

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas – Área Biología  
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, subárea Biología  
Celular y Molecular

*Rol de la cilia primaria en la diferenciación de  
fotorreceptores de la retina en el pez cebra  
(Danio rerio)*

Lic. Magela Rodao

Director de tesis: Dr. Flavio Zolessi

Co-director de tesis: Dr. José Badano

Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias; Laboratorio de Biología  
Celular del Desarrollo Neural y Laboratorio de Genética Molecular  
Humana, Institut Pasteur de Montevideo.

Tribunal

Presidenta: Dra. Anabel Fernández

Vocales: Dra. Inés Carrera y Dr. Andrés Kamaid

## Contenidos

Resumen .....	4
I. Introducción	
♦ Organización y morfogénesis de la retina .....	5
♦ Neurogénesis en la retina .....	9
♦ Estructura y diferenciación de los fotorreceptores .....	13
♦ Estructura y dinámica de las cilias primarias .....	16
♦ Funciones de las cilias primarias en el desarrollo del sistema .....	19
II. Hipótesis .....	
Objetivos .....	23
III. Materiales y Métodos	
♦ Mantenimiento de peces adultos .....	24
♦ Líneas de peces .....	24
♦ Obtención y mantenimiento de embriones .....	26
♦ Inyección de embriones .....	26
♦ Generación de construcciones y líneas transgénicas .....	27
♦ Oligómeros de Morfolino .....	28
♦ Inmunofluorescencia .....	32
♦ Observación de embriones <i>in vivo</i> .....	33
♦ Microscopía electrónica de transmisión .....	34
♦ Microscopía electrónica de barrido .....	35
♦ Análisis de datos .....	36

IV. Resultados	
A - Análisis de presencia de cilia en precursores tempranos de fotorreceptores .....	38
B - Análisis ultraestructural de cilias en el borde apical del neuroepitelio .....	47
C - Función de las cilias primarias en el desarrollo de fotorreceptores .....	61
V. Discusión	
♦ Presencia, estructura y dinámica de las cilias primarias en la región apical de la retina .....	75
♦ Función de las cilias primarias en la diferenciación de los fotorreceptores .....	80
VI. Conclusiones .....	85
VII. Referencias .....	86
VIII. Anexo I .....	98
IX. Agradecimientos .....	99

## **Abreviaturas**

RGC: célula ganglionar de la retina

DAB: diaminobencidina

hpf: horas post-fecundación

IFT: transporte intraflagelar

INL: capa nuclear interna

IPL: capa plexiforme interna

IS: segmento interno

MEB: microscopía electrónica de barrido

MET: microscopía electrónica de transmisión

MO: Oligómero de morfolino

NE: neuroepitelio

ONL: capa nuclear externa

OPL: capa plexiforme externa

OS: segmento externo

RPE: epitelio pigmentario de la retina

RPC: célula progenitora de la retina

## Resumen

Los fotorreceptores son células particulares que presentan características tanto de células epiteliales como de neuronas. Al igual que otras células del sistema nervioso central, son células altamente polarizadas y presentan dominios morfológicos muy desarrollados. Presentan en su dominio apical el segmento externo encargado de realizar la fototransducción y en su dominio basal un terminal sináptico que contacta con células bipolares y horizontales. El segmento externo destaca por ser una especialización apical conformada por una cilia modificada altamente especializada. Las células neuroepiteliales, progenitoras de las células del sistema nervioso central, también presentan polaridad celular marcada, con especializaciones en su membrana apical. Entre estas especializaciones, encontramos a las cilias primarias, organelos dinámicos, con estructura axonémica 9+0, presentes en casi todas las células de los vertebrados. Consideradas antenas celulares, las cilias primarias funcionan como sensores de señales extracelulares y su disfunción genera una gran variedad de enfermedades que se agrupan bajo el término ciliopatías.

En este trabajo caracterizamos la presencia, dinámica y función de las cilias primarias en las primeras etapas del desarrollo y el establecimiento de la polaridad de los fotorreceptores en la retina del pez cebra. Mediante el doble marcado fluorescente de cilias y precursores de fotorreceptores utilizando microscopía láser confocal, observamos que los progenitores tempranos y los fotorreceptores en diferenciación temprana presentan una pequeña cilia primaria de localización apical. Su presencia disminuye progresivamente a medida que la retina se desarrolla, pero reaparece en la capa de fotorreceptores durante las etapas finales de su diferenciación. Mediante microscopía electrónica, caracterizamos estas cilias en las primeras etapas de desarrollo de los fotorreceptores destacándose la ausencia o poca profundidad del bolsillo ciliar y una disminución de su longitud en las etapas posteriores de diferenciación. Finalmente, analizamos su función en el desarrollo de fotorreceptores mediante el uso de oligómeros de morfolino. La interrupción de genes necesarios para la ciliogénesis resultó en una modificación del comportamiento dinámico de los progenitores de fotorreceptores durante la retracción del proceso basal.

## Introducción

### Organización y morfogénesis de la retina

El ojo de los vertebrados es estructural y funcionalmente similar en muchas especies de este subfilo y se compone de varios tejidos, entre los que se destaca la retina neural. La retina es el único componente del ojo que forma parte del sistema nervioso central y es responsable de convertir las señales de luz del entorno en impulsos nerviosos que son enviados al cerebro. Está constituida por cinco tipos neuronales y un tipo de célula glial que se organizan en forma laminar resultando en una estructura muy conservada entre los vertebrados. En la región apical de la retina encontramos la capa de fotorreceptores, compuesta de los segmentos internos y externos de estas células en estrecho contacto con el epitelio pigmentario de la retina (RPE), mientras que sus núcleos se ubican en la capa nuclear externa (ONL). Los cuerpos de las células bipolares, horizontales, amacrinas y de la glía de Müller, conforman la capa nuclear interna (INL). Las células ganglionares de la retina constituyen la capa más basal y proyectan sus axones hacia el cerebro, formando primero los nervios ópticos y luego los tractos ópticos que contactan con el tectum. Además, la retina presenta dos capas de conexiones sinápticas, la capa plexiforme externa (OPL) donde los fotorreceptores contactan con las células bipolares y horizontales, y la capa plexiforme interna (IPL) en la que encontramos las conexiones entre células bipolares, amacrinas y ganglionares de la retina. La glía de Müller, además de ser el único tipo celular no neuronal, es también el único que permanece unido tanto a la lámina basal como a la región apical en la membrana limitante externa (OLM). En esta región fotorreceptores y glía se unen entre sí mediante complejos de unión apicales (Fig. 1).

Los principales tipos celulares presentes en la retina pueden a su vez clasificarse en subtipos según sus características morfológicas y/o funcionales. Dentro de los fotorreceptores, encontramos dos tipos: los conos y los bastones. Los bastones, presentan el fotorreceptor en discos membranosos separados de la membrana celular, mientras que los conos, presentan el fotorreceptor ubicado en invaginaciones de la membrana celular. Además, si bien todos los fotorreceptores

tienen la función de convertir la energía lumínica en impulsos nerviosos, conos y bastones presentan diferencias funcionales. Por ejemplo, los bastones presentan mayor sensibilidad a la luz que los conos, pero presentan una menor capacidad de resolución temporal y espacial. Los conos, por otro lado, permiten la percepción de colores.

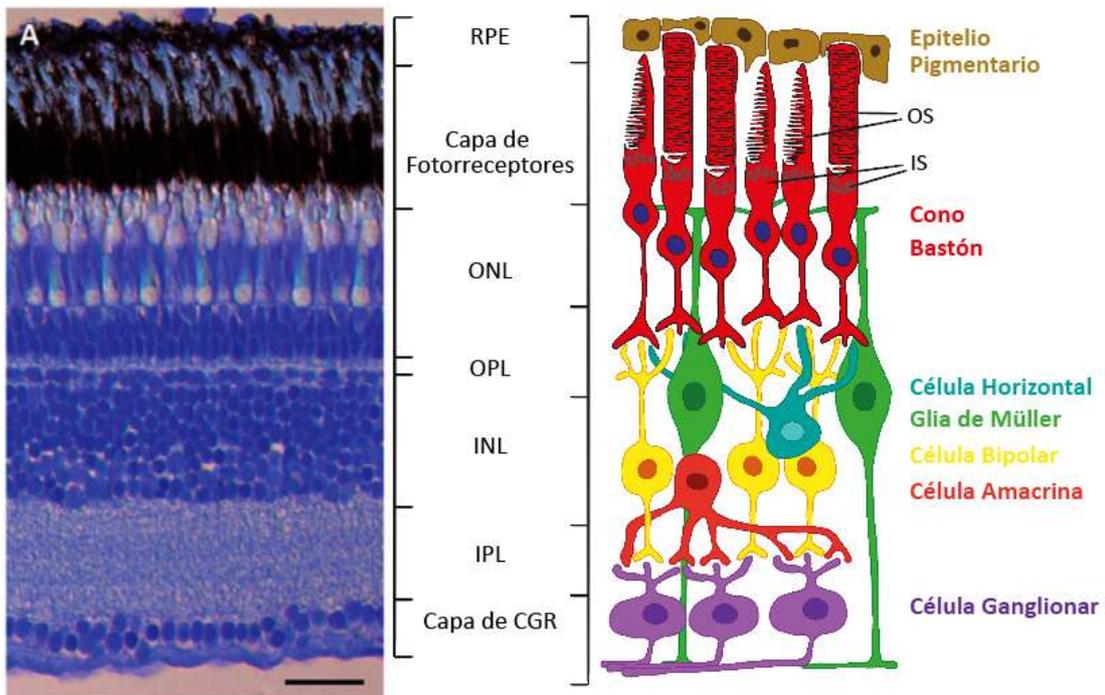


Fig. 1 – Estructura de la retina del pez cebra.

A la izquierda una sección transversal de la retina de pez cebra adulto y a la derecha un diagrama simplificado de la misma. En ambos se observan las diferentes capas de la retina, todas las células que la componen y las capas de conexiones sinápticas. Es notoria su estructura laminar, que en orden apical a basal está formada por: el RPE con el cual están en estrecho contacto los segmentos externos (OS) de los fotorreceptores; la región de segmentos internos (IS) de los fotorreceptores; la capa nuclear externa (ONL), formada por los cuerpos celulares de conos y bastones; la capa plexiforme externa (OPL), donde se encuentran los contactos sinápticos de fotorreceptores con células horizontales y bipolares; la capa nuclear interna (INL), donde se ubican los cuerpos celulares de las células bipolares, amacrinas, horizontales y glía de Müller; la capa plexiforme interna (IPL), región de sinapsis entre RGCs, amacrinas y bipolares; y en

la región más basal de la retina encontramos la capa de RGCs. Barra de escala = 25  $\mu$ m.

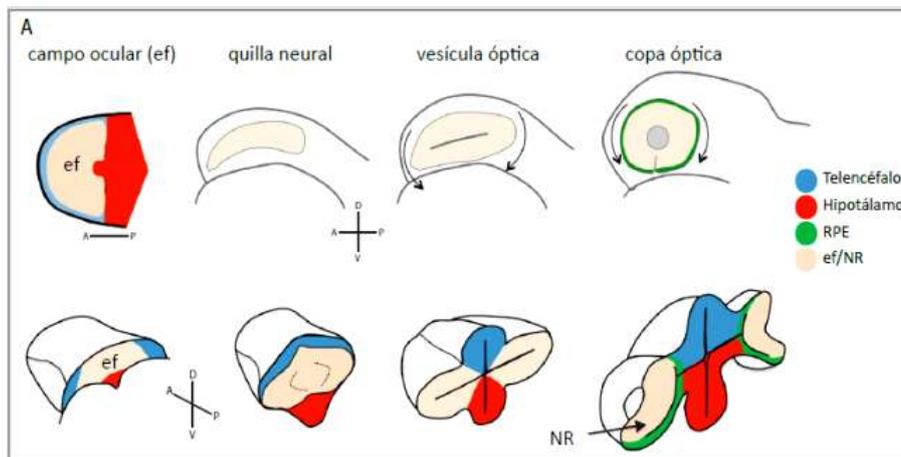
Modificado de Gramage, Li y Hitchcock 2014.

---

A su vez, existen varios subtipos de conos y se clasifican según la longitud de onda en la que presentan el pico máximo de absorción. Por otro lado, las células bipolares se presentan en dos subtipos funcionales: bipolares ON, que despolarizan y bipolares OFF, que se hiperpolarizan con aumentos de la intensidad de la luz. Los bastones contactan sólo con células bipolares ON, mientras que los conos contactan con ambos subtipos. Por su parte, las células amacrinas, encargadas de modular la excitación de las células ganglionares mediante inhibición, pueden ser gabaérgicas o glicinérgicas (Hoon et al. 2014). Además, se han caracterizado al menos 11 tipos de células ganglionares de la retina en el pez cebra según diferencias morfológicas, entre las que encontramos tamaño y ramificaciones de las dendritas así como su extensión en la IPL (Mangrum, Dowling y Cohen 2002).

El desarrollo de la retina también está conservado entre los vertebrados, con algunas diferencias entre grupos que surgen, principalmente, por variaciones en el mecanismo de neurulación. En los teleósteos, la formación de la retina se inicia a partir de la quilla neural, una barra sólida de células que se forma a partir de la placa neural y que luego cavitará para dar un tubo neural (Fig. 2A). Los primordios del ojo se forman como dos protuberancias que evaginan, también sólidas, hacia las 12 horas post-fecundación (hpf). Inicialmente, los primordios ópticos sobresalen a ambos lados del cerebro anterior como dos lóbulos aplanados; hacia las 13 hpf la parte posterior de cada lóbulo comienza a separarse del cerebro, mientras que la parte anterior permanece unida dando lugar al tallo óptico. A continuación, el lóbulo comienza a girar levemente sobre su eje antero-posterior, la región que estaba en dorsal ahora estará en la superficie y dará lugar a la retina neural, mientras que la que se encontraba en la región ventral dará lugar al epitelio pigmentario de la retina (RPE). Aproximadamente a las 15 hpf empieza a invaginarse la región lateral y se forma la fisura coroidea, comenzando así la formación de la copa óptica (Fig. 2B)

(Schmitt y Dowling 1994). Mientras tanto, el ectodermo que recubre la región invaginada comienza a engrosarse para formar el primordio del cristalino. A las 24 hpf la copa óptica se ha formado completamente, de manera que podemos distinguir el epitelio pigmentario de la retina, que ya presenta unos pocos gránulos de melanina y el neuroepitelio que formará la retina neural.



**B**

12 hpf		masa sólida de células continua con la quilla neural
16 hpf		separación del cerebro en la región posterior y rotación en el eje antero-posterior
18 hpf		invaginación y formación de la fisura coroidea comienzo de la formación del primordio del cristalino
24 hpf		formación de la copa óptica, aumento en la densidad de células y comienzo de la rotación ocular
36 hpf		rotación del ojo completada

Fig. 2 – Morfogénesis de la retina de teleósteos.

A) Representación esquemática de la formación de la retina neural (NR). La especificación del campo ocular (ef) se produce en la porción anterior de la placa neural, a medida que se forma la quilla neural el tejido se reorganiza y luego evaginan las vesículas ópticas que posteriormente se pliegan sobre sí mismas, generando las copas ópticas. El esquema superior izquierdo es una vista desde dorsal en la que anterior (A) está a la izquierda. T: temporal, D: dorsal, V: ventral. Modificado de Cavodeassi 2018.

B) Se muestra un esquema más detallado de la formación de la copa óptica. Modificado de Bibliowicz, Tittle y Gross 2011.

---

### **Neurogénesis en la retina**

Inicialmente, el neuroepitelio está formado por una única capa pseudoestratificada en la que todas las células contactan con la región apical y la lámina basal. Las células neuroepiteliales presentan una marcada polaridad ápico-basal con presencia de complejos apicales, tales como los complejos de Par3, Crumbs y Scribble y especializaciones de membrana, como la cilia primaria (Zolessi 2016). El mantenimiento de esta polaridad es esencial para la proliferación de las células progenitoras retinianas (RPCs) así como para la organización final de la retina y una de sus manifestaciones clave es la migración nuclear intercinética (Baye y Link 2008; Sauer 1936). Este mecanismo consiste en movimientos estereotipados de los núcleos de las células neuroepiteliales a lo largo del eje ápico-basal a medida que transcurre su ciclo celular (Fig. 3). De esta manera, los núcleos que se mueven de basal a apical están en la etapa G2, la fase S transcurre en el lado basal del neuroepitelio y la mitosis ocurre exclusivamente en la región apical, al menos hasta las 36 hpf (Weber et al. 2014; Zolessi 2016). Es a través de este mecanismo de migración nuclear que el neuroepitelio prolifera y las células progenitoras de la retina sufrirán sucesivas mitosis hasta el comienzo de su diferenciación. Durante este período se producen cambios en la duración de los ciclos celulares a medida que avanza la neurogénesis, al inicio se vuelven más cortos hasta alcanzar un pico de proliferación para luego

descender rápidamente cuando las células comienzan a salir del ciclo celular (He et al. 2012).

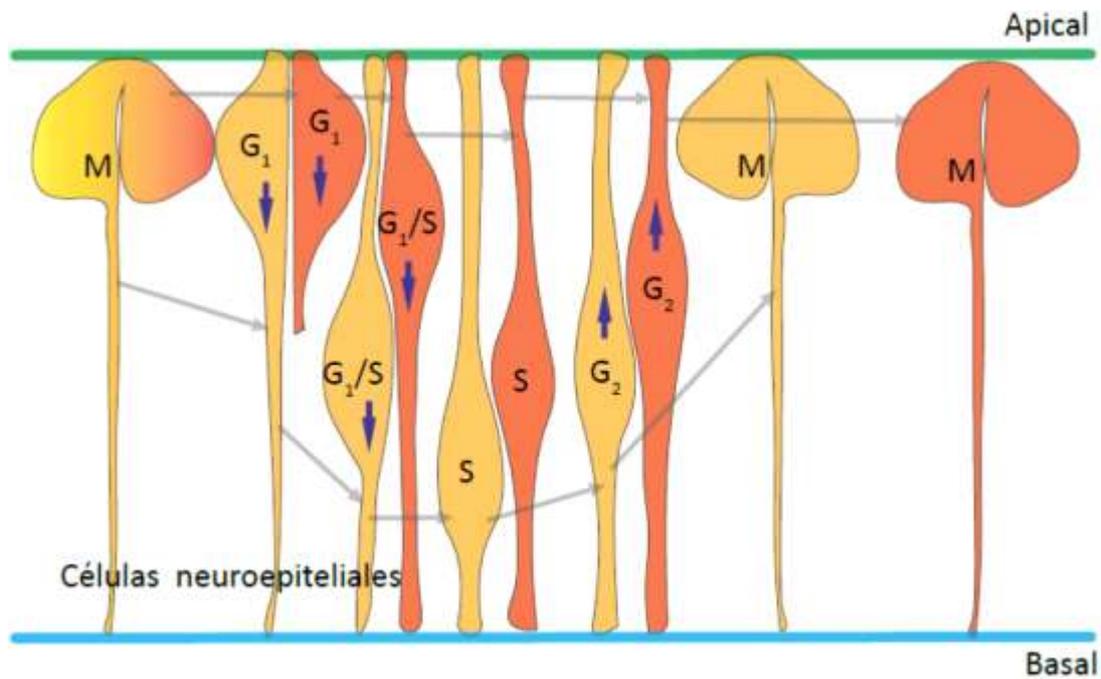


Fig. 3 – Migración nuclear intercinética.

Diagrama esquemático del mecanismo de proliferación de las células neuroepiteliales. A la izquierda observamos una célula en división ubicada en la región apical del neuroepitelio y unida por un fino proceso a la región basal. A continuación, las células hijas translocan sus núcleos hacia la región basal del neuroepitelio durante las etapas G<sub>1</sub> y S. Cuando se ha duplicado el ADN, durante la etapa G<sub>2</sub>, los núcleos son translocados nuevamente hacia la región apical. Finalmente, es en esta región donde se realiza de nuevo la división celular (M: mitosis). Este mecanismo estereotipado se repite para todas las células hasta que se dividen por última vez. Modificado de Zolessi 2016.

Se ha identificado una red centrada en al menos cuatro factores de transcripción que están involucrados en la generación de la diversidad celular en la retina (Fig. 4A). En etapas tempranas todas las células precursoras de la retina expresan *vsx2*, pero a medida que avanza el desarrollo la expresión de *vsx2* disminuye en la mayoría de

ellas, lo que da paso a la expresión de los factores de transcripción *atoh7*, *ptf1a* o *vsx1*, que influyen en el destino que adquirirán estas células (Fig. 4B) (Boije et al. 2015). Por otro lado, un factor extrínseco clave en el inicio de la neurogénesis es la señal de FGF (Factor de crecimiento de fibroblastos); específicamente las proteínas FGF8 y FGF3 son secretadas desde el tallo óptico y que es necesaria para la generación de las células ganglionares (Martinez-Morales et al. 2005). A continuación, las mismas células ganglionares comienzan a producir Shh (Sonic hedgehog) (Neumann 2001), luego lo hacen las amacrinas y más tarde el RPE promoviendo de esta manera la propagación de la onda de diferenciación (Stenkamp 2007). Recientemente se han descrito seis linajes neurogénicos principales de células progenitoras retinianas tardías que generan los distintos tipos y subtipos de neuronas que componen la retina del pez cebra (Wang et al. 2020).

En esta especie, el nacimiento de neuronas comienza a las 28 hpf en la capa de células ganglionares (Hu y Easter 1999), en una zona de la retina llamada “parche ventro-nasal”, que se encuentra en la región ventral en el lado nasal a la fisura coroidea, y a medida que avanza la diferenciación se extiende hacia la zona dorsal y la periferia (Schmitt y Dowling 1996) (Fig. 5A). A las 72 hpf pueden distinguirse todas las capas que forman la retina madura. Si bien algunos estudios previos muestran que el nacimiento de las neuronas de la retina se da por capas desde basal a apical, siguiendo un orden estereotipado (Hu y Easter 1999), investigaciones recientes apuntan a que el nacimiento de varios tipos celulares se da de manera simultánea en pequeñas regiones de la retina y al parecer éstas posteriormente encuentran sus posiciones correctas mediante interacciones con sus vecinas (Almeida et al. 2014).

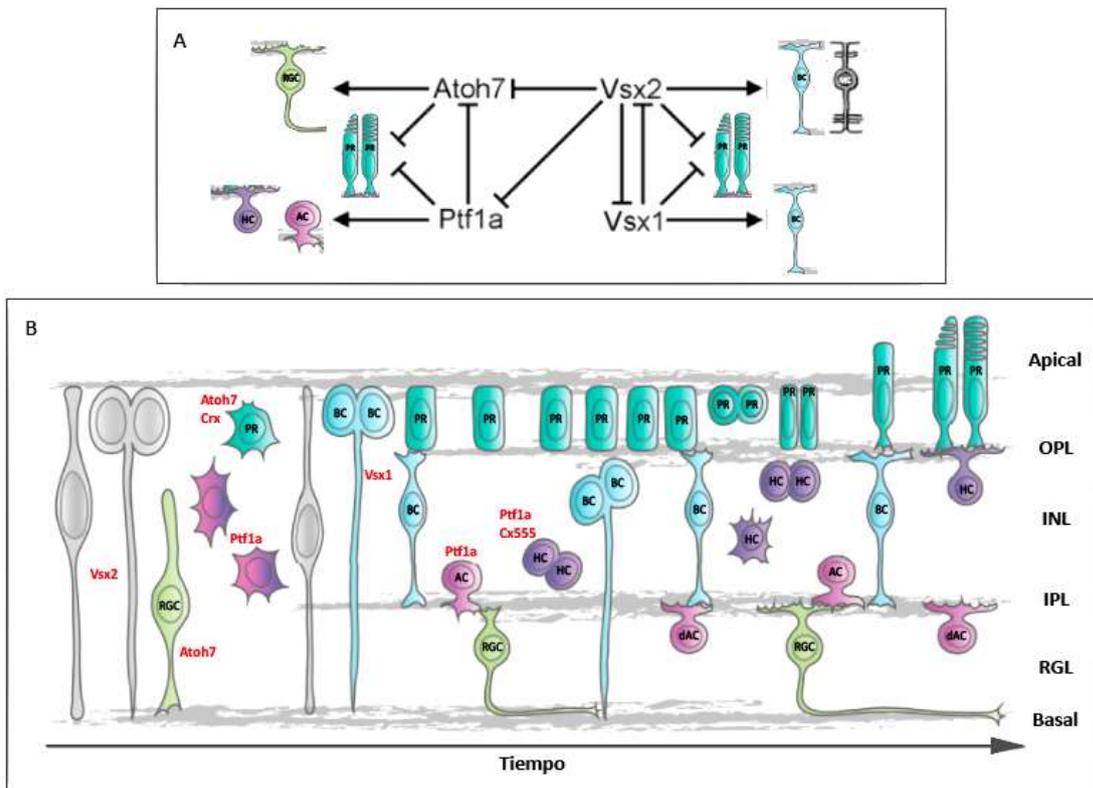


Fig. 4 – Generación de diversidad celular en la retina del pez cebrá.

A) Cuatro factores de transcripción (Atoh7, Ptf1a, Vsx1 y Vsx2) resultan clave para la generación de los distintos tipos celulares. Modificado de Boije et al. 2015.

B) Diagrama representativo de la retinogénesis. A medida que avanza el desarrollo podemos observar la formación de las distintas capas y la generación de la diversidad neuronal bajo la influencia de varios factores de transcripción. Inicialmente, todos los progenitores expresan Vsx2, luego su expresión disminuye en muchas de ellas y comienza la expresión de otros factores: *atoh7* se expresa fuertemente en aquellas que se convertirán en RGCs y más levemente y en combinación con Crx en progenitores de fotorreceptores, Ptf1a se expresa en aquellas células que se convertirán en amacrinas y horizontales, finalmente *vsx1* se expresa en progenitores de bipolares. Modificado de Weber et al. 2014.

OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; CGL: capa de células ganglionares; AC: célula amacrina; BC: célula bipolar; HC: célula horizontal; MC: glía de Müller; PR: fotorreceptor; RGC: célula ganglionar. En todos los casos las siglas pueden hacer referencia tanto a células diferenciadas como a sus progenitores especificados.

## Estructura y diferenciación de fotorreceptores

Como se mencionó anteriormente, en la retina del pez cebra encontramos dos tipos de fotorreceptores: conos y bastones. Si bien los bastones son de un único tipo, los conos se dividen en cuatro subtipos espectrales, según el pico máximo de absorción que posee la opsina que expresan: rojos (570 nm), verdes (480 nm), azules (415 nm) y ultravioletas (362 nm) (Chinen et al. 2003).

Los fotorreceptores presentan una región apical constituida por el segmento externo y el segmento interno, ambos unidos por un cilio conector; uniones de tipo adherentes con las células vecinas a nivel de la membrana limitante externa y una porción basal que presenta un axón que contacta con las interneuronas en la capa plexiforme externa. Es claro que tanto conos como bastones son células altamente polarizadas que presentan características de neuronas y de células epiteliales (Fig. 5B). El segmento externo es una cilia modificada, que consiste en sacos membranosos apilados donde sucede la fototransducción. En su base se conecta al segmento interno, una región rica en mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático, necesarios para sintetizar proteínas y abastecer la gran demanda del segmento externo. El pasaje desde el segmento interno hasta el segmento externo de todas estas moléculas está fuertemente regulado y sucede a través del estrecho cilio conector que los une. Entre el segmento interno y el axón se ubica el cuerpo celular que contiene al núcleo. En su lado más basal, el axón los conecta con células bipolares y horizontales en la capa plexiforme externa. La retina de muchos teleósteos, incluido el pez cebra, presenta una disposición en mosaico, con unidades repetidas muy ordenadas de los distintos subtipos de conos (Raymond y Barthel 2004).

Hacia las 25 hpf, cuando todas las células de la retina aún están proliferando, algunas de ellas ubicadas en el parche ventral comienzan a expresar *atoh7*, un factor de transcripción fuertemente expresado por progenitores que sufrirán su última división para generar células ganglionares. Su expresión se da en forma de abanico y se anticipa a la ola de diferenciación celular (Masai et al. 2000). En el pez cebra, aquellas células que lo expresan se dividen en la región apical de la retina y

posteriormente una de las hijas se desprende del lado apical para, finalmente, ubicarse en la región basal y diferenciarse en célula ganglionar (Poggi et al. 2005). La segunda célula hija permanece unida a la región apical y dará lugar a dos fotorreceptores (Wang et al. 2020). La expresión de *atoh7* se produce, aunque más débilmente, en progenitores de fotorreceptores, y como se mostró para ratones, éste induce la expresión de NeuroD en la vía de generación de fotorreceptores (Ma et al. 2004). Hacia las 31 hpf un grupo de estas células en el parche ventro-nasal comienza a expresar *crx*, otro factor de transcripción expresado en progenitores de fotorreceptores (Liu et al. 2001). Más tarde, se expresará el factor de transcripción *tbx2b* necesario para la génesis de los conos (Suzuki et al. 2013) o *Nr2e3* que parece ser un factor de transcripción clave en la génesis de bastones (Nelson et al. 2008).

Luego de su especificación, aquellas células que generarán fotorreceptores se desprenden de la lámina basal, translocan su núcleo hacia la región apical y retraen rápidamente su proceso basal (Aparicio et al. 2021; Suzuki et al. 2013). A medida que van poblando la región apical de la retina y esbozando una capa nuclear externa, proyectan largos procesos tangenciales dinámicos en su lado apical y un poco más tarde, alrededor de las 48 hpf, se puede detectar una primera división celular (Aparicio et al. 2021). Estas células comienzan a expresar opsinas a las 50 hpf, primero en los bastones y poco después en conos (Raymond, Barthel y Curran 1995). Sufren una segunda y última división recién hacia las 60 hpf (Weber et al. 2014), momento en que comienza su diferenciación y comienzan a generarse los primeros segmentos externos (Crespo y Knust 2018; Kljavin 1987). A diferencia de otras neuronas de la retina, la mayoría de los fotorreceptores nacen (se vuelven post-mitóticos) de divisiones simétricas y estas divisiones suceden en la capa nuclear externa donde residirá la célula diferenciada (Suzuki et al. 2013). Por lo tanto, aunque estas células son especificadas muy tempranamente, su nacimiento parece ocurrir varias horas más tarde, luego de posicionarse, polarizar, perder contacto con la lámina basal y volverse morfológicamente distinguibles del resto de los precursores (Aparicio et al. 2021; Crespo y Knust 2018) (Fig. 4B). Todo este proceso se inicia en el parche ventro-nasal y se extiende siguiendo una onda de diferenciación hacia la región dorsal (Fig. 5A).

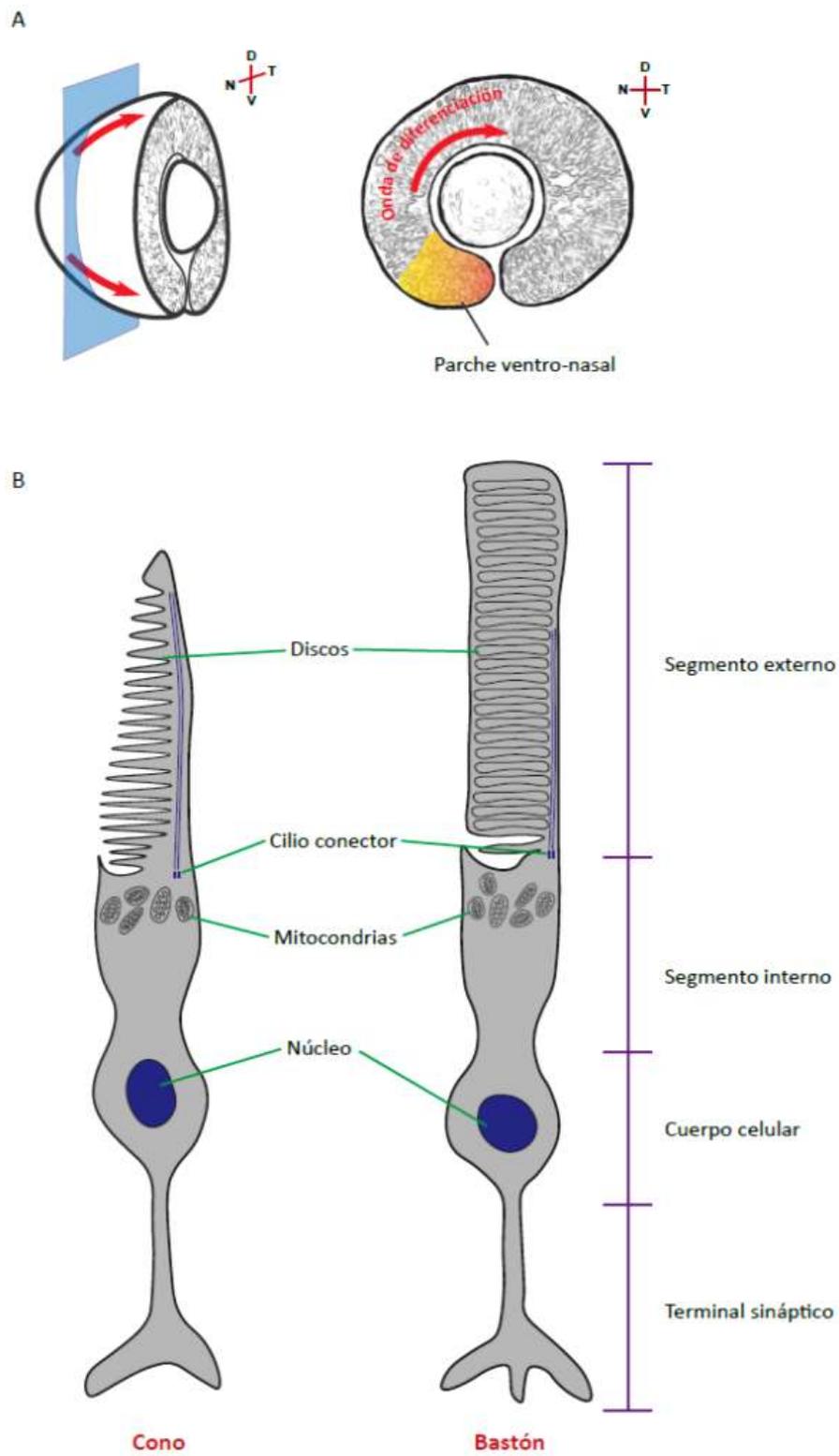


Fig. 5 – Diferenciación y estructura de los fotorreceptores.

A) Esquema que muestra la onda de diferenciación de los fotorreceptores en la retina en desarrollo del pez cebra. A la izquierda se observa un diagrama tridimensional del ojo

con un corte parasagital representado a la derecha. En él se indican el parche ventro-nasal, región de la retina donde nacen las primeras neuronas y el sentido que sigue la onda de diferenciación, que va desde ventral hasta dorsal y hacia la periferia (flechas rojas). N: nasal, T: temporal, D: dorsal, V: ventral.

B) Los fotorreceptores maduros son células sumamente polarizadas presentando un axón en la región basal y una cilia modificada en la región apical. En ellos se reconocen cuatro regiones morfológica y funcionalmente distinguibles: el segmento externo, el segmento interno, el cuerpo celular y el terminal sináptico. Las diferencias morfológicas entre conos y bastones también son muy claras, por ejemplo, los bastones presentan los fotopigmentos en discos membranosos que están rodeados por la membrana plasmática mientras que el segmento externo de los conos presenta invaginaciones de la membrana plasmática en donde se encuentra el fotopigmento.

---

### **Estructura y dinámica de las cilias primarias**

Las cilias primarias son pequeños organelos presentes en la gran mayoría de las células. Están formadas por un axonema de microtúbulos unidos al cuerpo basal que, a diferencia de las cilias móviles, generalmente carece de par central de microtúbulos y de brazos de dineína por lo que suelen ser inmóviles. Su configuración axonémica es, por lo tanto, de 9+0 (nueve dobletes periféricos de microtúbulos sin par central) (Rosenbaum y Witman 2002) (Fig. 6). La cilia primaria es un organelo dinámico que se elonga o reabsorbe según la fase del ciclo celular debido a que el cuerpo basal se forma a partir de uno de los centriolos (centriolo madre) del centrosoma, pero durante la división celular estas estructuras organizan el uso mitótico. Durante la fase S se produce la duplicación semi-conservativa de los centriolos, de modo que durante la fase M ambas células hijas heredarán un par de centriolos compuesto por un centriolo madre o maduro (derivado del par original) y un centriolo hijo (generado en la fase S previa división). La dinámica ciliar se corresponde entonces con las funciones de los centriolos: la cilia se encuentra presente en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y al inicio de la fase S pero al final de esta fase se desensambla y se duplican los centriolos que luego forman el huso mitótico (Irigoin y Badano 2011).

Como mencionamos antes, el cuerpo basal está formado por el centriolo madre, conservando su estructura de nueve tripletes de microtúbulos sin par central (9+0) al que se le anexan varias proteínas que formarán los apéndices distales y subdistales (Malicki y Johnson 2017). Los nueve dobletes de microtúbulos que forman el axonema ciliar se generan mediante el alargamiento de los microtúbulos A y B del cuerpo basal. La membrana ciliar que envuelve al axonema en toda su longitud es continua con la de la célula pero presenta dominios especializados (Fig. 6) y el tráfico de moléculas desde y hacia la cilia está fuertemente regulado en la zona de transición. Esta zona, localizada en la base de la cilia, está formada por fibras de transición, proteínas Y-linkers y un collar ciliar, y oficia de barrera selectiva excluyendo vesículas e impidiendo la difusión de proteínas y lípidos entre la cilia y el resto de la célula. En algunas células la membrana de la base ciliar se invagina formando el bolsillo ciliar, una región que se ha vinculado a la regulación del tráfico vesicular y la actividad endocítica (Molla-Herman et al. 2010) (Fig. 6).

Existen dos vías principales para la ciliogénesis, llamadas extracelular e intracelular. En la primera, el centrosoma migra hasta la superficie celular, una vez allí el centriolo madre se ancla a la membrana plasmática a través de las fibras de transición para transformarse en el cuerpo basal que sirve de molde para la nucleación de los microtúbulos, luego se forma la zona de transición y finalmente se pone en marcha la maquinaria de transporte intraflagelar (ver a continuación). En la vía intracelular, vesículas preciliares se unen al extremo distal del cuerpo basal mediante los apéndices distales, formando una vesícula ciliar en la que aparece la zona de transición y luego se da la extensión del axonema. Finalmente la vesícula ciliar se fusiona con la membrana plasmática y la membrana de la vesícula forma el bolsillo ciliar (Breslow y Holland 2019; Sorokin 1968). La presencia o ausencia de bolsillo, así como su forma, varían enormemente de un tipo celular a otro, incluso su profundidad varía dentro de un mismo tipo celular. De modo general, la presencia de bolsillo ciliar está asociada a una ciliogénesis por vía intracelular, como sucede en fibroblastos y precursores neuronales. Por otro lado, la vía extracelular que tiene lugar en células epiteliales polarizadas, genera cilias primarias sin bolsillo y que

aparentemente funcionan como sensores de flujo, como sucede en el riñón y el pulmón (Benmerah 2013).

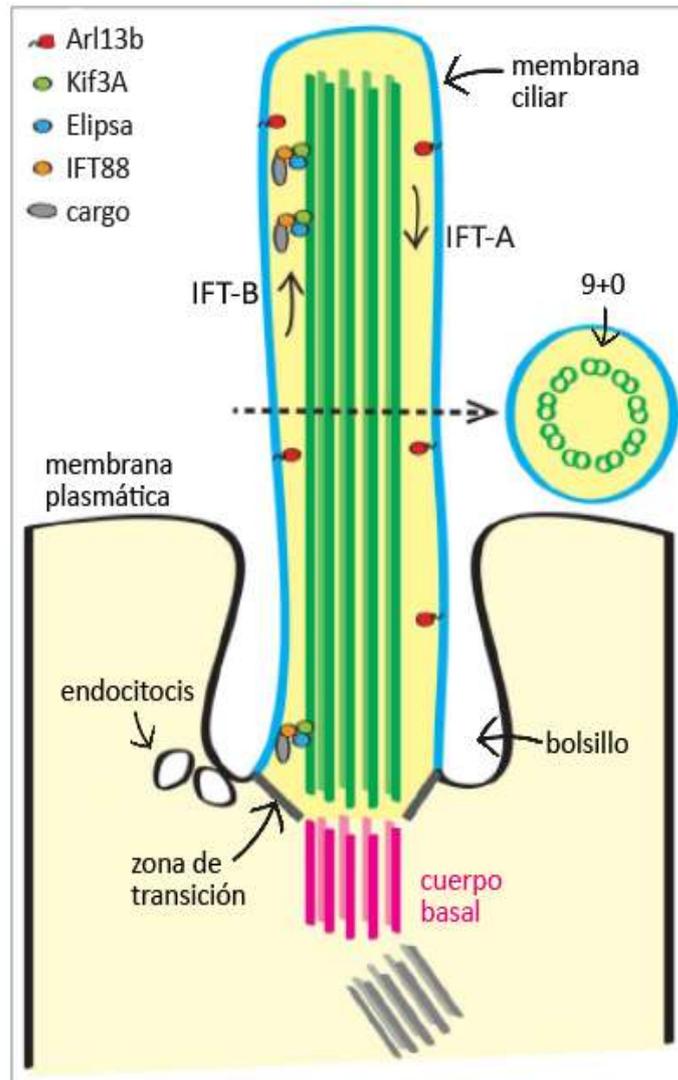


Fig. 6 – Estructura de las cilia primarias.

Diagrama de una cilia primaria y sus principales componentes. Se muestran las principales características de las cilia primarias de células neuroepiteliales. El axonema presenta una estructura 9+0 y se encuentra anclado al cuerpo basal (en magenta), a su vez, éste se encuentra unido a la membrana basal mediante las fibras de transición que forman parte de la zona de transición, región donde se regula el pasaje de moléculas hacia la cilia tanto a nivel del citoplasma como de la membrana plasmática. Esta barrera de difusión permite una composición especializada de la membrana ciliar (en azul claro),

a pesar de que es continua con la plasmática. Se detallan algunas de las proteínas que forman parte del complejo IFT-B y por lo tanto participan en el transporte anterógrado. También observamos el bolsillo ciliar y las vesículas endocíticas asociadas a él. Modificado de Lepanto, Badano y Zolessi 2016.

---

El transporte de moléculas desde y hacia la cilia se realiza mediante un mecanismo denominado transporte intraflagelar (IFT), que consiste en los complejos IFT-A e IFT-B, sumado a motores moleculares y otras proteínas accesorias. El transporte desde la base hasta la punta de la cilia (anterógrado) es realizado por el complejo IFT-B asociado a la proteína motora Kinesina-II, mientras que el transporte hacia el cuerpo basal (retrógrado) es realizado por IFT-A asociado a Dineína 2. El tráfico de proteínas citosólicas a través de la zona de transición puede ser pasivo o activo dependiendo del tamaño molecular (Breslow et al. 2013; Rosenbaum y Witman 2002). IFT-A media la entrada constitutiva mientras que el BBSoma junto con el complejo IFT-B participan en la salida regulada de receptores acoplados a proteínas G (Nachury 2018).

### **Funciones de las ciliarias primarias en el desarrollo del sistema nervioso**

Las ciliarias primarias se consideran “antenas” celulares a través de las cuales se reciben y emiten una gran cantidad de señales que controlan procesos vinculados al desarrollo embrionario, homeostasis tisular y señalización sensorial. La señalización se produce tanto por vía vesicular como por receptores moleculares anclados a la membrana ciliar. La ausencia de las ciliarias primarias o su mal funcionamiento genera defectos en muchos procesos biológicos, afectando particularmente el desarrollo embrionario. Mutaciones en genes necesarios para el mantenimiento de la estructura y función ciliar así como para su formación, causan un conjunto de trastornos genéticos denominados ciliopatías. En humanos se han descrito al menos 34 ciliopatías que se caracterizan, entre otras manifestaciones

fenotípicas, por anomalías en el SNC, disfunción renal, degeneración de la retina y obesidad (Malicki y Johnson 2017).

Se piensa que la señalización a través de la cilia se ve favorecida por la gran relación área de superficie/volumen que permitiría generar rápidamente una alta concentración de segundos mensajeros con un número relativamente pequeño de receptores en la superficie (Nachury 2014). Además, los complejos IFT pueden participar directamente de la transducción de señales (Wang, Pan y Snell 2006).

Algunas de las vías de señalización que operan a través de la cilia son Wnt (*wingless-type MMTV integration site*), mTor (*mechanistic target of rapamycin*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*), Notch y Hh (Hedgehog). De ellas, la que ha sido más estudiada es la vía de Shh, una proteína de secreción que participa de la comunicación celular y tiene una función destacada durante el desarrollo, fundamentalmente durante el desarrollo del SNC y en particular de la retina como se mencionó antes. La señalización por Shh requiere la unión a su receptor de membrana Ptch (Patched). En ausencia de Shh, Ptch está presente en la membrana ciliar e inhibe la inserción de Smo (Smoothened). En este contexto los factores Gli están unidos a SuFu y son degradados. En presencia de Shh, éste se une a Ptch inactivándolo, permitiendo entonces que Smo se inserte en la membrana reprimiendo a SuFu, lo que produce la liberación de los factores Gli que ingresan en el núcleo y actúan activando la transcripción de genes blanco (Gorojankina 2016). Los genes blanco regulados por Gli incluyen aquellos que regulan la vía de Shh, la proliferación y la apoptosis. Esta vía es esencial durante el desarrollo embrionario, especialmente del sistema nervioso por ejemplo en la determinación espacial del neuroepitelio y la guía axonal (Park, Jang y Lee 2019).

Las cilias primarias cumplen funciones esenciales durante el desarrollo del sistema nervioso (Lepanto, Badano y Zolessi 2016) y gran parte de las observaciones han surgido de investigaciones realizadas en ratones. Está bien establecido que las cilias y la señalización de la vía Shh participan en la morfogénesis del prosencéfalo, ya que la pérdida de *Ttc21b* (gen que codifica para Ift139, una molécula que participa en el IFT retrógrado) produce defectos en los patrones dorso-ventral y rostro-caudal

(Stottmann et al. 2009). También es conocida su participación en la diferenciación y migración de las células de la corteza como se vio mediante *knockdown* de genes ciliares (*Ift88* y *Kif3a*) que produjo además retrasos en el ciclo celular y defectos en la migración nuclear intercinética (Chen, Chang y Tsai 2019) o en interneuronas en las que la delección de *Arl13b* (que codifica una GTPasa necesaria para el mantenimiento de la cilia y está ubicada específicamente en ella) afectó su migración hacia la placa cortical. La cilia primaria resulta fundamental también para el mantenimiento de la polaridad ápico-basal, como se pudo observar en ratones mutantes para *Arl13b*, en los que la glía radial presentó inversión completa de la polaridad durante el desarrollo cortical (Higginbotham et al. 2013).

Estudios recientes muestran que en el pez cebra, las células neuroepiteliales presentan una cilia primaria en su lado apical que resulta necesaria para la supervivencia y proliferación de las células progenitoras de la retina y para la generación de las células ganglionares de la retina (Lepanto et al. 2016). Durante las etapas iniciales de su diferenciación, las RGCs presentan una cilia primaria que, en la mayoría de los casos, se pierde poco antes del desprendimiento apical para volver a ensamblarse una vez que la retracción del proceso apical comenzó. Además, la cilia puede permanecer en la superficie apical de la célula ganglionar incluso una vez que ha comenzado el crecimiento axonal y dendrítico (Fig. 7). La interrupción de genes necesarios para la generación y mantenimiento de la cilia (*ift88* y *elipsa*) no sólo produjo una disminución general en la proliferación celular, sino que provocó una reducción en la proliferación de las células ganglionares concomitantemente con un aumento de la proporción de fotorreceptores (Lepanto et al. 2016). Además, Lepanto y colaboradores demostraron que existe una disminución natural en la longitud de la cilia a medida que avanza la neurogénesis.

Numerosos reportes en la literatura describen variadas funciones de la cilia primaria durante el desarrollo del sistema nervioso entre las que destacan: el balance entre proliferación y diferenciación, la migración celular y el mantenimiento de la polaridad celular. Por ello, determinar la presencia de cilias primarias en los diferentes tipos celulares es una parte sustancial en la comprensión del desarrollo del sistema nervioso. Específicamente, en este trabajo de tesis, nos enfocamos en el análisis de la

presencia y función de la cilia primaria en los progenitores de fotorreceptores, lo que nos permitirá acercarnos a una mejor comprensión de las etapas iniciales del desarrollo de la retina.

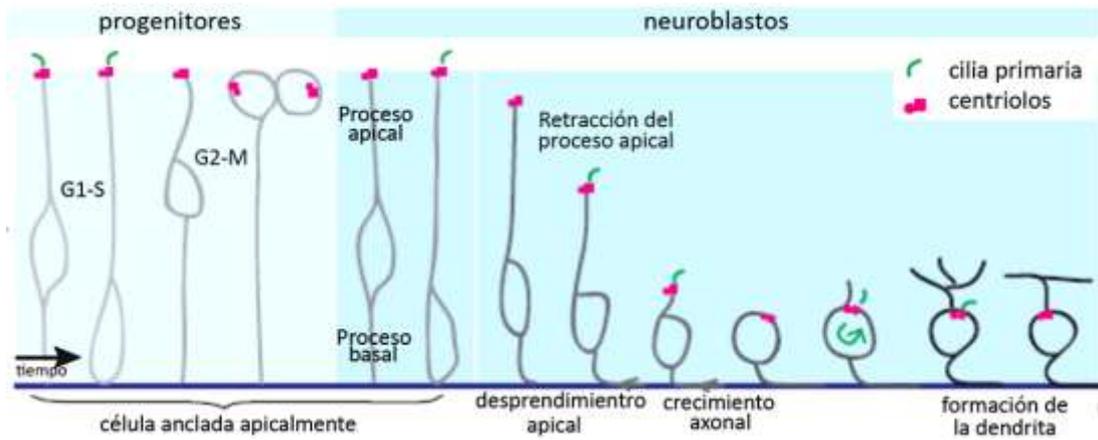


Fig. 7 – Cilia primaria en el neuroepitelio de la retina de pez cebra.

Esquema del comportamiento de la cilia primaria presente en progenitores retinianos y en las etapas iniciales de diferenciación de las RGCs. Las células neuroepiteliales presentan una cilia primaria en su región apical que es reabsorbida durante la división celular. En aquellos progenitores que darán lugar a RGCs, la cilia primaria puede presentar dos comportamientos distintos. En la mayoría de los casos, la cilia se desensambla momentos antes de que se produzca el desprendimiento apical de la RGC y vuelve a ensamblarse durante la retracción del proceso apical. En otros casos, la cilia puede permanecer en la superficie celular durante todo ese proceso. Modificado de Lepanto et al. 2016.

## **Hipótesis**

La cilia primaria está presente en las células progenitoras de fotorreceptores de la retina del pez cebra y tiene una función en las etapas tempranas de la diferenciación de fotorreceptores.

## **Objetivos**

### Objetivo general

Caracterización de cilias primarias de fotorreceptores en diferenciación y análisis de su posible función durante el desarrollo de este tipo celular en el embrión de pez cebra.

### Objetivos específicos

- 1- Análisis de la presencia y distribución de cilias primarias en precursores de fotorreceptores y fotorreceptores en diferenciación.
- 2- Caracterización morfológica de las cilias primarias de fotorreceptores en diferenciación.
- 3- Evaluación del efecto funcional de la disrupción de la cilia primaria en los fotorreceptores en diferenciación.

## **Materiales y métodos**

### Mantenimiento de peces adultos

Para este trabajo se utilizaron embriones de pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental. El mantenimiento de los adultos se realizó en los sistema ZebTec Stand Alone o Active Blue de Tecniplast (Italia), con agua a 28 °C, pH7.5 y conductividad de aproximadamente 800  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Se mantuvo controlada la concentración de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  (máximo 0.5 ppm),  $\text{NO}_2$  (máximo 0.25 ppm) y  $\text{NO}_3$  (máximo 50 ppm). El ciclo luz:oscuridad fue de 14:10 h. La alimentación fue a base de comida seca (TetraMin en escamas; Tetra, Alemania) dos veces por día y viva (larvas nauplio de *Artemia salina* de 24-48 h post-eclosión) una vez por día. Para la manipulación de los adultos se siguió el protocolo aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales de Institut Pasteur de Montevideo (CEUA), y se cuenta con la acreditación personal otorgada por CHEA.

### Líneas de peces

Las líneas de peces utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

Línea salvaje:

- *Tab5*

Línea generada por Nancy Hopkins y Adam Amsterdam (Center of Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA) mediante el cruce de individuos AB y Tübingen. La línea Tab5 presenta buena fecundidad, ausencia de mutaciones letales embrionarias y un equilibrio bastante uniforme entre los dos sexos.

Líneas transgénicas:

- *Tg(actb2:Arl13b-GFP) hsc5* (Borovina et al. 2010).

Línea que expresa la proteína de fusión Arl13b-GFP bajo el control transcripcional de la región promotora del gen que codifica para  $\beta$ -actina, que se expresa de forma

constitutiva y en todas las células del organismo (Borovina et al. 2010). La proteína Arl13b es una GTPasa pequeña que se localiza en el axonema ciliar y es necesaria para la ciliogénesis (Duldulao, Lee y Sun 2009; Borovina et al. 2010). En adelante esta línea será referenciada como *Arl13b-GFP*.

- *Tg (crx:EGFP-CAAX, cmlc2:EGFP)*
- *Tg (crx:mApple-CAAX, cmlc2:EGFP)*

Ambas líneas fueron generadas en nuestro laboratorio (la primera en el marco de la Tesis de Doctorado del Mag. Gonzalo Aparicio y la segunda para el presente trabajo) y expresan EGFP o mApple fusionadas a CAAX, respectivamente. CAAX es un sitio de palmitilación que permite la asociación de las proteínas fluorescentes a la membrana plasmática. La expresión, en ambos casos, está dada bajo el promotor *crx*, un factor de transcripción involucrado en el desarrollo de la retina que se expresa en progenitores de fotorreceptores y su progenie (Liu et al. 2001). En adelante las nombraremos como *crx:EGFP* y *crx:mApple*

- *Tg(bact2:APEX2-GBP, acrys:mCherry)*.

Línea generada para este proyecto a partir de la construcción “Bact2-APEX2-GBP in pDEST-Tol2-pA2-acrys-cherry”, obtenida de Addgene (Plasmid 67668). Para la generación de la línea seguimos el protocolo que se detalla más adelante en la sección “Inyección de embriones”. Expresa APEX2, una ascorbato peroxidasa de soja modificada (Lam et al. 2015), fusionada a GBP (*GFP-binding protein*) bajo un promotor ubicuo (*bactin2*). APEX2-GBP funciona como marcador de la expresión de GFP (o EGFP) que puede ser detectada por microscopía electrónica de transmisión. GBP se une a EGFP, mientras que APEX2 cataliza la polimerización y deposición de diaminobencidina (DAB) en presencia de peróxido. La DAB así depositada es osmiofílica, de modo que generará un contraste electrón-denso en el sitio donde se ubica EGFP y permite su detección por microscopía electrónica (Ariotti et al. 2015). En adelante nos referiremos a esta línea como *APEX2-GBP*.

### Obtención y mantenimiento de embriones

Los embriones fueron obtenidos mediante cruce de adultos seleccionados, apartados y colocados en parideras la tarde anterior al día de reproducción con agua del sistema de mantenimiento, en cantidades acordes al tamaño de la paridera (máximo 4 peces/L). Los embriones obtenidos se colocaron en medio para embriones (agua de sistema de mantenimiento a la que se le agrega 0.2 mg/L de azul de metileno para prevenir el crecimiento de hongos) dentro de una placa de 10 cm de diámetro. La incubación se realizó en estufa refrigerada a una temperatura estándar de 28.5 °C, en los casos en que fue necesario modificar la velocidad del desarrollo (obtención de embriones de 40 y 60 hpf), se incubaron a un mínimo de 25 °C y un máximo de 32 °C. La datación se realizó de acuerdo al trabajo de Kimmel et al. 1995. Como en el pez cebra la síntesis de melanina comienza alrededor de las 20 hpf, para las observaciones al microscopio confocal de embriones enteros a las edades estudiadas fue necesario inhibir la pigmentación. Para ello, incubamos los embriones desde las 8 hpf con 30 mg/L de PTU (1-phenyl 2-thiourea, Sigma P7629) en medio de embriones un inhibidor de la tirosinasa, necesaria para el inicio de la melanogénesis.

### Inyección de embriones

En todos los casos, los embriones fueron inyectados manteniendo una mínima cantidad de agua. Para realizar la microinyección utilizamos agujas generadas a partir de capilares de borosilicato estirados en un *puller*, micromanipulador y microinyector neumático con aire comprimido a 50 psi aproximadamente (ASI, modelo MPPI-3).

Realizamos inyecciones de embriones tanto para obtener líneas transgénicas o embriones marcados en mosaico con proteínas fluorescentes que revelen la estructura de interés, como para llevar a cabo tratamientos con oligómeros de morfolino. En aquellos experimentos en los que inyectamos oligómeros de morfolino lo hicimos en el vitelo de embriones en etapa de 1 a 4 células, mientras que las inyecciones de construcciones génicas las realizamos en el citoplasma de embriones en etapa de una célula.

## Generación de construcciones y líneas transgénicas

Realizamos construcciones génicas específicas que utilizamos tanto para la expresión en mosaico como para la generación de líneas transgénicas estables. En todos los casos las construcciones fueron realizadas mediante el sistema de kit Tol2 (Kwan et al. 2007), basado en Multisite Gateway (Thermo Fisher Scientific). Kit Tol2 se basa en la recombinación de cuatro tipos de plásmidos diferentes con una combinación particular de sitios de recombinación: pDestiny (pDest), p5'Entry (p5E), pMiddle-Entry (pME) y p3'Entry (p3E). Es un método rápido y eficiente ya que permite ensamblar las construcciones de forma direccional.

Las construcciones generadas para este trabajo fueron:

*crx:mApple-CAAX*

*crx:mCherry-CAAX*

La construcción *crx:EGFP-CAAX*, que también utilizamos en este trabajo, fue generada por el Mag. Gonzalo Aparicio en el marco de su tesis doctoral. El p5E-*crx* fue amablemente proporcionado por R. Wong (Suzuki et al. 2013). En todos los casos utilizamos el vector de destino pDestTol2pA2; el p5E-*crx* y el p3E-pA. El pME correspondió a una proteína fluorescente diferente para cada caso, fusionada a una señal de palmitilación. De esta manera, las tres construcciones expresan distintas proteínas fluorescentes bajo un promotor específico de progenitores de fotorreceptores y su progenie. Para generarlas seguimos el protocolo disponible en la página web de kit Tol2 (<http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/Protocols>).

Las reacciones de recombinación se realizaron mediante la combinación de 20 fmol de cada plásmido con 2 µL de la enzima LR Clonase Plus II (Invitrogen) en buffer TE (10 mM Tris pH 8- 1mM EDTA) en un volumen final de 10 µL, incubando a 25 °C durante 16 hs. Finalizamos la reacción mediante la incubación con Proteinasa K (Invitrogen) a 37 °C durante 15 min. Recuperamos las construcciones mediante transformación de células competentes TOP10 (Invitrogen) con 3 µL del producto de recombinación y selección por ampicilina en placa. Luego, los clones positivos fueron crecidos en medio líquido del cual una alícuota fue almacenada en glicerol 15 % a -80 °C y el resto se utilizó para purificar por medio de miniprep.

En el caso de APEX2-GBP, en Addgene obtuvimos la construcción *bact2:APEX2-GBP* clonada en un vector de destino pDestTol2pA2 (Plasmid 67668) (Ariotti et al. 2015). Para la obtención del ADN plasmídico seguimos el protocolo recomendado por Addgene (<https://www.addgene.org/protocols/streak-plate/>). Realizamos la purificación mediante Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) y almacenamos una alícuota en glicerol 15% a -80 °C.

Dichas construcciones fueron inyectadas en embriones para obtener marcado en mosaico o desarrollar líneas transgénicas. Para las inyecciones preparamos una solución conteniendo 5 pg/nL de la construcción de interés a inyectar y 12 pg/nL ARNm de la enzima transposasa Tol2. Inyectamos 0.5 nL de esta solución en el citoplasma de embriones en etapa de una célula de acuerdo a técnicas estándar (Yuan y Sun 2009). La concentración final inyectada en cada experimento fue de 2.5 pg/nL de ADN plasmídico y 6 pg/nL ARNm de enzima transposasa.

De esta forma obtuvimos embriones con expresión de la proteína fluorescente bajo el promotor *crx* en forma de mosaico. Para la generación de líneas transgénicas, identificamos aquellos individuos que portaban el transgen y se realizaron cruces hasta obtener una descendencia en proporciones mendelianas. Como se mencionó antes, las líneas generadas para este trabajo fueron:

Tg(*crx:mApple-CAAX, cmlc2:GFP*);

Tg(*bact2:APEX2-GBP;acrys:mCherry*).

### Oligómeros de Morfolino

El oligómero de morfolino (MO) es una molécula sintética análoga a los ácidos nucleicos, que está conformada por las mismas bases que éstos pero unidas por una estructura de anillos de morfolino que se unen a través de grupos fosfordiamidato para formar un oligonucleótido (Fig. 8 A) (Corey y Abrams 2001). Esta estructura impide su digestión por nucleasas, además es una molécula neutra a pH fisiológico, lo que disminuye la interacción no selectiva con otras estructuras. En general presentan

25 bases y se unen a secuencias complementarias en el ARNm, inhibiendo su procesamiento o el inicio de su traducción (Bill et al. 2009).

Los MOs utilizados para este trabajo fueron sintetizados por la compañía Gene Tools:

*ift88*-SP AACAGCAGATGCAAAATGACTCACT (Lepanto et al. 2016)

*elipsa*-SP CTGTTTTAATAACTCACCTCGCTGA (Lepanto et al. 2016)

control CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA (Gene Tools)

p53 GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG (Robu et al. 2007)

Las proteínas Ift88 y Elipsa forman parte del complejo IFT-B, por lo tanto sus funciones son esenciales en la generación y mantenimiento de la cilia. Los MOs *ift88*-SP y *elipsa*-SP fueron diseñados para bloquear el correcto procesamiento del pre-ARNm de los genes *ift88* y *elipsa*, respectivamente. *ift88*-SP tiene como blanco la región entre exón3 –intrón3, mientras que *elipsa*-SP se une a la región entre exón1 –intrón1. En ambos casos, el MO unido impide el *splicing* del intrón correspondiente que termina siendo retenido por el ARNm. Este intrón posee un codón *stop*, por lo que el ARNm ahora presentará un codón stop prematuro, generando una proteína trunca no funcional (Fig. 8B). Los MOs *ift88*-SP y *elipsa*-SP se coinyectaron con MO anti-*p53*, para inhibir el efecto apoptótico mediado por p53.

El MO control estándar consiste en una secuencia que no tiene blanco y que no debería tener actividad biológica, excepto en reticulocitos humanos. Es ampliamente utilizado como control negativo en pez cebra y ha sido usado en forma exitosa en trabajos previos de nuestro grupo (Zolessi et al. 2006; Lepanto et al. 2016; Prieto y Zolessi 2017).

Todos los MOs fueron inyectados en el vitelo de embriones en estadio de 1 a 4 células en un máximo de volumen de 3 nL de solución de mezcla de MOs (Yuan y Sun 2009). La combinación de estos MOs fue validada anteriormente por la Dra. Lepanto, quien obtuvo una reducción significativa en el largo y número de cilias en distintos tejidos a las concentraciones usadas (Lepanto et al. 2016; Lepanto 2017).

Las concentraciones utilizadas para todas las inyecciones fueron las siguientes:

Solución de MOs para el <i>knockdown</i> de proteínas ciliares	MO <i>elipsa</i> -SP	6 ng/nL
	MO <i>ift88</i> -SP	6 ng/nL
	MO anti-p53	3 ng/nL
Solución control	MO control	12 ng/nL
	MO anti-p53	3 ng/nL

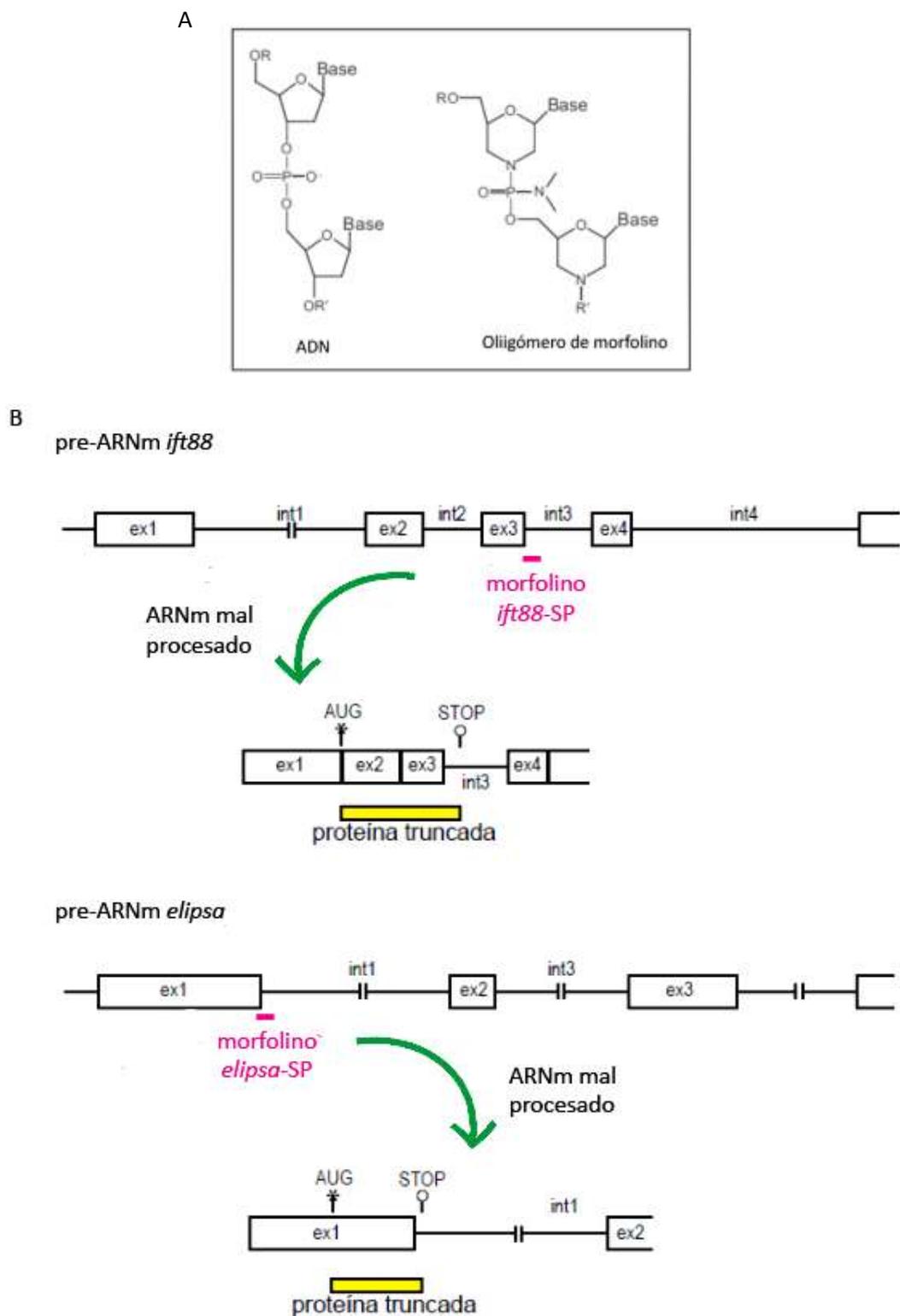


Fig. 8 – Oligómeros de morfolino utilizados en este trabajo.

A) Estructura de los MOs: están compuestos por las mismas bases que los ácidos nucleicos pero se unen mediante anillos de morfolino y grupos fosfordiamidato, lo que impide su digestión por nucleasas. Modificado de Corey y Abrams 2001.

B) Arriba: estructura del pre-ARNm que codifica para *lft88*. El MO *lft88*-SP utilizado en este trabajo hibrida en entre el exón 3 y el intrón 3. El ARNm maduro obtenido utilizando el MO *lft88*-SP (mal procesado) retiene el intrón 3, lo que introduce un codón de terminación prematuro. Abajo: estructura del pre-ARNm que codifica para *Elipsa*. El MO *elipsa*-SP utilizado en este trabajo hibrida en entre el exón 1 y el intrón 1. El ARNm maduro obtenido utilizando el MO *elipsa*-SP (mal procesado) retiene el intrón 1, lo que introduce un codón de terminación prematuro. Modificado de Lepanto 2017.

---

### Inmunofluorescencia *in toto*

Los embriones a diferentes estadios (36, 40, 48, 60 y 72 hpf) fueron fijados en paraformaldehído 4% durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente fueron lavados con solución de Tritón X-100 1%-PBS 1% (PBS-T) a temperatura ambiente (5 x 10 min). Se permeabilizaron con Tripsina 0.25%-EDTA a 4 °C (36 hpf: 10 min; 40 hpf: 15 min; 48 hpf: 20 min y 72 hpf: 30 min). El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó mediante incubación con BSA 0.1% en PBS-T (solución de bloqueo) por 30 min. La incubación con anticuerpos primarios se realizó en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C, con agitación. Al día siguiente se realizaron varios lavados con PBS-T (3 x 30 min) y se incubó con anticuerpo secundario en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C, con agitación. Finalmente, los embriones fueron lavados con PBS-T (3 x 30 min) y un lavado con PBS-T antes de montarlos.

En aquellos casos en que se realizó marcación de núcleos y/o de filamentos de actina, estos marcadores fueron incluidos con el anticuerpo secundario. Los núcleos fueron marcados con una solución de verde de metilo de 4 µg/mL (Prieto et al. 2015) y los filamentos de actina con 0.2 µg/mL de faloidina conjugada a TRITC (Sigma-Aldrich, P1951).

Los embriones fueron montados en cámaras, inmovilizados con una pequeña cantidad de agarosa-glicerol, embebidos en solución de glicerol 75 % en buffer Tris 50 mM pH 8. Las observaciones se realizaron en microscopio láser confocal Zeiss LSM

880 o Zeiss LSM 800, con 40x 1.2 NA, 63x 1.3 NA glicerol:agua (75:25) o 63x 1.3NA aceite .

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

Anticuerpos primarios	Dilución
anti-tubulina acetilada (Sigma-Aldrich, T-7451)	1/1000
anti- $\gamma$ -tubulina (Sigma-Aldrich, T6557)	1/500
anti-GFP (DSHB, DSHB-GFP-12A6)	1/200
zn8 (DSHB)	1/100

Anticuerpo secundarios	Dilución
anti-mouse IgG-Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, A11034)	1/1000
anti-mouse IgG-Alexa 555 (Thermo Fisher Scientific, A21424)	1/1000
anti-rabbit IgG-Alexa 633 (Thermo Fisher Scientific, A21070)	1/1000
anti-mouse IgG-Alexa 633 (Thermo Fisher Scientific, A21050)	1/1000

### Observación de embriones *in vivo*

Realizamos la observación, selección y registro de imágenes macroscópicas de los embriones utilizando un microscopio estereoscópico de fluorescencia asociado a una cámara Nikon EOS T3i-Rebel. Para los análisis por *time-lapse* seleccionamos embriones a 36 hpf con buena expresión de marcadores fluorescentes (8 por cada ensayo). En el caso de aquellos ensayos que incluían bloqueo de función ciliar, se seleccionaron tanto por expresión de marcadores fluorescentes, como por fenotipo ciliar (Fig. 17B y 19A) (6 morfantes y 2 controles). Una vez seleccionados, fueron anestesiados en MS222 0.04 mg/mL diluido en E3M, montados en placa con fondo de vidrio n° 0 (MaTek) con agarosa de bajo punto de fusión (Invitrogen, #16520) al 1%, MS222 0.04 mg/mL y PTU 30 mg/L. Luego de orientarlos, ya con la agarosa solidificada, bañamos la placa con una solución de E3M, MS222 0.04 mg/mL y PTU 30 mg/L. Realizamos las adquisiciones a 30 °C, en microscopio láser confocal Zeiss LSM

880, con objetivos 40x 1.2 NA o 63x 1.3 NA glicerol:agua (75:25). Realizamos adquisiciones de series de planos confocales cada 1  $\mu\text{m}$  de un total de alrededor de 50  $\mu\text{m}$  de espesor, en modo de escaneado bidireccional y con una resolución de 512 x 512 pixeles. Estas adquisiciones se realizaron cada 10 min durante aproximadamente 15 horas. El número máximo de embriones analizado en cada experimento fue de 8 y el tiempo de adquisición de cada embrión de aproximadamente 45 s.

### Microscopía electrónica de transmisión

Embriones de la línea TAB5 fueron fijados a 36, 40, 48, 60 y 72 hpf por inmersión en solución fijadora (paraformaldehído 4%, glutaraldehído 2.5% en *buffer* fosfato 0.1M, pH 7.2–7.4). Luego de unos minutos separamos las cabezas y las incubamos en solución fijadora toda la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras se lavaron en *buffer* fosfato, se pos-fijaron en tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) 1% y se lavaron nuevamente con *buffer* fosfato.

Los embriones *crx:EGFP;APEX-GBP* fueron procesados según Ariotti et al. 2015 y obtenidos mediante el cruce de adultos de la línea *crx:EGFP* con peces de la línea *APEX-GBP*. Los embriones obtenidos fueron fijados a 36, 40, 48, 60 and 72 hpf por inmersión en solución fijadora (paraformaldehído 4%, glutaraldehído 2.5% en *buffer* cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.4). Luego de unos minutos separamos las cabezas que incubamos en la misma solución fijadora toda la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras se lavaron en *buffer* cacodilato de sodio (3x 5 min), más un lavado con una solución de 1 mg/mL DAB/cacodilato (1 x 3 min). Luego incubamos por 30 min a temperatura ambiente con una solución de DAB/cacodilato + 5.88 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  para generar el producto de reacción. Realizamos lavados con *buffer* cacodilato (3x 2min) e incubamos durante 15 min en solución de  $\text{OsO}_4$  1% en el mismo *buffer*, para convertir el producto de reacción en una señal electrón-densa alrededor de EGFP. Finalmente hicimos lavados con *buffer* cacodilato (3 x 2 min) y con agua (3 x 2 min) antes de proceder a la deshidratación (Ariotti et al. 2015).

En todos los casos los embriones se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (25, 50, 75, 95, 100 %), fueron transferidos a acetona (100%) y finalmente infiltrados y embebidos con resina Araldita (Fluka) (2:1 acetona:araldita, 1:1 acetona:araldita, 1:2 acetona:araldita, cada uno por 30 min, 100 % araldita toda la noche a 4 °C y finalmente se incubaron por 48 h a 60 °C.

Usando un ultramicrotomo RMC MT-X, obtuvimos cortes parasagittales de la retina, semifinos (500 y 300 nm) y ultrafinos (70 nm) (Fig. 12A). Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de metileno borácico y examinados en microscopio de luz para elegir la zona de interés. Los cortes ultrafinos se montaron en grillas de cobre cubiertas con formvard y fueron contrastados con acetato de uranilo acuoso al 2%, seguido de una solución de citrato de plomo (Reynolds 1963).

La observación y adquisición de las imágenes se realizó en microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1010, operado a 80 kV y equipado con una cámara digital Hamamatsu C4742-95.

#### Microscopía electrónica de barrido

Embriones de la línea TAB5 a 38, 48 y 72 hpf fueron colocados por unos minutos en solución fijadora (paraformaldehído 4%, glutaraldehído 2.5% en *buffer* fosfato 0.1M, pH 7.2–7.4). Los embriones enteros se colocaron bajo lupa en una gota de *buffer* fosfato para diseccionar sus ojos, con ayuda de pinzas y agujas de disección se retiró el RPE con mucho cuidado de modo que la retina neural quedara expuesta. Luego, fueron fijados por inmersión en solución fijadora toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los ojos sin RPE se lavaron en *buffer* fosfato, se pos-fijaron en tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) 1% y se lavaron nuevamente con *buffer* fosfato. Los colocamos en cápsulas microporosas aptas para procesamiento y deshidratamos mediante concentraciones crecientes de etanol (25, 50, 75, 90 y 100 %) y acetona (100 %), finalizando en un secado de punto crítico de CO<sub>2</sub> en Denton Vacuum DCP-1. La orientación y montaje se realizó bajo lupa, sobre taco de aluminio utilizando cinta de carbono y luego se metalizó con oro durante 120 s a 40 mA en Denton Vacuum Desk II Sputter Coated.

La observación y adquisición de las imágenes las realizamos en microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 5900-LV, operado a 20 kV.

### Análisis de datos

Todas las imágenes fueron analizadas con el software libre Fiji (<https://fiji.sc/>).

Para la caracterización de la cilia se utilizaron imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. Las medidas fueron realizadas como se muestra en la Figura 13C: a- ancho medido en la base de la cilia de lado a lado de la membrana en aquellas cilia en las que se observó claramente el cuerpo basal y el inicio del axonema ciliar; b- diámetro de la región densa de la membrana; c- longitud de la cilia medido desde la base hasta la punta en aquellas cilia que en el corte muestran toda su longitud.

Para la cuantificación de las cilia en la región apical de la retina se utilizaron imágenes de microscopía confocal (Fig. 11B). En todos los casos se realizó el conteo en un único corte óptico por embrión y sólo en el cuadrante correspondiente a la región “ventro-nasal”. En los embriones de 36 y 40 hpf, los análisis se realizaron en el corte óptico donde se observan más células expresando *crx*, el “parche ventro-nasal”, y en el caso de embriones de 48 hpf en adelante se tomó como referencia el corte óptico que atravesó el cristalino por la mitad. Se analizaron 12 embriones de 36 hpf y 15 embriones para cada una de las edades restantes.

Para el análisis del largo de procesos basales utilizamos imágenes de *time-lapse* de embriones inyectados con morfolidos *ift88/elipsa/p53* y embriones control inyectados con morfolidos Ctrl/*p53*. Como se mencionó anteriormente estas adquisiciones se realizaron cada 10 min. Las medidas de longitud a lo largo del tiempo se realizaron en células individuales durante 4 horas para los embriones control y 17 horas para los embriones inyectados con morfolido. Realizamos el seguimiento de forma manual de entre 2 y 4 células por embrión, analizando un total de 20 células pertenecientes a 8 embriones de 3 experimentos distintos para las

medidas de embriones tipo salvaje y 20 células pertenecientes a 8 embriones de 2 experimentos distintos para los embriones morfantes. Por otro lado, realizamos una comparación entre medidas de longitud de procesos basales a 35 y 53 hpf, tanto para embriones control como tratados de 3 experimentos diferentes. Para las medidas en embriones a 36 hpf se usaron 5 procesos por embrión donde 7 fueron controles y 15 morfantes; mientras que las medidas a 53 hpf se hicieron en 5 procesos por embrión de 8 controles y 15 morfantes.

Los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism 6. Se usaron las pruebas de normalidad de D'agostino-Pearson o Shapiro-Wilk y test de Student o Mann-Whitney para analizar la significancia de las diferencias en datos con distribución normal o no normal, respectivamente.

## Resultados

### A - Análisis de presencia de cilia en precursores tempranos de fotorreceptores

Numerosas investigaciones han evidenciado que durante el desarrollo la gran mayoría de las células poseen o son capaces de presentar cilias primarias. Los fotorreceptores, por ejemplo, presentan una cilia primaria en las etapas tardías de su diferenciación y es a partir de ella que comienza la formación del segmento externo. Sin embargo, no existe, al menos hasta donde sabemos, una descripción de la presencia de cilias primarias en precursores tempranos específicos de este tipo celular. Por ello, como primer paso para nuestros objetivos, analizamos la presencia de este organelo tanto en células precursoras tempranas de los fotorreceptores como en fotorreceptores en diferenciación.

Para llevar a cabo estos análisis utilizamos marcadores de cilia (tanto Arl13b como la tubulina acetilada se encuentran en el axonema ciliar), en ocasiones adicionamos un marcador de cuerpo basal (anti- $\gamma$ -tubulina) y/o un marcador nuclear (verde de metilo). Primero, realizamos observaciones de embriones fijados de la línea *Ar13b-GFP* que fueron inmunomarcados *in toto* para  $\gamma$ -tubulina y a los que también se les marcó el núcleo con verde de metilo (Fig. 9A). Paralelamente, realizamos la observación de embriones de tipo salvaje marcados con anticuerpo anti-tubulina acetilada y anti- $\gamma$ -tubulina, y sus núcleos con verde de metilo (Fig. 9C). Dado que, las células del RPE presentan cilias que se proyectan hacia el espacio subretiniano, resultó necesaria también la detección de  $\gamma$ -tubulina para localizar los cuerpos basales. De esta manera, además de detectar las cilias, logramos diferenciar aquellas que pertenecen a células neuroepiteliales (Fig. 9A', cabeza de flecha) de las cilias primarias del RPE (Fig. 9A', flecha roja). Los embriones de tipo salvaje fueron fijados a 40, 48, 60 y 72 hpf y montados sobre uno de sus lados para obtener cortes ópticos parasagittales de sus ojos, como se muestra en la Figura 9B. Como resultado, en todos los estadios analizados, detectamos la presencia de cilias primarias en la región apical de la retina; además corroboramos la utilidad del anticuerpo anti-tubulina acetilada como marcador de cilias en la región apical de la retina del pez cebra, ya que, a diferencia de lo que sucede con otros tipos celulares retinianos, no se encuentra

presente en el cuerpo celular de los precursores de fotorreceptores hasta las 72 hpf. Por lo tanto, en estas células, durante las etapas de interés, la tubulina acetilada se encuentra enriquecida únicamente en la cilia (Fig. 9C).

Hasta aquí, comprobamos la presencia de cilias primarias en la región apical de la retina hasta el estadio de 72 hpf. Para corroborar si estas cilias pertenecen a precursores de fotorreceptores utilizamos embriones de la línea transgénica estable *crx:GFP*. Como mencionamos antes, *crx* codifica para un factor de transcripción, el cual en estos estadios, es específico de precursores de fotorreceptores y por lo tanto nos permite detectar estas células desde etapas tempranas mediante la expresión de GFP bajo su promotor. De esta manera, realizando inmunomarcación *in toto* de tubulina acetilada en embriones *crx:GFP* fijados, determinamos que efectivamente algunas de las cilias primarias ubicadas en la región apical pertenecen a progenitores de fotorreceptores (Fig. 10B). Esta observación se repitió en los diferentes estadios analizados. Aunque no todas las células GFP positivas presentaron una cilia, en aquellas que sí lo hicieron las cilias primarias se localizaron apicalmente. Esta localización se mantuvo durante todas las etapas analizadas: desde las 36 hpf, momento en que *crx* comienza a expresarse en la retina y por lo tanto GFP es detectable en progenitores de fotorreceptores, hasta las 72 hpf cuando los fotorreceptores son post-mitóticos. En este último estadio la mayoría de las células GFP positivas presentó una cilia (Fig.10A).

Dada la dificultad para poder analizar el número de cilias perteneciente a células GFP positivas, decidimos analizar la densidad de cilias en la región apical de la retina. Para ello, realizamos cortes ópticos de embriones fijados, inmunomarcados para tubulina acetilada y teñidos con verde de metilo. A modo de normalizar nuestro conteo dividimos la retina en cuadrantes y para cada corte analizamos el cuadrante que abarca la región ventro-nasal, como se muestra en la Figura 11B (línea amarilla). Se analizaron entre 12 y 15 embriones para cada edad en dos experimentos diferentes. Como resultado, observamos que la densidad de cilias en el borde apical del neuroepitelio aumentó ligeramente entre las 36 y 40 hpf (Tabla 1). En la etapa más temprana muchas de las cilias correspondieron a células neuroepiteliales no especificadas, mientras que a las 40 hpf se detectaron más cilias a la vez que más

progenitores de fotorreceptores se ubicaron en la región apical de la retina (Fig. 10A y 11A). A partir de las 40 hpf la densidad de cilias disminuyó de manera constante hasta las 60 hpf, para luego mostrar un aumento hacia las 72 hpf (Fig. 11C). Además, a las 48 hpf todas las células en la región apical de la retina de la región ventro-nasal son GFP positivas, por lo que consideramos que las cilias presentes en esas etapas corresponden en su mayoría a progenitores de fotorreceptores.

En suma, los progenitores de fotorreceptores de la retina presentaron una cilia primaria dirigida hacia el espacio subretiniano. A medida que avanzó el desarrollo de estas células, la densidad de cilias disminuyó de manera progresiva hasta las 60 hpf y volvió a aumentar hacia las 72 hpf. Pero aunque su presencia mostró variaciones, su localización se mantuvo en la región apical de los progenitores durante todos los estadios analizados.

	Densidad (cilias/ $\mu\text{m}$ )	Morfométricos ( $\mu\text{m}$ )		
		Ancho de la base	Diámetro de región densa de membrana	Longitud
36 hpf	$0,09 \pm 0,02$	--	--	--
40 hpf	$0,11 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,08$	$0,86 \pm 0,27$
48 hpf	$0,06 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,03$	$0,44 \pm 0,06$	$0,50 \pm 0,29$
60 hpf	$0,04 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,10$	$0,28 \pm 0,06$
72 hpf	$0,12 \pm 0,08$	$0,23 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,12$	$0,58 \pm 0,23$

**Tabla 1** – Valores promedio  $\pm$  SD, obtenidos para cada estadio, como se detalla en la sección Materiales y Métodos.

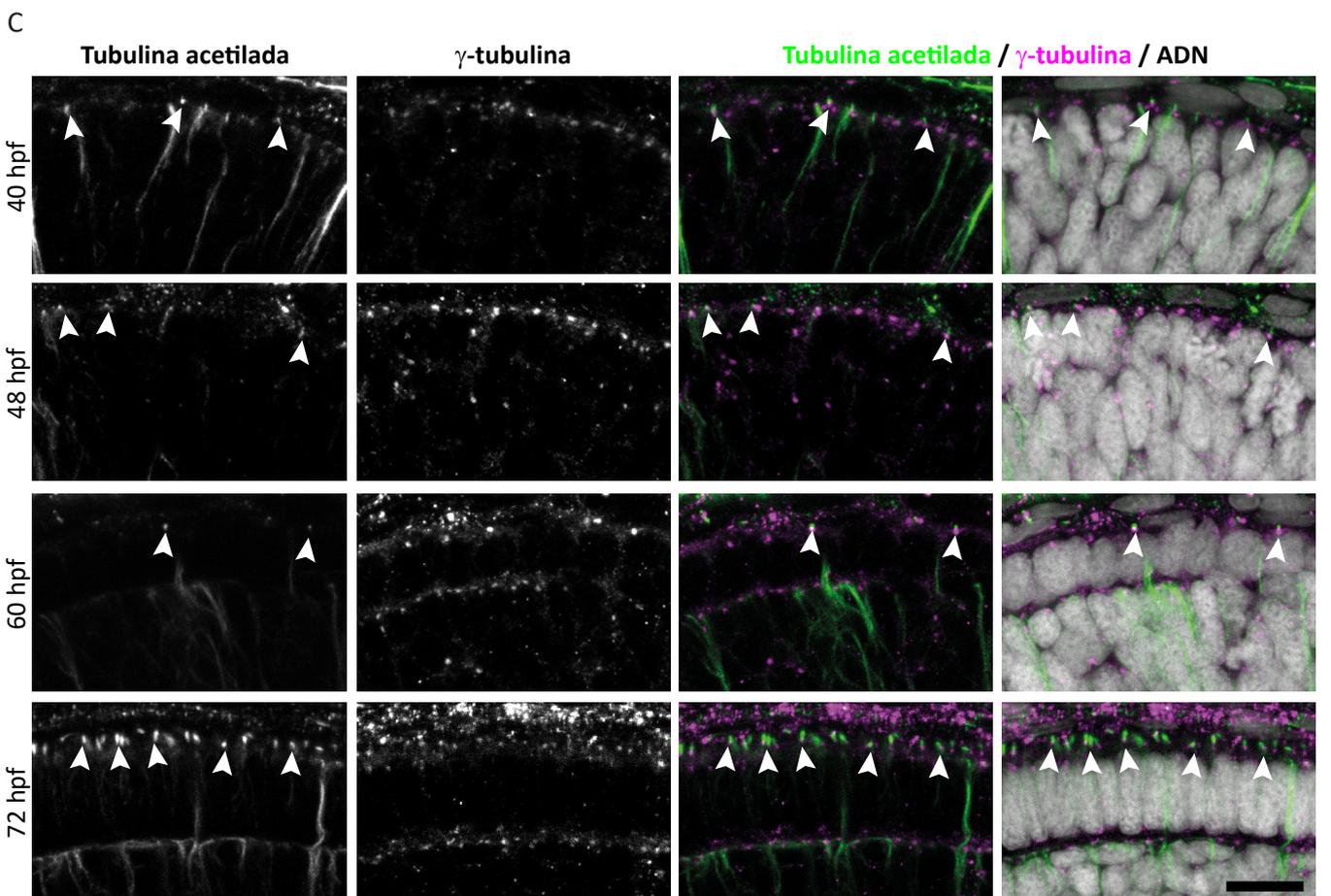
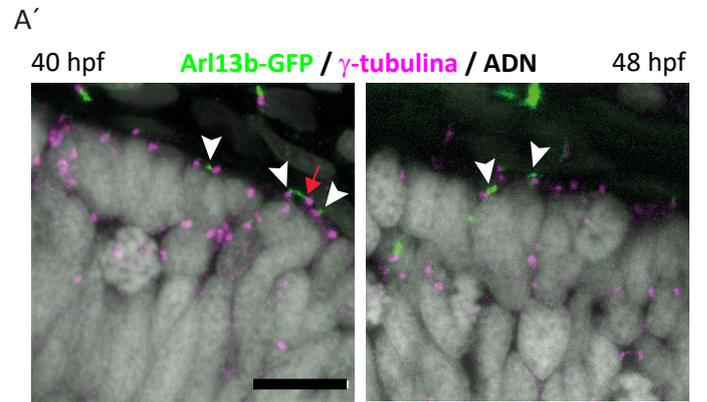
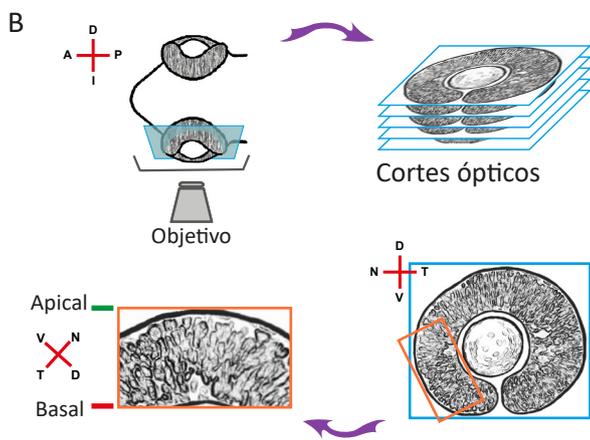
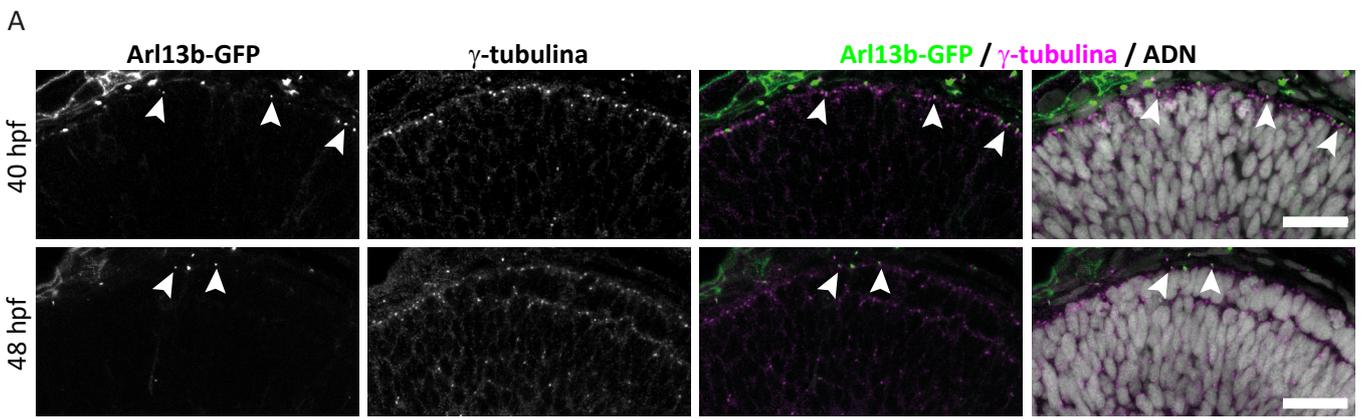


Fig. 9 – Detección de cilias primarias en la región apical de la retina.

A) Observación de embriones de la línea Arl13b-GFP fijados a 40 y 48 hpf marcados para la detección de  $\gamma$ -tubulina y ADN. Se detectaron cilias pertenecientes a células neuroepiteliales (cabezas de flecha) en la región apical de la retina a ambas edades. Proyecciones de máxima intensidad de dos secciones ópticas con una separación de 1  $\mu$ m.

A') Imágenes obtenidas de la misma manera pero a mayor magnificación. A 40 hpf podemos distinguir tres cilias muy cortas pertenecientes a células neuroepiteliales (cabezas de flecha) de una cilia más larga (flecha roja) en la que la posición del cuerpo basal indica que pertenece al RPE.

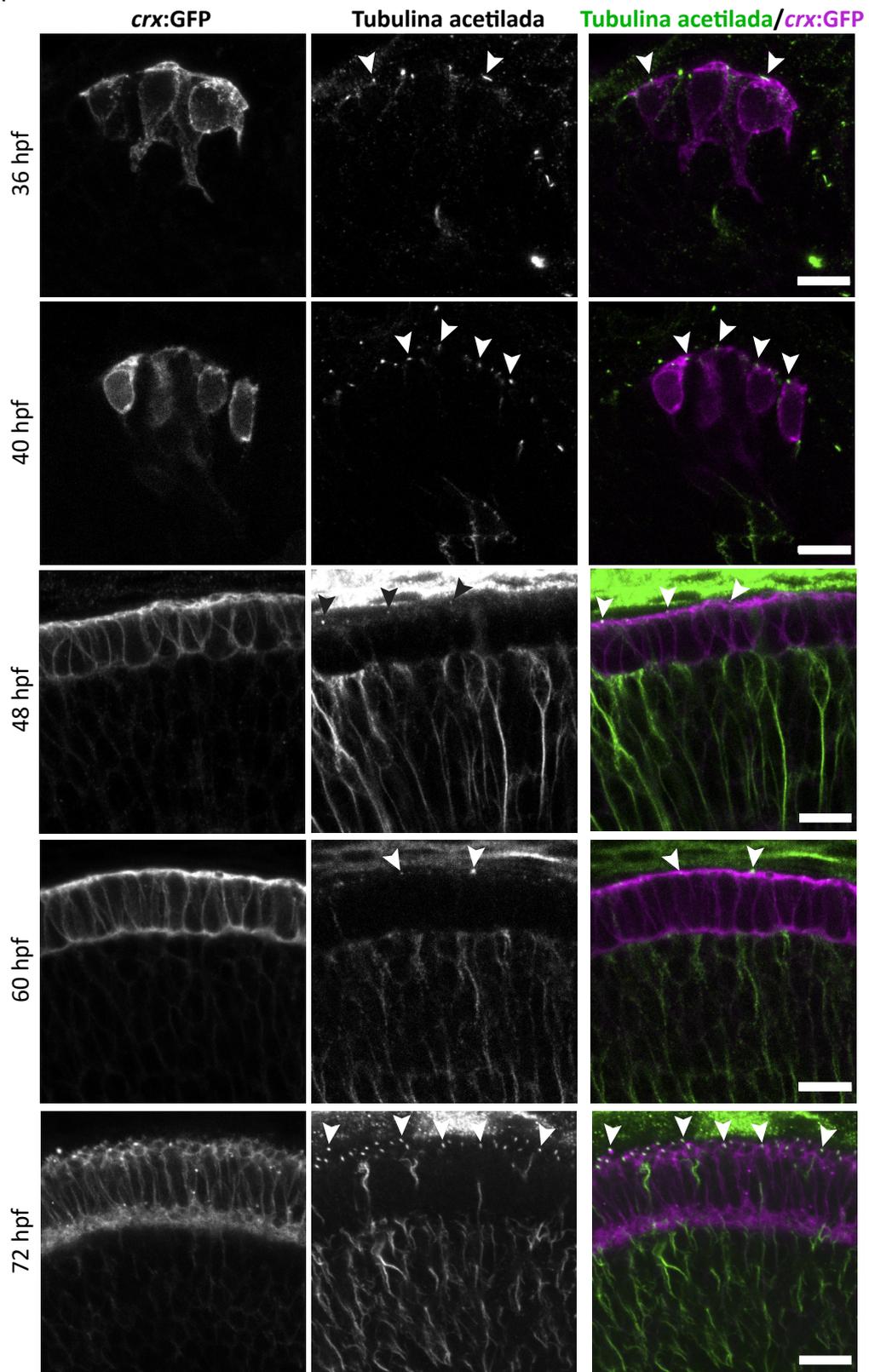
B) Diagrama representativo del montaje de embriones y la obtención de cortes ópticos en el microscopio de barrido láser confocal. Los embriones fueron montados sobre uno de sus ojos de manera que obtuvimos cortes ópticos parasagittales de la retina. En todos los casos analizamos únicamente la región ventro-nasal.

C) Mediante la inmunomarcación de embriones salvajes con anticuerpos anti-tubulina acetilada y anti- $\gamma$ -tubulina obtuvimos imágenes similares a las observadas en A. Analizamos retinas de embriones fijados a 40, 48, 60 y 72 hpf. Observamos que en las células presentes en la región apical de la retina, la tubulina acetilada se encuentra enriquecida únicamente en la cilia (cabezas de flecha), lo que nos permitió validarla como herramienta de detección en precursores de fotorreceptores al menos hasta las 72 hpf. Proyecciones de máxima intensidad de dos secciones con una separación de 1  $\mu$ m.

Barras de escala: A y A': 20  $\mu$ m, C: 10  $\mu$ m.

---

A



B

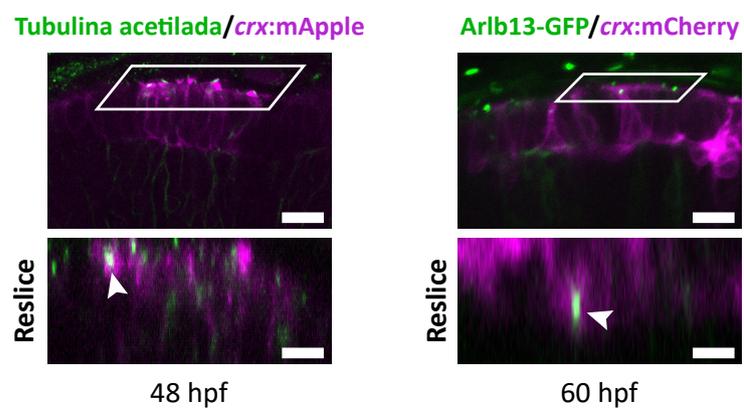


Fig. 10 – Detección de la presencia de cilias primarias en progenitores de fotorreceptores.

A) Imágenes de la región ventro-nasal de la retina de embriones de la línea *crx*:GFP fijados a 36, 40, 48, 60 y 72 hpf, marcados con anticuerpo anti-tubulina acetilada y verde de metilo. En todas las edades analizadas detectamos cilias pertenecientes a células *crx*:GFP positivas. Proyección de máxima intensidad de 8 (36 hpf), 7 (48 hpf) y 6 (72 hpf) secciones con una separación de 0.37  $\mu\text{m}$  y de 4 secciones con una separación de 1  $\mu\text{m}$  (40 hpf y 60 hpf).

B) A la izquierda, imagen de un embrión de la línea con *crx*:mApple fijado y marcado con anticuerpo anti-tubulina acetilada (48 hpf), a la derecha embrión de la línea *Arl13b*-GFP inyectado con la construcción *crx*:mCherry (60 hpf). Proyección de máxima intensidad de 3 (48 hpf) y 5 (60 hpf) secciones con una separación de 1  $\mu\text{m}$ . Abajo, imágenes obtenidas a partir de la reconstrucción (*reslice*) desde la parte superior de una pila de secciones ópticas, para obtener una imagen de la región comprendida por el recuadro, nos permitió evidenciar más claramente la pertenencia de las cilias a células que expresan *crx*.

Barras de escala: A y B, 10  $\mu\text{m}$ ; *Reslice*, 5  $\mu\text{m}$ .

---

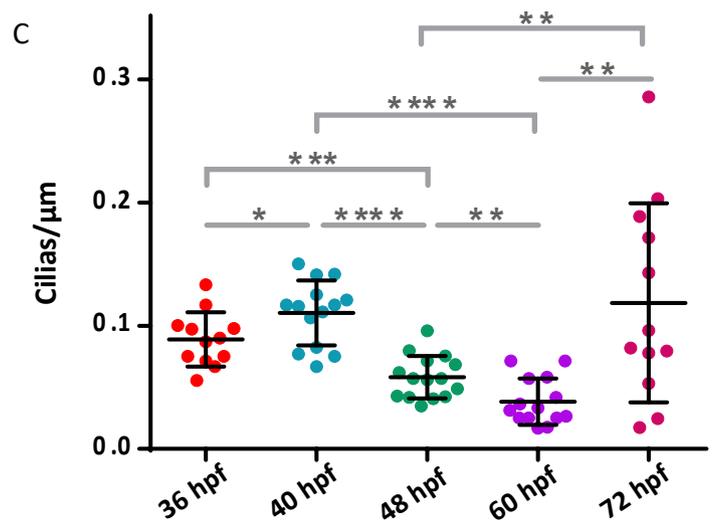
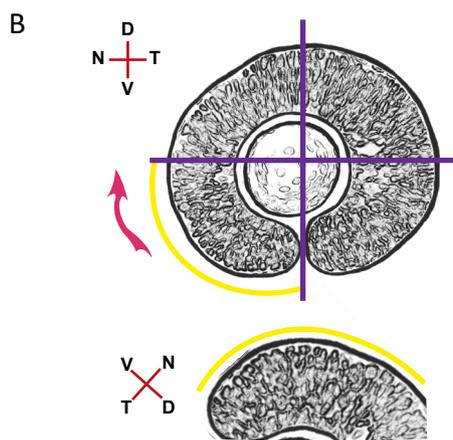
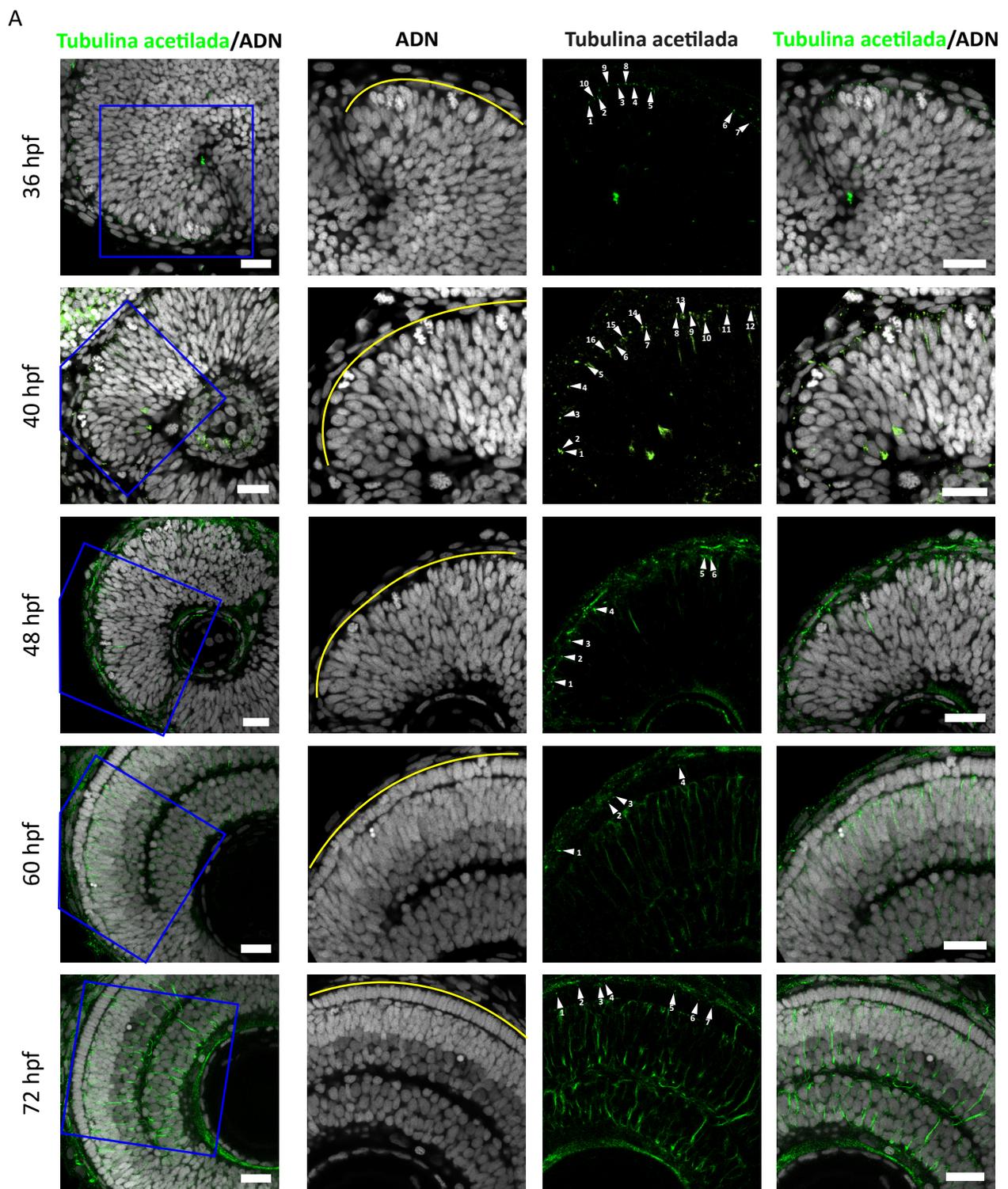


Fig. 11 – Densidad de cilias primarias en la región apical de la retina.

A) Secciones ópticas de retinas de embriones *crx*:GFP fijados a 36, 40, 48, 60 y 72 hpf y marcados con anticuerpo anti-tubulina acetilada y verde de metilo. La columna de la izquierda muestra imágenes panorámicas de la retina para cada edad y el recuadro azul corresponde a la región magnificada que se observa a la derecha. En todos los casos la región analizada corresponde a la ventro-nasal (línea amarilla) y se pueden observar cilias en la región apical de la retina (cabezas de flecha).

B) Diagrama del método utilizado para cuantificar las cilias. Elegimos el cuadrante ventro-nasal, contamos las cilias manualmente en una única sección óptica y normalizamos por la longitud de la región apical de la retina en ese cuadrante. Todas las adquisiciones se realizaron al mismo aumento, a las 36 y 40 hpf, la profundidad elegida para el análisis se correspondió con la región de mayor expresión de *crx*, luego se realizó la adquisición a la altura del ecuador del cristalino.

C) Cuantificación de la densidad de cilias en la región apical se produce un leve aumento (de 36 a 40 hpf) y luego una progresiva disminución significativa hasta las 60 hpf para luego volver a aumentar. Las líneas representan la media con SD, mientras que la significancia estadística fue determinada mediante el test de Student.

Barra de escala: A, 20  $\mu\text{m}$ .

---

## B - Análisis ultraestructural de cilias en el borde apical del neuroepitelio

Se sabe que las cilias primarias son receptoras de señales y se conocen varias vías de señalización vinculadas a ellas. Su función varía enormemente según el tipo celular y la etapa de desarrollo y esta variación puede estar acompañada de diferencias estructurales. Por ello, una vez determinada la presencia de cilias primarias en la región apical del neuroepitelio durante las etapas iniciales del desarrollo de fotorreceptores, nos enfocamos en el estudio de su estructura.

Mediante microscopía electrónica de transmisión analizamos las características ultraestructurales de estas cilias en embriones salvajes de 40, 48, 60 y 72 hpf, para ello orientamos las cabezas de manera de obtener cortes parasagitales de uno de los ojos, como muestra la Figura 12A. Realizamos cortes semifinos hasta más allá de la región ecuatorial para, recién en esa zona, obtener cortes ultrafinos que abarcan la zona del parche ventral (Fig. 12A y 12B).

La línea APEX-GBP nos permite detectar GFP mediante MET, lo que nos permitiría realizar microscopía de correlación. Luego de poner a punto el procesamiento de embriones *crx*:GFP/APEX-GBP obtuvimos imágenes de microscopía electrónica de transmisión en las que pudimos observar claramente células *crx*:GFP positivas (Fig. 12C). Esto nos permitió detectar mediante MET aquellas células neuroepiteliales especificadas como progenitoras de fotorreceptores. Aunque realizamos estas observaciones en embriones de 36, 40, 48 y 72 hpf, la detección de GFP no resultó necesaria desde las 48 hpf en adelante, ya que en esas etapas todas las células que ocupan la región apical de la retina son *crx*:GFP positivas (Fig. 12C). Además, a medida que avanza el desarrollo de la retina las células proliferan aumentando su densidad lo que genera una mayor dificultad para distinguir a qué célula pertenece la señal de GFP. Inicialmente, la idea de utilizar embriones *crx*:GFP/APEX-GBP surgió por la necesidad de tener una herramienta que nos permitiera caracterizar ultraestructuralmente a las cilias primarias pertenecientes a células progenitoras de fotorreceptores. Dada la dificultad de obtener cortes ultrafinos con cilias pertenecientes a células *crx*:GFP positivas a edades tempranas y que la señal no es detectada en la membrana ciliar (probablemente debido a que la barrera ciliar no

permite el pasaje de GFP-CAAX), el número de cilias utilizadas para la obtención de datos morfométricos incluyó tanto embriones transgénicos *crx*:GFP/APEX-GBP como embriones de tipo salvaje (Fig. 13D).

El análisis ultraestructural demostró que en todas las etapas analizadas (40, 48, 60 y 72 hpf), las cilias observadas en la zona apical de la retina se dirigen hacia el espacio subretiniano y sus axonemas presentaron la conformación clásica de cilias primarias 9+0. Además, en ocasiones se mostraron en estrecho contacto con el RPE. (Figs. 13A, D y 14).

Analizamos también tres dimensiones ciliares para las cuales se han reportado variaciones en distintos tipos o estadios celulares (Fig. 13C):

- 1 - ancho de la base ciliar. El ancho podría ser un indicativo del estadio de ciliogénesis. Está determinado por el diámetro del axonema más el diámetro de la zona de transición, una región importante que regula el pasaje de moléculas desde el citosol hacia la cilia.

- 2 - diámetro de la región densa de la membrana. Esta región, que en los fotorreceptores maduros es amplia, puede ser un indicador del estado de modificación de esa cilia a segmento externo y por lo tanto, del estadio de diferenciación de ese progenitor. Corresponde a la zona de la membrana que se muestra electrón-densa y que abarca al menos una parte de la membrana periciliar.

- 3 - longitud desde la base hasta el extremo de la cilia. El mantenimiento de la longitud ciliar es un indicador de la funcionalidad de la cilia; además, en el caso de los fotorreceptores puede ser un exponente del estadio de diferenciación de esa célula y esa cilia, ya que al inicio de la formación del segmento externo la cilia es de mayor longitud.

El análisis del ancho de la base de la cilia no arrojó diferencias significativas entre los estadios y tampoco se observó variación en el diámetro de la región densa de la membrana (Fig. 13F y 13G). Sin embargo, el largo de las cilias sí varió, observándose diferencias significativas entre las 48 (con un largo promedio de 0.50  $\mu\text{m}$ ) y 60 hpf (con un largo promedio de 0.28  $\mu\text{m}$ ). La disminución en la longitud ciliar fue

progresiva desde las 40 hasta las 60 hpf para luego volver a aumentar a las 72 hpf (Fig. 13E y Tabla 1). Para cada edad se analizaron al menos 3 embriones diferentes de 3 experimentos independientes.

Otra característica analizada fue el bolsillo ciliar que, como mencionamos anteriormente, puede ser un indicador del mecanismo de ciliogénesis utilizado por la célula. Gran parte de las ciliadas observadas en el espacio subretiniano entre las 40 y 60 hpf no presentaron bolsillo ciliar y las que sí lo hicieron, presentaron bolsillos en general más pequeños que los descritos anteriormente para las células neuroepiteliales a las 36 hpf (Lepanto et al. 2016). A las 40 hpf, de un total de 21 ciliadas observadas, 5 presentaron bolsillo, 2 de ellos completos; a las 48 hpf, de un total de 15 ciliadas observadas 2 presentaron bolsillo; a las 60 hpf de un total de 12 ciliadas observadas, ninguna presentó bolsillo ciliar y a las 72 hpf, de un total de 25 ciliadas observadas, 12 presentaron un bolsillo pronunciado (Fig. 14).

A las 60 hpf estas ciliadas se observaron en contacto muy estrecho con la membrana de células del RPE o de otros progenitores de la región apical de la retina y ocasionalmente observamos que desde el extremo de la cilia emergieron proyecciones fibrosas muy delgadas que contactaron con esas membranas (Fig. 14, flechas). A las 72 hpf las ciliadas presentaron una estructura marcadamente diferente, al aumento de longitud y el bolsillo profundo se sumó un ensanchamiento de la región distal y pequeñas interrupciones en la membrana donde parece conectarse el cuerpo ciliar con una gran cantidad de material celular que la rodea (Fig. 14, cabezas de flecha).

Como la probabilidad de obtener un corte longitudinal completo del axonema ciliar dentro de una sección de 70 nm para su análisis por MET es muy baja y disminuye con el aumento del largo ciliar, el número de ciliadas con medida de longitud ciliar total a las 40 hpf fue más bajo (4 de 25 ciliadas observadas) que el obtenido a las 60 hpf (8 de un total de 12). Para aumentar el volumen de datos de longitud ciliar consideramos necesario aumentar el número de ciliadas completas observadas, por este motivo decidimos realizar microscopía electrónica de barrido. De esta manera podíamos

obtener también información sobre la presencia de bolsillo y la orientación de las cilias.

Para ello fue necesario extraer los ojos y quitar el RPE para exponer la superficie apical de la retina neural. Analizamos así la región ventro-nasal de la retina de embriones de 38, 48 y 72 hpf. A las 38 hpf observamos la presencia de cilias primarias en un gran porcentaje de las células en la región apical de la retina. La mayor parte de estas cilias presentó bolsillo ciliar (Fig. 15A), de los cuales muchos parecen rodear parcialmente a las cilias. La presencia de un bolsillo parcial parece vincularse a la orientación de la cilia (que a priori parece ser no específica), coincidiendo con la zona en la que ésta forma el ángulo más pequeño con respecto a la superficie apical (Fig. 15B). Esto podría explicar por qué en las observaciones realizadas en MET el bolsillo parece estar ausente.

Además, los análisis preliminares en MEB ratificaron el largo promedio obtenido en MET (Fig. 15C), con una media de  $0.76\ \mu\text{m}$  a las 38 hpf y de  $0.86\ \mu\text{m}$  a las 40 hpf, respectivamente. A las 48 hpf nos resultó difícil distinguir las cilias de los procesos tangenciales (Fig. 16, flechas) que abundan aún en esta etapa; mientras que a las 72 hpf, en la región ventro-nasal observamos algunos segmentos externos en crecimiento y en las regiones periféricas observamos cilias largas con un bolsillo pronunciado (Fig. 16).

En síntesis, analizamos las características ultraestructurales de las cilias primarias de células progenitoras de fotorreceptores desde las 38 a las 72 hpf. Éstas se proyectaron hacia el espacio subretiniano y carecieron de bolsillo completa o parcialmente. En las etapas iniciales, hacia las 40 hpf las cilias analizadas fueron largas y su longitud disminuyó con el avance del desarrollo de la retina hasta el valor mínimo observado a las 60 hpf. Luego, a las 72 hpf, las cilias presentaron bolsillos grandes, fueron más largas y levemente más anchas.

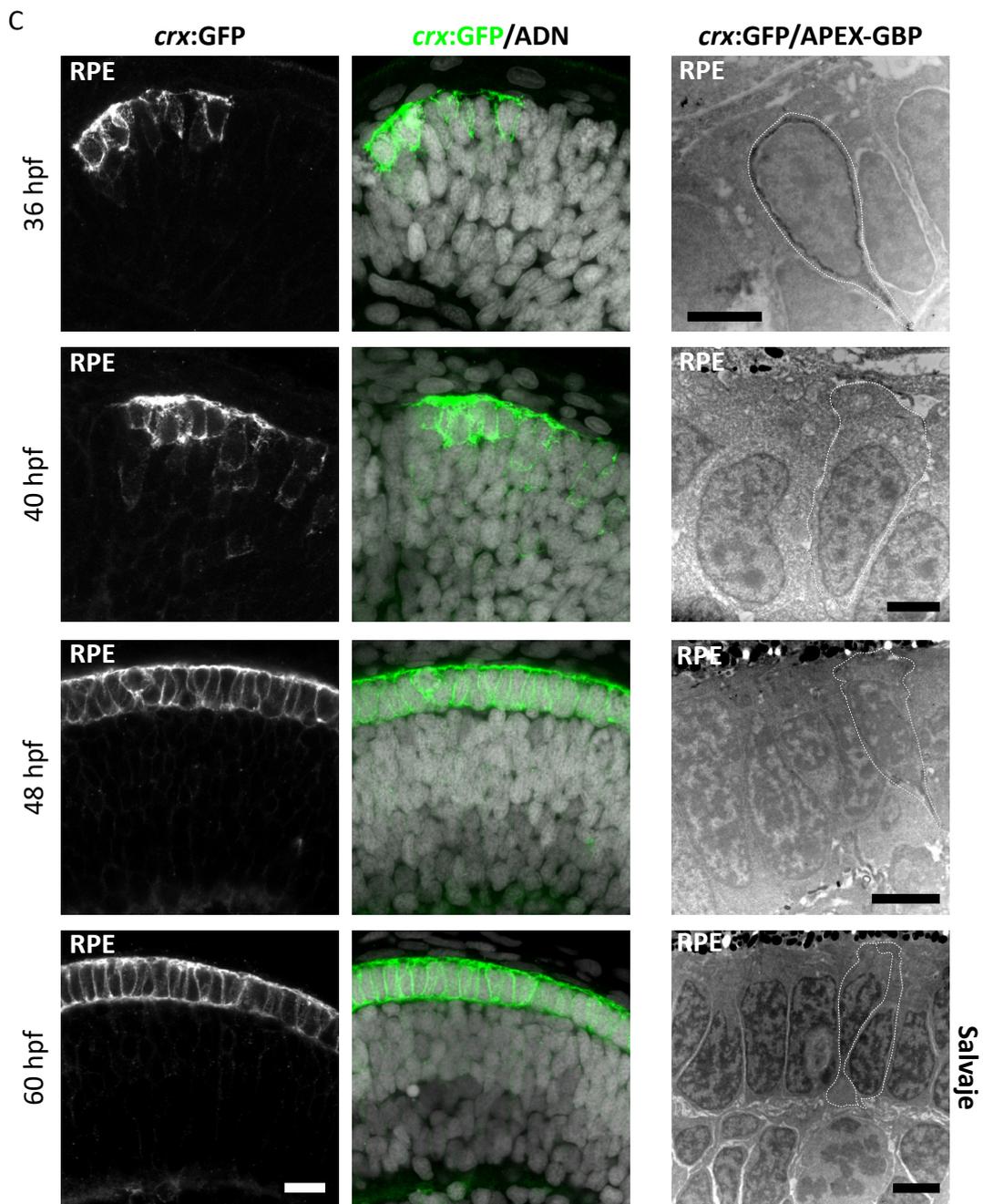
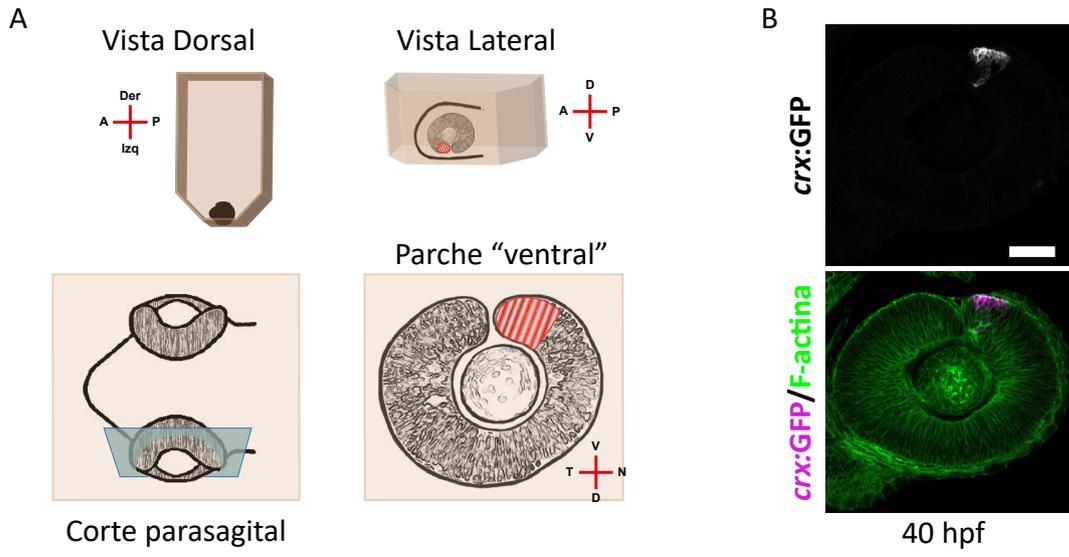


Fig. 12 – Detección de progenitores de fotorreceptores mediante MET.

A) Diagrama del montaje de embriones realizado para la obtención de secciones ultrafinas parasagitales y observación del parche ventro-nasal mediante MET. Arriba, vistas dorsal y lateral de la orientación de la cabeza en el bloque de resina; abajo, diagrama del corte realizado y la sección obtenida.

B) Imagen panorámica de la retina de un embrión de la línea *crx*:GFP fijado a las 40 hpf y marcado con faloidina-TRITC (F-actina), donde se observa el parche con células *crx*:GFP positivas. Proyección de máxima intensidad de 3 secciones ópticas con separación de 1  $\mu\text{m}$ .

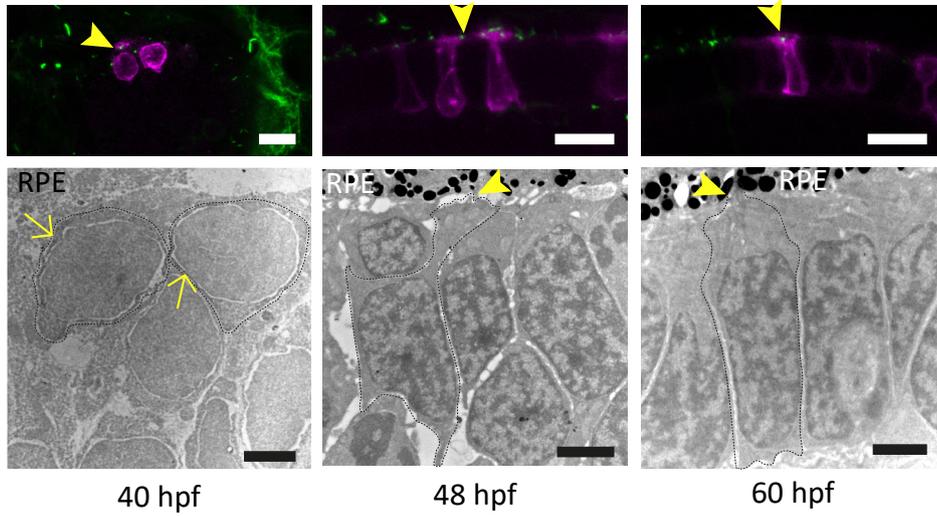
C) Comparación de las imágenes obtenidas mediante microscopía de barrido láser confocal y mediante MET. Embriones de las líneas *crx*:GFP/APEX-GBP fueron fijados a 36, 40, 48 y 60 hpf y procesados para su observación en MET. En todos los casos se detectaron células con precipitado electrondenso en la membrana, indicando la expresión de *crx*:GFP. Para las observaciones de embriones de 48 hpf en adelante, resultó más difícil su detección, pero como se puede observar en ambos tipos de imágenes, ya en esos estadios la región más apical de la retina está ocupada únicamente por células *crx*:GFP positivas. Proyección de máxima intensidad de 3 (36 hpf), 5 (40 hpf), 2 (48 hpf) y 3 (60 hpf) secciones ópticas con separación de 1  $\mu\text{m}$ .

Barras de escala: B, 50  $\mu\text{m}$ ; C, 10  $\mu\text{m}$  (imágenes ópticas), 2  $\mu\text{m}$  (imágenes de MET).

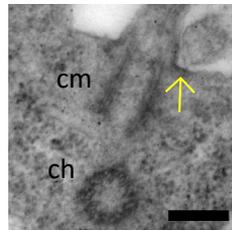
---

A

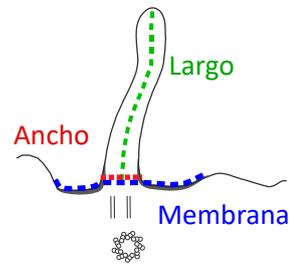
Arl13b-GFP/*crx*:mCherry



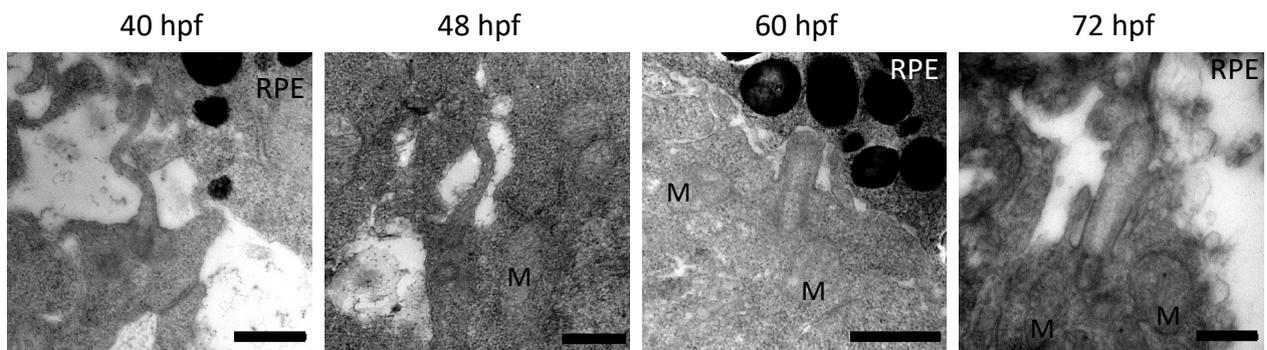
B 40 hpf



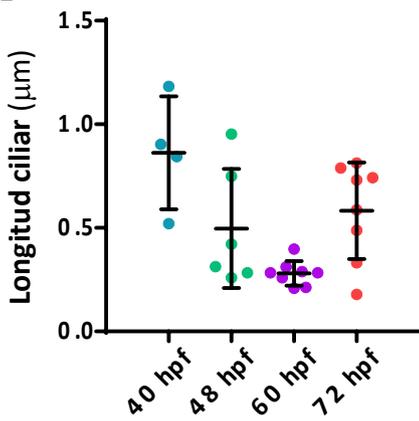
C



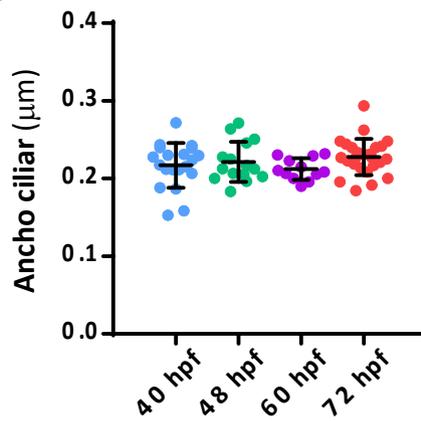
D



E



F



G

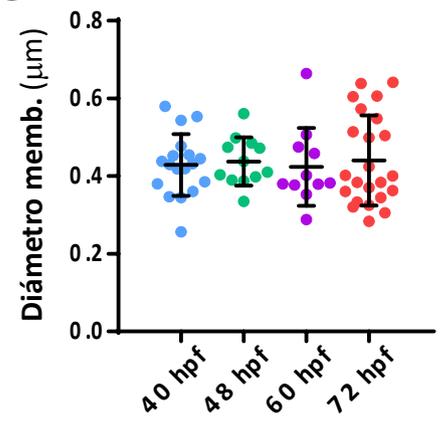


Fig. 13 - Análisis de dimensiones ciliares mediante MET

A) Arriba: secciones ópticas de retinas de embriones de la línea Arl13b-GFP inyectados con la construcción *crx:mCherry* y fijados a 40, 48 y 60 hpf donde se observan progenitores de fotorreceptores con cilias primarias en la región apical. Proyección de máxima intensidad de 7 (40 hpf), 10 (48 hpf) y 11 (60 hpf) secciones con separación de 1  $\mu\text{m}$ . Abajo: imágenes de MET de embriones de la línea APEX-GBP a 40 hpf y embriones salvajes a 48 y 60 hpf, en cada edad se observan células en la región apical de la retina (delineadas por líneas discontinuas), con morfología similar a las células *crx:mCherry* observadas por microscopía confocal. Las cabezas de flecha indican cilias primarias, las flechas marcan la señal de APEX.

B) Imágenes de MET de cilias primarias ubicadas en la región apical de la retina de embriones de pez cebra de 40 hpf. Sección longitudinal de la base de una cilia, se observan ambos centriolos (cm: madre, ch: hijo), la región densa de la membrana (flecha amarilla).

C) Esquema de las dimensiones ciliares analizadas (izquierda): ancho, diámetro de la región densa de la membrana y longitud.

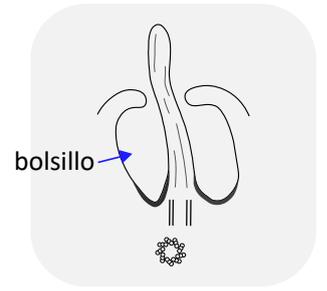
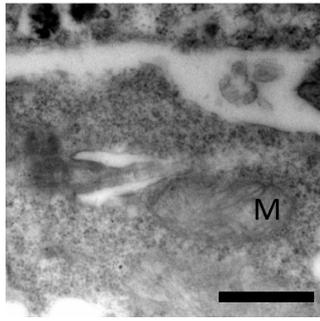
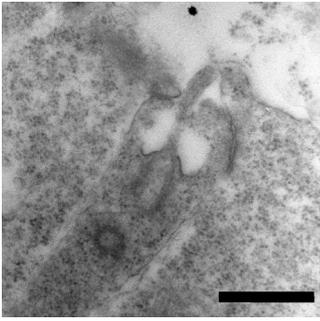
D) Imágenes de secciones de cilias con longitud completa observadas en la región apical de la retina de embriones salvajes fijados a 40, 48, 60 y 72 hpf. Entre las 40 y las 60 hpf la mayoría de las cilias presentes en progenitores de fotorreceptores carecen de bolsillo ciliar, además parecen reducir su longitud hasta las 60 hpf, momento en que detectamos las cilias más cortas. A las 72 hpf, las cilias primarias de los progenitores de fotorreceptores son morfológicamente diferentes, siendo más largas y presentando bolsillos profundos. RPE: epitelio pigmentario de la retina; M: mitocondria

E-G) Cuantificación de la longitud (E), el ancho (F) y el diámetro de la región densa de la membrana (G). Todas las medidas fueron realizadas en imágenes obtenidas mediante MET. Las líneas representan la media  $\pm$  SD.

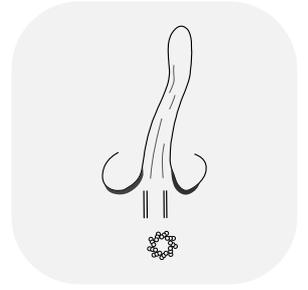
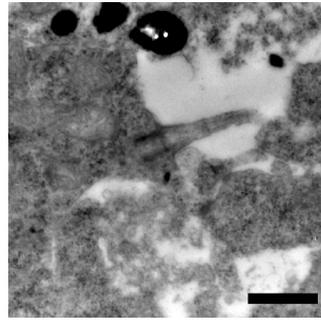
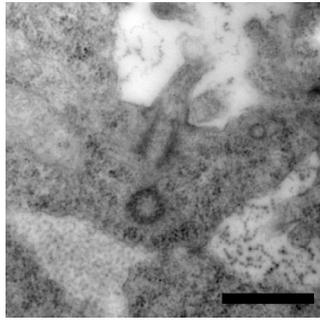
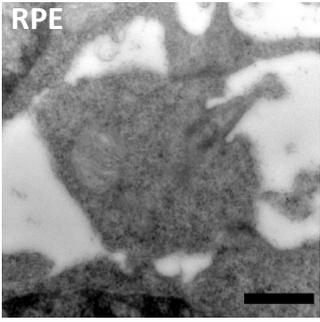
Barras de escala: A, arriba: 10  $\mu\text{m}$ , abajo: 2  $\mu\text{m}$ ; B, 200 nm; D, 500 nm.

---

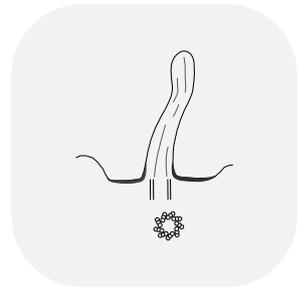
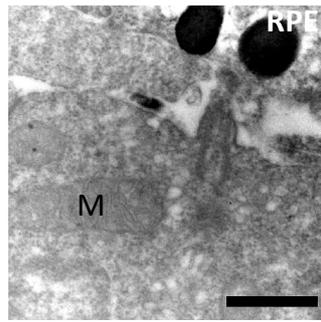
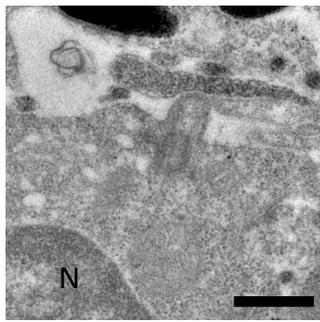
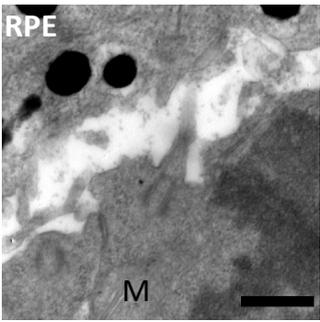
36 hpf



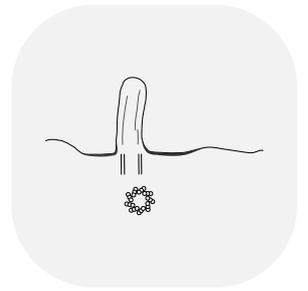
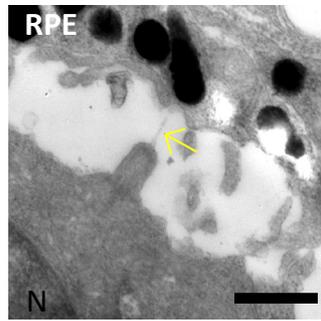
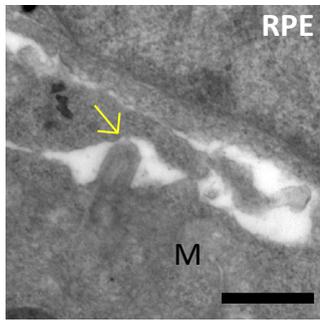
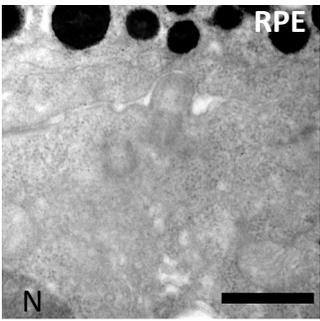
40 hpf



48 hpf



60 hpf



72 hpf

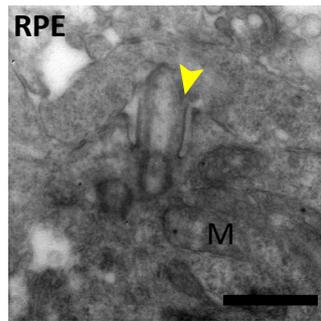
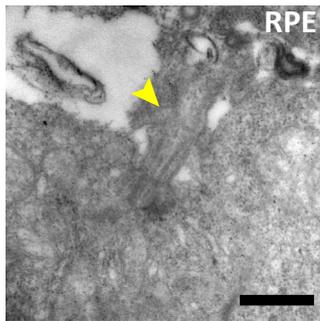
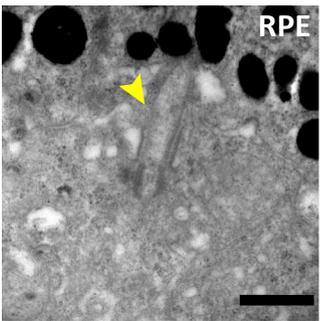


Fig. 14 – Variaciones en la morfología de la cilia primaria de progenitores de fotorreceptores.

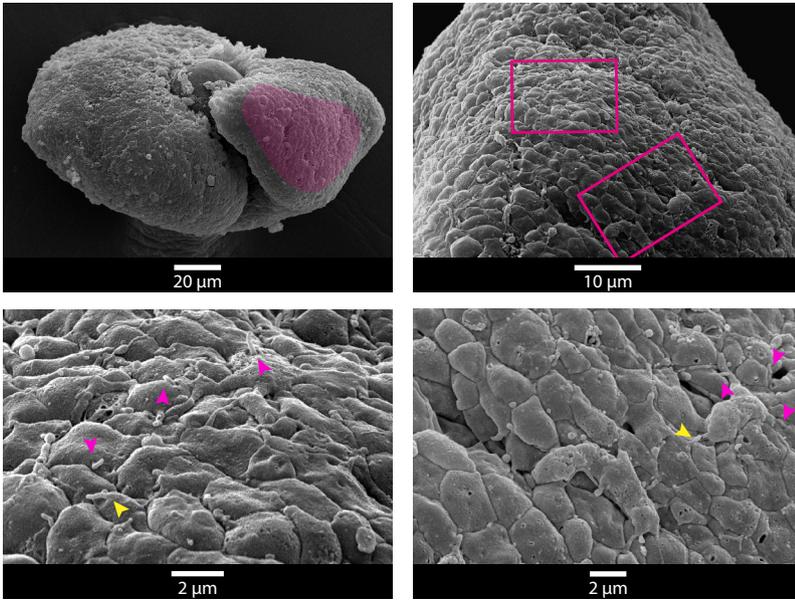
Imágenes de MET de cilias primarias ubicadas en la región apical de la retina de embriones de pez cebra fijados a las 36, 40, 48, 60 y 72 hpf. A la derecha, diagrama de la morfología predominante de las cilias primarias pertenecientes a progenitores de fotorreceptores según la etapa de desarrollo. Se observan proyecciones citoplasmáticas que emergen desde el extremo de la cilia y contactan con el RPE a las 60 hpf (flechas). A las 72 hpf se observan interrupciones en la membrana ciliar y abundante material celular contiguo (cabezas de flecha). RPE: epitelio pigmentario de la retina; M: mitocondria; N: núcleo.

Barras de escala: 500 nm

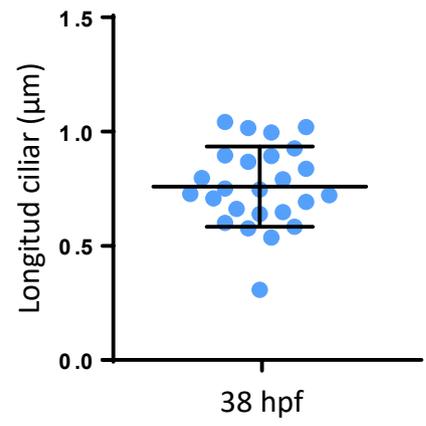
---

A

38 hpf



C



B

38 hpf

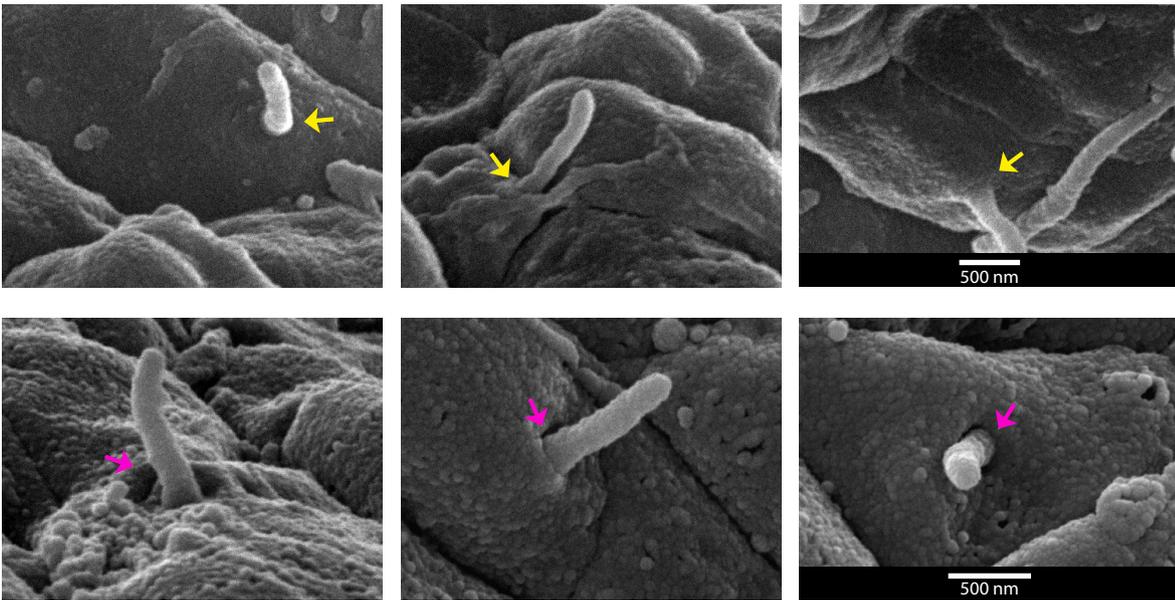


Fig. 15 – Análisis de cilias primarias presentes en el parche ventro-nasal durante estadios temprano.

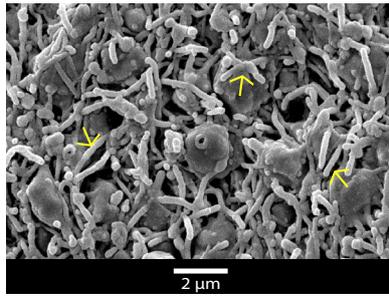
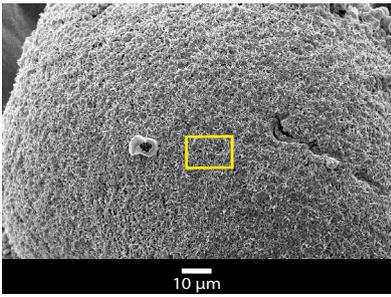
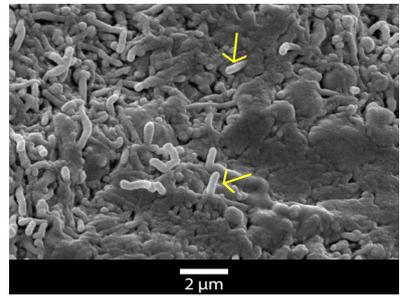
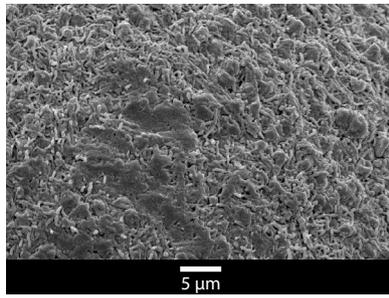
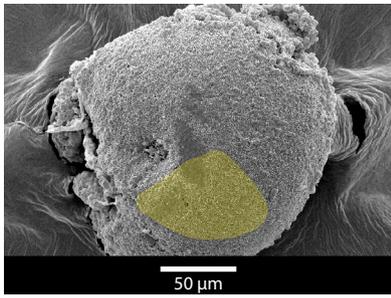
A) Imágenes de MEB de la retina de pez cebra a las 38 hpf. Partiendo de un ojo entero seleccionamos la región ventro-nasal (zona magenta), a su vez, en esa región analizamos las cilias presentes a mayor magnificación (abajo, corresponden a los recuadros magenta). En ambas imágenes se pueden observar varias cilias primarias, con y sin bolsillo (cabezas de flecha magenta y amarillas, respectivamente).

B) Imágenes de cilias primarias en la región del parche ventro-nasal a mayor magnificación; arriba sin bolsillo ciliar (flechas amarillas), abajo con bolsillo ciliar parcial (flechas magenta).

C) Cuantificación de la longitud ciliar medida en embriones de 38 hpf. Las medidas se tomaron en cilias primarias pertenecientes a células localizadas en la región ventro-nasal. N= 25 cilias de 2 embriones diferentes. Las líneas representan la media  $\pm$  SD.

---

48 hpf



72 hpf

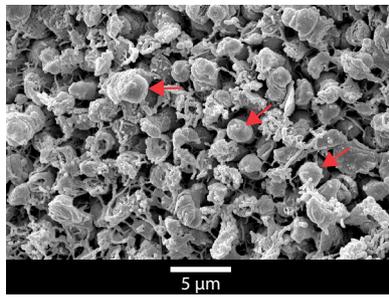
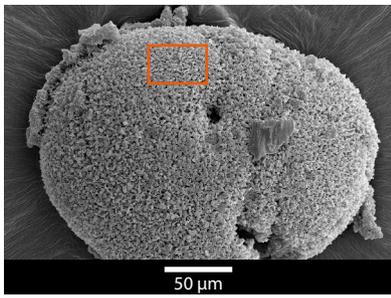
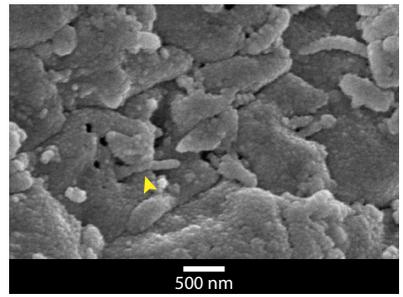
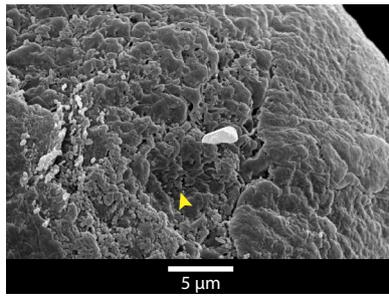
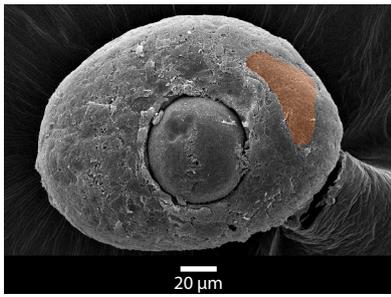


Fig. 16 – Análisis de cilias primarias presentes en la retina en estadios de 48 y 72 hpf.

Imágenes de MEB de ojos enteros con la región apical de la retina expuesta. A las 48 hpf resulta sumamente difícil distinguir las cilias primarias de los procesos tangenciales (flechas amarillas), mientras que a las 72 hpf ya comenzó la formación de segmentos externos (flechas rojas) en la región del parche ventro-nasal (rectángulo anaranjado), mientras que en otras regiones (parche anaranjado) se pueden detectar muy pocas cilias (cabezas de flecha), la mayor parte de las cuales presentan un bolsillo pronunciado y base ensanchada. A la izquierda, imágenes panorámicas, las imágenes a la derecha corresponden a aumentos en la magnificación de las zonas coloreadas.

---

### C- Función de las ciliias primarias en el desarrollo de fotorreceptores

Aunque durante años se consideraron vestigios evolutivos, en las últimas décadas se han descrito diversas funciones para las ciliias primarias, principalmente durante el desarrollo del sistema nervioso. Hoy sabemos que, por ejemplo, participan, entre otros procesos, en el mantenimiento de la polaridad de la glía radial durante el desarrollo del cerebro de ratones (Higginbotham et al. 2013). Sabiendo esto y habiendo determinado su presencia y localización en la región apical de los progenitores de fotorreceptores en etapas tempranas, nos preguntamos si las ciliias primarias están involucradas en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad y/u orientación de estas células en la retina.

Para responder a esta pregunta realizamos ensayos de inhibición de la formación y mantenimiento de las ciliias primarias mediante el uso de oligómeros de morfolino (MOs). Utilizamos una combinación de MOs diseñados para bloquear y modificar el correcto procesamiento del pre-ARNm de *Ift88* y *Elipsa*, dos proteínas esenciales para la ciliogénesis. Como se demostró previamente el uso de estos MOs combinados en embriones de pez cebra produce una reducción significativa del largo y la densidad de las ciliias en diferentes tejidos, lo cual no sucede con la inyección individual de cada MO a dichas dosis (Lepanto et al. 2016; Lepanto 2017). Esto es importante ya que aunque *Ift88* y *Elipsa* forman parte del complejo IFT-B, se conocen también roles independientes de la ciliogénesis para ambas proteínas (Bizet et al. 2015; Boehlke et al. 2015). Con la doble inyección de MOs a bajas concentraciones aseguramos entonces que los fenotipos obtenidos son generados por defectos en las funciones ciliares de estas proteínas y no en funciones extraciliares.

Para los ensayos de inhibición de ciliias primarias inyectamos 6 ng de MO *elipsa* + 6 ng de MO *ift88* + 3 ng de MO *p53* en embriones en etapa de 4 células. A los embriones control les inyectamos 12 ng de MO ctrl + 3 ng de MO *p53* (Fig. 17A). Un alto porcentaje de los embriones tratados, presentó fenotipo específico de defectos ciliares, caracterizado por pronunciada curvatura ventral del cuerpo entero y reducción del tamaño de los ojos (Omori et al. 2008; Taschner et al. 2016; Tsujikawa y Malicki 2004), que los hace fácilmente distinguibles para su selección (Fig.17B). De

los embriones con fenotipo ciliar, algunos lo presentaron más marcado que otros. Además de una menor cantidad de células neuroepiteliales (que produce un tamaño menor del ojo), los embriones morfantes presentaron un retraso general en la diferenciación celular (Fig. 18). Todas estas características fueron coincidentes con el fenotipo descrito anteriormente por Lepanto *et al.*, 2016 para embriones de pez cebra inyectados con MOs *elipsa/ift88* a la misma concentración. Para realizar el *time-lapse* seleccionamos entre 5 y 6 embriones *crx:GFP* positivos a 36 hpf (momento en que comienza a observarse la expresión *crx*) que presentaban “fenotipo ciliar” y entre 2 y 3 embriones control *crx:GFP* positivos (Fig. 19A). Luego de anestésarlos los colocamos en una placa y los inmovilizamos recubriéndolos con agarosa. En el microscopio de barrido láser confocal, obtuvimos para cada embrión, *stacks* de cortes ópticos de 1  $\mu\text{m}$  en intervalos de 10 min durante toda la noche, finalizando a las 53 hpf. La inyección de MOs *elipsa/ift88* en embriones de la línea *crx:GFP* nos permitió hacer un seguimiento del comportamiento dinámico de los progenitores de fotorreceptores con inhibición de las cilias primarias. Inicialmente, realizamos observaciones en embriones fijados a 36, 40, 48, 60 y 72 hpf. En estos ensayos observamos que los embriones morfantes, al igual que los controles, formaron la capa de fotorreceptores y ésta se localizó correctamente en la región apical (Fig. 18); observamos también que, aparentemente, los progenitores presentaron una correcta polarización que se mantuvo al menos hasta las 72 hpf (Fig. 18).

Sin embargo, las observaciones *in vivo* de embriones *crx:GFP* con el mismo tratamiento revelaron un fenotipo sutil, que inicialmente pasó desapercibido en embriones fijados. Mediante este procedimiento, observamos que en los embriones tratados muchos de los progenitores de fotorreceptores tenían procesos basales generalmente delgados, que en comparación con los embriones control (en los que también se observaron), se presentaron en mayor número y fueron más largos (Fig. 19B y 19C). Dichos procesos presentaron un comportamiento dinámico, extendiéndose y contrayéndose repetidamente. Además, en ocasiones fueron notorios varios procesos por células, a veces alternándose en extensión y retracción (Fig. 20A y 20B, video 1). Esto se mantuvo durante todo el período de adquisición a diferencia de los controles en los que no sólo fueron más cortos y más escasos, sino

que su comportamiento dinámico fue evidente durante un tiempo breve, y difícilmente observables luego de las 4 horas de adquisición (Fig. 20A y 20C). Para estos análisis realizamos 3 experimentos independientes, obteniendo un total de 15 embriones morfantes y 7 embriones control.

Al inicio de cada *time-lapse*, es decir a las 36 hpf, observamos procesos basales tanto en embriones tratados como en embriones control, pero en los primeros la longitud de los procesos fue más variable y mayor en promedio (Fig. 19C, 20C y 20D). En los embriones control de 53 hpf detectamos pocos procesos, siendo estos, además, significativamente más cortos que a 36 hpf (Fig. 19C). Sin embargo, en los embriones tratados no observamos una reducción significativa de la longitud de los procesos a 53 hpf respecto a las 36 hpf (Fig. 19C).

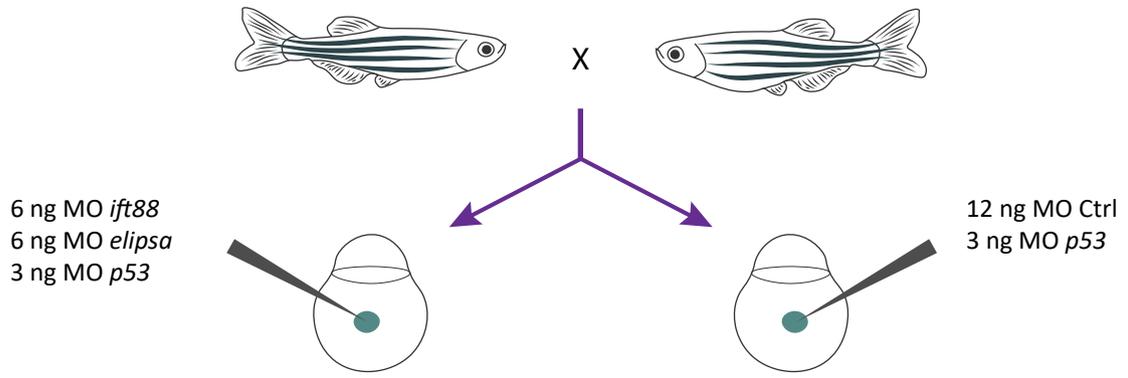
Analizando cada punto temporal para ambas condiciones, observamos que los procesos de células *crx*:GFP positivas de los embriones control no podían seguirse más allá de las primeras 4 horas de adquisición, aproximadamente a las 40 hpf; mientras que los procesos de células *crx*:GFP positivas de embriones tratados fueron visibles durante todo el tiempo de adquisición (Fig. 20C). La longitud de los procesos fue muy variable para cada punto temporal para ambas condiciones, pero la longitud promedio de embriones control a 36 hpf fue de 5  $\mu\text{m}$  y a 40 hpf fue de 3  $\mu\text{m}$ , a diferencia de lo que sucedió con los embriones tratados que presentaron una longitud promedio de 10  $\mu\text{m}$  durante todo el período de adquisición (Fig. 20C).

Por otro lado, cuando comparamos la longitud promedio de procesos basales de células individuales durante las primeras 4 horas observamos que la variabilidad fue grande en ambas condiciones, pero tanto la longitud media como el desvío estándar fue mayor en los embriones tratados (Fig. 20D). Una interrogante que surgió rápidamente fue hasta qué región de la retina se extendían estos procesos. Mediante reconstrucciones 3D de secciones ópticas de embriones *crx*:GFP marcados con faloidina-TRITC (36 hpf), que detecta la F-actina, o con anticuerpo zn8 (48 hpf), que se une a la superficie de las RGCs (reconoce la proteína DM-Grasp), pudimos evidenciar que, a pesar de su variabilidad en longitud, los procesos basales no se extendieron más allá de la IPL (Fig. 21A, video 2).

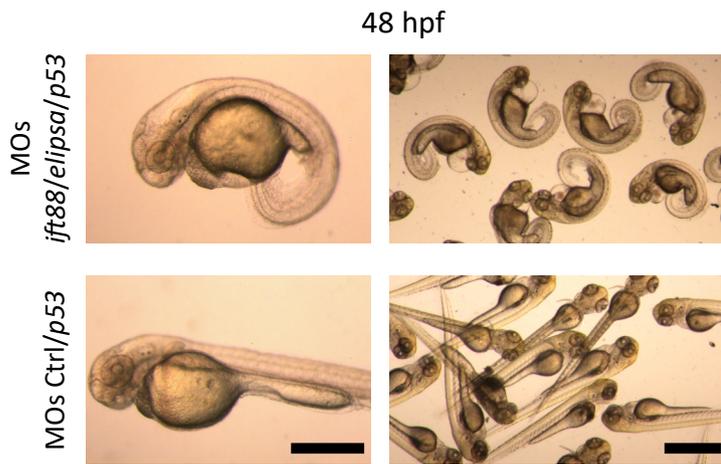
Finalmente, observamos también que los procesos tangenciales generados por los progenitores de fotorreceptores durante los estadios tempranos de desarrollo, no parecen haber resultado afectados en los embriones tratados (Fig. 21B).

En suma, mediante el análisis *in vivo* de embriones *crx*:GFP a partir de las 36 hpf, observamos, tanto en embriones tratados como embriones control, movimientos dinámicos de los procesos basales de los progenitores de fotorreceptores que ya se han desprendido de la lámina basal. Sin embargo, la inhibición de la formación de las cilias primarias mediante MOs *elipsa/ift88*, en embriones de la línea *crx*:GFP durante las etapas tempranas del desarrollo de fotorreceptores produjo un aumento en la longitud y la dinámica de estos procesos basales respecto a lo observado en embriones control. Además, nuestros resultados en embriones control mostraron una disminución, tanto de las alternancias de retracción y extensión de estos procesos como de su longitud con el avance del desarrollo, siendo un evento raro hacia las 53 hpf. En los embriones tratados, sin embargo, tanto el largo promedio como su dinámica se mantuvieron durante el período de observación.

A



B



C

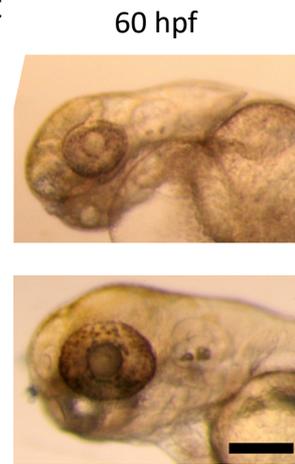


Fig. 17 – Obtención de embriones con fenotipo ciliar.

A) Representación esquemática de la aplicación de los MOs utilizados para la inhibición de la génesis de cilias primarias. La inyección se realizó en el vitelo de embriones durante la etapa de 1-4 células.

B) Imágenes de embriones de 48 hpf inyectados con MOs *ift88/elipsa/p53* (arriba) y con MOs *ctrl/p53* (abajo). Se observa el fenotipo ciliar con marcada curvatura ventral

C) Imagen a mayor magnificación de embriones a las 60 hpf en la que se observa retraso en el desarrollo y reducción en el tamaño de los ojos.

Barras de escala: B, izq. 500  $\mu$ m, der. 1 mm; C, 200  $\mu$ m.

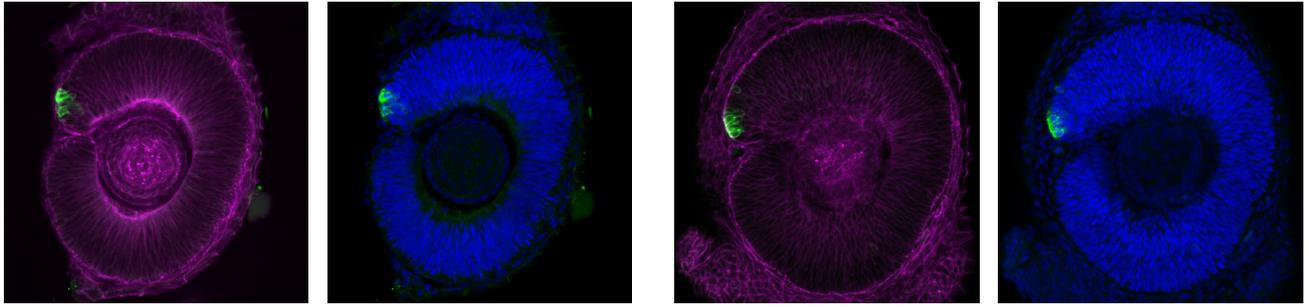
---



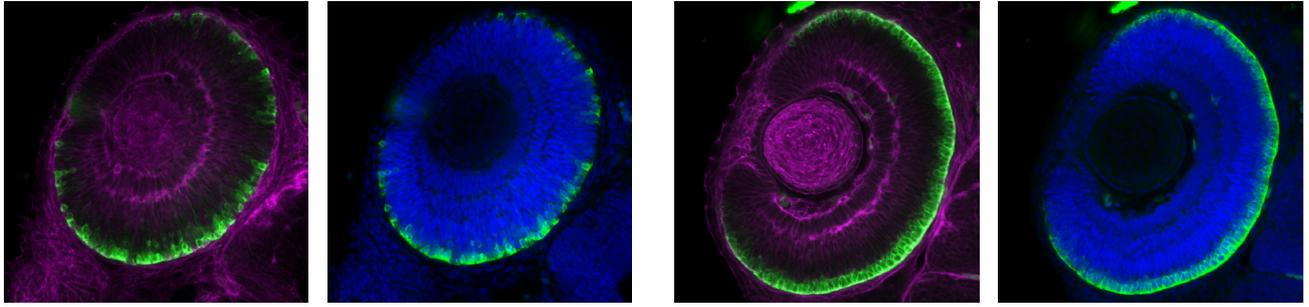
MOs *ift88/elipsa/p53*

MOs control/*p53*

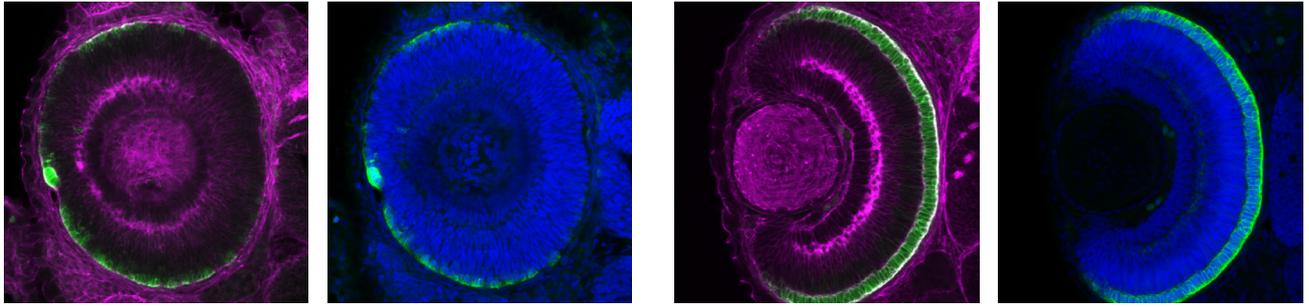
40 hpf



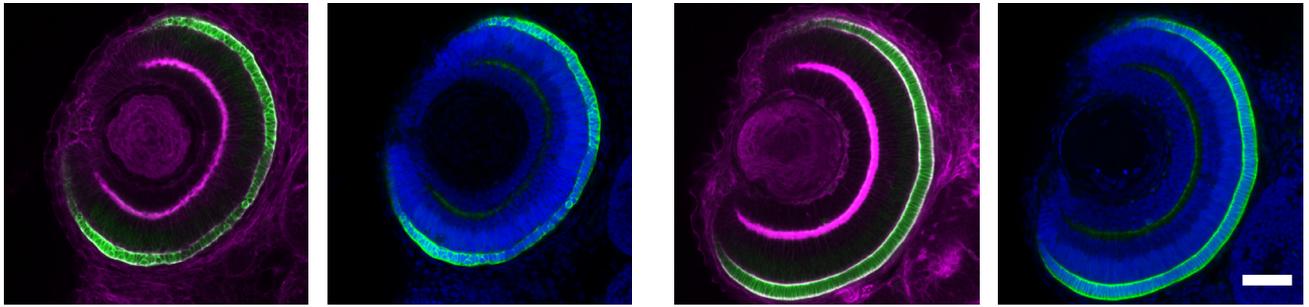
48 hpf



58 hpf



72 hpf



*crx:GFP*/*F-actina*/*ADN*

*crx:GFP*/*F-actina*/*ADN*

Fig. 18 – Localización de progenitores de fotorreceptores en embriones morfantes.

Imágenes ópticas panorámicas de las retinas de embriones de la línea *crx*:GFP inyectados con MOs *ift88/elipsa/p53* o MOs *ctrl/p53*, fijados a 40, 48, 58 y 72 hpf y marcados con verde de metilo. Se observa una correcta localización apical de las células progenitoras de fotorreceptores a pesar de una marcada reducción del tamaño de la retina. Proyección de máxima intensidad de 3 (40 y 48 hpf) y 2 (58 hpf) secciones con una separación de 1  $\mu\text{m}$ , o una única sección (72 hpf). Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

---

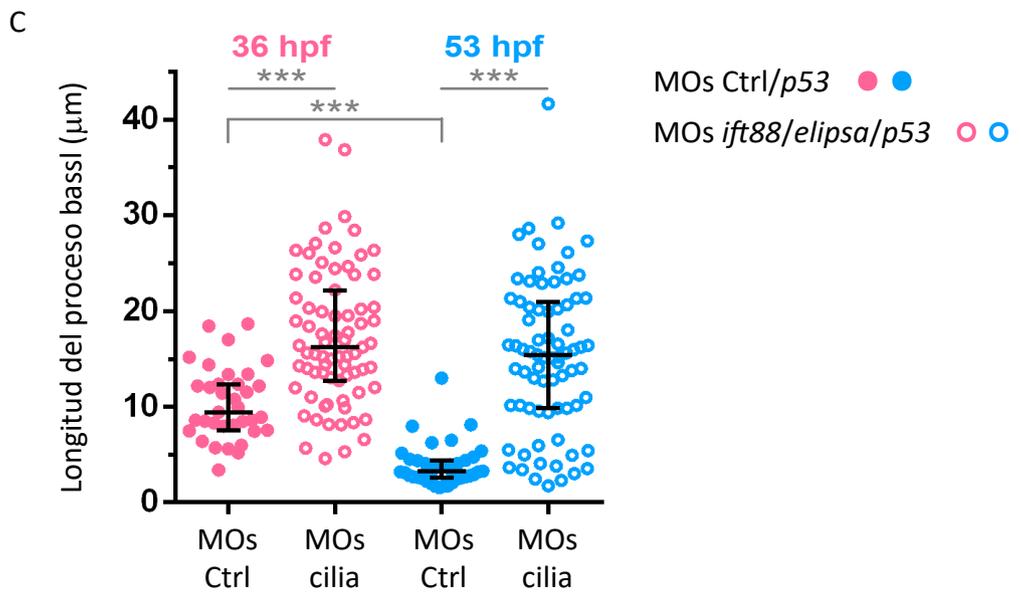
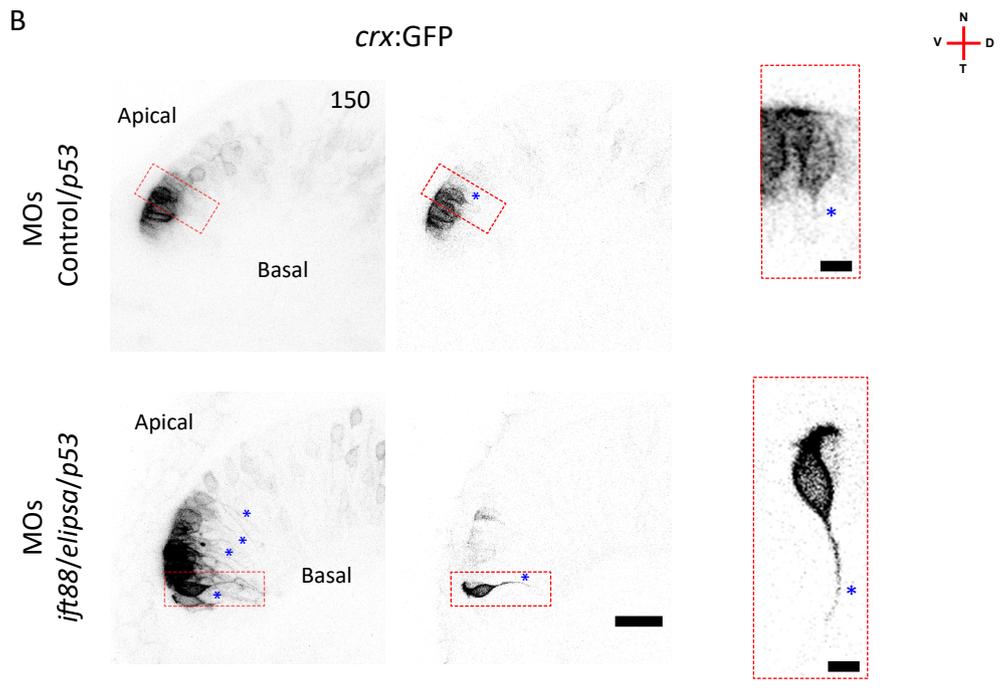
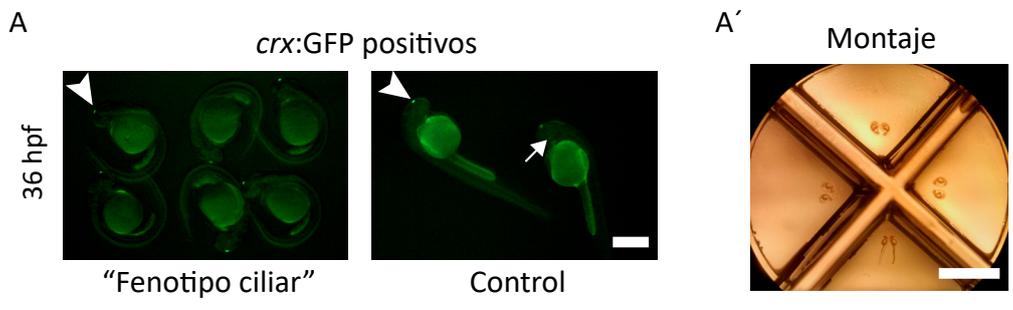


Fig. 19 – Observación *in vivo* de progenitores de fotorreceptores en embriones con inhibición ciliar.

A) Imágenes de embriones de la línea *crx:GFP* inyectados con MOs *ift88/elipsa/p53* (6) o MOs *ctrl/p53* (2) seleccionados a las 36 hpf y montados para realizar un *time-lapse*. Se detecta señal *crx:GFP* en la glándula pineal (cabeza de flecha) y en el parche ventro-nasal (flecha).

B) Imágenes de embriones a las 38.5 hpf, en ambas condiciones se observan procesos basales (asteriscos) que surgen de células *crx:GFP* positivas pero en los morfantes los procesos parecen más abundantes y largos en comparación con los embriones control en los que se observan menos y son más cortos. Izquierda: proyección de máxima intensidad; medio: sección única; derecha: magnificación de una célula.

C) Cuantificación de la longitud de los procesos basales. A las 36 hpf (inicio del *time-lapse*) el longitud promedio alcanzada por los procesos basales de embriones control fue de 9.42  $\mu\text{m}$ ; mientras que la media en morfantes es de 16.22  $\mu\text{m}$ . A las 53 hpf (fin del *time-lapse*) la longitud promedio de los procesos basales en embriones control se reduce fuertemente a 3.73  $\mu\text{m}$  pero en los embriones morfantes no hay un cambio significativo, siendo la media de 15.15  $\mu\text{m}$ . Se analizaron n=5 procesos/embrión de 7 (36 hpf) y 8 (53 hpf) embriones control y 15 morfantes (a ambos estadios), de 3 experimentos independientes. Para la comparación de los datos utilizamos el test de Mann-Whitney.

Barras de escala: A, 500  $\mu\text{m}$ ; A', 1 mm; B, 20  $\mu\text{m}$ ; B magnificación, 5  $\mu\text{m}$ .

---

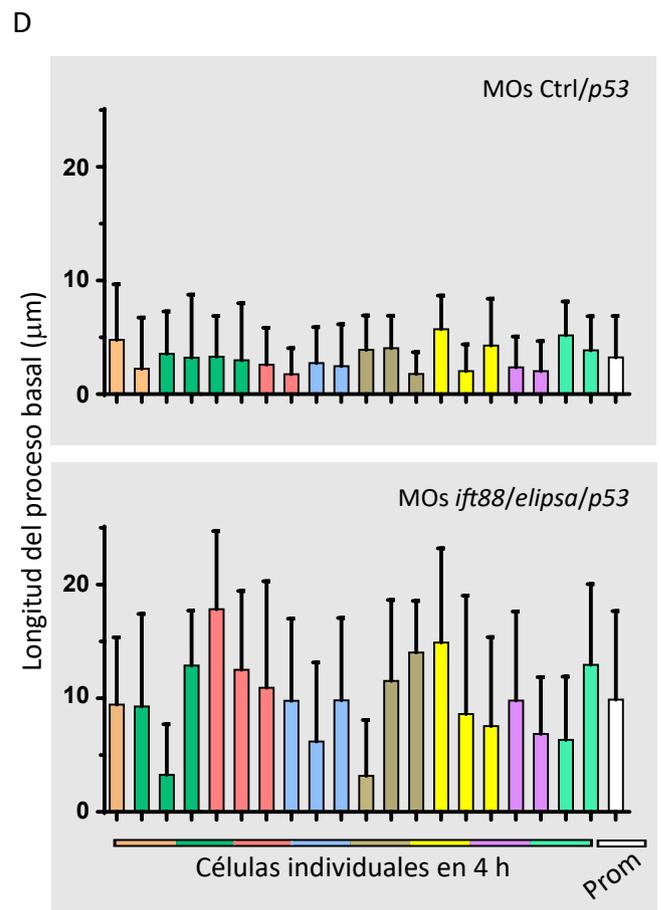
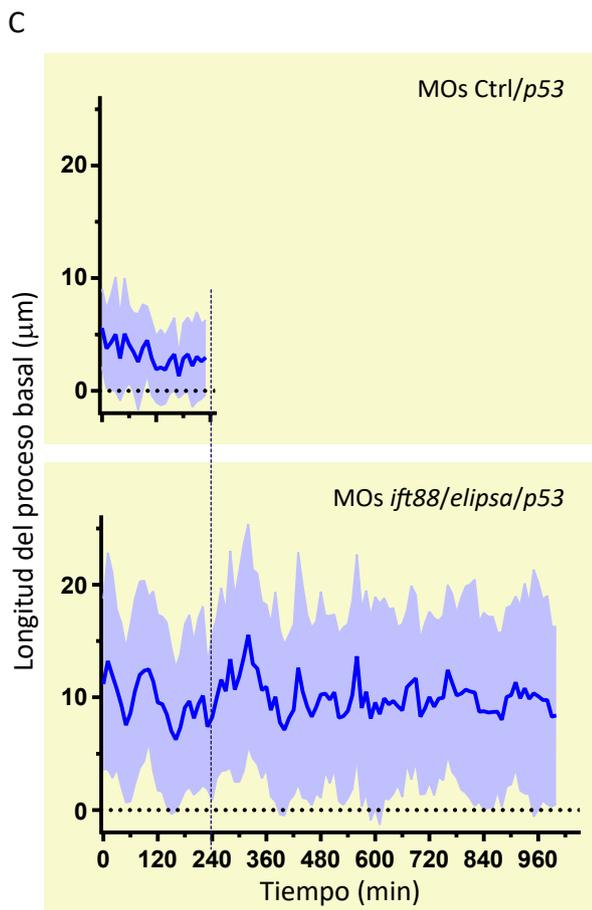
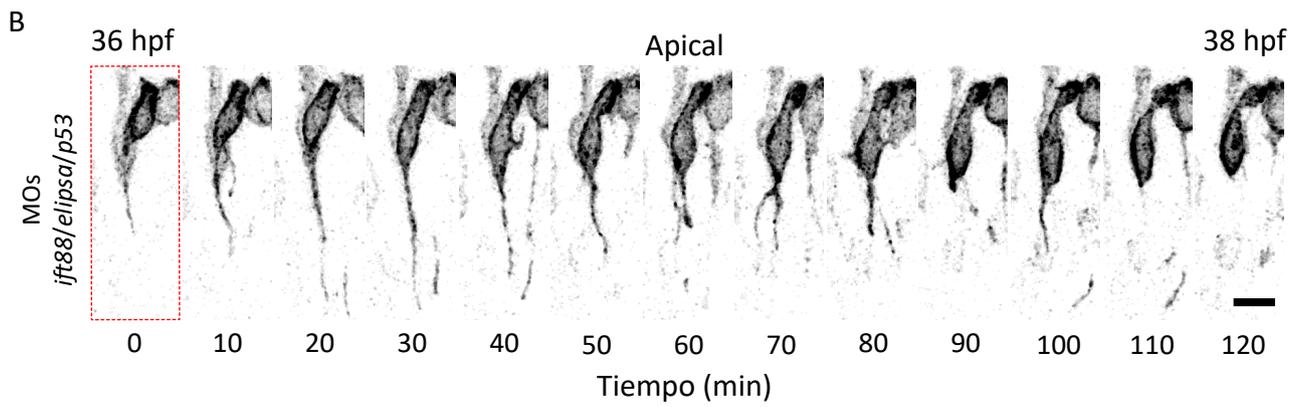
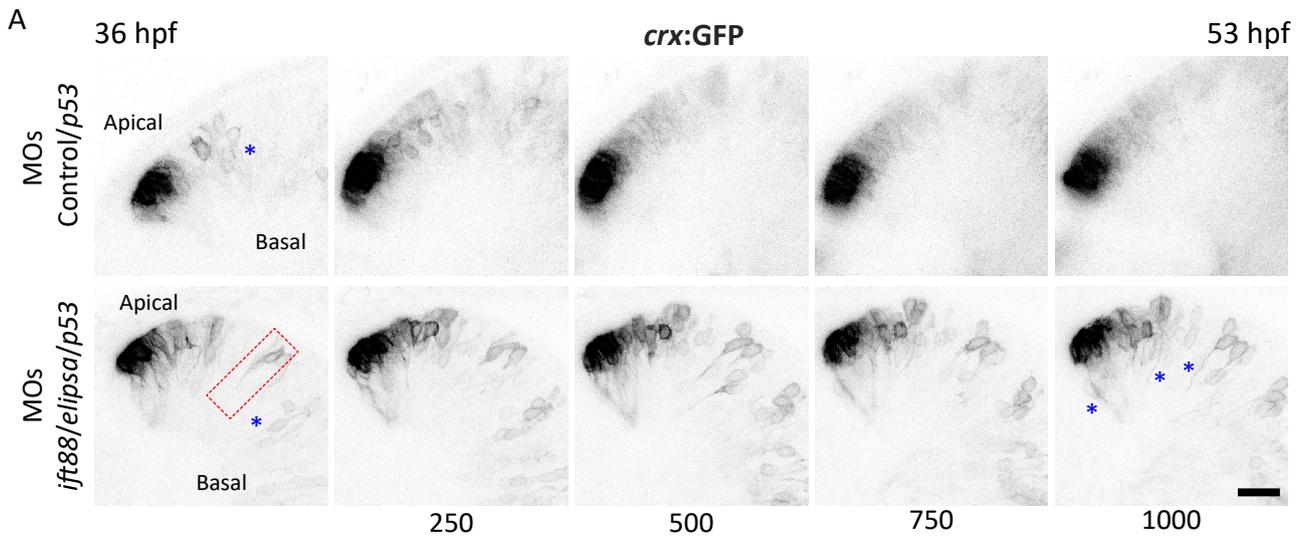


Fig. 20 – Análisis de la dinámica de los procesos basales en embriones morfantes.

A) Proyección de máxima intensidad de imágenes de *time-lapse* de embriones observados desde 36 a 53 hpf. Se observan varios procesos basales muy dinámicos que se mantienen presentes durante todo el tiempo de adquisición en los embriones morfantes (asteriscos).

B) A partir del *time-lapse* de embrión morfante mostrado en A, se observa a mayor magnificación el comportamiento de los procesos basales de una célula (recuadro) durante dos horas, estos cambian de longitud rápidamente e incluso se ramifican.

C) Longitud promedio (media  $\pm$  SD) de los procesos basales de células individuales medidos en cada punto de tiempo, durante 4 horas en los controles y 17 horas en los morfantes. Se midió la longitud de los procesos de entre 2 y 4 células/embrión de forma manual; n= 20 células de 8 embriones de 3 experimentos independientes para embriones control y 2 para morfantes.

D) Utilizando los mismos datos que en C analizamos la longitud promedio de procesos basales para cada célula durante las primeras 4 h de adquisición, aquí las barras representan células individuales y cada color un embrión diferente; las barras blancas representan los valores promedio.

Barras de escala: A, 20  $\mu\text{m}$ ; B, 8  $\mu\text{m}$ ;

---

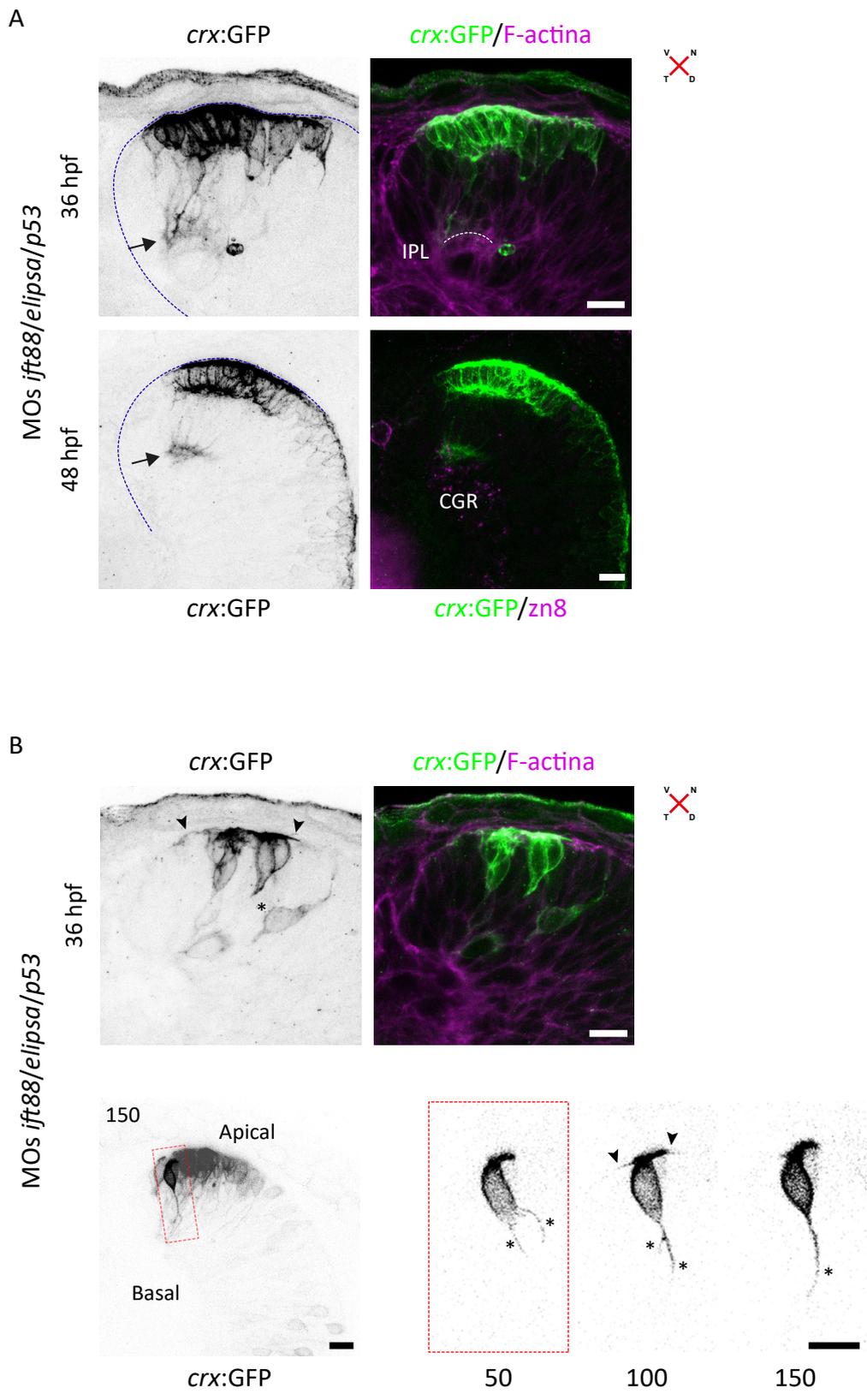


Fig. 21 – Análisis de la extensión de los procesos basales.

A) Proyecciones en 3D de embriones morfantes de la línea *crx*:GFP, marcados con faloidina-TRITC (36 hpf) o zn8 (48 hpf). Observamos que los procesos basales (flecha) no se extienden más allá de la capa plexiforme interna. Línea punteada azul: límite de la retina neural; línea punteada blanca: capa plexiforme interna (IPL).

B) Imágenes de embriones morfantes de la línea *crx*:GFP en las que se observan células progenitoras de fotorreceptores que extienden tanto procesos basales (asteriscos) como tangenciales (cabezas de flecha). Arriba, proyección de máxima intensidad de 5 secciones con una separación de 36  $\mu\text{m}$ . Abajo, proyección de máxima intensidad de imágenes de *time-lapse* a los 150 min de iniciado, en la que se destaca una sección en particular mediante montaje de imágenes. A la derecha, se observa una mayor magnificación de la célula contenida en el recuadro, a distintos tiempos extendiendo procesos tangenciales al mismo tiempo que presenta largos procesos basales muy dinámicos. Tiempo en min.

Barras de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

---

## Discusión

Hasta hace unas pocas décadas atrás, la cilia primaria era considerada un “vestigio evolutivo” y por lo tanto, sin relevancia funcional para la célula. Sin embargo, en los últimos tiempos se han multiplicado enormemente las descripciones sobre diversas funciones que desempeña. A pesar de que este reconocimiento es reciente, algunas de sus descripciones se remontan a mediados del siglo XX. Por ejemplo, los estudios del desarrollo de la cilia en el epitelio neural del embrión de pollo realizadas por Sotelo y Trujillo-Cenóz 1958, o la descripción de las vías de ciliogénesis publicada por Sorokin 1968. Actualmente, dada la caracterización a lo largo de las últimas décadas de su relevancia funcional en la señalización celular, el interés por investigar este organelo va en aumento y encontramos muchos reportes sobre su estructura y función en varias especies de vertebrados, particularmente durante el desarrollo del sistema nervioso (Lepanto, Badano y Zolessi 2016).

En este trabajo analizamos la presencia, localización, dinámica y características estructurales de la cilia primaria en progenitores tempranos de fotorreceptores, así como su posible función en la orientación y polarización de dichas células durante el desarrollo de la retina del pez cebra. Para ello, abarcamos etapas previas y posteriores a la última división celular de los fotorreceptores, desde las 36 hpf, momento en que las células progenitoras son especificadas, hasta las 72 hpf, etapa más tardía de su diferenciación y momento en el que la retina ya presenta todas sus capas y conexiones sinápticas.

### Presencia, estructura y dinámica de las cilias primarias en la región apical de la retina

Para realizar estos análisis, inicialmente, utilizamos embriones de pez cebra con doble marcado, evidenciando tanto la cilia (usando un anticuerpo anti-tubulina acetilada o la línea transgénica Arl13b-GFP) como el cuerpo basal (marcado con anti- $\gamma$ -tubulina). Esto nos permitió discriminar aquellas cilias que efectivamente pertenecían a la región apical de la retina neural de las que pertenecen al RPE. Determinamos así la presencia de cilias primarias en las células ubicadas en la región

apical de la retina desde las 36 a las 72 hpf. Esta observación no debe resultar sorprendente, no sólo porque la gran mayoría de las células de los vertebrados son capaces de poseer cilias, sino porque estudios previos ya indicaban la presencia de cilias primarias en la región apical de progenitores tempranos de fotorreceptores en embriones de pollo (Meller y Tetzlaff 1976) y de ratón (Hinds y Hinds 1979).

Si bien en las primeras etapas analizadas se observa una importante presencia de cilias primarias en la región apical de la retina neural del embrión de pez cebra, su densidad disminuye de manera significativa y progresiva hasta las 60 hpf, volviendo a aumentar hacia las 72 hpf. Esto supone una disminución de la presencia de cilias desde que estas células son especificadas (a las 36 hpf comienzan a expresar *crx*) (Liu et al. 2001) y un reensamblaje ciliar luego de su última división mitótica (que sucede aproximadamente a las 60 hpf) (Aparicio et al. 2021; Rocha-Martins et al. 2021), coincidiendo con las primeras etapas de diferenciación del segmento externo (Kljavin 1987).

Esta disminución en la densidad ciliar fue acompañada por una disminución en la longitud media de la cilia. Es decir, mientras que a las 40 hpf las cilias primarias de progenitores de fotorreceptores miden en promedio 0.86  $\mu\text{m}$ , a las 60 hpf miden en promedio 0.28  $\mu\text{m}$ , lo que representa una reducción al tercio del largo de la cilia y que, al igual que su presencia, aumenta nuevamente hacia las 72 hpf.

La longitud de las cilias primarias de los vertebrados es muy heterogénea, variando no sólo entre los diferentes tejidos, sino también entre células individuales. A pesar de que existe cierta variabilidad, la longitud ciliar es una característica de cada tipo celular que parece estar fuertemente regulada por diferentes mecanismos (Avasthi y Marshall 2012). Tanto la longitud de la cilia como el número de células ciliadas en una población pueden ser modificada por diferentes vías de señalización por lo que parece lógico considerar que estas variaciones podrían implicar diferencias funcionales. Por ejemplo, las cilias analizadas en el riñón de ratones adultos presentan longitudes que van desde 2 a 7  $\mu\text{m}$  en los segmentos tubulares y de 1.6 a 2.6  $\mu\text{m}$  en las células del túbulo colector, mientras que las cilias presentes durante el desarrollo de riñones humanos son mucho más pequeñas (0.59 – 0.81  $\mu\text{m}$ ) (Park

2018). Algo similar sucede en el sistema nervioso, por ejemplo, un análisis exhaustivo mostró que las neuronas postmitóticas corticales de ratón luego de migrar a su capa definitiva comienzan a formar una cilia cuya longitud y dinámica resulta diferente según el estadio y la capa a la que pertenece la célula, partiendo de cilias de entre 0.9 y 1.3  $\mu\text{m}$  a P0 y llegando a 5  $\mu\text{m}$  en P60 (Arellano et al. 2012). Más temprano, también durante el desarrollo de la corteza de ratón, otros autores describen cilias que se proyectan hacia el ventrículo con longitudes de entre 0.5 y 2  $\mu\text{m}$  (Willaredt et al. 2008) o entre 0.7 y 2.5  $\mu\text{m}$  de longitud en el neuroepitelio de la placa tectal (Cohen y Meininger 1987).

Las cilias que hemos caracterizado aquí para progenitores tempranos de fotorreceptores son, en promedio, más cortas que lo reportado para las células neuroepiteliales retinianas previo al inicio de la neurogénesis, a las 26 hpf, que tienen una longitud media de 1.8  $\mu\text{m}$  (Lepanto et al. 2016). Pero los progenitores de fotorreceptores no son las únicas células que disminuyen la longitud de su cilia durante el desarrollo de la retina del pez cebra. De manera similar, las RGCs en diferenciación disminuyen la longitud promedio de su cilia a 1.3  $\mu\text{m}$  luego de sufrir su última división celular y previo a su posicionamiento en la capa más basal (Davison 2014; Lepanto et al. 2016).

El acortamiento progresivo que se produce desde la especificación de los fotorreceptores y que presenta su valor mínimo en el mismo estadio en que comienza la diferenciación morfológica de los segmentos externos, coincide con una disminución significativa del número de cilias. Esto parece reflejar una dinámica ciliar en estas células que responde a un avance en su diferenciación. Las cilias son organelos dinámicos, que en ocasiones son desensamblados por las células, por ejemplo durante la progresión del ciclo celular o la diferenciación celular. Ambos eventos tienen lugar en progenitores de fotorreceptores durante las etapas analizadas. Estas células sufren al menos dos divisiones mitóticas, la última hacia las 60 hpf (Aparicio et al. 2021; Weber et al. 2014) e inician procesos de diferenciación incluso antes de nacer, por ejemplo expresando opsinas desde las 50 hpf (Schmitt y Dowling 1999) e iniciando el crecimiento del segmento interno desde las 55 hpf (Crespo y Knust 2018). Uno de los mecanismos utilizado para el desensamble de las

cilias es la reabsorción, en el que se produce un acortamiento de este organelo desde el extremo distal (Liang et al. 2016). Este mecanismo podría estar operando en las cilias de los progenitores de fotorreceptores entre las 40 y 60 hpf, ya que tanto su presencia como su longitud ciliar se reducen progresivamente a medida que transcurren estas etapas.

Al igual que lo reportado para progenitores de fotorreceptores de ratón (Hinds y Hinds 1979), la cilia primaria de progenitores de fotorreceptores de embriones de pez cebra permanece siempre en la porción apical de estas células, siempre en contacto estrecho con otros progenitores de la región apical (presumiblemente otros progenitores de fotorreceptores o de la glía de Müller) o con células del RPE. Este contacto parece volverse aún más estrecho en la etapa de 60 hpf observándose cilias que están rodeadas completamente por la membrana de otra célula y en ocasiones presentan pequeñas prolongaciones o fibras que se extienden desde el extremo ciliar y contactan directamente con dichas células. Estudios previos indican que el RPE es necesario para el correcto desarrollo de la retina (Pearson et al. 2005) y que alrededor de las 40 hpf comienza a expresar Shh, cuya vía de señalización ha sido ampliamente vinculada con la cilia primaria. Por otro lado, algunos estudios han mostrado que la modulación del largo ciliar puede ser una forma de control de la sensibilidad de la célula a señales ambientales (Hamamoto et al. 2016). Dado que la expresión de Shh por parte del RPE es concomitante con el inicio de la diferenciación de los fotorreceptores (Stenkamp et al. 2000), debemos considerar la posibilidad de que la disminución de la longitud de la cilia primaria en precursores de fotorreceptores del embrión de pez cebra sea una forma de modular su exposición a señales provenientes del RPE, ya que a medida que avanza el desarrollo general de la retina, el contacto entre ambos tejidos se hace más estrecho.

La mayoría de las cilias primarias de progenitores de fotorreceptores observadas carecen de un bolsillo profundo, similar a lo observado en otras células neuroepiteliales (Arellano et al. 2012; Sotelo y Trujillo-Cenóz 1958). Registramos la presencia de un bolsillo, generalmente pequeño en las etapas tempranas de la diferenciación de fotorreceptores a las 40 hpf, esta proporción disminuyó progresivamente, y a las 60 hpf no se observó ninguna cilia primaria con bolsillo. La

ausencia de bolsillo ciliar puede estar asociada a una ciliogénesis por vía extracelular, mientras que su presencia puede estar asociada a una vía de ciliogénesis intracelular, ciliogénesis incompleta o retracción del cuerpo basal posterior a la génesis (Molla-Herman et al. 2010). No observamos ninguna vesícula con cuerpos basales o pequeñas cilias en el citoplasma de los progenitores de fotorreceptores, lo que refuerza nuestra hipótesis de la ciliogénesis por vía extracelular.

A las 72 hpf, luego de su última división celular y con una diferenciación celular avanzada, tanto la densidad como la longitud de las cilias primarias en la región apical de la retina de pez cebra aumentan significativamente. De manera similar, durante la diferenciación de los fotorreceptores postmitóticos en la retina de ratón, se observa un aumento en longitud de las cilias presentes en estas células entre las etapas E15 y E17 (Hinds y Hinds 1979). En general, las cilias observadas en la región apical de la retina del embrión de pez cebra hacia las 72 hpf presentaron un bolsillo profundo, ensanchamiento en la región distal y aspecto más robusto. Además, se vieron rodeadas de gran cantidad de material celular, que en ocasiones parece continuarse con el cuerpo de la cilia ya que la membrana ciliar aparece interrumpida en esas regiones de contacto. Cilias con estructuras similares ha sido descritas durante la morfogénesis de bastones en la retina de ratón (De Robertis 1956; Salinas et al. 2017). Todo parece indicar que en este estadio las cilias que encontramos en la región apical de la retina corresponden a las cilias primitivas que ya han comenzado el proceso de diferenciación en segmento externo.

Las cilias primarias tienen diferentes funciones durante la diferenciación neuronal modulando la proliferación, la determinación celular, la migración e incluso su forma ya que influyen en el establecimiento de la polaridad celular (Higginbotham et al. 2013; Lepanto, Badano y Zolessi 2016); además, estas funciones varían en los diferentes tipos celulares así como en los distintos estadios. La disminución de la longitud ciliar, en conjunto con los cambios en la profundidad del bolsillo luego de las 40 hpf, indica grandes diferencias estructurales con respecto a las cilias primarias de los progenitores retinianos tempranos de pez cebra con longitudes mayores y bolsillos profundos y completos (Davison 2014; Lepanto et al. 2016).

Proponemos un modelo en el que inicialmente las células neuroepiteliales de la retina presentan una cilia primaria relativamente larga, con un bolsillo ciliar marcado, que probablemente se desensambla poco antes de que la célula entre en mitosis. Una vez que los progenitores de fotorreceptores comienzan a expresar factores de transcripción específicos y se ubican en la región externa de la retina neural, presentan una cilia primaria más corta y que carece de bolsillo. Esta cilia, que parece emerger por vía extracelular, está menos presente y parece acortarse a medida que la diferenciación de los fotorreceptores avanza, pero a la vez parece estrechar su contacto con otros tipos celulares. Finalmente, cuando comienza la generación del segmento externo se observa una cilia con características muy diferentes a las ciliadas presentes en estas mismas células en etapas previas y se presenta en la gran mayoría de los fotorreceptores en diferenciación (Fig. 22).

#### Función de la cilia primaria en la diferenciación de los fotorreceptores

Luego de identificar y caracterizar las ciliadas primarias de células precursoras de fotorreceptores, evaluamos su función. Utilizamos una combinación de dos morfolidos que interrumpen el correcto procesamiento del ARNm de dos proteínas que participan en la ciliogénesis, *Ift88* y *Elipsa*, que se ha demostrado que genera una reducción de la longitud y la densidad de las ciliadas (Lepanto et al. 2016). Centramos nuestros análisis en los estadios comprendidos entre la especificación y el inicio de la morfogénesis del segmento externo (entre 36 y 72 hpf).

Si bien existen reportes que indican que en algunos tejidos las ciliadas primarias influyen en el establecimiento de la polaridad celular o la migración (Higginbotham et al. 2013) mediante la observación de embriones fijados concluimos que las ciliadas primarias no son esenciales para la orientación de los fotorreceptores ni para su correcta laminación. A pesar del notorio retraso en desarrollo y la diferenciación celular, los fotorreceptores presuntivos se ubicaron correctamente en la región apical de la retina y formaron una capa nuclear externa. Estos resultados ratifican observaciones previas realizadas por nuestro laboratorio con un marcador no específico de fotorreceptores (Lepanto 2017). Mediante la realización de *time-lapse*

determinamos un fenotipo sutil en el que la retracción de los procesos basales se ve afectada.

Los fotorreceptores y sus progenitores sufren un proceso de diferenciación que presenta una notable diferencia con el resto de los progenitores retinianos: no se desprenden nunca de la región apical (Aparicio et al. 2021; Hinds y Hinds 1979). En cambio, una vez que la célula progenitora ha sido especificada se produce la última translocación nuclear hacia la región más apical y con ella el desprendimiento y retracción del proceso basal, en los que la actomiosina parece cumplir un rol fundamental (Aparicio et al. 2021; Rocha-Martins et al. 2021). En los embriones salvajes, la retracción del proceso basal no se produce de manera fluida y continua, sino que se da de forma saltatoria con movimientos de elongación y retracción alternados, observándose procesos dinámicos a las 36 hpf incluso una vez que los núcleos de los precursores alcanzaron la región apical. Estos movimientos tienden a desaparecer rápidamente, siendo difíciles de observar a las 40 hpf, cuando los procesos basales son muy cortos y menos dinámicos. Algo similar fue descrito para progenitores de fotorreceptores de la retina de ratón mediante la realización de cortes seriados y una reconstrucción posterior a dos edades embrionarias distintas. Los diagramas realizados por los autores ilustran células con procesos basales de longitud y grosor variados (Hinds y Hinds 1979).

Sin embargo, en los embriones morfantes se observan procesos también dinámicos, pero notablemente más largos en promedio, que presentan movimientos de extensión y retracción alternados durante todo el período analizado, desde las 36 hpf hasta al menos hasta las 53 hpf (momento de finalización del *time-lapse*). Las proteínas Slit son factores parácrinos que han sido vinculadas con la guía axonal en algunos tipos neuronales y se ha descrito la presencia de sus receptores en la cilia primaria de interneuronas corticales (Higginbotham et al. 2012). Un fenotipo similar al descrito aquí, se ha observado en las RGCs postmitóticas en embriones de pez cebra con interrupción de la expresión de Slit1b. Estos embriones morfantes para Slit1b presentan inhibición de la retracción del proceso apical debido a un defecto en el desprendimiento (Zolessi et al. 2006; Wong et al. 2012). Pero los procesos basales de los precursores de fotorreceptores no parecen tener inconveniente en

desprenderse de la lámina basal y su longitud varía entre las distintas células e incluso en una misma célula a lo largo del tiempo. De hecho, a pesar de su comportamiento dinámico, estos procesos no atraviesan nunca la capa de RGCs y en ocasiones parecen confluir en la IPL. Por lo tanto, la disrupción de genes ciliares parece afectar el acortamiento del proceso basal y no su desprendimiento.

Este fenotipo puede deberse a un efecto autónomo de los progenitores de fotorreceptores o a la carencia de una señal o interacción con otro tipo celular retiniano. En caso de que fuera un efecto no autónomo podría deberse, por ejemplo, a: 1) la disminución de la población de RGCs que se ha demostrado que sucede en estos morfantes (Lepanto et al. 2016), sobre todo teniendo en cuenta que muchos procesos basales de morfantes confluyen en la IPL; 2) la interrupción de cilias primarias en otros precursores retinianos. Tanto las RGCs como las células amacrinas expresan *shh*, y se ha demostrado que la expresión de *shh* por las células amacrinas es necesaria para la formación de las capas plexiformes y la diferenciación de los fotorreceptores en el pez cebra (Shkumatava et al. 2004); 3) retraso en generación de otros tipos retinianos necesarios para el establecimiento de la sinaptogénesis en la capa plexiforme externa. En el pez cebra, la diferenciación de las dendritas de las células horizontales precede a la aparición de las primeras cintas sinápticas (65 hpf), a las 50 hpf se observan procesos de células horizontales en la OPL (Schmitt y Dowling 1999). Además, se ha visto un posicionamiento aberrante de los contactos sinápticos de los fotorreceptores en la retina de ratones mutantes para componentes del BBSoma (un complejo proteico importante para la formación y funcionamiento de las cilias), causados por un mal posicionamiento de los procesos de células horizontales (Hsu et al. 2020). La evidencia con la que contamos hoy nos impide determinar si este fenotipo es autónomo de los fotorreceptores o depende de interacciones celulares.

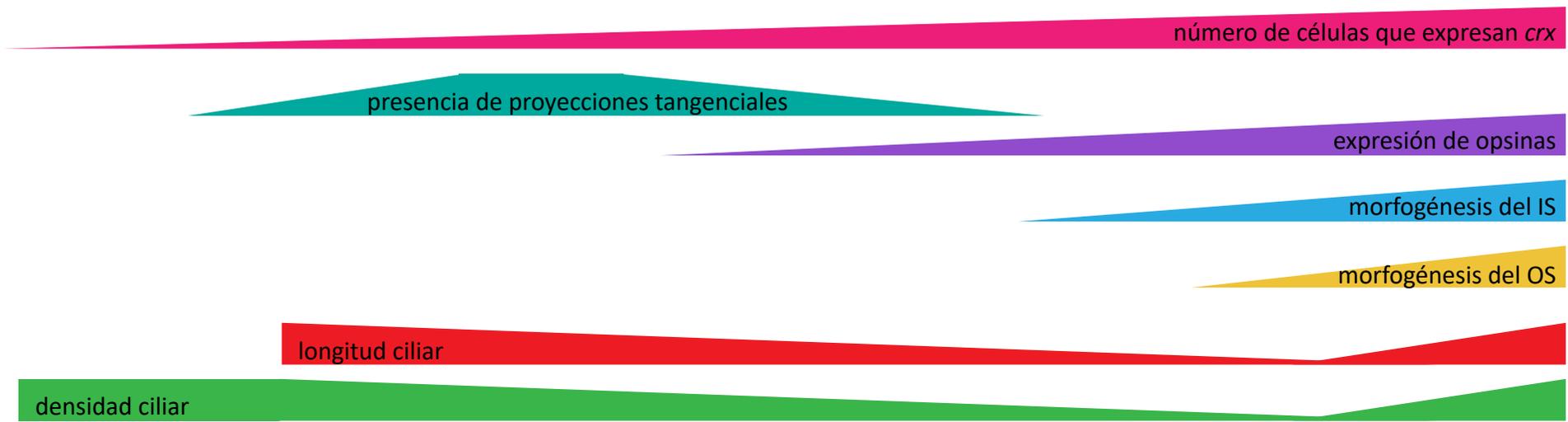
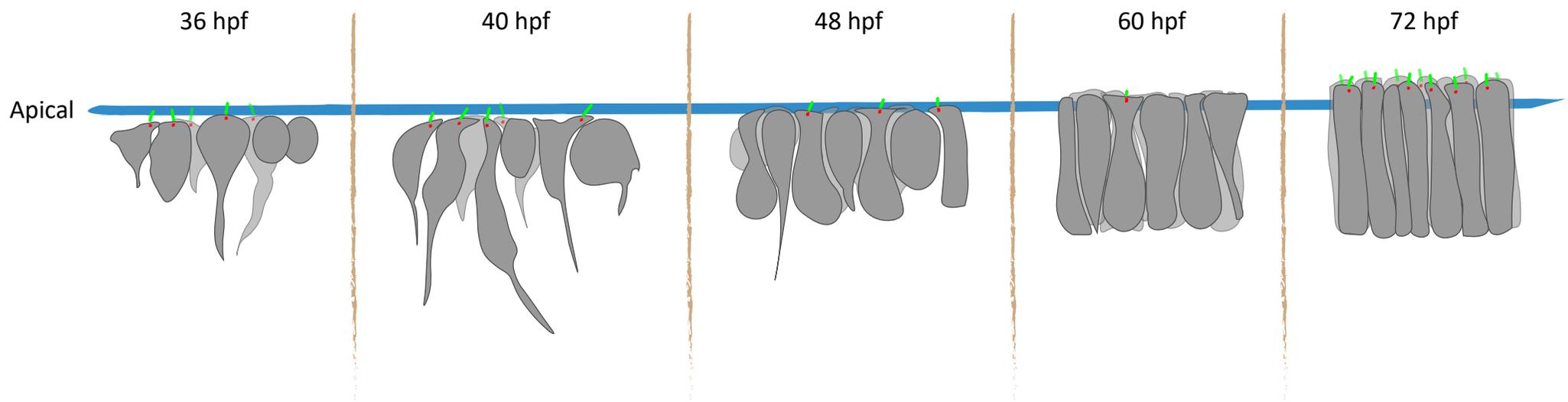


Fig. 22 – Diagrama de la presencia, localización y dinámica de la cilia primaria de progenitores de fotorreceptores y fotorreceptores en diferenciación.

Representación esquemática de la dinámica ciliar de células presentes en la región apical durante el desarrollo de la retina del pez cebra en el contexto de los principales eventos durante la diferenciación de los fotorreceptores. Este diagrama fue elaborado en base a datos recabados de la bibliografía y los obtenidos en esta investigación. Se observa una reducción en la densidad y la longitud de la cilia desde las 40 a las 60 hpf y un aumento de ambos parámetros a las 72 hpf. Para cada edad se mantiene la escala de longitud ciliar y tamaño celular aproximados, excepto entre cilias y células (el tamaño ciliar está aumentado respecto al tamaño celular para lograr una mejor visualización de la cilia primaria).

---

## Conclusiones

Mediante este trabajo revelamos la presencia de cilias primarias desde etapas tempranas del desarrollo de fotorreceptores retinianos del embrión de pez cebra. Las variaciones en su densidad y longitud registradas durante los diferentes estadios de desarrollo indican que las cilias primarias de los progenitores de fotorreceptores presentan una dinámica que parece responder a una necesidad inicial de recepción de señales para el progreso de su diferenciación, pero que dejan de ser necesarias a medida que avanza su desarrollo en etapas premitóticas. Las características ciliares observadas en estadios postmitóticos, indican que la cilia vuelve a ser necesaria, probablemente debido al inicio del desarrollo del segmento externo. Por otro lado, la inhibición de la cilia primaria en estos embriones produce una interrupción del comportamiento dinámico de los progenitores de fotorreceptores, que se manifiesta con retracción aberrante del proceso basal. Aunque no pudimos determinar si ese fenotipo se debe a un efecto autónomo de estos progenitores o a un defecto asociado a otras células de la retina.

En suma, nuestros resultados sugieren que la presencia de las cilias primarias en los progenitores de fotorreceptores es necesaria durante las etapas iniciales, inmediatamente después de la especificación, posiblemente influyendo en la retracción de su proceso basal y que su presencia disminuye luego hasta que vuelve a ser necesaria para la generación del segmento externo.

Si bien existen muchos reportes sobre la estructura ciliar durante las etapas tardías de diferenciación de fotorreceptores, no encontramos ninguno que refiera a un análisis estructural y funcional de la cilia primaria durante las etapas tempranas del desarrollo de estas células. Consideramos que este trabajo es un importante aporte hacia la elucidación del proceso de diferenciación de estas células tan particulares.

## Referencias

- ALMEIDA, A.D., BOIJE, H., CHOW, R.W., HE, J., THAM, J., SUZUKI, S.C. y HARRIS, W.A., 2014. Spectrum of Fates: a new approach to the study of the developing zebrafish retina. *Development (Cambridge, England)*, vol. 141, no. 9, pp. 1971-80. ISSN 1477-9129. DOI 10.1242/dev.104760.
- APARICIO, G., RODAO, M., BADANO, J.L. y ZOLESSI, F.R., 2021. Photoreceptor progenitor dynamics in the zebrafish embryo retina and its modulation by primary cilia and N-cadherin. *International Journal of Developmental Biology*, vol. 65, no. 5-6, pp. 439-455. ISSN 16963547. DOI 10.1387/ijdb.200113fz.
- ARELLANO, J.I., GUADIANA, S.M., BREUNIG, J.J., RAKIC, P. y SARKISIAN, M.R., 2012. Development and distribution of neuronal cilia in mouse neocortex. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 520, no. 4, pp. 848-873. ISSN 00219967. DOI 10.1002/cne.22793.
- ARIOTTI, N., HALL, T.E., RAE, J., FERGUSON, C., MCMAHON, K.A., MARTEL, N., WEBB, R.E., WEBB, R.I., TEASDALE, R.D. y PARTON, R.G., 2015. Modular Detection of GFP-Labeled Proteins for Rapid Screening by Electron Microscopy in Cells and Organisms. *Developmental Cell*, vol. 35, no. 4, pp. 513-525. ISSN 18781551. DOI 10.1016/j.devcel.2015.10.016.
- AVASTHI, P. y MARSHALL, W.F., 2012. Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. *Differentiation*, vol. 83, no. 2, pp. S30-S42. ISSN 03014681. DOI 10.1016/j.diff.2011.11.015.
- BAYE, L.M. y LINK, B.A., 2008. Nuclear migration during retinal development. *Brain Research*, vol. 1192, pp. 29-36. ISSN 00068993. DOI 10.1016/j.brainres.2007.05.021.
- BENMERAH, A., 2013. The ciliary pocket. *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 25, no. 1, pp. 78-84. ISSN 18790410. DOI 10.1016/j.ceb.2012.10.011.
- BIBLIOWICZ, J., TITTLE, R.K. y GROSS, J.M., 2011. *Toward a better understanding of*

*human eye disease: Insights from the zebrafish, Danio rerio*. S.l.: s.n. ISBN 9780123848789.

BILL, B.R., PETZOLD, A.M., CLARK, K.J., SCHIMMENTI, L.A. y EKKER, S.C., 2009. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish*, vol. 6, no. 1, pp. 69-77. ISSN 1557-8542. DOI 10.1089/zeb.2008.0555.

BIZET, A.A., BECKER-HECK, A., RYAN, R., WEBER, K., FILHOL, E., KRUG, P., HALBRITTER, J., DELOUS, M., LASBENNES, M.C., LINGHU, B., OAKELEY, E.J., ZARHRATE, M., NITSCHKÉ, P., GARFA-TRAORE, M., SERLUCA, F., YANG, F., BOUWMEESTER, T., PINSON, L., CASSUTO, E., DUBOT, P., ELSHAKHS, N.A.S., SAHEL, J.A., SALOMON, R., DRUMMOND, I.A., GUBLER, M.C., ANTIGNAC, C., CHIBOUT, S., SZUSTAKOWSKI, J.D., HILDEBRANDT, F., LORENTZEN, E., SAILER, A.W., BENMERAH, A., SAINT-MEZARD, P. y SAUNIER, S., 2015. Mutations in TRAF3IP1/IFT54 reveal a new role for IFT proteins in microtubule stabilization. *Nature Communications*, vol. 6. ISSN 20411723. DOI 10.1038/ncomms9666.

BOEHLKE, C., JANUSCH, H., HAMANN, C., POWELSKE, C., MERGEN, M., HERBST, H., KOTSIS, F., NITSCHKE, R. y KUEHN, E.W., 2015. A cilia independent role of lft88/polaris during cell migration. *PLoS ONE*, vol. 10, no. 10, pp. 1-19. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0140378.

BOIJE, H., RULANDS, S., DUDCZIG, S., SIMONS, B.D. y HARRIS, W.A., 2015. The Independent Probabilistic Firing of Transcription Factors: A Paradigm for Clonal Variability in the Zebrafish Retina. *Developmental Cell*, vol. 34, no. 5, pp. 532-543. ISSN 18781551. DOI 10.1016/j.devcel.2015.08.011.

BOROVINA, A., SUPERINA, S., VOSKAS, D. y CIRUNA, B., 2010. Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nature Cell Biology*, vol. 12, no. 4, pp. 407-412. ISSN 14657392. DOI 10.1038/ncb2042.

BRESLOW, D.K. y HOLLAND, A.J., 2019. Mechanism and Regulation of Centriole and Cilium Biogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 88, pp. 691-724. ISSN 15454509. DOI 10.1146/annurev-biochem-013118-111153.

- BRESLOW, D.K., KOSLOVER, E.F., SEYDEL, F., SPAKOWITZ, A.J. y NACHURY, M. V., 2013. An in vitro assay for entry into cilia reveals unique properties of the soluble diffusion barrier. *Journal of Cell Biology*, vol. 203, no. 1, pp. 129-147. ISSN 00219525. DOI 10.1083/jcb.201212024.
- CAVODEASSI, F., 2018. Dynamic tissue rearrangements during vertebrate eye morphogenesis: Insights from fish models. *Journal of Developmental Biology*, vol. 6, no. 1. ISSN 22213759. DOI 10.3390/jdb6010004.
- CHEN, J.L., CHANG, C.H. y TSAI, J.W., 2019. Gli2 Rescues Delays in Brain Development Induced by Kif3a Dysfunction. *Cerebral Cortex*, vol. 29, no. 2, pp. 751-764. ISSN 14602199. DOI 10.1093/cercor/bhx356.
- CHINEN, A., HAMAOKA, T., YAMADA, Y. y KAWAMURA, S., 2003. Gene duplication and spectral diversification of cone visual pigments of zebrafish. *Genetics*, vol. 163, no. 2, pp. 663-675. ISSN 00166731. DOI 10.1093/genetics/163.2.663.
- COHEN, E.D. y MEININGER, V., 1987. Ultrastructural Analysis Of Primary Cilium In The Embryonic Nervous Tissue Of Mouse. *Int J Devl Neuroscincence*, vol. 5, no. 1, pp. 43-51. DOI 10.1016/0736-5748(87)90047-5.
- COREY, D.R. y ABRAMS, J.M., 2001. Morpholino antisense oligonucleotides: Tools for investigating vertebrate development. *Genome Biology*, vol. 2, no. 5, pp. 3-5. ISSN 14656906. DOI 10.1186/gb-2001-2-5-reviews1015.
- CRESPO, C. y KNUST, E., 2018. Characterisation of maturation of photoreceptor cell subtypes during zebrafish retinal development. *Biology Open*, vol. 7, no. 11. ISSN 20466390. DOI 10.1242/bio.036632.
- 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 República*,
- DE ROBERTIS, E.M., 1956. Morphogenesis Of The Retinal Rods: An Electron Microscope Study. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol*, vol. 2, no. 4. DOI

10.1083/jcb.2.4.209.

DULDULAO, N.A., LEE, S. y SUN, Z., 2009. Cilia localization is essential for in vivo functions of the Joubert syndrome protein Arl13b/Scorpion. *Development*, vol. 136, no. 23, pp. 4033-4042. ISSN 09501991. DOI 10.1242/dev.036350.

GOROJANKINA, T., 2016. Hedgehog signaling pathway: A novel model and molecular mechanisms of signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 73, no. 7, pp. 1317-1332. ISSN 14209071. DOI 10.1007/s00018-015-2127-4.

GRAMAGE, E., LI, J. y HITCHCOCK, P., 2014. The expression and function of midkine in the vertebrate retina. *British Journal of Pharmacology*, vol. 171, no. 4, pp. 913-923. ISSN 00071188. DOI 10.1111/bph.12495.

HAMAMOTO, A., YAMATO, S., KATOH, Y., NAKAYAMA, K., YOSHIMURA, K., TAKEDA, S., KOBAYASHI, Y. y SAITO, Y., 2016. Modulation of primary cilia length by melanin-concentrating hormone receptor 1. *Cellular Signalling*, vol. 28, no. 6, pp. 572-584. ISSN 18733913. DOI 10.1016/j.cellsig.2016.02.018.

HE, J., ZHANG, G., ALMEIDA, A.D., CAYOUILLE, M., SIMONS, B.D. y HARRIS, W.A., 2012. How Variable Clones Build an Invariant Retina. *Neuron* [en línea], vol. 75, no. 5, pp. 786-798. ISSN 08966273. DOI 10.1016/j.neuron.2012.06.033.  
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.033>.

HIGGINBOTHAM, H., EOM, T., MARIANI, L.E., BACHLEDA, A., HIRT, J., CUSACK, C., LAI, C., CASPARY, T. y ANTON, E.S., 2012. NIH Public Access. , vol. 23, no. 5, pp. 925-938. DOI 10.1016/j.devcel.2012.09.019.

HIGGINBOTHAM, H., GUO, J., YOKOTA, Y., UMBERGER, N.L., SU, C.Y., LI, J., VERMA, N., HIRT, J., GHUKASYAN, V., CASPARY, T. y ANTON, E.S., 2013. Arl13b-regulated cilia activities are essential for polarized radial glial scaffold formation. *Nature Neuroscience*, vol. 16, no. 8, pp. 1000-1007. ISSN 10976256. DOI 10.1038/nn.3451.

- HINDS, J.W. y HINDS, P.L., 1979. Differentiation of photoreceptors and horizontal cells in the embryonic mouse retina: An electron microscopic, serial section analysis. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 187, no. 3, pp. 495-511. ISSN 10969861. DOI 10.1002/cne.901870303.
- HOON, M., OKAWA, H., DELLA SANTINA, L. y WONG, R.O.L., 2014. Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 42, pp. 44-84. ISSN 18731635. DOI 10.1016/j.preteyeres.2014.06.003.
- HSU, Y., GARRISON, J.E., SEO, S. y SHEFFIELD, V.C., 2020. The absence of BBSome function decreases synaptogenesis and causes ectopic synapse formation in the retina. *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, pp. 1-19. ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-020-65233-4.
- HU, M. y EASTER, S.S., 1999. Retinal Neurogenesis: The Formation of the Initial Central Patch of Postmitotic Cells. *Developmental biology*, vol. 207, no. 2, pp. 309-321. DOI 10.1006/dbio.1998.9031.
- IRIGOÍN, F. y BADANO, J.L., 2011. Keeping the Balance Between Proliferation and Differentiation: The Primary Cilium. *Current Genomics*, vol. 12, no. 4, pp. 285-297. ISSN 13892029. DOI 10.2174/138920211795860134.
- KIMMEL, C.B., BALLARD, W.W., KIMMEL, S.R., ULLMANN, B. y SCHILLING, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, vol. 203, no. 3, pp. 253-310. ISSN 1058-8388. DOI 10.1002/aja.1002030302.
- KLJAVIN, I.J., 1987. Early Development of Photoreceptors in the Ventral Retina of the Zebrafish Embryo. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 260, no. 3, pp. 461-471. ISSN 10969861. DOI 10.1002/cne.902600311.
- KWAN, K.M., FUJIMOTO, E., GRABHER, C., MANGUM, B.D., HARDY, M.E., CAMPBELL, D.S., PARANT, J.M., YOST, H.J., KANKI, J.P. y CHIEN, C. Bin, 2007. The Tol2kit: A multisite gateway-based construction Kit for Tol2 transposon

- transgenesis constructs. *Developmental Dynamics*, vol. 236, no. 11, pp. 3088-3099. ISSN 10588388. DOI 10.1002/dvdy.21343.
- LAM, S.S., MARTELL, J.D., KAMER, K.J., DEERINCK, T.J., ELLISMAN, M.H., MOOTHA, V.K. y TING, A.Y., 2015. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proteomics. *Nature Methods*, vol. 5, no. 6, pp. 1-8. DOI 10.1038/nmeth.3179.
- LEPANTO, P., 2017. Rol de las cilias primarias en la neurogénesis y diferenciación de las células ganglionares de la retina. *Tesis de Doctorado - Universidad de la República*,
- LEPANTO, P., BADANO, J.L. y ZOLESSI, F.R., 2016. Neuron's little helper: The role of primary cilia in neurogenesis. *Neurogenesis*, vol. 3, no. 1, pp. 1-9. ISSN 23262133. DOI 10.1080/23262133.2016.1253363.
- LEPANTO, P., DAVISON, C., CASANOVA, G., BADANO, J.L. y ZOLESSI, F.R., 2016. Characterization of primary cilia during the differentiation of retinal ganglion cells in the zebrafish. *Neural Development*, vol. 11, no. 1, pp. 10. ISSN 1749-8104. DOI 10.1186/s13064-016-0064-z.
- LIANG, Y., MENG, D., ZHU, B. y PAN, J., 2016. Mechanism of ciliary disassembly. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 73, no. 9, pp. 1787-1802. ISSN 14209071. DOI 10.1007/s00018-016-2148-7.
- LIU, Y., SHEN, Y., REST, J.S., RAYMOND, P.A. y ZACK, D.J., 2001. Isolation and Characterization of a Zebrafish Homologue of the Cone Rod Homeobox Gene. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 42, no. 2, pp. 481-487.
- MA, W., YAN, R.-T., XIE, W. y WANG, S.-Z., 2004. A Role of ath5 in Inducing neuroD and the Photoreceptor Pathway. *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 32, pp. 7150-7158. ISSN 0270-6474. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2266-04.2004.
- MALICKI, J. y JOHNSON, C.A., 2017. The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends in Cell Biology*, vol. 27, no. 2, pp. 126-140. ISSN

18793088. DOI 10.1016/j.tcb.2016.08.002.

MANGRUM, W.I., DOWLING, J.E. y COHEN, E.D., 2002. A morphological classification of ganglion cells in the zebrafish retina. *Visual Neuroscience*, vol. 19, no. 6, pp. 767-779. ISSN 09525238. DOI 10.1017/S0952523802196076.

MARTINEZ-MORALES, J.R., DEL BENE, F., NICA, G., HAMMERSCHMIDT, M., BOVOLENTA, P. y WITTBRODT, J., 2005. Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center. *Developmental Cell*, vol. 8, no. 4, pp. 565-574. ISSN 15345807. DOI 10.1016/j.devcel.2005.01.022.

MASAI, I., STEMPLER, D.L., OKAMOTO, H. y WILSON, S.W., 2000. Midline signals regulate retinal neurogenesis in zebrafish. *Neuron*, vol. 27, no. 2, pp. 251-263. ISSN 08966273. DOI 10.1016/S0896-6273(00)00034-9.

MELLER, K. y TETZLAFF, W., 1976. Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. *Cell and Tissue Research*, vol. 170, no. 2, pp. 145-159. ISSN 0302766X. DOI 10.1007/BF00224296.

MOLLA-HERMAN, A., GHOSSOUB, R., BLISNICK, T., MEUNIER, A., SERRES, C., SILBERMANN, F., EMMERSON, C., ROMEO, K., BOURDONCLE, P., SCHMITT, A., SAUNIER, S., SPASSKY, N., BASTIN, P. y BENMERAH, A., 2010. The ciliary pocket: An endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *Journal of Cell Science*, vol. 123, no. 10, pp. 1785-1795. ISSN 00219533. DOI 10.1242/jcs.059519.

NACHURY, M. V., 2014. How do cilia organize signalling cascades? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 369, no. 1650. ISSN 14712970. DOI 10.1098/rstb.2013.0465.

NACHURY, M. V., 2018. The molecular machines that traffic signaling receptors into and out of cilia. *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 51, pp. 124-131. ISSN 18790410. DOI 10.1016/j.ceb.2018.03.004.

NELSON, S.M., FREY, R.A., WARDWELL, S.L. y STENKAMP, D.L., 2008. The

- developmental sequence of gene expression within the rod photoreceptor lineage in embryonic zebrafish. *Developmental Dynamics*, vol. 237, no. 10, pp. 2903-2917. ISSN 10588388. DOI 10.1002/dvdy.21721.
- NEUMANN, C.J., 2001. Pattern formation in the zebrafish retina. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 12, pp. 485-490. DOI 10.1006/scdb.2001.0272.
- OMORI, Y., ZHAO, C., SARAS, A., MUKHOPADHYAY, S., KIM, W., FURUKAWA, T., SENGUPTA, P., VERAкса, A. y MALICKI, J., 2008. Elipsa is an early determinant of ciliogenesis that links the IFT particle to membrane-associated small GTPase Rab8. *Nature cell biology*, vol. 10, no. 4, pp. 437-444. ISSN 1465-7392. DOI 10.1038/ncb1706.
- PARK, K.M., 2018. Can Tissue Cilia Lengths and Urine Cilia Proteins Be Markers of Kidney Diseases? *Chonnam Medical Journal*, vol. 54, no. 2, pp. 83. ISSN 2233-7385. DOI 10.4068/cmj.2018.54.2.83.
- PARK, S.M., JANG, H.J. y LEE, J.H., 2019. Roles of primary cilia in the developing brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 13, no. May, pp. 1-10. ISSN 16625102. DOI 10.3389/fncel.2019.00218.
- PEARSON, R.A., DALE, N., LLAUDET, E. y MOBBS, P., 2005. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron*, vol. 46, no. 5, pp. 731-744. ISSN 08966273. DOI 10.1016/j.neuron.2005.04.024.
- POGGI, L., VITORINO, M., MASAI, I. y HARRIS, W.A., 2005. Influences on neural lineage and mode of division in the zebrafish retina in vivo. *Journal of Cell Biology*, vol. 171, no. 6, pp. 991-999. ISSN 00219525. DOI 10.1083/jcb.200509098.
- PRIETO, D., APARICIO, G., MACHADO, M. y ZOLESSI, F.R., 2015. Application of the DNA-specific stain methyl green in the fluorescent labeling of embryos. *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2015, no. 99, pp. 1-7. ISSN 1940087X. DOI 10.3791/52769.

- PRIETO, D. y ZOLESSI, F.R., 2017. Functional Diversification of the Four MARCKS Family Members in Zebrafish Neural Development. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, vol. 328, no. 1-2, pp. 119-138. ISSN 15525015. DOI 10.1002/jez.b.22691.
- RAYMOND, P.A. y BARTHEL, L.K., 2004. A moving wave patterns the cone photoreceptor mosaic array in the zebrafish retina. *International Journal of Developmental Biology*, vol. 48, no. 8-9, pp. 935-945. ISSN 02146282. DOI 10.1387/ijdb.041873pr.
- RAYMOND, P.A., BARTHEL, L.K. y CURRAN, G.A., 1995. Developmental patterning of rod and cone photoreceptors in embryonic zebrafish. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 359, no. 4, pp. 537-550. ISSN 00219967. DOI 10.1002/cne.903590403.
- REYNOLDS, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*, vol. 17, no. 1, pp. 208-212. ISSN 00219525. DOI 10.1083/jcb.17.1.208.
- ROBU, M.E., LARSON, J.D., NASEVICIUS, A., BEIRAGHI, S., BRENNER, C., FARBER, S.A. y EKKER, S.C., 2007. P53 Activation By Knockdown Technologies. *PLoS Genetics*, vol. 3, no. 5, pp. 787-801. ISSN 15537390. DOI 10.1371/journal.pgen.0030078.
- ROCHA-MARTINS, M., KRETZSCHMAR, J., NERLI, E., WEIGERT, M., ICHA, J., MYERS, E.W. y NORDEN, C., 2021. Bidirectional neuronal migration coordinates retinal morphogenesis by preventing spatial competition. *bioRxiv*, pp. 2021.02.08.430189. DOI 10.1101/2021.02.08.430189.
- ROSENBAUM, J.L. y WITMAN, G.B., 2002. Intraflagellar transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 3, no. 11, pp. 813-825. ISSN 14710072. DOI 10.1038/nrm952.
- SALINAS, R.Y., PEARRING, J.N., DING, J.D., SPENCER, W.J., HAO, Y. y ARSHAVSKY, V.Y., 2017. Photoreceptor discs form through peripherin-independent suppression of ciliary ectosome release. *Journal of Cell Biology*, vol. 216, no. 5,

pp. 1489-1499. ISSN 15408140. DOI 10.1083/jcb.201608081.

SAUER, F.C., 1936. The interkinetic migration of embryonic epithelial nuclei. *Journal of Morphology*, vol. 60, no. 1, pp. 1-11. ISSN 10974687. DOI 10.1002/jmor.1050600102.

SCHMITT, E.A. y DOWLING, J.E., 1994. Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 344, no. 4, pp. 532-542. ISSN 00219967. DOI 10.1002/cne.903440404.

SCHMITT, E.A. y DOWLING, J.E., 1996. Comparison of topographical patterns of ganglion and photoreceptor cell differentiation in the retina of the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 371, no. 2, pp. 222-234. ISSN 00219967. DOI 10.1002/(SICI)1096-9861(19960722)371:2<222::AID-CNE3>3.0.CO;2-4.

SCHMITT, E.A. y DOWLING, J.E., 1999. Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: light and electron microscopic analyses. *The Journal of comparative neurology*, vol. 404, no. 4, pp. 515-536. ISSN 0021-9967. DOI 10.1002/(SICI)1096-9861(19990222)404:4<515::AID-CNE8>3.0.CO;2-A.

SHKUMATAVA, A., FISCHER, S., MÜLLER, F., STRAHLE, U. y NEUMANN, C.J., 2004. Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina. *Development*, vol. 131, no. 16, pp. 3849-3858. ISSN 09501991. DOI 10.1242/dev.01247.

SOROKIN, S.P., 1968. Reconstructions Of Centriole Formation And Ciliogenesis In Mammalian Lungs. *Journal of Cell Science*, vol. 3, no. 2, pp. 207-230. DOI 10.1242/jcs.3.2.207.

SOTELO, R. y TRUJILLO-CENÓZ, O., 1958. Electron Microscope Study On The Development Of Ciliary Components Of The Neural Epithelium Of The Chick Embryo. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, vol. 49, no. 1, pp. 1-12. DOI 10.1007/BF00335059.

- STENKAMP, D.L., 2007. Neurogenesis in the Fish Retina. *International Review of Cytology*, vol. 259, no. 06, pp. 173-224. ISSN 00747696. DOI 10.1016/S0074-7696(06)59005-9.
- STENKAMP, D.L., FREY, R.A., PRABHUDESAI, S.N. y RAYMOND, P.A., 2000. Function for Hedgehog genes in zebrafish retinal development. *Developmental Biology*, vol. 220, no. 2, pp. 238-252. ISSN 00121606. DOI 10.1006/dbio.2000.9629.
- STOTTMANN, R.W., TRAN, P. V., TURBE-DOAN, A. y BEIER, D.R., 2009. Ttc21b is required to restrict sonic hedgehog activity in the developing mouse forebrain. *Developmental Biology*, vol. 335, no. 1, pp. 166-178. ISSN 1095564X. DOI 10.1016/j.ydbio.2009.08.023.
- SUZUKI, S.C., BLECKERT, A., WILLIAMS, P.R., TAKECHI, M., KAWAMURA, S. y WONG, R.O.L., 2013. Cone photoreceptor types in zebrafish are generated by symmetric terminal divisions of dedicated precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 37, pp. 15109-14. ISSN 1091-6490. DOI 10.1073/pnas.1303551110.
- TASCHNER, M., WEBER, K., MOURÃO, A., VETTER, M., AWASTHI, M. y STIEGLER, M., 2016. Intraflagellar transport proteins 172, 80, 57, 54, 38, and 20 form a stable tubulin-binding IFT-B2 complex. *The EMBO journal*, vol. 35, no. 7, pp. 1-18. DOI 10.15252/embj.201593164.
- TSUJIKAWA, M. y MALICKI, J., 2004. Genetics of photoreceptor development and function in zebrafish. *International Journal of Developmental Biology*, vol. 48, no. 8-9, pp. 925-934. ISSN 02146282. DOI 10.1387/ijdb.041890mt.
- WANG, M., DU, L., LEE, A.C., LI, Y., QIN, H. y HE, J., 2020. Different lineage contexts direct common pro-neural factors to specify distinct retinal cell subtypes. *The Journal of cell biology*, vol. 219, no. 9. ISSN 15408140. DOI 10.1083/jcb.202003026.
- WANG, Q., PAN, J. y SNELL, W.J., 2006. Intraflagellar Transport Particles Participate Directly in Cilium-Generated Signaling in Chlamydomonas. *Cell*, vol. 125, no. 3,

pp. 549-562. ISSN 00928674. DOI 10.1016/j.cell.2006.02.044.

WEBER, I.P., RAMOS, A.P., STRZYZ, P.J., LEUNG, L.C., YOUNG, S. y NORDEN, C., 2014.

Mitotic Position and Morphology of Committed Precursor Cells in the Zebrafish Retina Adapt to Architectural Changes upon Tissue Maturation. *Cell Reports*, vol. 7, no. 2, pp. 386-397. ISSN 22111247. DOI 10.1016/j.celrep.2014.03.014.

WILLAREDT, M.A., HASENPUSCH-THEIL, K., GARDNER, H.A.R., KITANOVIC, I.,

HIRSCHFELD-WARNEKEN, V.C., GOJAK, C.P., GORGAS, K., BRADFORD, C.L., SPATZ, J., WÖLFL, S., THEIL, T. y TUCKER, K.L., 2008. A crucial role for primary cilia in cortical morphogenesis. *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 48, pp. 12887-12900. ISSN 02706474. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2084-08.2008.

WONG, G.K.W., BAUDET, M.-L., NORDEN, C., LEUNG, L. y HARRIS, W.A., 2012. Slit1b-

Robo3 signaling and N-cadherin regulate apical process retraction in developing retinal ganglion cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 32, no. 1, pp. 223-8. ISSN 1529-2401. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2596-11.2012.

YUAN, S. y SUN, Z., 2009. Microinjection of mRNA and morpholino antisense

oligonucleotides in zebrafish embryos. *Journal of Visualized Experiments*, no. 27, pp. 27-29. ISSN 1940087X. DOI 10.3791/1113.

ZOLESSI, F.R., 2016. Vertebrate Neurogenesis: Cell Polarity. *Encyclopedia of Life*

*Sciences*, pp. 1-14. DOI 10.1002/9780470015902.a0000826.pub2.

ZOLESSI, F.R., POGGI, L., WILKINSON, C.J., CHIEN, C.-B. y HARRIS, W.A., 2006.

Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo. *Neural development*, vol. 1, no. 2, pp. 2. ISSN 1749-8104. DOI 10.1186/1749-8104-1-2.

## Anexo I

**Video 1** – *Time-lapse* de embriones de la línea *crx:GFP* inyectados con MOs Ctrl/*p53* (embriones 1 y 2) o MOs *ift88/elipsa/p53* (embriones 3 – 8). La adquisición se realizó desde las 36 hpf hasta las 53 hpf, se realizaron 46 secciones ópticas con una separación de 1  $\mu\text{m}$  y en intervalos de 10 min, para cada embrión.

**Video 2** – Proyección en 3D de un embrión de la línea *crx:GFP* inyectado con MOs *ift88/elipsa/p53*, fijado a las 36 hpf y marcado con faloidina-TRITC.

Link de acceso a videos y figuras:

[https://drive.google.com/drive/folders/1Lam2OVeSgIXqeLKgyhIQ\\_jlivPB-QQ3Y?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/1Lam2OVeSgIXqeLKgyhIQ_jlivPB-QQ3Y?usp=sharing)

## Agradecimientos

El desarrollo de esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de un montón de personas a quienes quiero agradecerles aquí. Primero, a Flavio y a José por abrirme las puertas de sus laboratorios, el apoyo, la guía y la confianza que han sido invaluable para mí. A mis compañeros de laboratorio Pao, Cami, Gonza, Ile, Lu, tanto por sus aportes académicos como los no académicos. A Gisell y Marcela por el soporte técnico, el entrenamiento y sobre todo por la buena disposición. A mis compas del Microscopía Electrónica de hoy y de siempre Fefa, Gaby, Fer, Marcie, Ale, Anita y por supuesto a Gaby, una de las principales culpables de que esto suceda.

No puedo olvidar a mis amigues y a mi familia, principalmente a mis padres por el esfuerzo de años que hoy hace posible este trabajo, pero por sobre todo a mi pareja y compañera por la paciencia, los consejos y el enorme apoyo.

Agradezco a la ANII que financió este trabajo a través de un proyecto del Fondo Clemente Estable (1\_1\_2014\_1\_4982), a la Comisión Académica de Postgrado de la UDELAR que lo hizo mediante una Beca de Maestría y a FOCEM-Institut Pasteur de Montevideo (COF 03/11). También agradezco al PEDECIBA y ADUR por financiar la asistencia a un curso y congresos en el exterior.

A todes quienes han compartido conmigo estos años, muchas gracias!