of hedgehog/gli signaling in zebrafish: Regulation of Zebrafish Hedgehog/Gli Signaling. *Developmental Dynamics* 242: 539-549.

- Shen, Y., Raymond, P.A. 2004. Zebrafish cone-rod (*crx*) homeobox gene promotes retinogenesis. *Developmental Biology* 269: 237-251.
- Shkumatava, A. 2004. Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina. *Development* 131: 3849-3858.
- Shkumatava, A., Neumann, C.J. 2005. Shh directs cell-cycle exit by activating p57Kip2 in the zebrafish retina. *EMBO reports* 6: 563-569.
- Sokal, R., Rohlf, J. 1979. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. 1.^a ed. H. Blume.
- Spassky, N., Han, Y.-G., Aguilar, A., Strehl, L., Besse, L., Laclef, C., Romaguera Ros, M. et al. 2008. Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Developmental Biology* 317: 246-259.
- Spear, P.C., Erickson, C.A. 2012. Apical movement during interkinetic nuclear migration is a two-step process. *Developmental Biology* 370: 33-41.
- Stadler, J.A., Shkumatava, A., Neumann, C.J. 2005. The Role of Hedgehog Signaling in the Development of the Zebrafish Visual System. *Developmental Neuroscience* 26: 346-351.
- Stenkamp, D.L. 2015. Development of the Vertebrate Eye and Retina. En *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pp. 397-414. Elsevier.
- Stenkamp, D.L., Frey, R.A., Prabhudesai, S.N., Raymond, P.A. 2000. Function for Hedgehog Genes in Zebrafish Retinal Development. *Developmental Biology* 220: 238-252.
- Sukumaran, S., Perkins, B.D. 2009. Early defects in photoreceptor outer segment morphogenesis in zebrafish *ift57*, *ift88* and *ift172* Intraflagellar Transport mutants. *Vision Research* 49: 479-489.
- Sung, C.-H., Leroux, M.R. 2013. The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking. *Nature cell biology* 15: 1387-1397.
- Szymczak-Workman, A.L., Vignali, K.M., Vignali, D.A.A. 2012. Design and Construction of 2A Peptide-Linked Multicistronic Vectors. *Cold Spring Harbor Protocols* 2012: pdb.ip067876-pdb.ip067876.
- Takao, D., Verhey, K.J. 2016. Gated entry into the ciliary compartment. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 119-127.
- Taschner, M., Lorentzen, E. 2016. The Intraflagellar Transport Machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8: a028092.

- Taverna, E., Götz, M., Huttner, W.B. 2014. The Cell Biology of Neurogenesis: Toward an Understanding of the Development and Evolution of the Neocortex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30: 465-502.
- Torrado, B., Graña, M., Badano, J.L., Irigoín, F. 2016. Ciliary Entry of the Hedgehog Transcriptional Activator Gli2 Is Mediated by the Nuclear Import Machinery but Differs from Nuclear Transport in Being Imp- α/β 1-Independent. *PLOS ONE* 11: e0162033.
- Tsujikawa, M., Malicki, J. 2004. Intraflagellar transport genes are essential for differentiation and survival of vertebrate sensory neurons. *Neuron* 42: 703–716.
- Tyurina, O.V., Guner, B., Popova, E., Feng, J., Schier, A.F., Kohtz, J.D., Karlstrom, R.O. 2005. Zebrafish Gli3 functions as both an activator and a repressor in Hedgehog signaling. *Developmental Biology* 277: 537-556.
- Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R., Peleg, Y. 2010. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology* 172: 34-44.
- Wallace, V.A. 2008. Proliferative and cell fate effects of Hedgehog signaling in the vertebrate retina. *Brain Research* 1192: 61-75.
- Wang, X., Zhao, Z., Muller, J., Iyu, A., Khng, A.J., Guccione, E., Ruan, Y., Ingham, P.W. 2013. Targeted inactivation and identification of targets of the Gli2a transcription factor in the zebrafish. *Biology Open* 2: 1203-1213.
- Wang, Y., Dakubo, G., Thurig, S., Mazerolle, C.J., Wallace, V.A. 2005. Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development* 132: 5103-5113.
- Waters, A.M., Beales, P.L. 2011. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatric Nephrology* 26: 1039-1056.
- Whewey, G., Parry, D.A., Johnson, C.A. 2014. The role of primary cilia in the development and disease of the retina. *Organogenesis* 10: 69-85.
- Willaredt, M.A., Hasenpusch-Theil, K., Gardner, H.A.R., Kitanovic, I., Hirschfeld-Warneken, V.C., Gojak, C.P., Gorgas, K. et al. 2008. A Crucial Role for Primary Cilia in Cortical Morphogenesis. *Journal of Neuroscience* 28: 12887-12900.
- Wilsch-Brauninger, M., Peters, J., Paridaen, J.T.M.L., Huttner, W.B. 2012. Basolateral rather than apical primary cilia on neuroepithelial cells committed to delamination. *Development* 139: 95-105.
- Wilson, S.L., Wilson, J.P., Wang, C., Wang, B., McConnell, S.K. 2012. Primary cilia and Gli3 activity regulate cerebral cortical size. *Developmental Neurobiology* 72: 1196-1212.

- Wong, G.K.W., Baudet, M.-L., Norden, C., Leung, L., Harris, W.A. 2012. Slit1b-Robo3 Signaling and N-Cadherin Regulate Apical Process Retraction in Developing Retinal Ganglion Cells. *Journal of Neuroscience* 32: 223-228.
- Xing, L., Quist, T.S., Stevenson, T.J., Dahlem, T.J., Bonkowsky, J.L. 2014. Rapid and Efficient Zebrafish Genotyping Using PCR with High-resolution Melt Analysis. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*51138.
- Yan, X., Zhu, X. 2013. Branched F-actin as a negative regulator of cilia formation. *Experimental Cell Research* 319: 147-151.
- Yeh, C., Li, A., Chuang, J.-Z., Saito, M., Cáceres, A., Sung, C.-H. 2013. IGF-1 Activates a Cilium-Localized Noncanonical G β γ Signaling Pathway that Regulates Cell-Cycle Progression. *Developmental Cell* 26: 358-368.
- Yu, I., Garnham, C.P., Roll-Mecak, A. 2015. Writing and Reading the Tubulin Code. *Journal of Biological Chemistry* 290: 17163-17172.
- Zolessi, F.R. 2016. Vertebrate Neurogenesis: Cell Polarity. En John Wiley & Sons Ltd (ed.), *eLS*, pp. 1-14. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Zolessi, F.R., Poggi, L., Wilkinson, C.J., Chien, C.-B., Harris, W.A. 2006. Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo. *Neural development* 1: 2.

Glosario

Arl13b / Arl13b-GFP / Arl13b(1-190): GTPasa pequeña que se localiza en la membrana de la cilia primaria y que está involucrada en el transporte de proteínas hacia la membrana ciliar. Arl13b-GFP denota la proteína Arl13b fusionada a GFP y Arl13(1-190) indica el dominio N-terminal entre los aminoácidos 1 y 190.

atoh7: región promotora de la transcripción del factor Atoh7. Este factor se expresa en progenitores neuronales de la retina durante su último ciclo celular y en células ganglionares de la retina.

barhl1.2: región promotora de la transcripción del factor Barhl1.2. Esta proteína se expresa en un subgrupo de células ganglionares de la retina.

crx: región promotora de la transcripción del factor Crx, que se expresa en células bipolares y fotorreceptores

DMSO: dimetilsulfóxido

EGFP-CAAX: versión de EGFP fusionada en C terminal con 21 aminoácidos que codifican una señal de prenilación, lo que permite la asociación del EGFP a la membrana plasmática

Elipsa: proteína relacionada al transporte intraflagelar anterógrado que media la interacción entre la partícula de IFT y la GTPasa Rab8 de membrana

elipsa-BT / *elipsa*-BS: morfolinós dirigidos a inhibir la traducción (-BT) o el splicing (-BS) del pre-ARNm codificante para Elipsa.

gap-GFP / gap-mRFP: GFP o mRFP fusionadas en N-terminal a la señal de palmitilación de la proteína GAP43 (gap).

Gal4: proteína que contiene el dominio de unión al ADN de Gal4 fusionado al dominio de transactivación de la transcripción VP16 [413-470].

Gli1-EGFP: factor transcripcional Gli1 fusionado a EGFP en C terminal

Gli2DR: versión truncada del factor transcripcional Gli2 que actúa como un represor no regulable de la transcripción

hsp70I / hsp: región promotora del gen Hsp70I. El gen *hsp70* presenta muy baja expresión a 28.5 °C pero se induce al incubar los embriones a 37 °C (shock térmico)

IFT: *intraflagellar transport* - transporte intraflagelar

IFT88: proteína involucrada en el transporte intraflagelar anterógrado, compuesta por dominios TRP que permiten su interacción con otras proteínas.

ift88-BT / *ift88*-BS: morfolinós dirigidos a inhibir la traducción (-BT) o el splicing (-BS) del pre-ARNm codificante para Ift88.

P2A: péptido viral que da lugar a un evento de *ribosomal skipping* en C-terminal de esta secuencia

Patched: proteína de membrana que actúa como receptor de la molécula de señalización extracelular Sonic Hedgehog

ptf1: promotor del factor transcripcional Ptf1 cuya expresión es requerida para la formación de células amácrinas y horizontales

Rab8A: Rab8A es una GTPasa pequeña que participa en el tráfico de vesículas hacia la base de la cilia y que por lo tanto es requerida para su formación

Rab8A[T22N]: proteína Rab8A con una mutación de una treonina en la posición 22 ([T22N]). Esta variante de la proteína permanece unida a GDP y es incapaz de entrar a la cilia

SAG: droga que actúa como agonista de la proteína Smoothened

Smoothened: proteína de membrana que participa en la transducción de señales de la vía de Sonic Hedgehog

Sonic Hedgehog (Shh): proteína de secreción que funciona en la comunicación intercelular a corta y larga distancia

SP6: promotor utilizado para síntesis de ARNm *in vitro* a partir de la polimerasa de ARN SP6

UAS: promotor conteniendo 10 elementos de respuesta a Gal4 (*Gal4 upstream activating sequence*).

ANEXO I

Los videos se pueden ver utilizando el programa Quick Time Player. En todos los casos mostramos proyecciones en 3D de la intensidad máxima y el tiempo está expresado en h:min. cp: cilia primaria; ax: axón; pa: proceso apical.

Video 1 (relacionado a la figura 7A). En este video observamos un progenitor (asterisco) que expresa gap-RFP antes y durante la mitosis. Al inicio del video se puede observar una cilia primaria marcada con Arl13b-GFP en el extremo apical del progenitor. La cilia dejó de ser visible momentos antes de que el progenitor se redondee (fase M del ciclo) y reapareció luego de finalizada la división celular.

Video 2 (relacionado a la figura 7B). En este video observamos una CGR en diferenciación (asterisco) desde momentos previos al desprendimiento de la superficie del neuroepitelio, hasta el inicio de la extensión de filopodios previo a la formación de las dendritas. Esta célula ya presentaba un axón al inicio de la adquisición. Pudimos observar una cilia primaria previo al desprendimiento, durante la retracción del proceso apical y en las primeras etapas de la dendritogénesis.

Video 3 (relacionado a la figura 7C). Este video muestra una CGR en diferenciación (asterisco) desde momentos previos al desprendimiento de la superficie del neuroepitelio hasta el final de la retracción del proceso apical. En el panel de la derecha mostramos el canal de Arl13b-GFP, mientras que en el de la izquierda se trata de la imagen compuesta del canal de Arl13b-GFP y gap-RFP. Momentos antes de que la célula se desprendiera de la superficie del neuroepitelio, la cilia primaria comenzó a desplazarse en dirección basal

Video 4 (relacionado a la figura 9A). En este caso observamos una CGR en diferenciación (asterisco) durante la retracción del proceso apical hasta el inicio de la formación de filopodios (>). Observamos una cilia primaria en el extremo del proceso apical, que deja

de ser visible luego de finalizada la retracción y reaparece en posición apical cuando la célula comienza a extender filopodios.

Video 5 (relacionado a la figura 9C). En este video mostramos una CGR en diferenciación (asterisco) que se encuentra posicionada en la región basal del neuroepitelio y presenta un axón al inicio de la adquisición. La observamos hasta el inicio de la formación de las dendritas. La cilia primaria es muy dinámica al inicio del video, pero se ubica en la región apical de la célula previo al inicio de la formación de las dendritas (>).

Video 6 y 7 (relacionados a la figura 15A). Imágenes de células que expresan gap-RFP provenientes de un embrión inyectado con morfolino control, en la retina de un embrión de la línea *atoh7:gap-GFP*. Las células del donante se incorporaron normalmente a la capa de CGR del receptor.

Video 8 (relacionado a la figura 15B). Imágenes de células que expresan gap-RFP provenientes de un embrión inyectado con los morfolinios *elipsa-BS/ift88-BS*, en la retina de un embrión de la línea *atoh7:gap-GFP*. Algunas de las células del donante se incorporaron normalmente a la capa de CGR del receptor, pero otras permanecieron por fuera durante el período de adquisición.

Video 9 (relacionado a la figura 15C). En éste video observamos células que expresan gap-GFP provenientes de un embrión sin inyectar. El embrión receptor de la línea *atoh7:gap-RFP* fue inyectado con *elipsa-BS/ift88-BS*. Las células que expresan gap-GFP (>) diferencian antes que las células gap-RFP en la misma región de la retina (»).

Video 10 (relacionado a la figura 15D). En este caso observamos un grupo grande de células que expresan gap-GFP provenientes de un embrión sin inyectar, que se desarrollan en la retina de un embrión de la línea *atoh7:gap-RFP* inyectado con *elipsa-BS/ift88-BS*. Las células del donante sobrepasan en número a las células del receptor.

Video 11 (relacionado a la figura 17D). En la parte superior mostramos videos de la retina de embriones SoFa1 inyectados con morfolino control o *elipsa-BS/ift88-BS*. En las gráficas se observa el perfil de intensidad de cada fluoróforo a través de la retina y cómo cambia a medida que pasa el tiempo.

Video 12 (relacionado a la figura 18A). Serie de imágenes a lo largo del tiempo en donde mostramos una CGR en diferenciación en un embrión inyectado con morfolino control. El punto azul indica el centro del soma, la flecha verde el inicio del crecimiento axonal y la localización del cono de crecimiento, y la flecha magenta indica el extremo del proceso apical durante la retracción.

Videos 13 y 14 (relacionados a las figuras 18B y C). En estos videos observamos CGR en diferenciación en un embrión inyectado con *elipsa-BS/ift88-BS*. El punto azul indica el centro del soma, la flecha verde el inicio del crecimiento axonal y la localización del cono de crecimiento, y la flecha magenta indica el extremo del proceso apical durante la retracción.