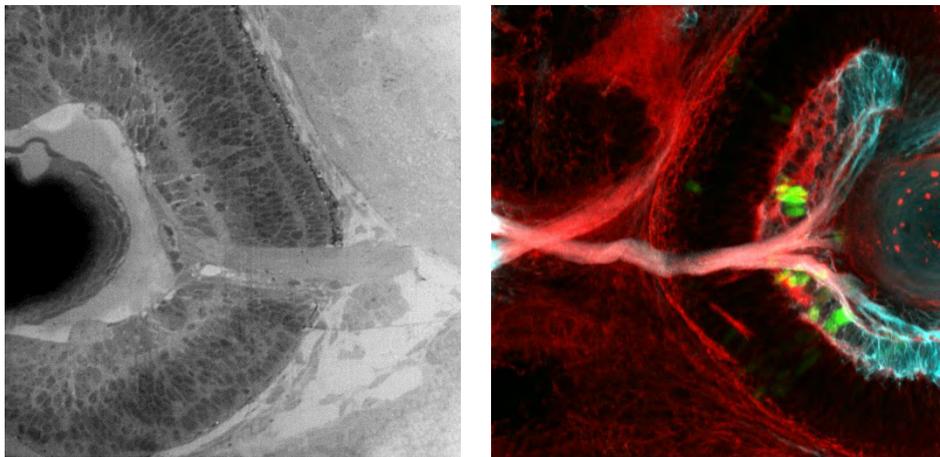


Análisis ultraestructural de la cilia primaria durante la diferenciación neuronal en la retina del pez cebra (*Danio rerio*)



Camila Davison

Tutor: Flavio Zolessi

Co-tutora: Gabriela Casanova

**Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión
Facultad de Ciencias
Universidad de la República**

**Laboratorio de Biología Celular del Desarrollo Neural
Institut Pasteur de Montevideo**

Noviembre de 2014

Índice

Resumen	1
Introducción	3
Función y ultraestructura ciliar	3
Polaridad epitelial y diferenciación neuronal	9
Elección del modelo experimental	17
Organización y desarrollo de la retina	18
Materiales y métodos	23
Ejemplares utilizados	23
Procesamiento de rutina para microscopía electrónica de transmisión	24
Inmunodetección <i>in toto</i> con peroxidasa	26
Generación del vector Atoh7:nls-EGFP	27
Microinyección de embriones	28
Inmunofluorescencia indirecta <i>in toto</i>	28
Inmunodetección <i>in toto</i> con peroxidasa sobre embriones inyectados	30
Resultados	32
Cilias en progenitores neuroepiteliales	32
Cilias en neuroblastos en proceso de retracción apical	38
Cilias en neuroblastos que han finalizado la retracción apical y en células ganglionares jóvenes	42
Marcado de las células ganglionares de la retina y sus progenitores	46
Discusión	57
Conclusiones	76
Perspectivas	77
Bibliografía	79

Resumen

La retina es un órgano del sistema nervioso central compuesto por varios tipos neuronales, entre los que se encuentran fotorreceptores, células bipolares, células amacrinas, y células ganglionares (CGRs). Todos estos tipos celulares derivan del neuroepitelio, un epitelio especializado que se diferencia a partir del ectodermo embrionario. Este epitelio exhibe una polaridad característica, dada por la asociación a una lámina basal en la superficie basal, y por la existencia de complejos de adhesión celular y una cilia primaria en la región apical. Esta cilia es un organelo sensorial que se forma a partir de uno de los centriolos del centrosoma, y que se encuentra presente en la mayoría de las células del organismo.

Las CGRs son las primeras células de la retina en comenzar a volverse post-mitóticas. El proceso de diferenciación de estas células comienza con el desplazamiento del núcleo hacia la región basal, seguido por el desprendimiento del proceso apical de la superficie, y su posterior retracción. Se ha observado que tanto el centrosoma como la cilia primaria, localizados en la región apical del neuroepitelio, permanecen asociados al extremo del proceso apical en retracción.

Con el fin de determinar las características ultraestructurales de la cilia primaria durante la diferenciación de las CGRs en el pez cebra, comenzamos el análisis de la retina de embriones mediante microscopía electrónica de transmisión. Encontramos que los precursores neuroepiteliales presentan una cilia primaria que, en la mayoría de los casos, se extiende desde la membrana apical y se asocia con un bolsillo ciliar. Esta estructura también se encuentra en los neuroblastos, donde se localiza en el extremo del proceso apical durante su retracción, pero parece sufrir una deslocalización momentánea luego de que la retracción culmina. Posterior a la formación del árbol dendrítico, solo observamos cilias primarias en unas pocas CGRs. La mayor parte de estas cilias son más cortas que las que encontramos en los precursores neuroepiteliales. La mayor parte de los centriolos que encontramos asociados a la membrana plasmática, sin embargo, no nuclean una cilia primaria. Esto indica que, al menos en algunas CGRs, la cilia desaparece en etapas tardías

de la diferenciación, aunque desconocemos si esta desaparición es transitoria o permanente.

Nuestros resultados señalan que la cilia primaria se encuentra presente durante las etapas tempranas de la diferenciación de las CGRs en el pez cebra, pero, al menos en algunos casos, se pierde en etapas más avanzadas de este proceso.

Palabras clave: cilia primaria, células ganglionares de la retina, diferenciación neural, pez cebra, microscopía electrónica.

Abreviaturas:

CGR: célula ganglionar de la retina

dpf: días post-fecundación

EPR: epitelio pigmentario de la retina

hpf: horas post-fecundación

MET: microscopía electrónica de transmisión

Introducción

FUNCIÓN Y ULTRAESTRUCTURA CILIAR

Las cilias son estructuras altamente especializadas que protruyen desde la superficie celular hacia el espacio extracelular. Estos organelos poseen un esqueleto interno denominado axonema, el cual está compuesto por microtúbulos y sus proteínas asociadas, dispuestos en un patrón regular. Los microtúbulos son componentes del citoesqueleto formados por subunidades de α y β -tubulina que, en general, se nuclean desde un lugar intracelular específico, denominado centro organizador de microtúbulos (MTOC). La mayoría de las células animales tiene un único y bien definido MTOC: el centrosoma. Los microtúbulos se encuentran asociados a él por su extremo menos, y crecen alejándose de él por su extremo más. Estos microtúbulos crecen y se acortan continuamente mediante un mecanismo de inestabilidad dinámica (Alberts et al., 2008).

El centrosoma está compuesto por un par de centriolos, estructuras cilíndricas que se disponen formando un ángulo recto, adoptando una configuración en forma de L. Cada centriolo consiste de un cilindro corto de microtúbulos modificados, junto con un gran número de proteínas accesorias. Estos microtúbulos se organizan en forma de nueve tripletes cortos dispuestos en forma radial, cada uno de los cuales está compuesto por un microtúbulo completo (microtúbulo A), fusionado con dos microtúbulos incompletos (microtúbulos B y C) (Alberts et al., 2008).

Uno de los procesos con los que a menudo se relaciona al centrosoma es la migración celular. Este organelo generalmente se localiza entre el proceso líder y el núcleo de las células que muestran una migración dirigida (Baudoin et al., 2012), tal como ocurre durante la diferenciación neuronal. Estudios realizados en neuronas corticales han revelado dos pasos principales en la migración: primero, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y el centrosoma se mueven hacia adelante, generando un ensanchamiento citoplásmico hacia el cual posteriormente se transloca el núcleo. El centrosoma, por tanto, se localiza en la base de la neurita líder y ancla un conjunto de microtúbulos, la llamada

jaula perinuclear, que rodea al núcleo y dirige su movimiento hacia el centrosoma (Higginbotham y Gleeson, 2007). Sin embargo, existen tipos neuronales que presentan un comportamiento diferente, como son las neuronas del núcleo tegmental del cerebro posterior o las neuronas granulares del cerebelo. En estos casos, el centrosoma no se encuentra constantemente al frente de la migración, sino que su posición se alterna con la del núcleo (Distel et al., 2010).

Es a partir de estos centriolos que se forma, en muchos tipos celulares, el cuerpo basal que nuclea la cilia. El cuerpo basal tiene la misma organización que los centriolos, y ambas estructuras resultan interconvertibles (Alberts et al., 2008). Las cilias son estructuras celulares que están presentes en G0/G1 y al comienzo de la fase S, y que se desensamblan en la fase S tardía o al comienzo de G2, dependiendo del tipo celular. Durante la fase S ocurre la duplicación de los centriolos, y los centrosomas resultantes se separan en G2 para formar los polos del huso mitótico. Luego de la citocinesis, cada célula hija hereda un centrosoma, que se convertirá en el MTOC (Irigoín y Badano, 2011). Cada centrosoma se compone de un centriolo maduro, denominado centriolo madre, y un centriolo inmaduro más pequeño que fue ensamblado durante el ciclo celular previo, el centriolo hijo. Los cuerpos basales derivan del centriolo madre del centrosoma, el cual puede distinguirse por la presencia de apéndices en su extremo distal. Estos apéndices, que reciben el nombre de fibras de transición, se relacionan con el anclaje de los microtúbulos y con la asociación con la membrana plasmática durante la ciliogénesis (Azimzadeh y Bornens, 2007). Se ha propuesto que estas fibras forman parte de un complejo de poro similar al poro nuclear, que se encargaría de regular el tráfico de proteínas hacia y desde la cilia. La presencia de esta barrera selectiva permitiría mantener la composición proteica de la cilia, la cual difiere marcadamente de la composición del citoplasma (Fisch y Dupuis-Williams, 2011).

Las cilias se clasifican según su organización interna en dos tipos: cilias móviles y cilias primarias. Ambas presentan un axonema compuesto por nueve dobletes de microtúbulos organizados en forma radial en la periferia, cada uno de los cuales contiene un microtúbulo completo fusionado a un hemitúbulo. Éstos son continuación de los

microtúbulos A y B del cuerpo basal, respectivamente. En las cilias móviles, estos dobletes rodean un par central de microtúbulos, constituido por dos microtúbulos completos, que se encuentra ausente en las cilias primarias. Debido a ello, las cilias móviles se clasifican como de tipo 9+2 y las cilias primarias como de tipo 9+0 (Fisch y Dupuis-Williams, 2011).

Ambos tipos de cilia difieren además en la presencia de determinadas proteínas accesorias. En las cilias móviles, los dobletes externos de microtúbulos adyacentes están conectados por medio de nexinas, las cuales se encuentran ausentes en las cilias primarias. Existen a su vez brazos externos e internos de dineína, y fibras radiales, que se encuentran regularmente espaciados a lo largo del microtúbulo A. Los brazos externos e internos de dineína son ATPasas que causan el deslizamiento de los dobletes de microtúbulos con respecto a sus vecinos. Cuando el dominio motor de esta molécula es activado, la molécula de dineína unida a un doblete intenta caminar sobre el doblete adyacente. Sin embargo, la presencia de nexinas que conectan los dobletes previene el deslizamiento, y la fuerza se traduce en su lugar en un movimiento de flexión (Fisch y Dupuis-Williams, 2011). El batido de las cilias móviles puede propulsar células individuales a través de un fluido, como sucede en algunos protozoarios, o mover un fluido sobre la superficie de un tejido, como es el caso de las cilias que recubren el epitelio del tracto respiratorio y el oviducto (Alberts et al., 2008).

El patrón 9+0 asociado con las cilias primarias fue descrito inicialmente en el neuroepitelio de embrión de pollo (Sotelo y Trujillo-Cenoz, 1958). Trabajos posteriores revelaron la presencia de este tipo de cilia en la superficie de muchos tipos celulares, incluyendo fibroblastos, células epiteliales, neuronas, osteocitos y condrocitos (Alberts et al., 2008). A pesar de que la falta del par central es lo que define a estas cilias como de tipo 9+0, es la ausencia simultánea de estructuras asociadas, como los brazos externos e internos de dineína y las nexinas, lo que las hace inmóviles (Fisch y Dupuis-Williams, 2011).

Aunque la mayoría de las cilias móviles posee un arreglo 9+2, y la mayoría de las cilias no móviles tienen una configuración 9+0, se han descrito algunas excepciones particulares. Una de ellas son las cilias móviles 9+0 del nodo embrionario de ratón, las cuales se

encargan de generar un movimiento de fluido relacionado con el establecimiento del eje izquierda-derecha (Takeda y Narita, 2012). Se han encontrado a su vez cilias no móviles 9+2 en el epitelio olfatorio del sapo (Gerdes et al., 2009).

Debido a que el extremo de la cilia es el lugar en el que se localiza el extremo más de los microtúbulos, es éste el sitio de crecimiento y resorción del axonema (Fisch y Dupuis-Williams, 2011). Dado que no hay evidencia de que la síntesis proteica ocurra a nivel de la cilia, debe haber un transporte selectivo de proteínas ciliares hacia su extremo. El transporte intraflagelar (IFT), el movimiento bidireccional de complejos multiproteicos a lo largo del axonema, es el mecanismo que hace esto posible. Entre las proteínas que componen dichos complejos se encuentran las kinesinas y las dineínas, las cuales se mueven preferencialmente hacia el extremo más y menos de los microtúbulos, respectivamente. De esta forma, el transporte hacia el extremo de la cilia (transporte anterógrado) es mediado por el complejo IFT-B, el cual interacciona con kinesinas, mientras que el movimiento de regreso hacia el cuerpo celular (transporte retrógrado) es mediado por el complejo IFT-A, el cual interacciona con dineínas (Hao y Scholey, 2009; Ishikawa y Marshall, 2011). Entre las moléculas que son transportadas por medio del IFT se encuentran componentes del axonema, proteínas de la membrana ciliar y proteínas relacionadas con la transducción de señales. El IFT es un mecanismo que opera en forma permanente, de modo que la cilia permanece en un estado dinámico aún cuando ha culminado su crecimiento (Ishikawa y Marshall, 2011).

En la región proximal de algunas cilias se ha descrito la presencia de una estructura particular: el bolsillo ciliar. Éste se define como el dominio de la membrana plasmática que va desde la zona donde se ancla el cuerpo basal hasta la región donde emerge el axonema hacia el espacio extracelular. La región proximal de la cilia se encuentra rodeada por la membrana del bolsillo, que adopta una forma redondeada, y en la mayoría de los casos tiende a acercarse a la membrana ciliar más cerca de su extremo. La profundidad del bolsillo varía en los distintos tipos celulares, pero la región distal de la cilia usualmente emerge hacia el medio extracelular. La membrana del bolsillo es continua con la

membrana ciliar, pero funcionalmente distinta de ésta gracias a la presencia de una barrera de difusión formada por septinas, proteínas transmembrana que se localizan en la base de la cilia (Ishikawa y Marshall, 2011; Fisch y Dupuis-Williams, 2011).

Se ha observado que existe una mayor cantidad de fosas revestidas de clatrina en la membrana del bolsillo ciliar que en la membrana plasmática, lo cual señala a esta estructura como un dominio endocítico especializado de membrana. Esta endocitosis podría relacionarse específicamente con la internalización de componentes ciliares o con la remoción de proteínas de membrana que no hayan sido correctamente dirigidas a la cilia (Ghossoub et al., 2011; Molla-Herman et al., 2010). También se ha señalado esta estructura como un posible sitio de exocitosis. De esta manera, el bolsillo podría actuar, por ejemplo, como sitio de fusión de vesículas que transportan proteínas de la membrana ciliar, o como un lugar de anclaje para vesículas secretorias, cuyo contenido podría liberarse a su interior antes de llegar al medio extracelular. La posición particular en la que se encuentra el bolsillo ciliar favorecería dicho proceso: la proximidad del centrosoma, el sitio de anclaje de los microtúbulos, posibilitaría la dirección específica de vesículas transportadas por complejos de dineína. El aparato de Golgi y los compartimentos endocíticos de reciclaje también se localizan cerca del cuerpo basal y del bolsillo ciliar, así como otras poblaciones de endosomas y lisosomas, lo cual es consistente con ambas funciones propuestas (Ghossoub et al., 2011).

Debido a su falta de movimiento, las cilias primarias fueron en un principio consideradas como organelos vestigiales carentes de una función celular particular. Sin embargo, una gran variedad de estudios ha mostrado que se trata de organelos celulares especializados en sensor el medio extracelular. La presencia de una barrera de difusión en la base de la cilia hace posible que la membrana ciliar tenga un enriquecimiento significativo de diversas moléculas de señalización (Irigoín y Badano, 2011). La gran relación superficie/volumen que posee la cilia la hace un compartimento ideal para la transducción de señales mediante la generación de segundos mensajeros, ya que un número relativamente bajo de receptores activos en la superficie puede producir una alta

concentración de segundos mensajeros en el lumen de la cilia (Marshall y Nonaka, 2006). El pequeño volumen de la cilia facilita a su vez la interacción entre las distintas moléculas necesarias para integrar y transducir una cascada de señalización dada. Entre las vías de señalización que han sido más frecuentemente relacionadas con la cilia primaria se encuentran las de Hedgehog (Hh), Wingless (Wnt), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Irigoín y Badano, 2011).

Las primeras evidencias de que la señalización por Hh requiere de la cilia en los vertebrados provinieron de estudios de mutantes de ratón que mostraban fenotipos consistentes con una señalización por Hh alterada. Estos fenotipos incluyen la pérdida de los tipos celulares más ventrales del tubo neural, y defectos en su cierre y en el establecimiento del patrón corporal, procesos regulados por uno de los miembros de la familia Hh, Sonic Hedgehog (Shh). Los genes alterados en estas mutaciones incluyen varios componentes de la maquinaria del IFT, así como proteínas del cuerpo basal (Goetz y Anderson, 2010; Berbari et al., 2009). De forma similar, los mutantes de pez cebra para *ift88* carecen de los tipos celulares que requieren los mayores niveles de Hh. Se ha encontrado que todos los componentes clave de la vía de Hh se encuentran enriquecidos en la cilia, incluyendo a los receptores Patched1 y Smoothened, y a los factores de transcripción Gli (Berbari et al., 2009).

Varios trabajos vinculan a la vía de Wnt con la señalización por medio de la cilia primaria, pero esta relación no resulta tan clara. Se ha encontrado que la disrupción de proteínas ciliares aumenta la señalización por la vía canónica de Wnt y altera procesos relacionados con la señalización por la vía no canónica, como la extensión convergente, lo cual señala a la cilia primaria como un posible interruptor entre ambas vías (Goetz y Anderson, 2010). Sin embargo, existen estudios en los que se encontraron respuestas normales tanto a la vía canónica como no canónica de Wnt a pesar de existir una disrupción de las proteínas ciliares (Louvi y Grove, 2011).

La cilia primaria también ha sido relacionada con la señalización mediada por los PDGFs, importantes reguladores de la respuesta migratoria durante el desarrollo y la cicatrización.

Los fibroblastos responden a la señalización por PDGF proliferando o migrando hacia la fuente del ligando (Albrecht-Buehler, 1977). La disrupción de proteínas ciliares ocasiona defectos en esta respuesta, lo cual indica que la migración celular se relaciona directa o indirectamente con el ensamblaje o la señalización por la cilia primaria. En los fibroblastos, así como en otros tipos celulares, se ha observado que la cilia primaria se encuentra generalmente en el proceso líder, y se orienta preferentemente en la dirección de la migración (Schneider et al., 2010).

Si bien la mayor parte de las vías de señalización que han sido vinculadas a la cilia primaria se encuentran relacionadas con el desarrollo embrionario, este organelo participa en otro tipo de procesos. En algunos tipos de neuronas diferenciadas, por ejemplo, las cilias parecen actuar principalmente como quimiosensores, encontrándose en ellas receptores para diversos neurotransmisores y señales neurohormonales y neuromoduladoras, tales como la somatostatina y la serotonina (Fuchs y Schwark, 2004).

POLARIDAD EPITELIAL Y DIFERENCIACIÓN NEURONAL

Durante el desarrollo, las neuronas que componen el sistema nervioso de los vertebrados surgen a partir de células progenitoras neuroepiteliales. En las primeras etapas del desarrollo del tejido nervioso, estas células proliferan para generar el número apropiado de progenitores, y eventualmente dejan de dividirse para comenzar el proceso de neurogénesis (Kay et al., 2005).

Las células neuroepiteliales forman parte de un tejido neuroepitelial con características muy similares a las de otros epitelios. Se trata de un tejido en el que existe muy poco espacio extracelular, y en el que las células se encuentran unidas por medio de complejos de adhesión. En las células neuroepiteliales pueden distinguirse tres dominios: un dominio basal, en el que se encuentran complejos de adhesión que permiten la unión a la lámina basal; un dominio lateral, mediante el cual las células se unen entre ellas; y un dominio apical, a través del cual las células entran en contacto con el espacio extracelular. Los

dominios apical y basolateral están claramente separados gracias a la presencia de los complejos de unión subapicales, que bloquean la difusión de moléculas en el plano de la membrana (Zolessi, 2009).

El neuroepitelio es un tejido pseudoestratificado en el que, si bien todas las células se extienden desde la superficie apical hasta la lámina basal durante todo el ciclo celular, sus núcleos se localizan en distintas posiciones a lo largo del eje ápico-basal. Existe una correlación entre la localización del núcleo y la fase del ciclo celular en la que se encuentra la célula, fenómeno que se conoce como migración nuclear intercinética. La mitosis tiene lugar en la superficie apical del neuroepitelio o muy cerca de ella, mientras que la fase S ocurre en una localización más basal, con una migración nuclear de apical a basal en G1 y de basal a apical en G2 (Taverna y Huttner, 2010).

Al igual que la mayoría de los epitelios, el neuroepitelio presenta una polaridad ápico-basal intrínseca, dada por la distribución asimétrica de estructuras citoplasmáticas, tales como el aparato de Golgi y el centrosoma, los cuales se localizan en la región apical. El establecimiento de la polaridad ápico-basal está regulado, en la mayoría de los epitelios, por tres complejos proteicos: el complejo PAR, formado por Par-3, Par-6 y aPKC; el complejo Crumbs, formado por Crumbs (CRB), PALS1 y PATJ; y el complejo Scribble, formado por Scribble (SCRIB), Discs Large (DLG) y Lethal Giant Larvae (LGL). Estos complejos, compuestos en su mayoría por proteínas asociadas al lado interno de la membrana plasmática, se localizan en diferentes subdominios de forma mutuamente excluyente: Crumbs se encuentra en el dominio de la membrana apical, PAR se asocia a las uniones ocluyentes y Scribble se localiza en el dominio de la membrana basolateral. La localización de estos tres complejos se encuentra conservada en el neuroepitelio. En este tejido, a pesar de no existir uniones ocluyentes, Par-3 se mantiene localizada en la región apical de las células (Zolessi, 2009).

En las células neuroepiteliales, al igual que en otras células epiteliales, el centrosoma se encarga de nuclear una cilia primaria, la cual protruye desde la membrana apical (Taverna y Huttner, 2010). Al ser una estructura polarizada, no sorprende que muchas observaciones

apoyen la existencia de un vínculo íntimo entre la cilia primaria y el establecimiento y mantenimiento de la polaridad ápico-basal. El análisis de la localización de Crumbs3, Par-3, Par-6 y aPKC en células epiteliales ha revelado que estos marcadores se encuentran dentro de la cilia primaria, y su bloqueo resulta en la incapacidad de las células para formar cilias, lo cual sugiere que son necesarias para la ciliogénesis (Fan et al., 2004). Por otra parte, la presencia de la cilia podría tener un efecto en el mantenimiento de la polaridad celular, ya que la disrupción de algunos de sus componentes lleva a defectos en su establecimiento. No se puede excluir, sin embargo, la posibilidad de que estas proteínas tengan funciones no relacionadas con la cilia. Es importante notar que existen células ciliadas que carecen de polaridad ápico-basal, como es el caso de las células mesenquimales (Gerdes et al., 2009).

Es a partir de esta polaridad de tipo epitelial del neuroepitelio que surge, durante el desarrollo, la polaridad particular que exhiben las neuronas. La polaridad neuronal está dada por la presencia de una prolongación larga (el axón) y varios procesos más cortos y ramificados (las dendritas), que actúan como sitio de emisión y recepción de señales, respectivamente. Estos dos dominios difieren en morfología, composición de citoesqueleto, y distribución de organelos membranosos y proteínas asociadas a membrana (Craig y Banker, 1994). Se ha sugerido que la polaridad neuronal es una simple modificación de la polaridad epitelial, de forma que el axón se corresponde con el dominio apical de las células epiteliales, mientras que el soma y las dendritas se corresponden con el dominio basolateral (Dotti y Simons, 1990). Debido a esto, muchos estudios se han centrado en la comprensión de los mecanismos que llevan a la adquisición de la polaridad neuronal, y en la transición de los elementos de la polaridad neuroepitelial durante este proceso.

Existen evidencias que señalan la presencia de un programa de polarización intrínseco en las neuronas en desarrollo: diversos tipos neuronales, tales como las neuronas de hipocampo (Shi et al., 2003), las neuronas granulares del cerebelo (Zmuda y Rivas, 1998) y las células ganglionares de la retina (Zolessi et al., 2006), son capaces de formar axones y

dendritas *in vitro*. Bajo estas condiciones, las neuronas pueden incluso llegar a alcanzar morfologías que se aproximan mucho al fenotipo maduro observado *in vivo*.

Uno de los modelos más utilizados para el estudio del establecimiento de la polaridad neuronal son las neuronas piramidales de hipocampo. Estas células descienden de las células de la glía radial, las cuales, al ser descendientes de las células neuroepiteliales, presentan una polaridad ápico-basal de tipo epitelial (Funahashi et al., 2014). En cultivo, la diferenciación de las neuronas piramidales de hipocampo sigue una serie de etapas establecidas. En un primer momento, las neuronas emiten protrusiones cortas (estadio 1), que luego se desarrollan en varias neuritas indiferenciadas de tamaño similar (estadio 2). Una de estas neuritas comienza posteriormente a crecer de forma más rápida y se diferencia en axón, rompiendo la simetría inicial (estadio 3), mientras que las otras neuritas se transforman subsecuentemente en dendritas (estadio 4). Finalmente, las neuronas forman contactos sinápticos y establecen una red de conexiones (estadio 5) (Arimura y Kaibuchi, 2005). Durante su diferenciación *in situ*, las neuronas piramidales también pasan inicialmente por una fase multipolar, pero esta morfología da lugar rápidamente a una morfología bipolar, la cual permite la migración posterior. Durante la transición multipolar-bipolar, una de las neuritas, generalmente la primera en formarse, se transforma en el proceso rezagado, el cual se desarrolla en un axón, y posteriormente se genera el proceso líder, una futura dendrita. Las células bipolares migran luego sobre otras células de la glía radial hacia la placa cortical, donde se desarrollan en neuronas piramidales maduras. Para llevar a cabo la migración, las células progenitoras se desprenden tanto de la superficie apical como de la superficie basal, lo cual lleva a una pérdida transitoria de la polaridad, que debe establecerse luego nuevamente (Funahashi et al., 2014).

Estudios de la distribución de diferentes marcadores apicales durante la diferenciación de las neuronas piramidales de hipocampo en cultivo han mostrado que las proteínas Par-3 y Par-6 se localizan en el cuerpo celular y en las neuritas indiferenciadas de las neuronas no polarizadas en estadio 2. Sin embargo, en las neuronas ya polarizadas en estadio 3 estas

proteínas se vuelven particularmente abundantes en el axón, pero no se detectan en otras neuritas. La distribución polarizada de Par-3 y Par-6 es importante para la especificación del axón y el establecimiento de la polaridad neuronal, ya que su expresión ectópica, así como su bloqueo, resulta en una alteración en el proceso de polarización (Shi et al., 2003).

El aparato de Golgi y el centrosoma son organelos que también presentan una localización polarizada, y que han sido relacionados con la adquisición de la polaridad neuronal. En las neuronas de hipocampo diferenciando tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha observado que estos organelos se dirigen hacia la base de la neurita que eventualmente se convertirá en axón, aunque su posición parece ser dispensable para el subsecuente alargamiento y maduración del mismo (Calderón de Anda et al., 2005, 2010). Se ha sugerido que la relación entre la localización del aparato de Golgi y el centrosoma, y el sitio de salida del axón se debe a que estos organelos dirigen el tráfico vesicular y la polimerización de los microtúbulos, los cuales son necesarios para el crecimiento axonal (Calderón de Anda et al., 2010). Cuando las neuronas de hipocampo sin polarizar son tratadas con nocodazol (que previene la polimerización de los microtúbulos) o brefeldina A (que bloquea el reciclaje de proteínas hacia el aparato de Golgi y los endosomas), se inhibe la polarización. A su vez, al generar una duplicación del centrosoma en neuroblastos de hipocampo en cultivo, se obtienen neuronas que, en lugar del fenotipo normal de un axón y varias neuritas cortas, presentan dos neuritas largas, que emergen desde los sitios en los que se encuentran los centrosomas ectópicos (Calderón de Anda et al., 2005).

Al igual que muchas células neuroepiteliales, las células de la glía radial que dan origen a las neuronas piramidales de hipocampo presentan una cilia primaria, la cual se extiende desde la superficie apical. Este organelo se encuentra presente también en las neuronas maduras, pero la ciliogénesis parece iniciarse luego de que las células han completado la migración, y la elongación del axonema se da mayormente de forma posnatal (Arellano et al., 2012).

Otro modelo experimental que se ha utilizado para el estudio del establecimiento de la polaridad neuronal son las neuronas granulares del cerebelo, las cuales presentan una

morfología bipolar en etapas tempranas de la diferenciación. La adquisición de esta morfología ocurre de forma similar *in vitro* e *in vivo*. Las células primero extienden un proceso único (estadio 1), seguido de un segundo proceso que emerge del polo opuesto del cuerpo celular (estadio 2), y finalmente se vuelven multipolares mediante la extensión de varias dendritas cortas (estadio 3). Estudios del proceso de diferenciación de estas neuronas *in vitro* han revelado que, de forma similar a lo que ocurre en las neuronas piramidales de hipocampo, el aparato de Golgi y el centrosoma se localizan en la base del proceso inicial durante la etapa unipolar, y luego se repositionan hacia la base del segundo proceso durante la transición hacia una morfología bipolar. En las células más desarrolladas, que ya poseen dos axones largos, estos organelos se mueven hacia una posición media entre los mismos, lo cual podría relacionarse con la migración posterior del cuerpo celular (Zmuda y Rivas, 1998). Estudios realizados *in vivo* muestran que los precursores de las células granulares del cerebelo también presentan una cilia primaria, la cual tiene un papel clave en la proliferación de los progenitores mediada por Shh (Spassky et al., 2008).

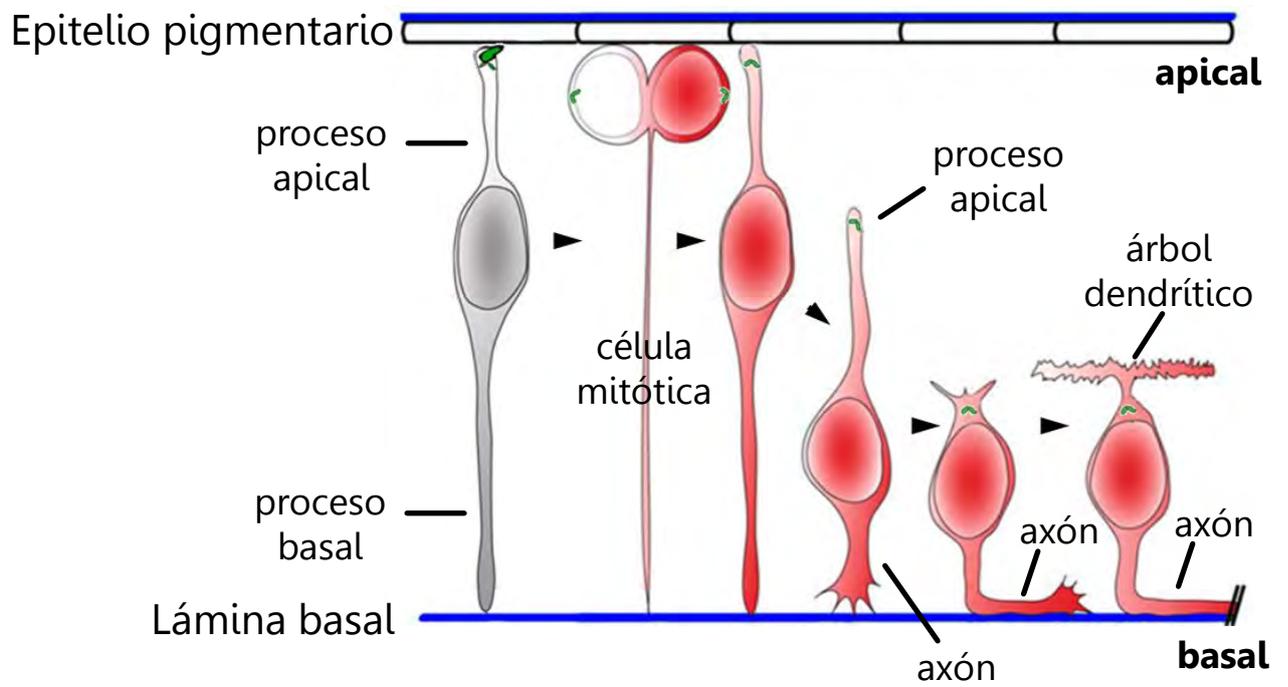
Estas evidencias plantean que algunos elementos de la polaridad intracelular se localizan en el sitio de salida del axón durante la diferenciación neuronal. Existe, sin embargo, un tipo de neurona que presenta un comportamiento distinto: las células ganglionares de la retina (CGRs). La diferenciación de las CGRs *in vivo* ocurre en una serie de pasos que han sido descritos en la retina del pez cebra (Zolessi et al., 2006; Figura 1). Poco después de su última división, el cuerpo celular de los precursores se mueve hacia el lado basal del neuroepitelio mediante la translocación del núcleo a lo largo de un proceso basal que se mantiene durante la citocinesis. Luego, el proceso apical, que permanece en contacto con la superficie apical durante la fase de proliferación, se desprende y comienza a retraerse. La primera neurita se forma en la superficie basal, cerca de la lámina basal, y se diferencia inmediatamente en un axón. En la mayoría de las CGRs, el axón emerge luego del comienzo de la retracción apical pero antes de que ésta se complete.

A diferencia de lo previamente descrito para las neuronas piramidales de hipocampo y las células granulares del cerebelo, no se observa una acumulación de marcadores apicales en los axones en crecimiento durante la diferenciación de las CGRs. *In vivo*, se ha observado que la localización de Par-3, aPKC, α -catenina y F-actina, así como la del centrosoma, se corresponde de forma dinámica con los extremos de los procesos apicales en retracción, aún cuando la célula está extendiendo el axón en el lado opuesto (Zolessi et al., 2006). *In vitro*, las CGRs pasan por una fase multipolar, y el centrosoma se mueve dentro del cuerpo celular, siendo su posición independiente del sitio de origen del axón (Randlett et al., 2011b).

Todos los progenitores de la retina presentan, al igual que el resto de las células neuroepiteliales, una cilia primaria que protruye desde la superficie apical. Estudios realizados mediante microscopía electrónica en retina de ratón han mostrado que, en la mayoría de los casos, esta cilia permanece asociada al proceso apical a medida que éste se retrae. En otros casos, sin embargo, los centriolos y la cilia migran parcial o totalmente al pericarión mientras el proceso apical permanece extendido. En etapas más avanzadas de la diferenciación, cuando aún mantienen un proceso apical relativamente largo, algunas células parecen incluso llegar a perder la cilia (Hinds y Hinds, 1974).

Estas evidencias apuntan a una posible relación entre la polarización neuronal y la polaridad intrínseca de las células neuroepiteliales, relación que parece variar de acuerdo al tipo celular. Sin embargo, existen señales adicionales que provienen del entorno altamente polarizado al que están sometidos los precursores neuroepiteliales, y que parecen influir sobre la adquisición de la polaridad neuronal. Las neuronas son capaces de polarizar correctamente en ausencia de estas señales, ya que este proceso ocurre en cultivo, pero eligen para ello orientaciones aleatorias. *In vivo*, la neurona debe polarizar en una orientación particular, de forma que el axón y las dendritas estén dirigidos en una dirección específica, y el establecimiento de las conexiones ocurra de manera apropiada (Zolessi, 2009).

Figura 1. Representación esquemática del proceso de diferenciación de las células ganglionares de la retina. Las células ganglionares de la retina se desarrollan a partir de progenitores neuroepiteliales que presentan una cilia primaria en la región apical. Luego de la última división mitótica, los neuroblastos se desprenden de la superficie y comienza la retracción del proceso apical, de forma simultánea con la extensión del axón desde la región basal de la célula. Una vez que finaliza la retracción del proceso apical, se desarrolla, a partir de la región apical, el árbol dendrítico. Se ha observado que el centrosoma permanece en posición apical al menos durante las etapas tempranas de este proceso. Esquema modificado de Randlett et al., 2011a.



Una de las señales externas que guía la polarización neuronal es la Laminina, una de las moléculas que compone la lámina basal. Embriones de pez cebra que carecen de Laminina $\alpha 1$ (una de las subunidades de la Laminina) muestran defectos severos en la guía axonal en múltiples tipos neuronales, incluyendo las CGRs. En estos embriones, dichas células pasan por una fase multipolar prolongada similar a la que se observa *in vitro*, y el axón que finalmente se forma muchas veces se proyecta desde regiones de la célula distintas al punto más basal. Estudios hechos en cultivo han demostrado que el contacto con la Laminina 1 es capaz de especificar una neurita particular para convertirse en axón. *In vivo*, este contacto parece ser suficiente para determinar el punto a partir del cual emerge el axón. A su vez, la Laminina 1 parece ser esencial para el comportamiento polarizado del centrosoma. Cuando se desarrollan en un entorno deficiente en Laminina $\alpha 1$, los centrosomas de las células progenitoras neuroepiteliales y las CGRs inmaduras se observan inicialmente en el extremo del proceso apical, pero a menudo se mueven hacia el cuerpo celular a medida que las CGRs maduran y comienzan a polarizar (Randlett et al., 2011b).

ELECCIÓN DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

La retina de los vertebrados es un modelo particularmente útil para el estudio de la diferenciación neuronal *in vivo*. Se trata de un órgano relativamente simple que, como una protrusión del sistema nervioso central sobre la superficie del embrión, se encuentra accesible para la manipulación experimental. A su vez, la retina contiene múltiples tipos neuronales bien caracterizados, los cuales son fácilmente identificables en base a su morfología, y expresión de marcadores moleculares específicos (Randlett et al., 2011a). Dentro de estos tipos neuronales, las CGRs resultan particularmente apropiadas para el estudio del establecimiento de la polaridad neuronal, ya que son las primeras neuronas de la retina en comenzar a diferenciar (Kay et al., 2001).

El pez cebra exhibe varias ventajas como modelo experimental para la biología del desarrollo. En primer lugar, se trata de animales con una alta fecundidad, que producen un gran número de huevos por cruce. A su vez, el desarrollo de los embriones es externo y rápido, y tanto ellos como los huevos son transparentes, lo cual facilita la observación de movimientos morfogénicos y de la organogénesis bajo microscopio (Fadool y Dowling, 2008; Stenkamp, 2007). En estos animales, los ojos presentan un gran tamaño y rápido desarrollo (todos los tipos celulares de la retina se encuentran presentes a los 3 días post-fecundación), y se encuentran accesibles para la manipulación experimental y la observación *in vivo* (Neumann, 2001).

Una ventaja adicional de este organismo es la gran disponibilidad de herramientas genéticas que ofrece. La caracterización fenotípica de un gran número de mutaciones ha permitido determinar que, cuando éstas son llevadas a homocigosis, producen defectos que se asocian a patologías similares a las enfermedades humanas. Esto no es de sorprender si se tiene en cuenta que el 71,4% de los genes codificantes humanos tiene al menos un ortólogo en el pez cebra, y de forma recíproca, el 69% de los genes codificantes del pez cebra tiene al menos un ortólogo en el humano. Entre estos genes ortólogos, el 47% de los genes humano tiene una relación de uno a uno con un ortólogo en el pez cebra (Howe et al., 2013). Muchos de los genes que se han identificado en este organismo se encuentran involucrados en el desarrollo, particularmente en el desarrollo ocular, y se han aislado miles de mutaciones que afectan cientos de loci esenciales para el desarrollo del embrión, que incluyen al ojo y al sistema visual (Fadool y Dowling, 2008).

ORGANIZACIÓN Y DESARROLLO DE LA RETINA

La retina es un órgano del sistema nervioso central que presenta una organización laminar conservada entre los vertebrados. En ella se han identificado seis tipos celulares principales: fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células gliales de Müller y células ganglionares (Gestri et al., 2012). Los cuerpos celulares y

los procesos de estas células se encuentran organizados en capas alternantes, de forma que se observan tres capas nucleares, conectadas por medio de dos capas plexiformes (Tarboush et al., 2012). Rodeando la retina neural se encuentra el epitelio pigmentario de la retina (EPR), un tejido delgado cuyas células contienen gránulos de melanina, y que reduce la dispersión de la luz que entra al ojo (Purves et al., 2004).

Adyacentes al EPR se localizan los fotorreceptores, las células que se encargan de absorber la luz y de transformar el estímulo lumínico en una señal eléctrica (Purves et al., 2004). Existen dos tipos de fotorreceptores: los bastones y los conos. Los bastones son muy sensibles a la luz, pero no discriminan información espectral, debido a que presentan un único tipo de fotopigmento. Por otra parte, los conos tienen una menor sensibilidad a la luz, pero poseen sensibilidad espectral. Existen varios tipos de conos, que difieren en el fotopigmento que poseen. Cada uno de estos fotopigmentos tiene una sensibilidad diferente a la luz de distintas longitudes de onda. La cantidad y el tipo de fotorreceptores que posee una especie determinan qué rangos del espectro es capaz de percibir. En los humanos, por ejemplo, existen tres tipos de conos, llamados de longitud de onda corta (azul), media (verde) y larga (rojo) (Stenkamp, 2007; Purves et al., 2004). En la retina del pez cebra hay un tipo adicional de conos, sensibles a la radiación ultravioleta (UV), lo cual le permite a estos peces percibir longitudes de onda dentro de este rango (Gestri et al., 2012).

Los cuerpos celulares de los fotorreceptores forman la capa nuclear externa, y a partir de ellos se originan terminales sinápticas que establecen conexiones en la capa plexiforme externa con células bipolares u horizontales. Los cuerpos de estos dos tipos celulares, junto con los de las células amacrinas y las células gliales de Müller, se localizan en la capa nuclear interna. Las células bipolares poseen procesos axonales cortos, que establecen contactos sinápticos con los procesos dendríticos de las CGRs en la capa plexiforme interna, o que se conectan con ellos de forma indirecta por medio de las células amacrinas. Los cuerpos celulares de las CGRs conforman la capa de células ganglionares, y sus axones,

mucho más grandes que los de las células bipolares, forman el nervio óptico, el cual se encarga de transmitir la información sobre la estimulación de la retina (Purves et al., 2004).

Cada célula bipolar se conecta con muchos bastones, y a su vez cada célula amacrina se conecta con muchas células bipolares. Esta convergencia hace al sistema de los bastones un mejor detector de la luz, pero reduce su resolución espacial. La vía de los conos es mucho menos convergente, ya que una CGR recibe información de una única célula bipolar, la cual a su vez se conecta con un único cono. Esto le brinda al sistema de los conos una mejor resolución espacial, a expensas de la sensibilidad a la luz (Purves et al., 2004).

Las CGRs son las neuronas de proyección de la retina. Sus axones salen de la misma y se asocian para formar el nervio óptico. El lugar en el que se encuentran los dos nervios ópticos se denomina quiasma óptico, y es a partir de él que surgen los tractos ópticos, los cuales se proyectan hacia el núcleo geniculado lateral del tálamo, cuyas neuronas envían axones hacia la corteza cerebral. En el quiasma ocurre a menudo un reordenamiento de las fibras, de forma que algunas se proyectan hacia blancos que se encuentra del mismo lado (ipsilateralmente) y otras se proyectan hacia el lado contrario (contralateralmente) (Purves et al., 2004). La proporción entre ambos tipos de proyecciones es variable, pero en todos los vertebrados la cantidad de proyecciones contralaterales es mayor que la de proyecciones ipsilaterales. La cantidad relativa de estas últimas depende de la localización de los ojos. Cuando los ojos se localizan lateralmente en la cabeza, la cantidad de proyecciones ipsilaterales es pequeña, o incluso nula, como es el caso del pez cebra. En animales con ojos que se encuentran más frontalmente, tal como los humanos, estas proyecciones llegan casi a igualar a las contralaterales (Jeffery y Erskine, 2005).

Durante el desarrollo, la retina se forma a partir de estructuras huecas derivadas del tubo neural, las cuales reciben el nombre de vesículas ópticas (Fadool y Dowling, 2008). En la mayoría de los vertebrados, el tubo neural se forma por invaginación de la placa neural, y las vesículas ópticas se forman a partir de evaginaciones que surgen de la porción anterior de dicho tubo (Lowery y Sive, 2004). En los peces teleósteos, como el pez cebra, el tubo

neural se origina en un principio como una masa sólida de células, el cilindro neural, que cavita de forma secundaria. Es a partir de esta estructura que surgen los primordios ópticos, masas sólidas de células que sufren una cavitación posterior para dar lugar a las vesículas ópticas (Schmitt y Dowling, 1994). Una vez formadas, las vesículas sufren una invaginación en su región central que lleva a la formación de las copas ópticas, constituidas por dos capas. La capa interna continúa proliferando y produce la retina neural, mientras que la capa externa da lugar al EPR (Fadool y Dowling, 2008).

En la retina neural, los distintos tipos celulares se generan durante el desarrollo en un orden particular, y ciertos aspectos de este orden se encuentran conservados entre los vertebrados. Las CGRs son las primeras células en comenzar a volverse post-mitóticas y en diferenciar en el ojo de todos los vertebrados estudiados hasta el momento (Kay et al., 2001). La neurogénesis luego prosigue en un orden que va, de forma aproximada, desde las capas más internas a las más externas de la retina. De esta forma, la diferenciación de las CGRs es seguida de forma cercana por la de las células amacrinas y las células horizontales, las cuales constituyen la capa nuclear interna. Una tercera ola de neurogénesis genera los fotorreceptores, las células que componen la capa nuclear externa. Las células gliales de Müller se encuentran entre las últimas células en expresar el fenotipo maduro en muchas especies, incluyendo al pez cebra (Neumann, 2001; Fadool y Dowling, 2008). En la mayoría de los vertebrados, la diferenciación de los fotorreceptores y las CGRs comienza dentro de la región central, para luego expandirse a las regiones periféricas. En contraste, en el pez cebra este proceso se inicia en la retina ventro-nasal, y se extiende subsecuentemente a la región dorsal, antes de alcanzar la retina ventro-temporal (Schmitt y Dowling, 1999).

Al igual que las demás neuronas del sistema nervioso central, las CGRs se originan a partir de un tejido neuroepitelial. Si bien muchos aspectos de la transición de los diferentes componentes de la polaridad durante la diferenciación de estas células han sido estudiados, quedan aún aspectos por analizar. Uno de estos componentes es la cilia primaria, la cual, debido a su función sensorial, resulta un organelo de particular

importancia, ya que existen diversas señales extracelulares que dirigen la polarización neuronal. Teniendo esto en cuenta, nos preguntamos cuál es la localización y cómo es la estructura fina de las cilias primarias en la retina durante el proceso de diferenciación de las células ganglionares. El objetivo principal de este trabajo fue, entonces, caracterizar ultraestructuralmente las cilias primarias de células progenitoras (neuroepiteliales), neuroblastos y neuronas en distintas etapas de la diferenciación, en la retina neural de embriones de pez cebra.

Materiales y métodos

EJEMPLARES UTILIZADOS

En el presente trabajo se utilizaron embriones de pez cebra (*Danio rerio*) provenientes del acuario del Institut Pasteur de Montevideo. El laboratorio cuenta con las acreditaciones correspondientes de CHEA y CNEA para la manipulación y experimentación en pez cebra, aunque en este trabajo solo se utilizaron embriones menores a 5 días post-fecundación (dpf), los cuales no se encuentran contemplados en las regulaciones de estos organismos. Las manipulaciones con individuos adultos para la obtención de los huevos (fecundación externa, por medios naturales), fue realizada por o bajo la estricta supervisión del tutor u otro personal acreditado del Instituto. Los peces adultos son mantenidos en un sistema automatizado de tipo "stand alone" (modelo Zebtec Tecniplast SPA, Italia), en el cual el agua es recirculada, filtrada, calefaccionada y esterilizada constantemente. Los parámetros fisicoquímicos de la misma se mantienen constantes: pH 7,5; conductividad 500 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$; temperatura 28°C. La iluminación del cuarto se fija a 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Los peces son alimentados tres veces al día con alimento seco (TetraMin y ZM de 50-100 μm) y vivo (*Artemia salina*). Los embriones se obtuvieron de apareamientos entre adultos seleccionados alojados en recipientes separados, y fueron incubados en estufa refrigerada a una temperatura estándar de 28,5°C. En aquellos casos en que se buscó modificar la velocidad de desarrollo, la incubación se realizó a temperaturas variables entre 26 y 32°C. Se utilizaron embriones de 26 a 48 horas post-fecundación (hpf). La datación de los mismos se realizó según la tabla de Kimmel et al. (Kimmel et al., 1995).

La línea de pez cebra de mayor utilización fue una cepa de tipo salvaje (línea SAT; origen: Zfin, Oregon, USA). Esta línea fue inicialmente generada en el Instituto Sanger del Reino Unido a partir de la línea Tu, sobre la cual se realizó la mayor parte de la secuenciación genómica. En algunos casos se utilizaron ejemplares de las líneas transgénicas Atoh7:Gap43-EGFP y Atoh7:Gap43-mRFP, los cuales expresan EGFP y RFP de membrana, respectivamente, bajo la regulación de la región upstream conteniendo el promotor del gen que codifica para la proteína Atoh7 (previamente denominado Ath5), un factor de

transcripción específico de progenitores y CGRs en diferenciación (Masai et al., 2003; Zolessi et al. 2006).

PROCESAMIENTO DE RUTINA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Una vez alcanzada la edad deseada, los embriones fueron decorionados y sacrificados por inmersión en líquido fijador. Para una mejor preservación de la estructura subcelular, se realizó una doble fijación de las muestras, empleando tres fijadores clásicos en los estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET). El primer líquido fijador estuvo compuesto por una solución de paraformaldehído al 10% en buffer fosfato salino 0,1 M (PBS) con glutaraldehído al 2.5% (pH 7,2-7,4). Para asegurar una mejor penetración de la mezcla fijadora, las cabezas fueron separadas del resto del cuerpo, y mantenidas en dicha mezcla durante toda la noche a 4°C. Luego de cumplido este período, se retiró el líquido fijador y se procedió a eliminarlo mediante la realización de cinco lavados de 5 minutos en PBS. Esto fue seguido por una post-fijación en tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Este compuesto es capaz de unirse a las cabezas polares de los lípidos de membrana, permitiendo una mejor preservación de las muestras y aumentando el contraste de las mismas, al conferirles un intenso color negro. Posteriormente, se repitieron los lavados en buffer fosfato para eliminar los restos de OsO_4 , y se procedió a la deshidratación de las piezas por inmersión en alcoholes de concentración creciente, con un pasaje final por acetona pura. A continuación, los tejidos fueron embebidos en araldita (resina epóxica). Para ello se realizaron pasajes sucesivos por diluciones de araldita/acetona de concentración creciente, hasta llegar a araldita pura, donde permanecieron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizó la inclusión definitiva de los tejidos, los cuales fueron colocados en moldes de silicona y orientados de forma de facilitar el abordaje del ojo en la orientación deseada al realizar los cortes. Los embriones de 26 y 35 hpf se orientaron de forma que el eje antero-posterior se encontrara paralelo a la cara de corte del bloque, mientras que en el caso de los embriones de 48 hpf este eje se

colocó perpendicular a la misma. Una vez armados, los bloques fueron colocados en estufa a 60°C durante 48 horas para permitir la polimerización de la resina.

Para la obtención de secciones semi y ultrafinas se empleó un ultramicrotomo RMC MT-X, utilizando cuchillas de vidrio. En una primera instancia, y con el fin de alcanzar la zona de interés, se realizaron cortes de 500 nm de espesor (semifinos). Los mismos fueron montados sobre portaobjetos, teñidos con azul de metileno borácico al 1% y examinados bajo un microscopio de luz Nikon Eclipse E200. En el caso de los embriones de 26 y 35 hpf, se buscó alcanzar la región media de la retina, de forma de realizar cortes transversales. Para los embriones de 48 hpf, la región deseada fue aquella en la que la capa plexiforme interna fuera claramente visible, lo cual indica la presencia de una capa de células ganglionares ya formada. Una vez alcanzada la zona de interés, se realizaron secciones de 70 nm de espesor (ultrafinas), las cuales fueron montadas sobre rejillas de cobre. Se utilizaron rejillas de retículo de 75 y 100 mesh recubiertas con film de Formvar, y rejillas de ventana, colocadas sobre un film de soporte del mismo tipo.

Una vez obtenidas las rejillas se procedió a contrastar los cortes ultrafinos con sales metálicas pesadas, de modo de lograr una clara visualización de las estructuras celulares. Los cortes ya montados en las rejillas fueron colocados en contacto con una solución saturada de acetato de uranilo al 2% en agua ultrapura durante 2 horas en oscuridad y en estufa a 60°C. Posteriormente, fueron lavados en agua ultrapura y sobre-contrastados con citrato de plomo de Reynolds durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de ser lavados nuevamente en agua ultrapura, se procedió a secar cuidadosamente las rejillas con los cortes y almacenarlas debidamente identificadas hasta su observación al microscopio electrónico. El análisis fue realizado en un microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, modelo JEM 1010 X operado a 100 kV, equipado con una cámara digital HAMAMATSU C4742-95 para el registro de imágenes.

INMUNODETECCIÓN *IN TOTO* CON PEROXIDASA

Con el objetivo de identificar las células Atoh7 positivas por MET, realizamos una inmunodetección *in toto* con peroxidasa. Para ello, fijamos embriones de la línea transgénica Atoh7:Gap43-EGFP a las 35 hpf en paraformaldehído al 10% en PBS 0,1 M (pH 7,2-7,4) durante toda la noche a 4°C. Luego se llevaron a cabo tres lavados de 30 minutos cada uno en Tritón X-100 al 0,5% en PBS (PBS-T0,5), con el objetivo de eliminar el fijador y permeabilizar el material biológico. Se procedió a realizar una incubación en solución de bloqueo, compuesta por PBS-T0,5 con seroalbúmina bovina (BSA) al 0,1%, durante una hora, de forma de bloquear los sitios de unión inespecífica. Una vez finalizado el bloqueo, se incubó con el anticuerpo primario monoclonal anti-GFP hecho en ratón (DSHB, Universidad de Iowa; DSHB-GFP-12E6-ds) en una dilución 1:200 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 30 minutos en PBS-T0,5, de manera de eliminar el anticuerpo primario que no se unió a su antígeno, seguidos de un lavado de 30 minutos en PBS. Se procedió entonces a realizar una segunda fijación en paraformaldehído al 10% en PBS durante una hora a 4°C, con el propósito de mejorar la preservación del tejido. Luego de esta fijación se llevó a cabo un lavado de 30 minutos en PBS-T0,5 y tres lavados de 30 minutos en solución de bloqueo. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma; A4416), en una dilución 1:500 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 30 minutos en PBS-T0,5, seguidos por dos lavados de 30 minutos en Tritón X-100 al 0,1% en PBS (PBS-T0,1). Posteriormente, se incubaron las muestras con diaminobencidina (DAB) (Sigma; D5905) en una concentración de 1 mg/mL en PBS-T0,1 durante 40 minutos en oscuridad a 4°C, de manera de permitir la penetración de la misma en el tejido. Esta incubación fue seguida por el agregado de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en una concentración final de 0,036%. La peroxidasa produce oxígeno (O₂) a partir del H₂O₂, el cual a su vez oxida a la DAB. El OsO₄ reacciona con el producto de oxidación de la DAB, produciendo un precipitado que se observa electrón-denso bajo el microscopio electrónico (Mesa-Tejada et al., 1977). Las muestras fueron mantenidas en esta solución en oscuridad con agitación a temperatura

ambiente hasta observar la aparición de células oscuras en la retina. En este punto, se detuvo la reacción por medio de dos lavados de 20 minutos en PBS-T0,5, seguidos de dos lavados de 20 minutos en PBS. Se realizó una fijación final en paraformaldehído al 10% en PBS con glutaraldehído al 2,5% (pH 7,2-7,4) durante 72 horas a 4°C. Los embriones fueron procesados posteriormente utilizando la técnica de rutina para MET.

GENERACIÓN DEL VECTOR Atoh7:nls-EGFP

La señal obtenida mediante la inmunodetección *in toto* con peroxidasa sobre embriones transgénicos Atoh7:Gap43-EGFP es citoplásmica o de membrana, lo cual puede interferir con la observación de las cilias. Con el fin de realizar un marcado nuclear de las células Atoh7 positivas, generamos el vector Atoh7:nls-EGFP por medio del kit Tol2 (Kwan et al., 2007).

Este kit está basado en el sistema Gateway, el cual combina tres vectores de "entrada" (uno "5'-entry" típicamente conteniendo el promotor, uno "middle-entry" conteniendo un reportero o la secuencia codificante de interés, y uno "3'-entry" conteniendo una señal de poliadenilación o un marcador) en un vector de "destino" por medio de recombinación sitio-específica. En este caso, utilizamos los vectores de entrada p5E-Atoh7, que contiene el promotor de Atoh7 (Kwan et al., 2007), pME-nls-EGFP (EGFP con una señal de localización nuclear), y p3E-poliA (señal de poliadenilación). Como vector de destino utilizamos pDestTol2pA2, el cual contiene las regiones terminales del transposon Tol2, necesarias para la inserción en el genoma.

La reacción de recombinación es llevada a cabo por la enzima LR Clonasa II Plus de Gateway (Invitrogen; 12538) siguiendo las indicaciones del fabricante y las que se encuentran en la página web del kit desarrollado por Kristen Kwan y Chi-Bin Chien (http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/Main_Page). En una reacción de 10 µL, se colocaron 20 fmol de cada vector de entrada y 20 fmol del vector de destino en buffer Tris-EDTA (TE) 0,01 M (pH 8), junto con 2 µL de la enzima. Esta mezcla fue incubada toda la

noche a 25°C en un termoblock. Al día siguiente, se le agregó 1 µL de Proteinasa K y se incubó a 37°C durante 10 minutos para terminar la reacción. 3 µL de la reacción de recombinación fueron posteriormente transformados en células competentes OneShot TOP10 (Invitrogen; C4040), las cuales fueron plaqueadas en medio LB Agar con ampicilina e incubadas toda la noche a 37°C. Una vez cumplido este período, las colonias fueron picadas y puestas a crecer en LB líquido. Al día siguiente, se realizaron minipreps utilizando el kit GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma; PLN70), y se llevó a cabo la confirmación por medio de un ensayo de restricción con la enzima NotI, analizando el producto de digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa 1%.

MICROINYECCIÓN DE EMBRIONES

La construcción Atoh7:nls-EGFP fue inyectada en embriones de diferentes líneas en etapa de una célula. Para permitir la inserción de dicha construcción en el genoma, se inyectó a su vez el ARNm codificante para la transposasa Tol2 (Kawakami, 2007). Este ARNm fue generado a partir del vector pCS2FA-transposase del kit Tol2, por medio de una transcripción *in vitro* utilizando el kit mMessage mMachine (Ambion). El ARNm obtenido fue purificado por medio de una columna MicroSpin G-50 (GE Healthcare; 27-5330-01). Se preparó una solución con una concentración final de 20 pg/nL de ADN plasmídico conteniendo la construcción Atoh7:nls-EGFP y 25 pg/nL de ARNm codificante para la transposasa Tol2. Cada embrión fue inyectado con 1 nL de dicha solución.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA *IN TOTO*

Una vez obtenida la construcción Atoh7:nls-EGFP, comparamos la localización de la señal obtenida con la de marcadores moleculares específicos de CGRs. En una primera instancia utilizamos el anticuerpo zn-5. Para ello, embriones de la línea SAT inyectados con ADN plasmídico conteniendo la construcción Atoh7:nls-EGFP fueron fijados a las 48 hpf en

paraformaldehído al 10% en PBS 0,1 M (pH 7,2-7,4) durante toda la noche a 4°C. Luego se llevaron a cabo tres lavados de 30 minutos cada uno en Tritón X-100 al 1% en PBS (PBS-T1), con el objetivo de eliminar el fijador y permeabilizar el material biológico. Se procedió a realizar una incubación en tripsina al 0,25% en PBS-T1 en hielo durante 30 minutos, de modo de aumentar la permeabilización del tejido. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 10 minutos en solución de bloqueo, compuesta por PBS-T1 con BSA al 0,1%, en hielo, seguidos por dos lavados de 30 minutos en la misma solución a 4°C, de forma de bloquear los sitios de unión inespecífica. Se procedió a incubar las muestras con el anticuerpo primario monoclonal zn-5 hecho en ratón (ZIRC, Oregon; ZDB-ATB-081002-19) en una dilución 1:100 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron cinco lavados de 30 minutos en solución de bloqueo, de manera de eliminar el anticuerpo primario que no se unió a su antígeno, y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa633 (Life Technologies; A-21050), en una dilución 1:500 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. A su vez, se incluyó el marcador de actina filamentosa faloidina conjugado a rodamina en una dilución 1:2000, y el marcador de ADN Hoechst 33342 en una dilución 1:5000. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 20 minutos en PBS-T1, seguidos por dos lavados de 20 minutos en PBS. Los embriones fueron montados en glicerol al 70% en Tris 20 mM (pH 8,0), en cámaras realizadas con cinta aisladora sobre portaobjetos. Sobre estas cámaras se colocaron cubreobjetos, y el espacio entre los bordes del cubre y portaobjetos fue sellado con esmalte para uñas incoloro. Las muestras fueron mantenidas a -20°C hasta su observación al microscopio de barrido láser confocal. El análisis fue realizado en un microscopio confocal Leica TCS-SP5.

En una segunda instancia, realizamos la inyección sobre embriones de la línea transgénica Atoh7:Gap43-mRFP, con el fin de comparar la señal de nls-EGFP obtenida mediante microinyección (transgénesis transitoria) con la señal observada en embriones de una línea transgénica estable. Los embriones fueron fijados a las 35 hpf en paraformaldehído al 10% en PBS 0,1 M (pH 7,2-7,4) durante toda la noche a 4°C. El protocolo continúa de la misma

forma que el descrito anteriormente para la inmunofluorescencia *in toto* con el anticuerpo zn-5, con las siguientes modificaciones:

- Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la inmunodetección, se realizaron ensayos paralelos utilizando PBS-T1 o PBS-T0,5.
- No se realizó una tripsinización previo a la incubación con solución de bloqueo.
- Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal anti-GFP hecho en ratón en una dilución 1:100 en solución de bloqueo.
- Como marcador de ADN se utilizó verde de metilo en una dilución 1:5000.
- No se utilizó el marcador de actina filamentosa faloidina conjugado a rodamina.

INMUNODETECCIÓN *IN TOTO* CON PEROXIDASA SOBRE EMBRIONES INYECTADOS

Una vez realizada la evaluación de la construcción Atoh7:nls-EGFP como marcador de las CGRs y sus precursores, llevamos a cabo una inmunodetección con peroxidasa sobre embriones inyectados, de forma de poder identificar estas células mediante MET. Para ello, embriones de la línea transgénica Atoh7:Gap43-mRFP fueron inyectados con ADN plasmídico conteniendo la construcción Atoh7:nls-EGFP en etapa de una célula, mantenidos a 28,5°C y fijados a las 42 hpf en paraformaldehído al 10% en PBS 0,1 M (pH 7,2-7,4) durante toda la noche a 4°C. El protocolo continúa de la misma forma que el descrito previamente para la inmunodetección *in toto* con peroxidasa sobre embriones no inyectados, con las siguientes modificaciones:

- El anticuerpo primario monoclonal anti-GFP se utilizó en una dilución 1:80.
- El anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a HRP se utilizó en una dilución 1:300.

- El detergente en el que se incubó la DAB fue Tween en lugar de Tritón X-100. De esta forma, al día siguiente de la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron tres lavados de 30 minutos en PBS-T0,5, seguidos por un lavado de 30 minutos en PBS, y un lavado de 30 minutos en Tween al 0,1% en PBS (PBS-Tween).
- La DAB se utilizó en una concentración de 2 mg/mL.
- La reacción se detuvo por medio de dos lavados de 20 minutos en PBS-Tween, seguidos de dos lavados de 20 minutos en PBS.

Resultados

CILIAS EN PROGENITORES NEUROEPITELIALES

Con el fin de analizar las características ultraestructurales de las cilias primarias durante el proceso de diferenciación de las células ganglionares de la retina (CGRs), procesamos embriones de pez cebra de 35 horas post-fecundación (hpf) para microscopía electrónica de transmisión (MET) utilizando la técnica de rutina (ver Materiales y Métodos). Observamos que las células que se encuentran unidas a la superficie apical del neuroepitelio, que pueden ser tanto progenitores neuroepiteliales que aún no han sufrido su última división mitótica como neuroblastos que no han comenzado el proceso de retracción, presentan una cilia primaria que protruye desde la superficie apical hacia el espacio subretiniano. Las cilias presentes en estas células poseen características ultraestructurales notoriamente conservadas, siendo una de ellas la presencia de un bolsillo ciliar asociado. Esta estructura rodea a la cilia en su región proximal, y la membrana del bolsillo entra en contacto con la membrana ciliar más cerca del extremo de la cilia. En 70 de 110 casos analizados, el bolsillo parece rodear completamente la base la cilia, ya que las expansiones de membrana que lo conforman se observan a ambos lados de la misma (Figura 2). Estas expansiones de membrana pueden mantener dimensiones similares a medida que rodean la cilia (Figura 2B), o presentar variaciones de tamaño, de forma de tener un espesor mayor en una región que en otra (Figura 2E). El extremo distal de la cilia emerge del bolsillo hacia el medio extracelular, pero el grado de exposición hacia éste varía según el caso. En algunas cilias, el extremo está expuesto al medio extracelular del espacio subretiniano (Figura 2B,G), mientras que en otros este extremo parece estar totalmente recubierto por las expansiones de membrana que constituyen el bolsillo ciliar (Figura 2D). En 9 de las 110 cilias observamos que la membrana plasmática parece expandirse rodeando solo una parte de la cilia, asociándose únicamente con una región de la membrana ciliar (Figura 3A). En algunos de estos casos, la otra región de la membrana ciliar entra en contacto con la membrana apical de la célula vecina (Figura 3Ac). Si bien la mayoría de las cilias apicales aparecen asociadas a un bolsillo ciliar total o

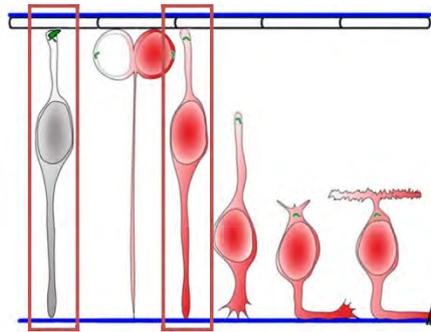
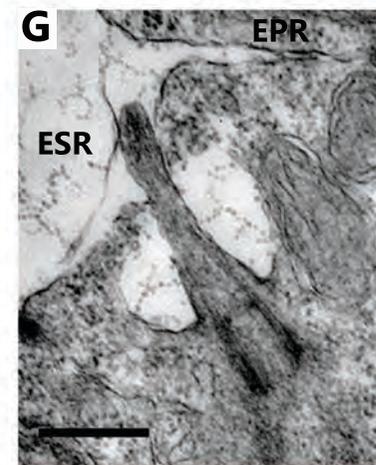
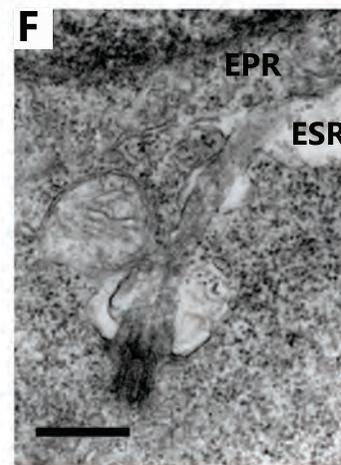
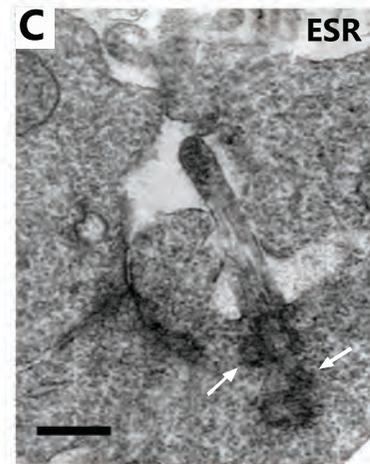
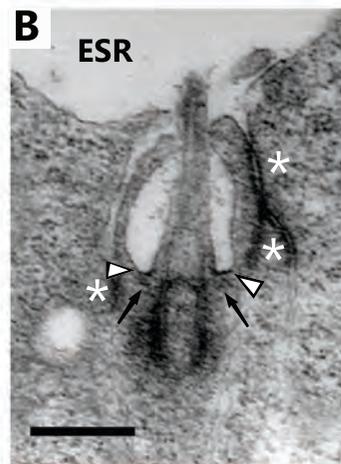
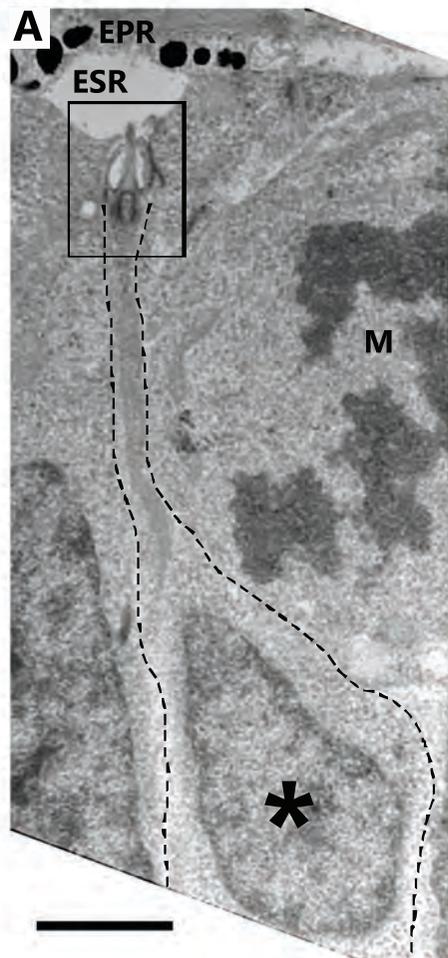


Figura 2. Ciliarias primarias de la membrana apical del neuroepitelio retiniano con bolsillo ciliar completo. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina de embriones de pez cebra de 35 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. Desde la membrana apical de las células neuroepiteliales se extiende una cilia primaria. La mayor parte de estas ciliarias se encuentra asociada a un bolsillo ciliar, constituido por expansiones de membrana que se observan a ambos lados de la cilia en los cortes ultrafinos. **A.** Imagen panorámica de una célula neuroepitelial (límites marcados con línea punteada negra; núcleo marcado con asterisco negro), en la que se observa la localización y orientación de la cilia primaria (recuadro). Esta estructura protruye desde la membrana apical, y su extremo se dirige hacia el epitelio pigmentario de la retina (EPR). **B.** Ampliación del recuadro indicado en A. Se observan zonas de membrana plasmática electrón-densas en la base del bolsillo (cabezas de flecha), que parecen estar conectadas con el centriolo madre a través de estructuras también electrón-densas, posiblemente fibras de transición (flechas negras). Los asteriscos blancos marcan la posición de la zonula adherens entre esta célula y tres células vecinas. **C-G.** Imágenes a mayor aumento en las que se aprecian detalles de ciliarias apicales. Es posible observar que las dimensiones de las expansiones de membrana que forman el bolsillo son variables, así como el grado de exposición del extremo de la cilia hacia el espacio subretiniano (ESR). Las flechas blancas en C indican la presencia de centriolos incompletos, que aparentemente nacen a partir de cada uno de los centriolos del cuerpo basal, indicando que esta célula se dividirá al menos una vez más. Las estructuras señaladas en B pueden apreciarse en varias de estas micrografías. Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. M: Célula mitótica. Barras de escala: A: 2 μm ; B-G: 0,5 μm .



parcial, 16 de las 110 observadas parece carecer completamente de dicha estructura (Figura 3B). Llamativamente, algunas de estas cilias se encuentran asociadas en su porción distal a invaginaciones de las células del epitelio pigmentario de la retina (Figura 3C). Una segunda característica que aparece en algunas de las cilias que se extienden desde la superficie apical es la presencia de una región de membrana plasmática particularmente electrón-densa alrededor de su base, que parece encontrarse en la zona en la que se establece el contacto con las fibras de transición que se extienden desde el cuerpo basal (Figura 2B). Cuando existe un bolsillo ciliar, esta membrana conforma la base de éste.

Utilizando el programa Fiji realizamos medidas de una serie de parámetros morfométricos de las cilias apicales que presentan un bolsillo ciliar completo (Figura 4). Entre estas medidas se encuentran el largo, el ancho en la base de la cilia y el ángulo con que se orienta la misma con respecto al EPR. Determinamos a su vez algunos parámetros relacionados con el bolsillo ciliar, como son la profundidad y el ancho. La mayor parte de las medidas realizadas presenta variaciones considerables.

Las 15 cilias restantes de las 110 observadas que se localizan próximas a la superficie apical se orientan con su extremo dirigido hacia la superficie basal del neuroepitelio, en lugar de protruir hacia el espacio subretiniano (Figura 5). Muchas de estas cilias se extienden desde regiones ubicadas por debajo de los complejos de unión adherentes (Figura 5D-G), y su longitud es comparable a la de las cilias que se extienden desde la superficie apical del neuroepitelio (Figura 5B,D). Estudios anteriores realizados en corteza cerebral de ratón muestran que los progenitores basales forman cilias basolaterales luego de la división mitótica previa a la delaminación (Wilsch-Bräuninger et al., 2012). Nuestro análisis de la retina de embriones de pez cebra en etapas previas a la neurogénesis (26 hpf) muestra que, a esta edad, unas pocas cilias parecen tener su extremo orientado hacia la superficie basal (Figura 6). De un total de 24 cilias halladas solo 3 presentaban dicha orientación.

En los embriones de 35 hpf observamos además cilias notoriamente más cortas que las descritas anteriormente. Estas cilias se extienden tanto desde la membrana apical,

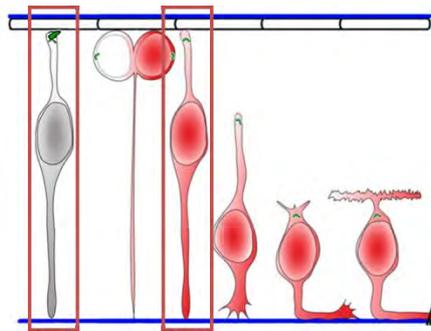
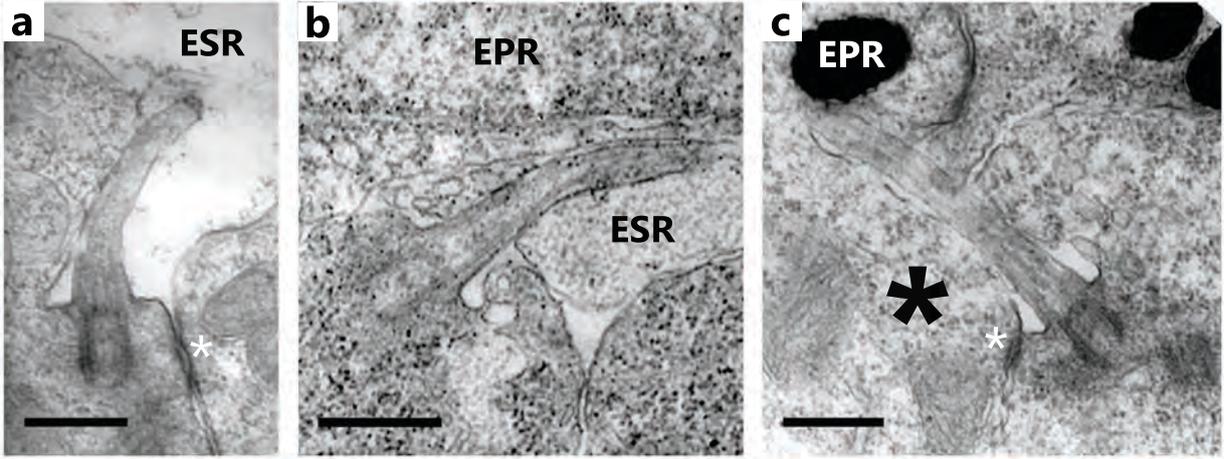
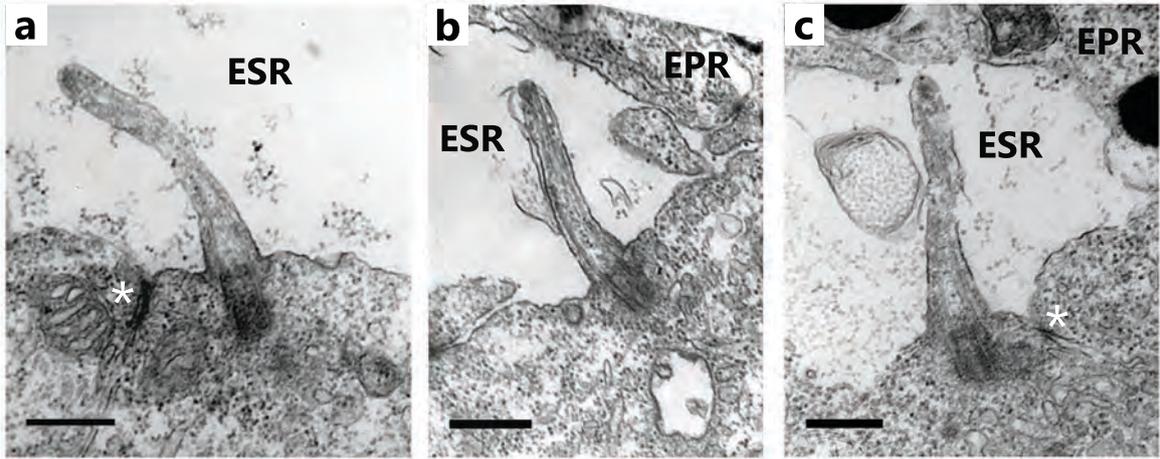


Figura 3. Cilias primarias de la membrana apical del neuroepitelio retiniano con un bolsillo ciliar incompleto o no evidente. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina de embriones de pez cebra de 35 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. Una minoría de las células neuroepiteliales presenta cilias que no se encuentran asociadas a un bolsillo ciliar completo. Estas cilias también se extienden desde la membrana apical, con su extremo dirigido hacia el espacio subretiniano (ESR). **A.** Cilias apicales con un bolsillo ciliar incompleto, en el que las expansiones de membrana solo aparecen asociadas a una región de la cilia en los cortes ultrafinos. Algunas de estas cilias establecen contacto con la membrana apical de la célula vecina (asterisco negro). **B.** Cilias apicales que carecen de un bolsillo ciliar. **C.** Cilias apicales sin bolsillo que se asocian con invaginaciones de las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Los asteriscos blancos marcan las uniones adherentes entre la célula que presenta la cilia y sus vecinas. Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. Barras de escala: 0,5 μm .

A



B



C

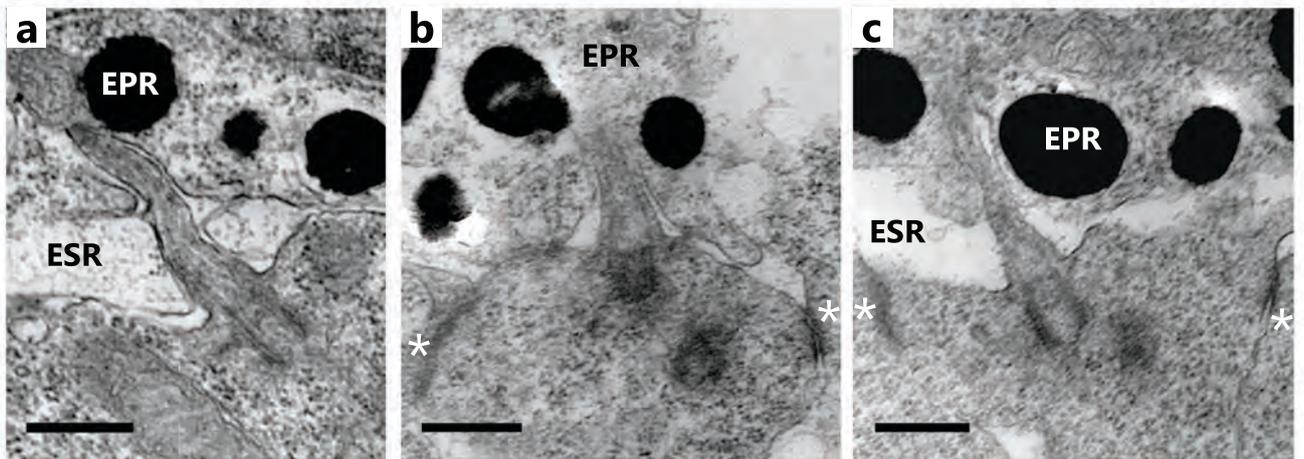
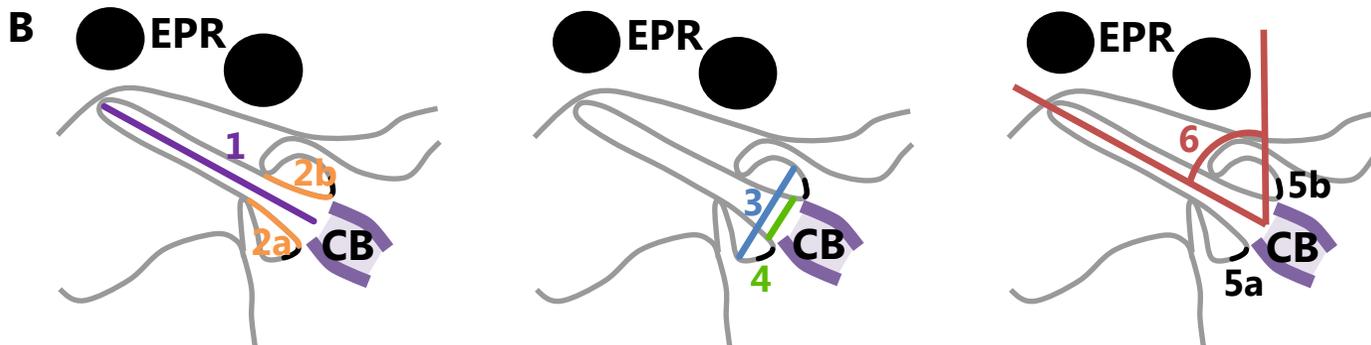
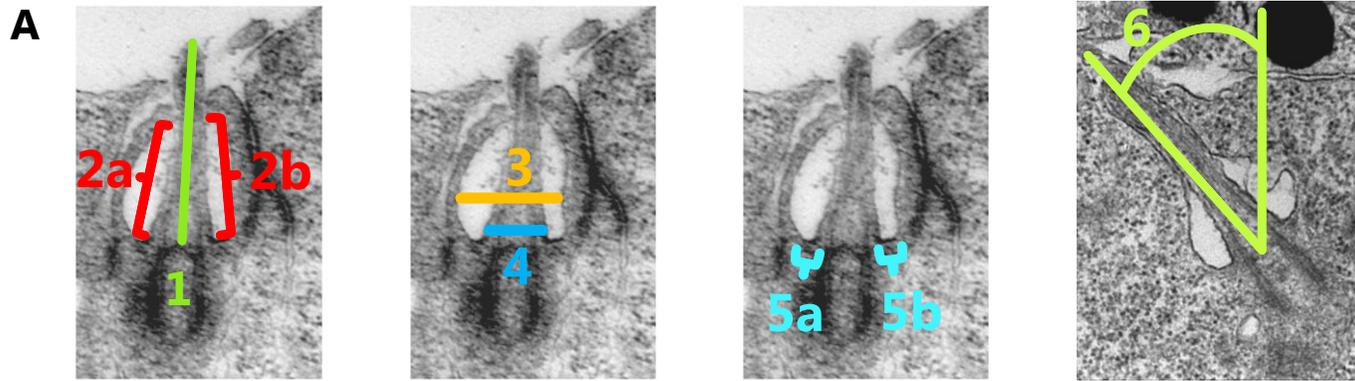


Figura 4. Caracterización morfométrica de las cilias apicales. Los valores mostrados en C fueron determinados sobre cilias que se extienden desde la membrana apical del neuroepitelio retiniano a las 35 hpf, y que se encuentran asociadas a un bolsillo ciliar completo. Se representa cada medida tomada sobre una micrografía (A) y en forma esquemática (B). Las medidas fueron tomadas utilizando el programa Fiji. CB: Cuerpo basal; EPR: Epitelio pigmentario de la retina.



C

	1	2	2a-2b	3	4	5	5a-5b		6
PROMEDIO (nm)	1304.2	470.3	55.7	702.6	307.3	136.9	58.5	PROMEDIO (°)	39.4
DESVIO ESTANDAR (nm)	298.3	150.6	44.9	167.0	31.7	69.3	28.9	DESVIO ESTANDAR (°)	22.1

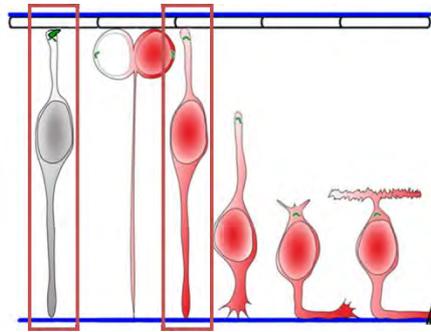
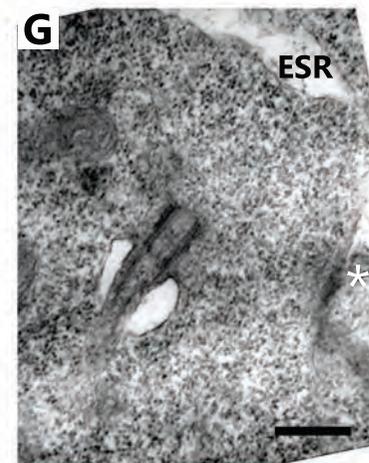
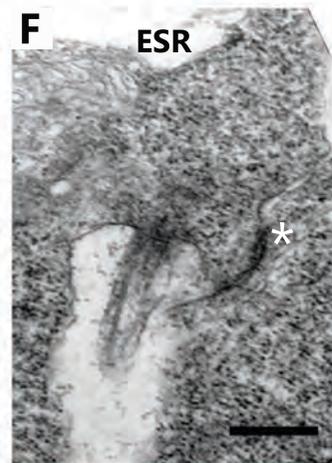
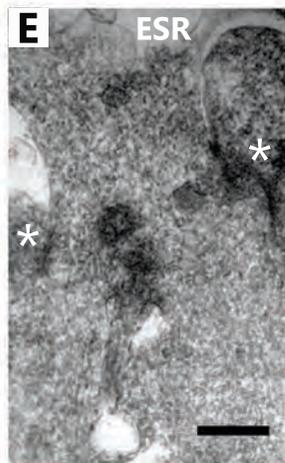
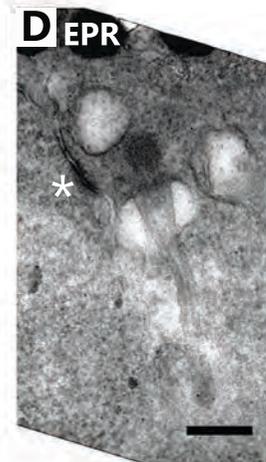
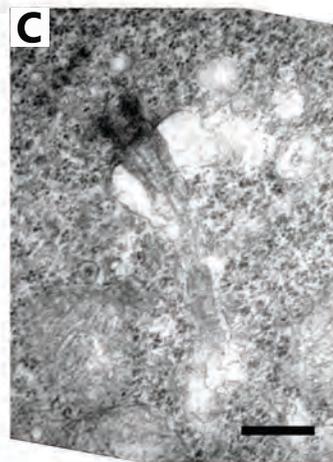
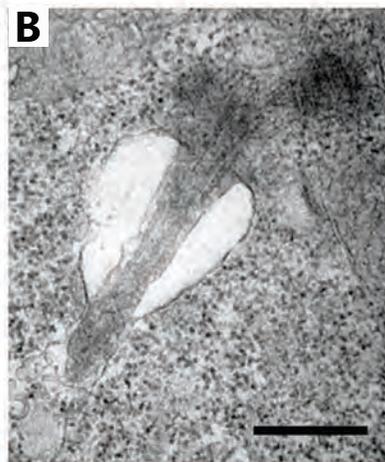


Figura 5. Cilias primarias subapicales orientadas con el extremo distal hacia la superficie basal del neuroepitelio. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina de embriones de pez cebra de 35 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. Se observan algunas cilias que se orientan con su extremo dirigido hacia la superficie basal del neuroepitelio. **A.** Imagen panorámica de una célula neuroepitelial (límites marcados con línea punteada negra; núcleo marcado con asterisco negro), en la que se observa la localización y orientación de la cilia primaria (recuadro). Estas células se encuentran unidas a la superficie apical del neuroepitelio y presentan cilias cuyo extremo se encuentra dirigido hacia la superficie basal del mismo. **B.** Ampliación del recuadro indicado en A. **C-G.** Imágenes a mayor aumento en las que se aprecian detalles de cilias subapicales. Muchas de estas cilias parecen extenderse desde regiones que se encuentran por debajo de los complejos de unión apicales (asteriscos blancos). Algunas de ellas protruyen desde la membrana basolateral (F), mientras que otras parecen encontrarse internalizadas en vesículas citoplásmicas (B,C,E). Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. EPR: Epitelio pigmentario de la retina; ESR: Espacio subretiniano. Barras de escala: A: 2 μm ; B-G: 0,5 μm .



estrechamente asociadas al aparato de Golgi (Figura 7A), como desde la membrana basolateral, por debajo de los complejos de unión adherentes (Figura 7B). En algunos de estos últimos casos se observa incluso la presencia del aparato de Golgi ubicado en la base de la cilia, y en algunos casos dispuesto entre ésta y la membrana apical de la célula (Figura 7Bd). En algunos casos se observa una sección transversal del centriolo asociado a la membrana plasmática, acompañado de un axonema corto que se organiza a partir de él (Figura 7Bd,f). En otros casos solo se observa una sección longitudinal del centriolo, sin que sea posible visualizar un axonema (Figura 7Bb,c).

Existen a su vez ciliacortas que parecerían encontrarse dentro de vesículas membranosas, las cuales se localizan cerca de la superficie apical (Figura 8). Estas ciliacortas presentan un axonema de longitud variable, el cual se organiza a partir del centriolo asociado a la membrana de la posible vesícula y se proyecta hacia la luz de la misma. En algunos casos, dicho axonema llega a medir cerca de 0,5 μm (Figura 8C,E,G). La orientación de estas ciliacortas también es variable: su extremo distal puede estar dirigido hacia la membrana lateral (Figura 8B,D,F), o hacia la superficie basal (Figura 8C,E,G). Dicho extremo, en algunos casos, presenta una forma redondeada (Figura 8E,G), mientras que en otros muestra forma de cuña (Figura 8C). Puede observarse el aparato de Golgi siempre en la zona del citoplasma que rodea al centrosoma (Figura 8B,G).

CILIAS EN NEUROBLASTOS EN PROCESO DE RETRACCIÓN APICAL

En los embriones de 35 hpf es posible observar algunas CGRs que ya han comenzado el proceso de diferenciación. Encontramos varios casos de neuroblastos que han comenzado la retracción apical y que presentan una cilia asociada al extremo del proceso en retracción, tanto en etapas tempranas (Figura 8) o tardías (Figura 10) de dicho proceso. Estas ciliacortas se orientan con su extremo dirigido hacia el EPR, y presentan características

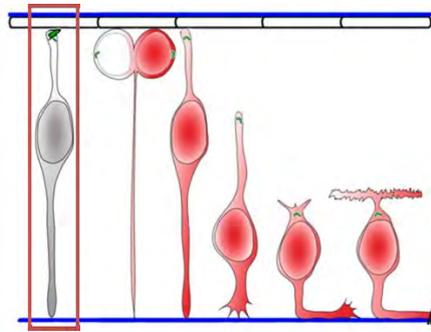
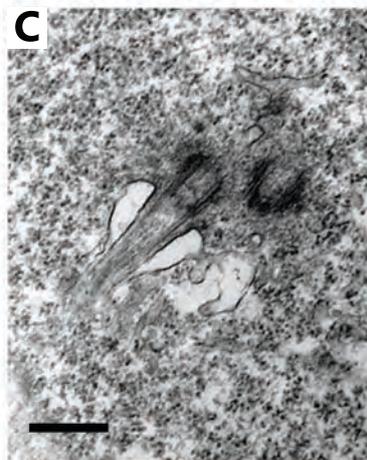
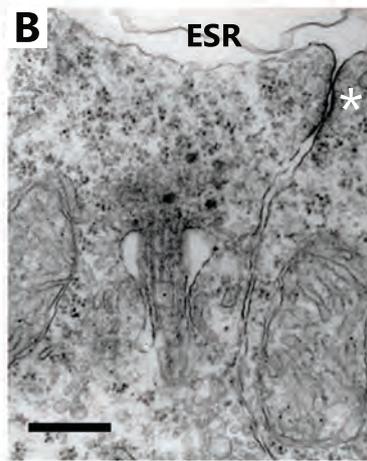


Figura 6. Cilias primarias orientadas con el extremo distal hacia la superficie basal del neuroepitelio, en etapas previas al comienzo de la neurogénesis. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina de embriones de pez cebra de 26 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. En este estadio del desarrollo, previo al comienzo de la neurogénesis en la retina, también aparecen cilias con su extremo orientado hacia la superficie basal del neuroepitelio. **A.** Imagen panorámica de una célula neuroepitelial (límites marcados con línea punteada negra; núcleo marcado con asterisco negro), en la que se observa la localización y orientación de la cilia primaria (recuadro). Estas células se encuentran unidas a la superficie apical del neuroepitelio y presentan cilias cuyo extremo se encuentra dirigido hacia la superficie basal del mismo. **B.** Ampliación del recuadro indicado en A. El asterisco blanco marca una unión adherente entre la célula que presenta la cilia y su vecina. **C.** Imagen a mayor aumento de otra cilia orientada de forma similar. Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. EPR: Epitelio pigmentario de la retina; ESR: Espacio subretiniano. Barras de escala: A: 2 μm ; B,C: 0,5 μm .



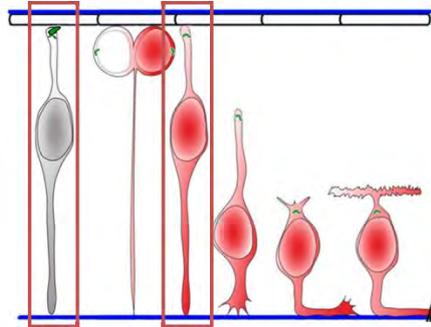
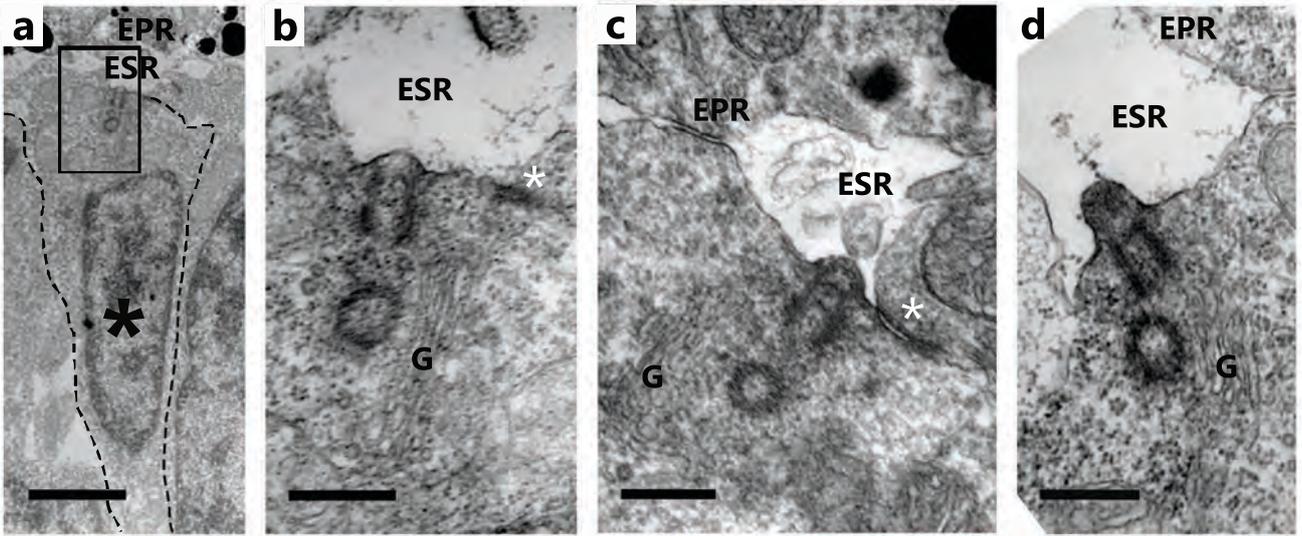
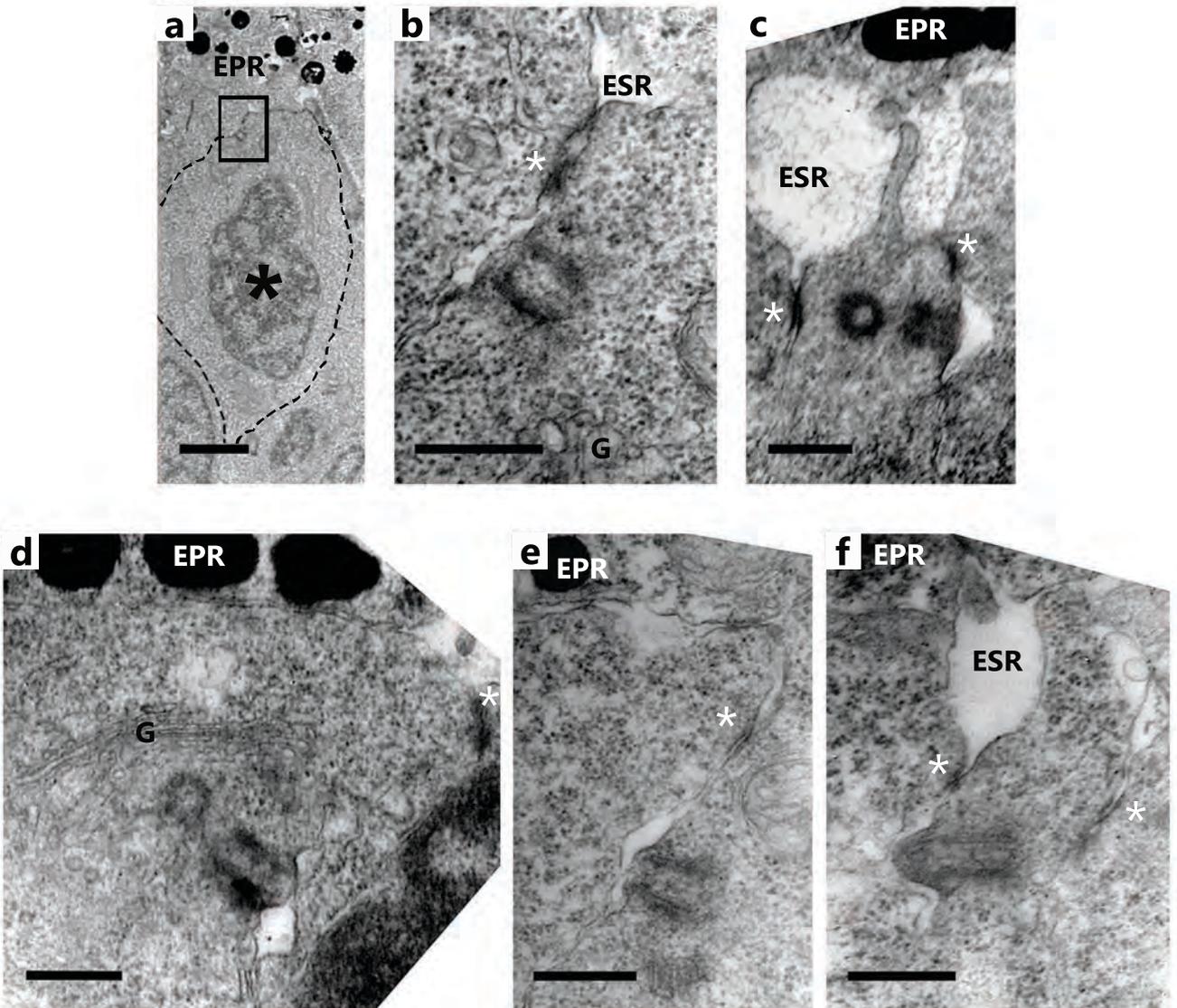


Figura 7. Cilios primarios cortos en la membrana plasmática de las células neuroepiteliales de la retina. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina de embriones de pez cebra de 35 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. Unas pocas células neuroepiteliales presentan cilios significativamente cortos, o sin axonema visible. Muchas de estas cilios aparecen estrechamente asociadas al aparato de Golgi (G). **A.** Cilios cortos que se extienden desde la membrana apical de la célula hacia el espacio subretiniano (ESR). **(a)** Imagen panorámica de una célula neuroepitelial (límites marcados con línea punteada negra; núcleo marcado con asterisco negro), en la que se observa la localización de la cilia (recuadro). **(b)** Ampliación del recuadro indicado en (a). **(c,d)** Imágenes a mayor aumento en las que se observan detalles de cilios apicales cortos. **B.** Cilios cortos que se extienden desde la membrana basolateral, por debajo de los complejos de unión adherentes (asteriscos blancos). **(a)** Imagen panorámica de una célula neuroepitelial (límites marcados con línea punteada negra; núcleo marcado con asterisco negro), en la que se observa la localización de la cilia (recuadro). **(b)** Ampliación del recuadro indicado en (a). **(c-f)** Imágenes a mayor aumento en las que se observan detalles de cilios basolaterales cortos. En algunos casos es posible observar un axonema (d-f), mientras que en otros no (c). Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. EPR: Epitelio pigmentario de la retina. Barras de escala: A(a): 2 μm ; A(b-d): 0,5 μm ; B(a): 2 μm ; B(b-f): 0,5 μm .

A



B



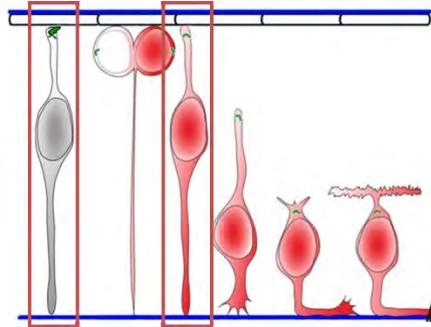
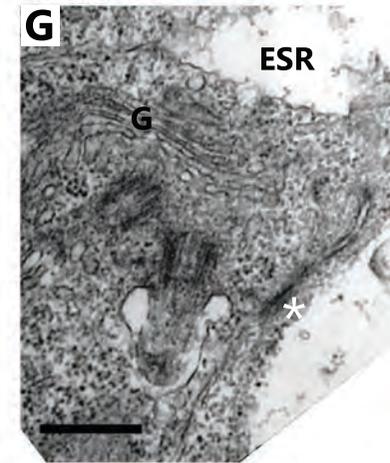
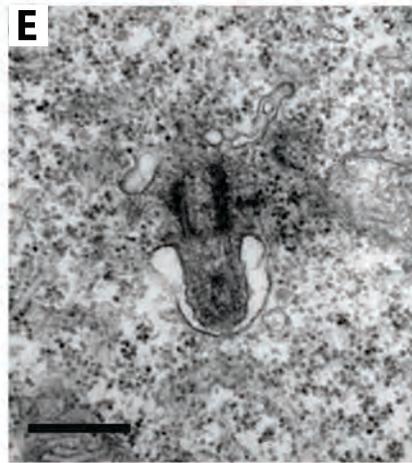
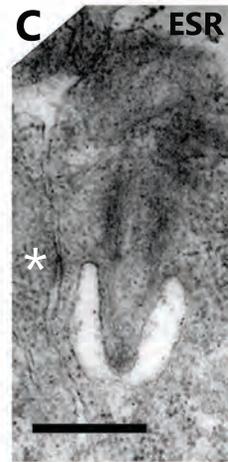
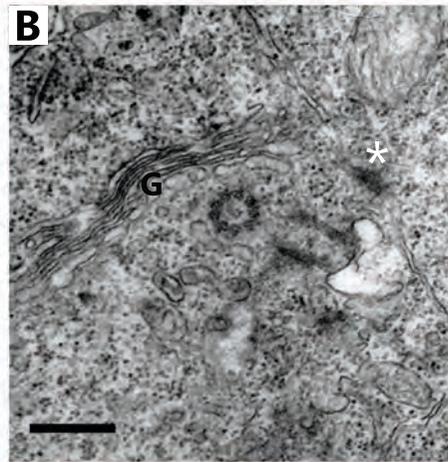
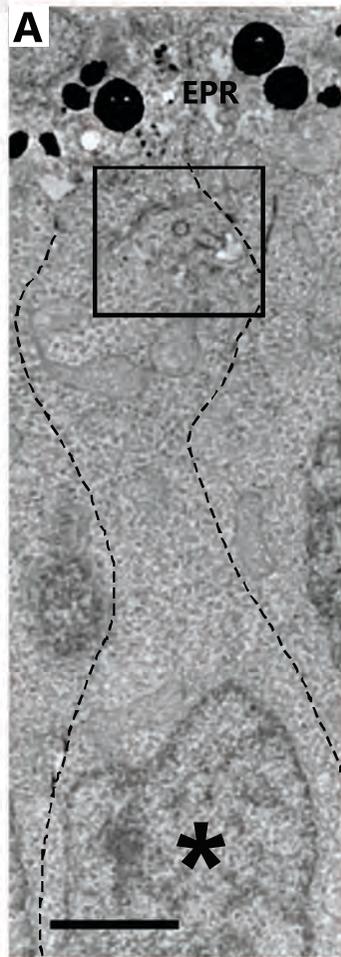


Figura 8. Cilias primarias cortas dentro de vesículas próximas a la superficie apical del neuroepitelio.

Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina de embriones de pez cebra de 35 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. Cerca de la superficie apical de algunas células neuroepiteliales se observan cilias que parecen encontrarse dentro de vesículas membranosas. **A.** Imagen panorámica de una célula neuroepitelial (límites marcados con línea punteada negra; núcleo marcado con asterisco negro), en la que se observa la localización de la vesícula (recuadro). **B.** Ampliación del recuadro indicado en A. **C-G.** Imágenes a mayor aumento en las que se observan detalles de cilias que parecen estar dentro de vesículas. La longitud de estas cilias es variable. En algunos casos, el axonema es relativamente corto (D), mientras que en otros la cilia alcanza una longitud cercana a $0,5 \mu\text{m}$ (C,E,G). La orientación de estas cilias también es variable. Algunas se encuentran dirigidas hacia la membrana lateral (B,D,F), mientras que otras se dirigen hacia la superficie basal (C,E,G). El extremo de la cilia puede presentar una forma redondeada (E,G) o de cuña (C). En algunos casos se observa la presencia del aparato de Golgi (G) en el citoplasma que se encuentra alrededor del centrosoma. Los asteriscos blancos marcan las uniones adherentes entre la célula que presenta la cilia y sus vecinas. Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. EPR: Epitelio pigmentario de la retina; ESR: Espacio subretiniano. Barras de escala: A: $2 \mu\text{m}$; B-G: $0,5 \mu\text{m}$.



ultraestructurales variables. Algunas tienen una longitud comparable a la de las cilias presentes en la membrana apical de células progenitoras o que aún no han comenzado el proceso de retracción (Figura 9B), y también presentan un bolsillo ciliar (Figura 9B; 10A,B). En otros casos, sin embargo, el bolsillo parece estar ausente (Figura 9A,C). Resulta interesante notar que en el extremo apical de uno de los procesos en retracción observamos estructuras electrón-densas asociadas a la membrana, que parecen ser uniones intercelulares (Figura 9C).

CILIAS EN NEUROBLASTOS QUE HAN FINALIZADO LA RETRACCIÓN APICAL Y EN CÉLULAS GANGLIONARES JÓVENES

Las CGRs parecen mantener una cilia incluso luego de que la retracción cesa, cuando su núcleo se encuentra posicionado cerca de la lámina basal, en la región en la que posteriormente se formará la capa de células ganglionares. Algunas de estas cilias se encuentran en posición apical (Figura 11), mientras que otras parecen extenderse desde regiones más basales (Figura 12). Estas últimas presentan una orientación variable, pudiendo tener su extremo dirigido hacia la lámina basal (Figura 12A) o hacia la superficie apical (Figura 12B). Estas cilias parecen ser más cortas que las que protruyen desde la membrana apical de las células neuroepiteliales. En un caso particular encontramos dos cilias de células vecinas muy próximas entre sí, separadas por lo que parecería ser un complejo de unión intercelular (Figura 11A).

Con el fin de analizar la presencia y ultraestructura de las cilias en etapas más avanzadas de la diferenciación de las CGRs, procesamos embriones de 48 hpf para MET utilizando la técnica de rutina. En 7 de las 49 células en las que encontramos un centriolo asociado a la membrana plasmática observamos cilias que parecen ser relativamente largas, las cuales se extienden lateralmente desde la región apical (Figura 13). Estas cilias parecerían por tanto encontrarse en el tronco del árbol dendrítico o en su base, con su extremo dirigido hacia la lámina basal. En algunas de estas cilias encontramos una región de membrana

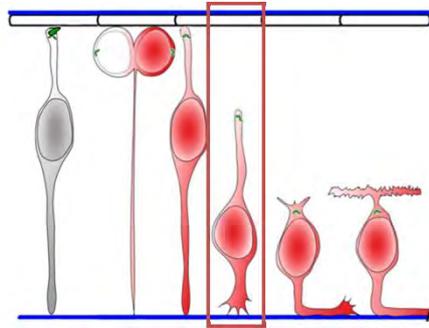
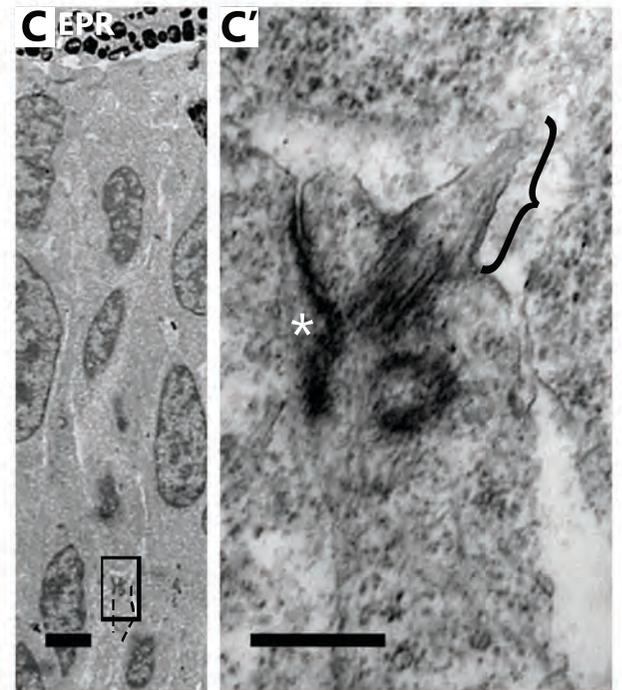
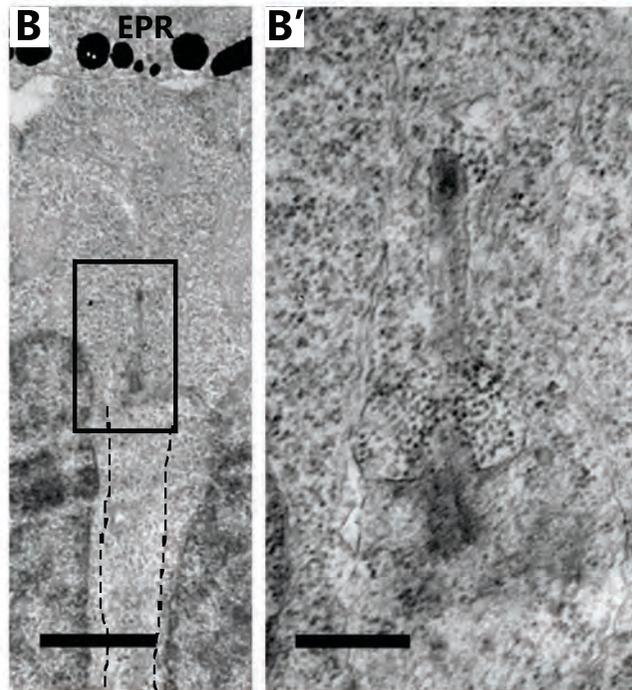
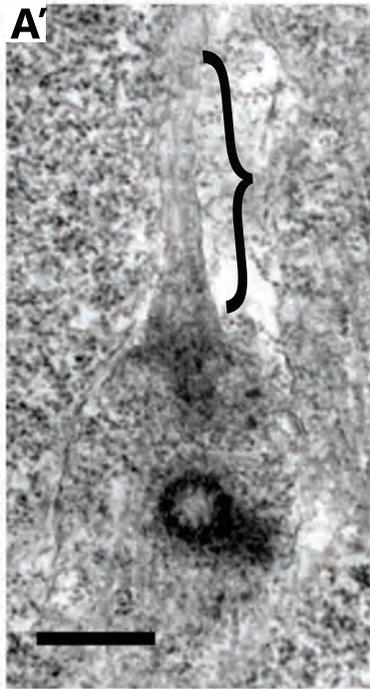
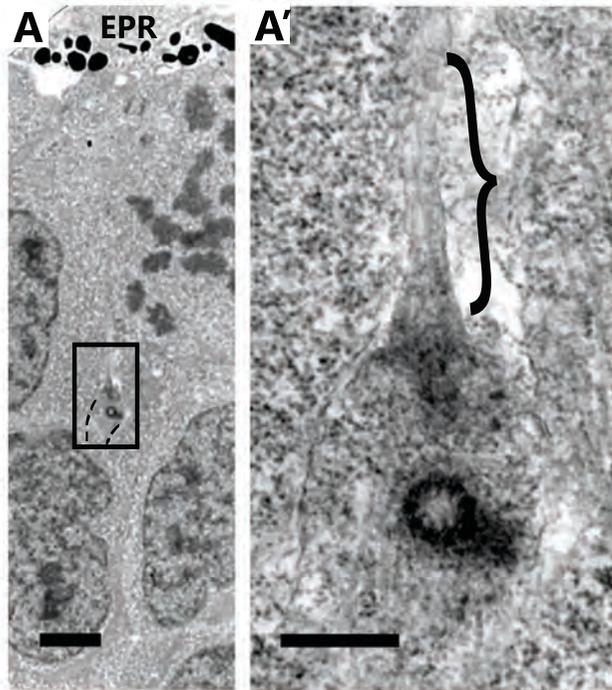


Figura 9. Cilias primarias en neuroblastos en etapas tempranas de la retracción del proceso apical. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina de embriones de pez cebra de 35 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. Se observan neuroblastos en etapas tempranas de la retracción que presentan una cilia en el extremo del proceso apical. **A-C.** Imágenes panorámicas en las que se observa la localización y orientación de la cilia (recuadros). Estas cilias se ubican en el extremo del proceso apical en retracción (límites marcados con línea punteada negra), y se orientan con su extremo dirigido hacia el epitelio pigmentario de la retina (EPR). En ninguno de los casos fue posible identificar el núcleo de las células que presentan estas cilias. **A'-C'.** Ampliaciones de los recuadros indicados en A-C, respectivamente. Se observa que algunas de las cilias presentan un bolsillo ciliar asociado (B'), mientras que en otras esta estructura parece estar ausente (A',C'). En aquellas cilias en las que no se observa el extremo se marca la longitud del axonema hasta donde es posible apreciarla (llave). En uno de los procesos en retracción observamos una estructura electrón-densa asociada a la membrana, que parece ser un complejo de unión intercelular de tipo adherente (asterisco blanco). Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. Barras de escala: A-C: 2 μm ; A'-C': 0,5 μm .



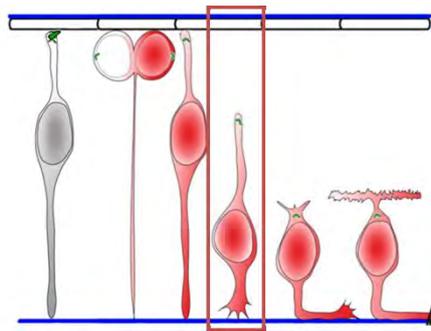
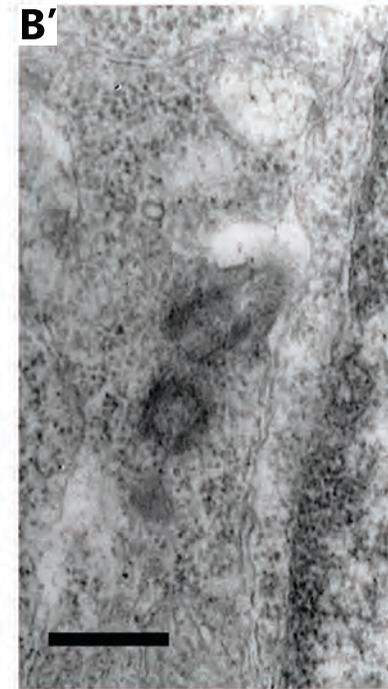
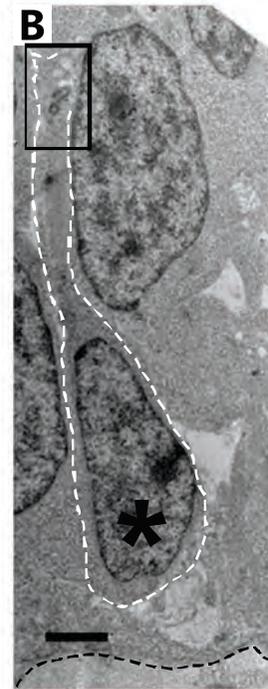
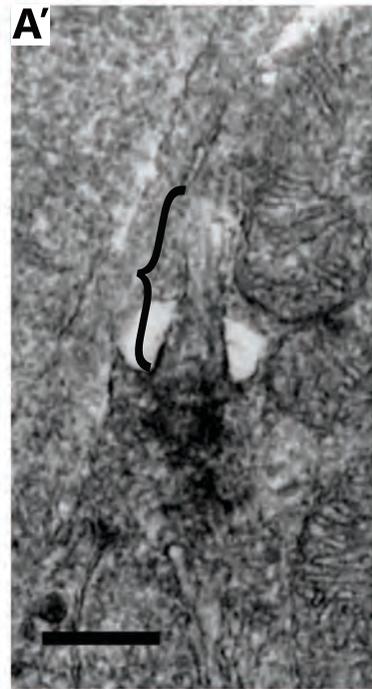
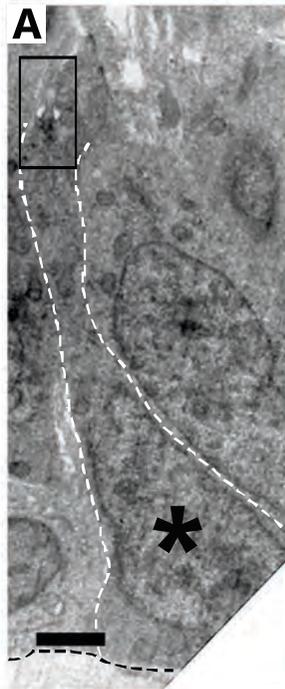


Figura 10. Cilios primarios en neuroblastos en etapas avanzadas de la retracción del proceso apical. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina de embriones de pez cebra de 35 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. **A,B.** Imágenes panorámicas de neuroblastos en etapas avanzadas de la retracción (límites marcados con línea punteada blanca), que presentan una cilia en el extremo del proceso apical (recuadros). Estas cilias se orientan con su extremo dirigido hacia el epitelio pigmentario de la retina, y presentan un bolsillo ciliar asociado. El núcleo de estos neuroblastos (marcado con asterisco negro) se encuentra muy próximo a la lámina basal (línea punteada negra). **A',B'.** Ampliaciones de los recuadros indicados en A y B, respectivamente. En aquellas cilias en las que no se observa el extremo se marca la longitud del axonema hasta donde es posible apreciarla (llave). Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. Barras de escala: A,B: 2 μm ; A',B': 0,5 μm .



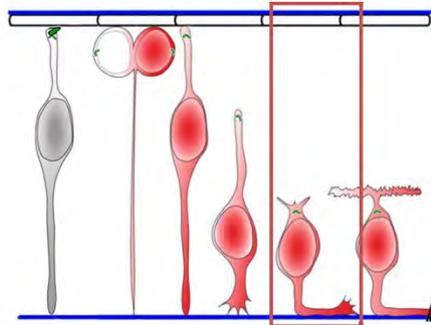
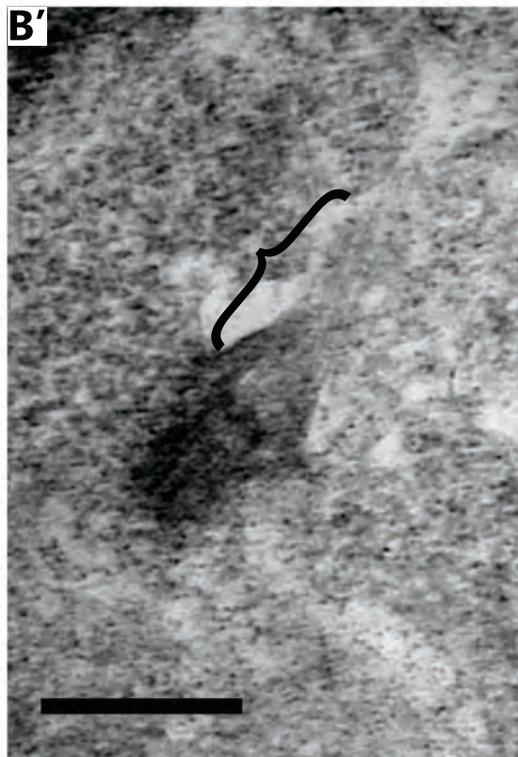
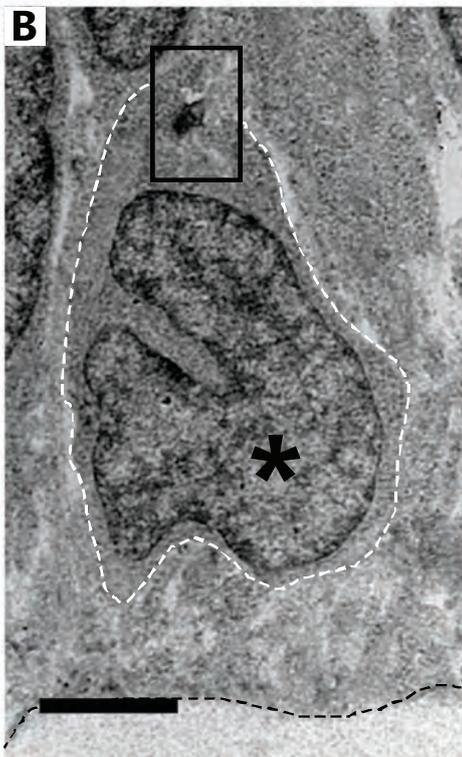
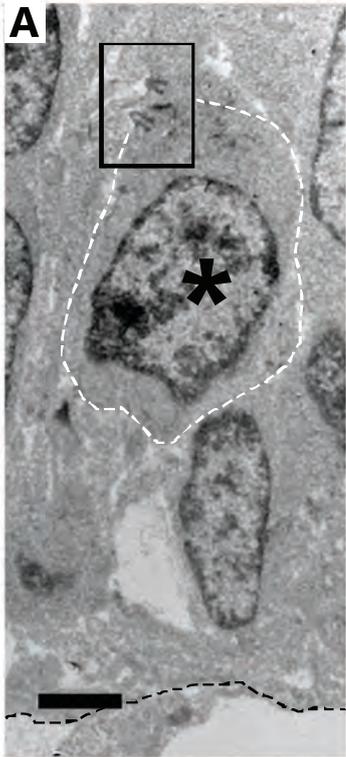


Figura 11. Cilios primarios en la región apical de neuroblastos que han finalizado la retracción del proceso apical. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina de embriones de pez cebra de 35 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. Las cilias son retenidas en los neuroblastos luego de que la retracción cesa, cuando el núcleo (marcado con asterisco negro) se encuentra muy próximo a la lámina basal (línea punteada negra). **A,B.** Imágenes panorámicas de los neuroblastos (límites marcados con línea punteada blanca), en las que se observa la localización y orientación de la cilia (recuadros). Algunas de las cilias se localizan en la región apical de la célula. **A'.** Ampliación del recuadro indicado en A. Se observa que la cilia es más corta que las que se extienden desde la membrana apical de las células neuroepiteliales. En este caso particular se observan dos cilias de células vecinas que se encuentran muy próximas entre sí, y están separadas por lo que parece ser un complejo de unión adherente (asterisco blanco). **B'.** Ampliación del recuadro indicado en B. En este caso, al no ser posible observar el extremo de la cilia, se marca la longitud del axonema hasta donde es posible apreciarla (llave). Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. Barras de escala: A,B: 2 μm ; A',B': 0,5 μm .



plasmática electrón-densa cerca de la base, similar a la que se observa en las cilias apicales de las células neuroepiteliales (Figura 13A). El bolsillo, sin embargo, parece estar ausente. Cerca de estas cilias es posible observar la presencia del aparato de Golgi en disposición similar a los casos descritos anteriormente (Figura 13B,C).

En la mayor parte de las CGRs en los embriones de 48 hpf, sin embargo, no observamos cilias completas. En 33 de las 49 células en las que encontramos un centriolo asociado a la membrana plasmática, no existe un axonema visible (Figura 14A). La región de la membrana a la que se ancla el centriolo aparece electrón-densa, de forma similar a lo que se observa en las cilias que se extienden desde la superficie apical de las células neuroepiteliales y desde el tronco del árbol dendrítico de las CGRs jóvenes. Las 9 CGRs restantes de las 49 en las que aparece un centriolo asociado a la membrana poseen cilias cortas, cuya región distal aparece libre de microtúbulos y ensanchada (Figura 14B). En esta región distal se observa la presencia de un componente granular (Figura 14Ba,c,d). Al igual que las cilias más largas, éstas se extienden lateralmente desde la región apical, a partir de lo que podría ser el tronco del árbol dendrítico, y aparecen asociadas al aparato de Golgi (Figura 14Ba,c,d). A su vez, la membrana que las recubre aparece más electrón-densa en la zona de la base.

MARCADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA Y SUS PROGENITORES

Con el objetivo de identificar las células Atoh7 positivas por MET realizamos una inmunodetección de GFP *in toto* con peroxidasa sobre embriones transgénicos Atoh7:Gap43-EGFP. Estos embriones expresan una forma de membrana de la proteína EGFP, la cual se encuentra bajo el control del promotor de Atoh7 (ver Materiales y Métodos). Al observar embriones fijados a las 35 hpf y sometidos a este tratamiento por MET, encontramos células con un citoplasma más electrón-denso (Figura 15), lo cual podría corresponder al precipitado que se forma mediante la inmunodetección con

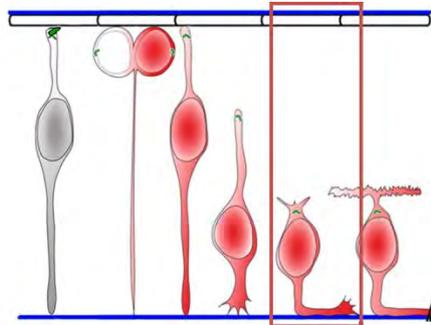
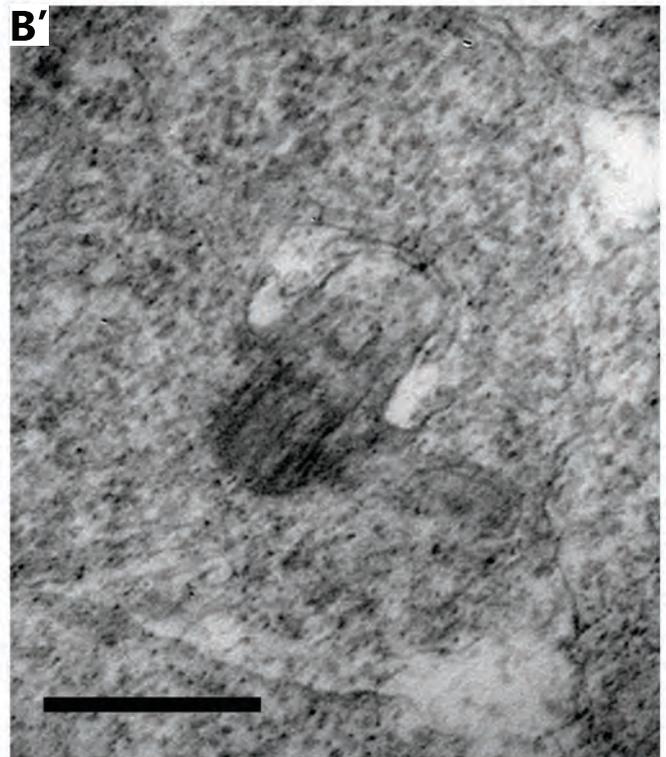
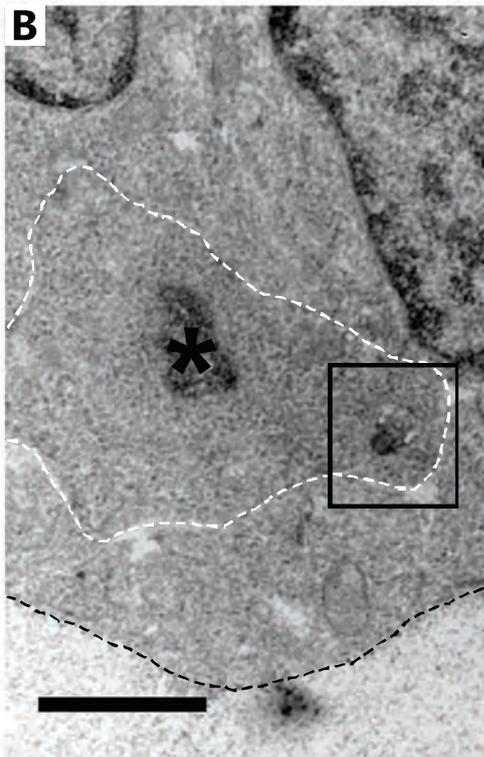
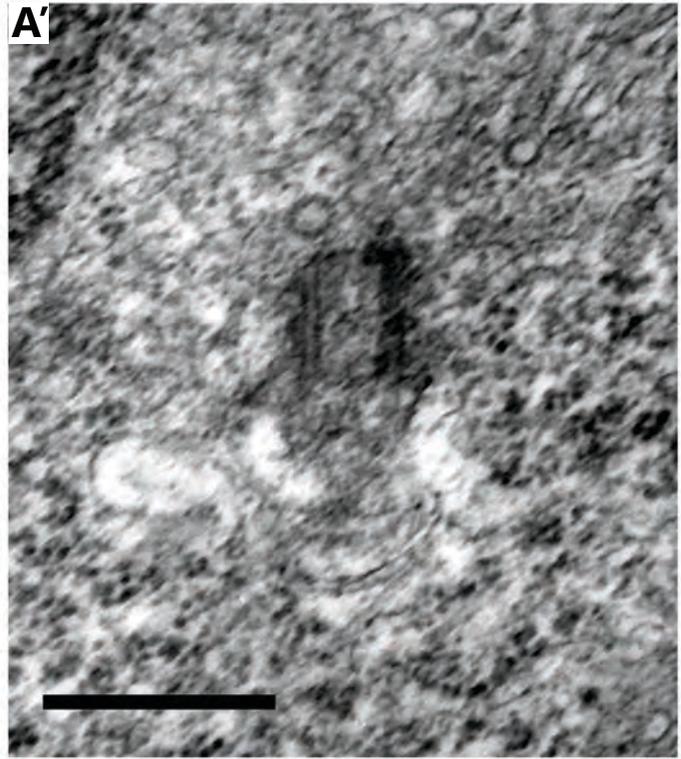
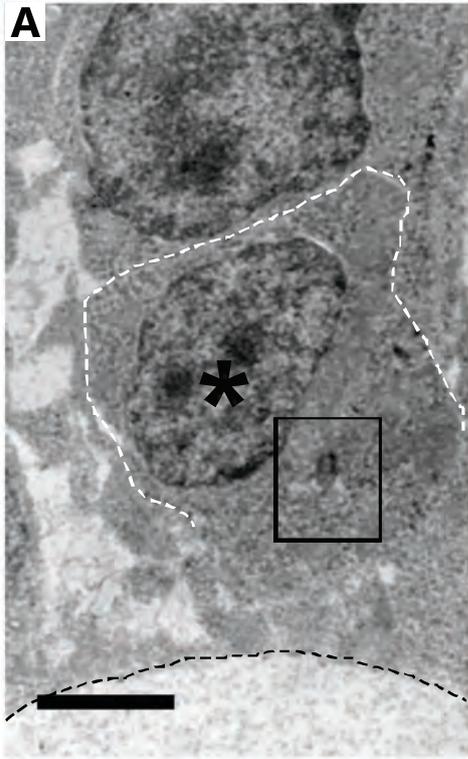


Figura 12. Cilias primarias en regiones no apicales de neuroblastos que han finalizado la retracción del proceso apical. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina de embriones de pez cebra de 35 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. Algunos neuroblastos que han terminado el proceso de retracción presentan cilias que se extienden desde la región basal o lateral. Los núcleos de estos neuroblastos (marcados con asterisco negro) se encuentran posicionados cerca de la lámina basal (línea punteada negra). **A,B.** Imágenes panorámicas de neuroblastos (límites marcados con línea punteada blanca), en las cuales se observa la localización y orientación de la cilia (recuadros). Algunas de estas cilias se orientan con su extremo hacia la lámina basal (A), mientras que en otras éste se encuentra dirigido hacia la superficie apical del neuroepitelio (B). La imagen B corresponde a un corte tangencial de la célula. **A',B'.** Ampliaciones de los recuadros indicados en A y B, respectivamente, en las que se observan detalles de las cilias. Estas cilias parecen ser más cortas que las que se extienden desde la membrana apical de las células neuroepiteliales. Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. Barras de escala: A,B: 2 μm ; A',B': 0,5 μm .



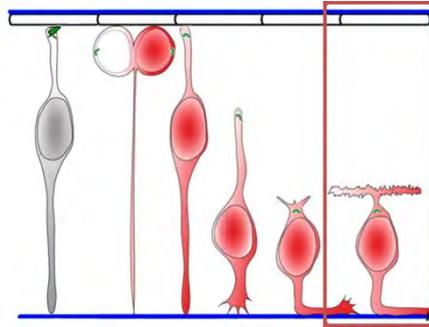
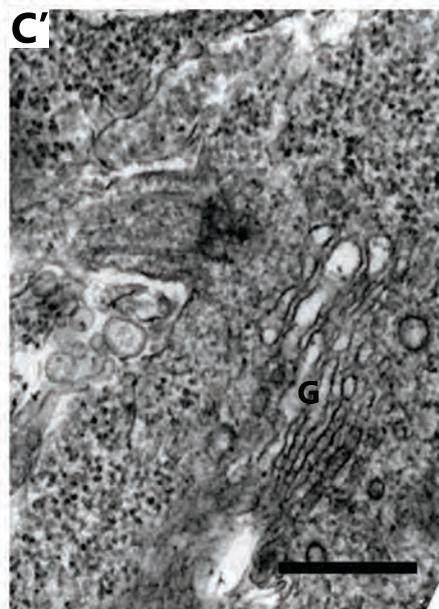
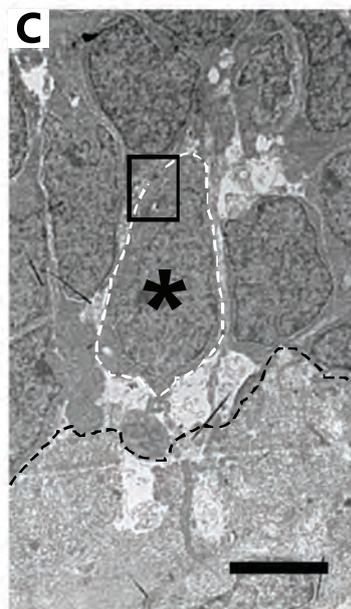
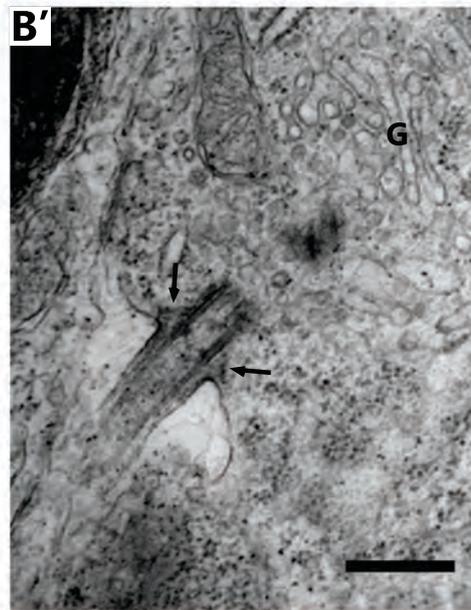
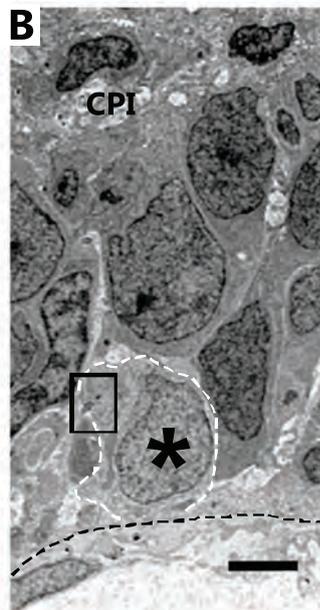
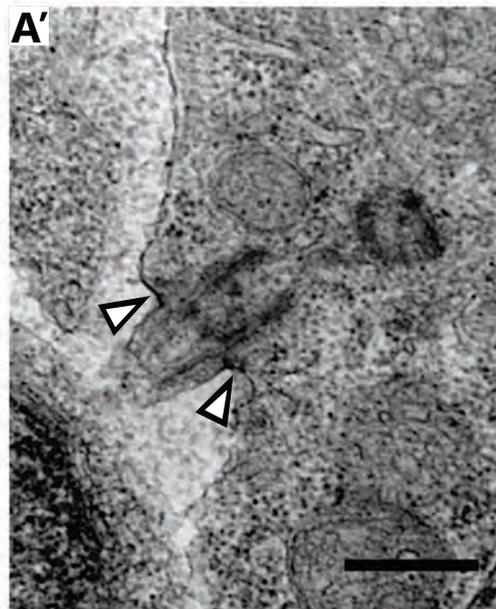
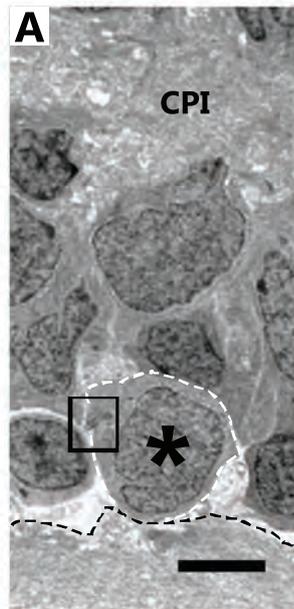


Figura 13. Cilias primarias largas en células ganglionares jóvenes. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina central de embriones de pez cebra de 48 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. Algunas células ganglionares jóvenes presentan una cilia primaria larga, que carece de bolsillo ciliar. **A,B,C.** Imágenes panorámicas de células ganglionares jóvenes (límites marcados con línea punteada blanca; núcleo marcado con asterisco negro) ubicadas en la capa de células ganglionares, en las que se observa la localización y orientación de la cilia (recuadros). Estas cilias se extienden lateralmente desde el tronco del árbol dendrítico, con su extremo dirigido oblicuamente hacia la lámina basal (línea punteada negra). **A',B',C'.** Ampliaciones de los recuadros indicados en A, B y C, respectivamente, en las que se aprecian detalles de las cilias. Estas cilias se localizan próximas al aparato de Golgi (G). En algunos casos se observa una región de membrana electrón-densa cerca de la base de la cilia (cabezas de flecha), similar a la que se encuentra en cilias que se extienden desde la membrana apical de las células neuroepiteliales. En ocasiones es también posible observar las fibras de transición (flechas negras), las cuales se extienden desde el cuerpo basal y establecen contacto con la membrana plasmática. Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. CPI: Capa plexiforme interna. Barras de escala: A,B,C: 4 μm ; A',B',C': 0,5 μm .



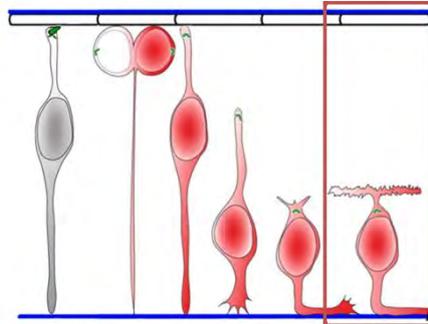
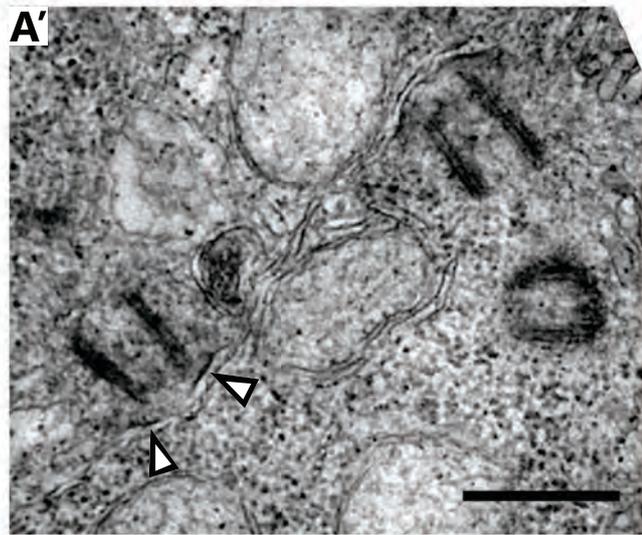
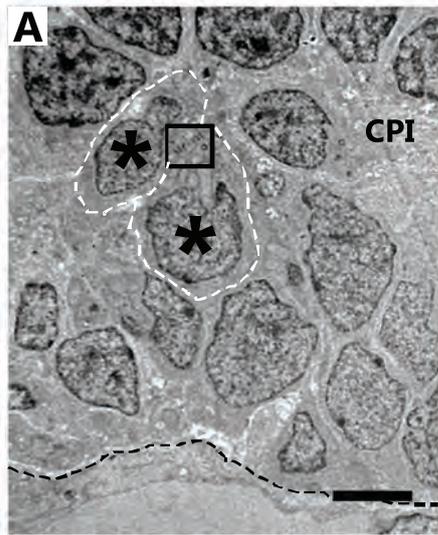
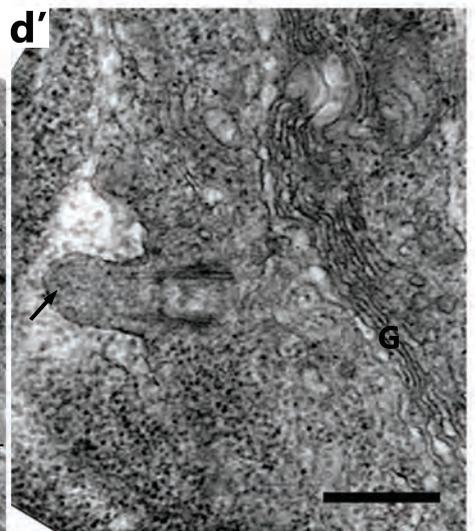
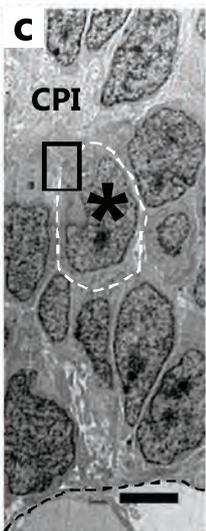
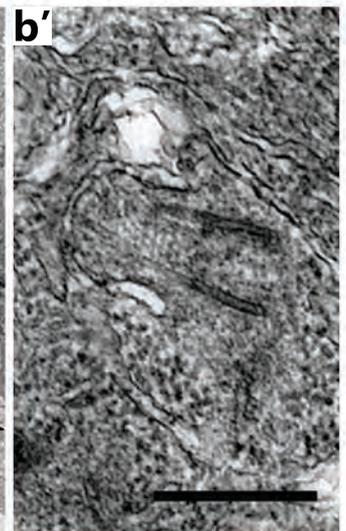
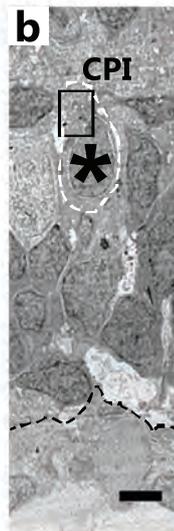
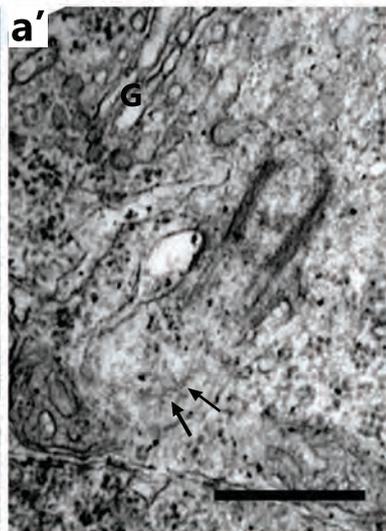
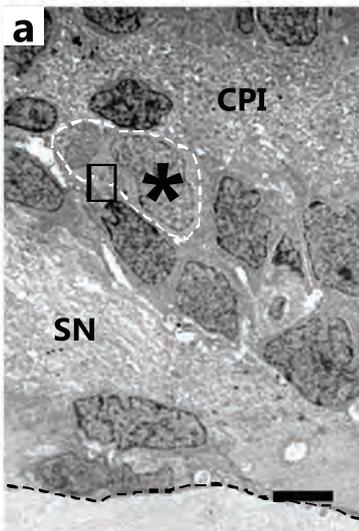


Figura 14. Centriolos asociados a la membrana y cilias primarias cortas en células ganglionares jóvenes. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la retina de embriones de pez cebra de 48 hpf procesados utilizando la técnica de rutina. **A.** Imagen panorámica de una zona de la capa de células ganglionares. En la mayor parte de las células ganglionares jóvenes que se ubican allí (límites marcados con línea punteada blanca; núcleo marcado con asterisco negro) en las que encontramos un centriolo asociado a la membrana no existe un axonema visible. **A'.** Ampliación del recuadro indicado en A. En los sitios de la membrana con los que el centriolo establece contacto se observan zonas electrón-densas (cabezas de flecha). **B.** Algunas células ganglionares jóvenes presentan cilias cortas, con su extremo distal dilatado. **(a-d)** Imágenes panorámicas de células ganglionares jóvenes (límites marcados con línea punteada blanca; núcleo marcado con asterisco negro), en las que se observa la localización y orientación de la cilia (recuadros). Estas cilias se extiende lateralmente desde la región apical (a,b,c), aunque algunas lo hacen desde la región basal (d). **(a'-d')** Ampliaciones de los recuadros indicados en a-d, respectivamente. En estas cilias cortas el axonema es claramente visible cerca de la base, pero parece desaparecer hacia el extremo, que se observa dilatado y con un material granular (flechas negras). Próximo a ellas se encuentra el aparato de Golgi (G). Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. CPI: Capa plexiforme interna; SN: Salida del nervio óptico; línea punteada negra: lámina basal. Barras de escala: A,B(a-d): 4 μm ; A',B(a'-d'): 0,5 μm .



B



peroxidasa. Esta señal, sin embargo, es débil y se encuentra distribuida de forma heterogénea.

Debido a que las ciliastomas son especializaciones de membrana, la presencia de un precipitado electrón-denso en el citoplasma o la membrana podría interferir con la observación de estos organelos. A su vez, el cuerpo basal, una estructura que también es electrón-densa, se localiza en el citoplasma. Con el fin de solucionar este problema, nos propusimos llevar a cabo un marcado nuclear de las CGRs. Para ello realizamos una construcción Atoh7:nls-EGFP (Figura 16A), la cual fue inyectada en forma de ADN plasmídico en embriones en etapa de una célula. Esta construcción permite la expresión de una proteína quimérica constituida por EGFP con una señal de localización nuclear (nls, secuencia MAPKKRKV), la cual se encuentra bajo el control del promotor de Atoh7. Al inyectar embriones transgénicos Atoh7:Gap43-mRFP con ADN plasmídico conteniendo esta construcción y observarlos a las 35 hpf en un microscopio estereoscópico de fluorescencia encontramos que la señal de nls-EGFP se localiza en los ojos (Figura 16B). La observación por microscopía confocal muestra que la señal de nls-EGFP es mayoritariamente nuclear, ya que co-localiza en gran medida con la señal correspondiente al verde de metilo (marcador de ADN), pero no con la señal de RFP de membrana (Figura 16C). Con el objetivo de determinar si el marcado resulta específico para células del linaje de las CGRs, comparamos la localización de la señal de nls-EGFP con la de dos marcadores moleculares específicos de dicho linaje. En primer lugar, realizamos una inyección sobre embriones de la línea SAT, los cuales fueron fijados a las 48 hpf, sometidos a inmunofluorescencia con el anticuerpo zn-5 y observados por medio de microscopía confocal (Figura 17). Este anticuerpo reconoce la neurolina, una proteína de adhesión celular que se expresa en las CGRs en diferenciación (Laessing y Stuermer, 1996). Utilizamos a su vez faloidina conjugada a rodamina para marcar la actina filamentosa. La señal de la rodamina es particularmente intensa en la capa plexiforme interna, lo cual permite delimitar la capa de células ganglionares. Observamos que la mayor parte de las células nls-EGFP positivas se localizan en esta capa, si bien existen unas pocas con una señal más débil que se encuentran fuera de la misma. En una segunda instancia, comparamos la señal de nls-EGFP

Figura 15. Observación de neuroblastos Atoh7:Gap43-EGFP positivos mediante microscopía electrónica de transmisión. Imágenes de microscopía electrónica de la retina de embriones de pez cebra transgénicos Atoh7:Gap43-EGFP fijados a las 35 hpf, sometidos a una inmunodetección de GFP *in toto* con peroxidasa-DAB y procesados posteriormente utilizando la técnica de rutina para microscopía electrónica de transmisión. **A,B.** Imágenes panorámicas de células neuroepiteliales que aparecen con un citoplasma levemente más electrón-denso que las otras, que podrían corresponder a células ganglionares de la retina en diferenciación. Estas células aparecen cerca de la lámina basal (línea punteada negra). **A',B'.** Ampliaciones de los recuadros indicados en A y B, respectivamente, en las que se observa la distribución heterogénea de la electrón-densidad en el citoplasma. Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. Barras de escala: A,B: 4 μm ; A',B': 2 μm .

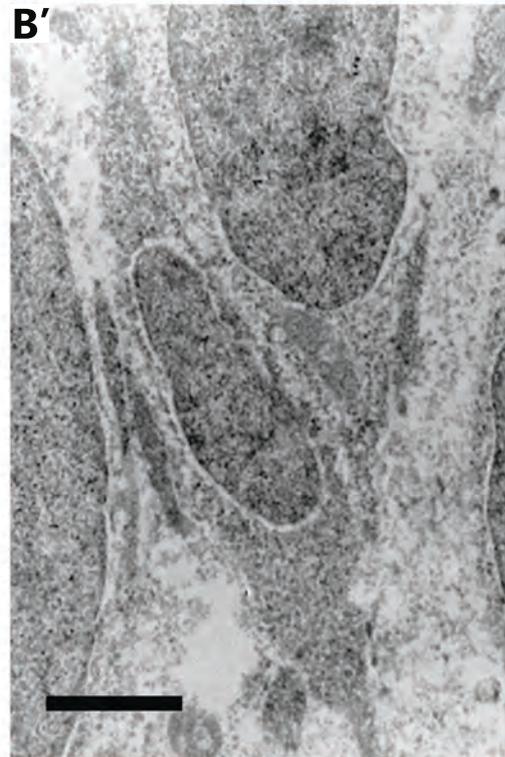
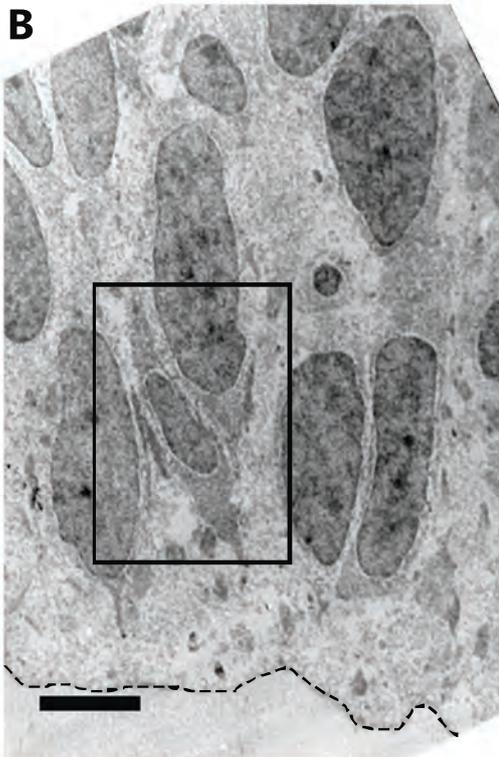
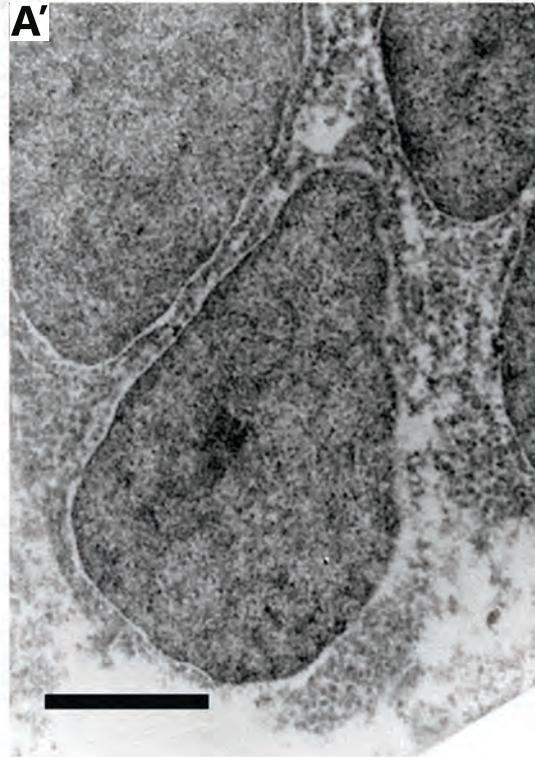
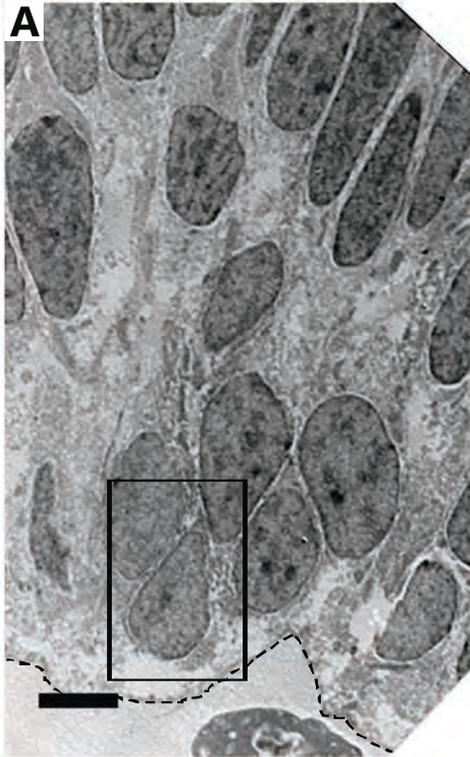
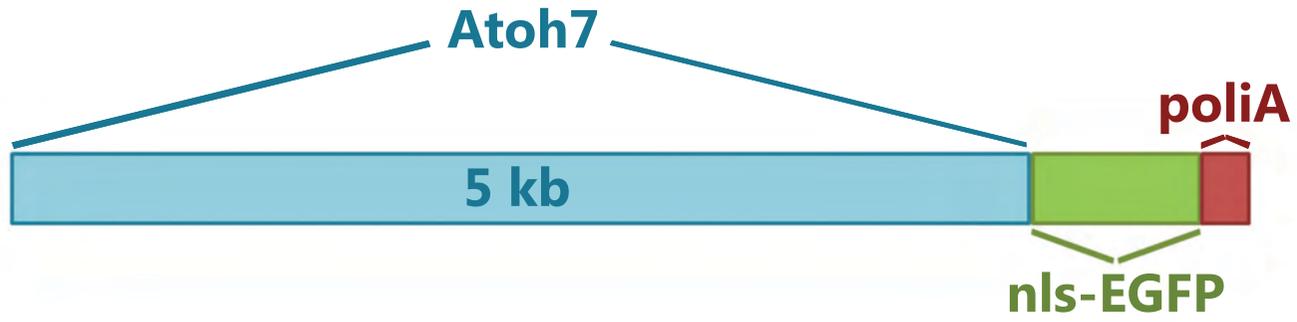


Figura 16. Características y evaluación primaria de la construcción Atoh7:nls-EGFP.

A. Diagrama de la construcción Atoh7:nls-EGFP realizada por medio del kit Tol2, basado en el sistema Gateway (ver Materiales y Métodos). Se mantienen las proporciones de cada segmento de acuerdo con el número de pares de bases. Atoh7: región upstream del gen de Atoh7 de pez cebra, conteniendo secuencias reguladoras de la transcripción; nls-GFP: secuencia codificante de EGFP fusionada en su extremo N-terminal a una secuencia de localización nuclear. **B.** Imagen de un embrión de pez cebra de 35 hpf inyectado con ADN plasmídico conteniendo la construcción Atoh7:nls-EGFP, tomada en un microscopio estereoscópico de fluorescencia. Se observa una intensa señal de nls-EGFP solamente en los ojos. **C.** Imágenes de microscopía de barrido láser confocal correspondientes a una única sección óptica de la retina de un embrión de 35 hpf que fue inyectado con la construcción Atoh7:nls-EGFP en forma de ADN plasmídico. La señal de nls-EGFP (verde) co-localiza con la correspondiente a los núcleos de posibles neuroblastos (cabezas de flecha), con una débil señal de localización citoplásmica. Los progenitores y neuroblastos de células ganglionares de la retina se marcan con mRFP asociada a membrana (Atoh7; rojo) en este embrión que es transgénico para Atoh7:Gap43-mRFP, y los núcleos con verde de metilo (VM; cian). Barras de escala: B: 150 μm ; C: 15 μm .

A



B



C

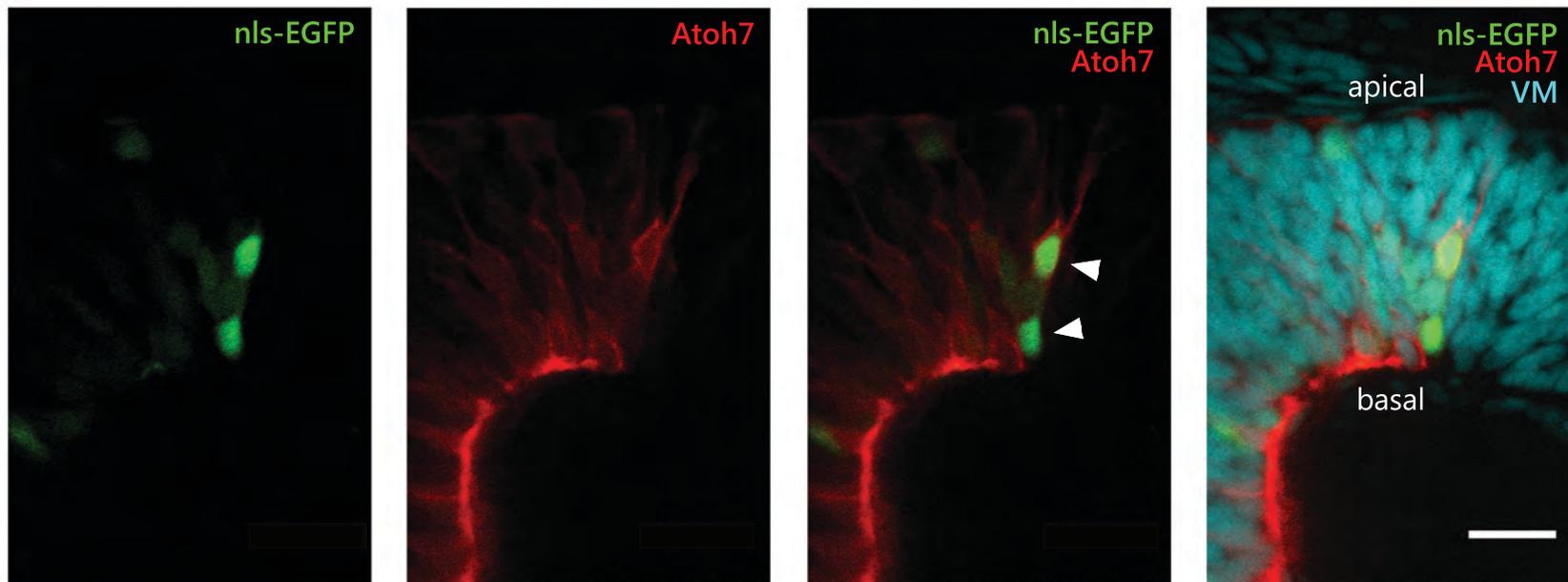
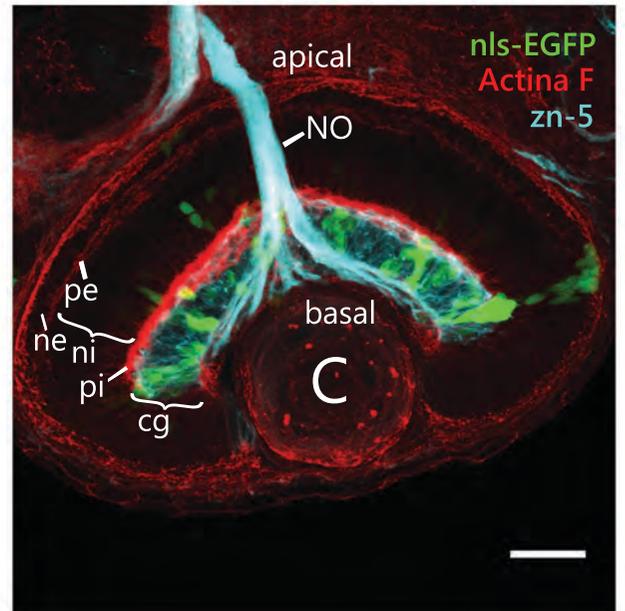
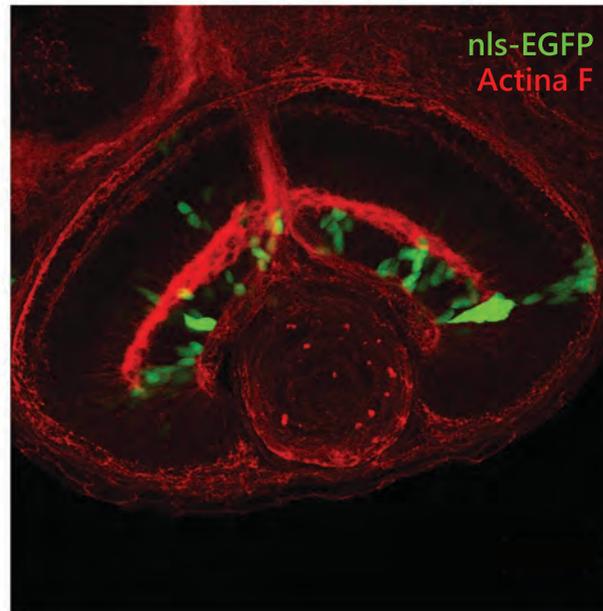
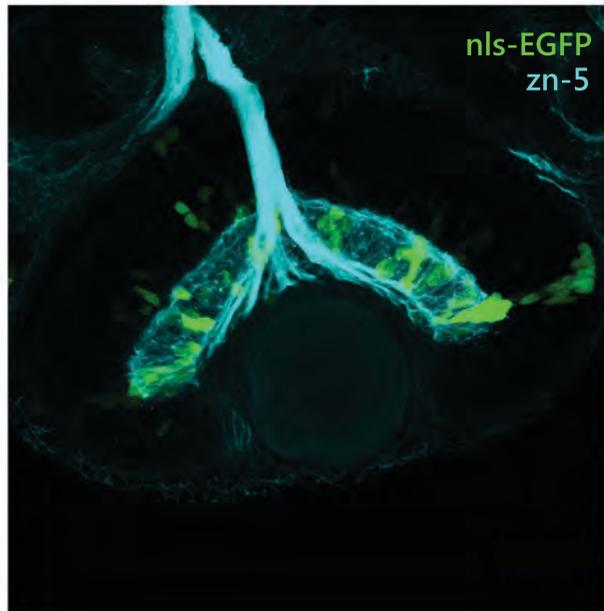
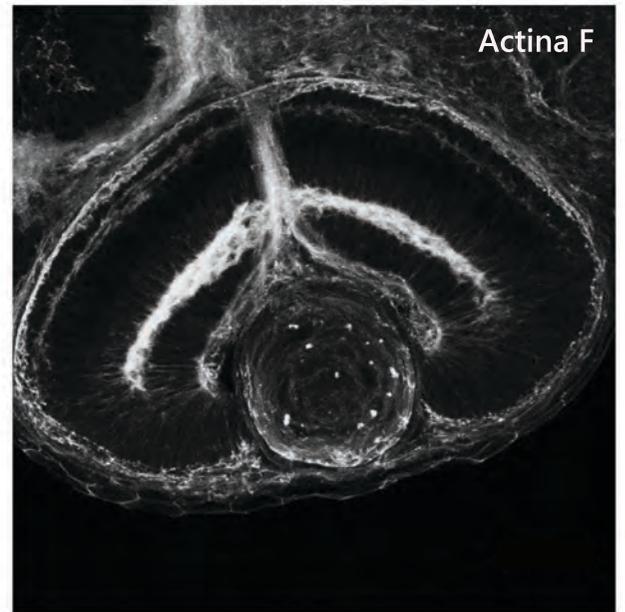
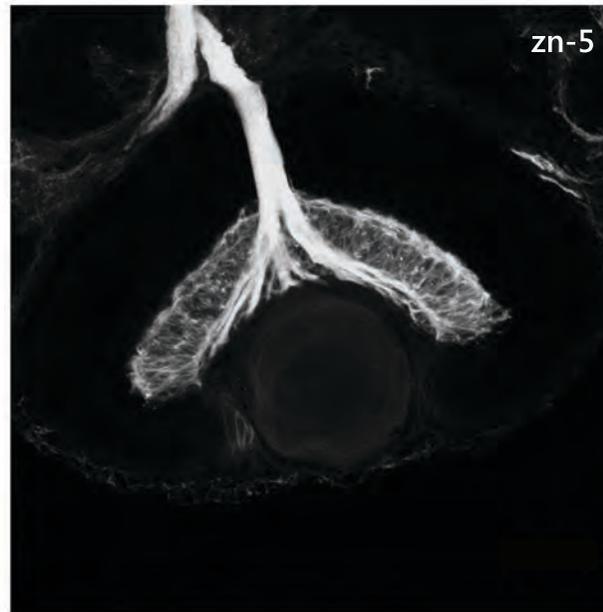
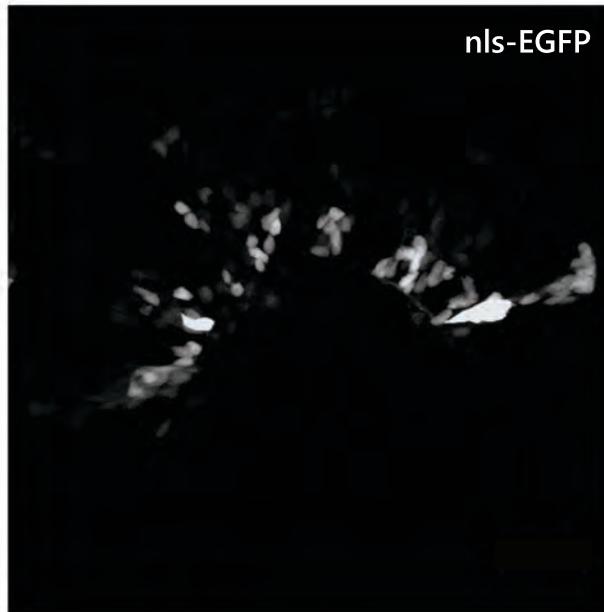


Figura 17. Inmunofluorescencia contra neurolina *in toto* sobre embriones inyectados con ADN plasmídico conteniendo la construcción Atoh7:nls-EGFP. Imágenes de microscopía de barrido láser confocal construidas a partir de una proyección de máxima intensidad de 20 secciones ópticas tomadas cada 1 μm . Se muestra el ojo de un embrión de pez cebra inyectado con la construcción Atoh7:nls-EGFP en forma de ADN plasmídico, fijado a las 48 hpf y sometido a inmunofluorescencia *in toto*. La señal de la actina filamentosa (faloidina-TRITC; rojo) marca claramente la localización de la capa plexiforme interna (ρi). El anticuerpo zn-5 (cian) reconoce la neurolina, un marcador de células ganglionares de la retina en diferenciación, de forma que su señal se encuentra en la capa de células ganglionares (cg). La mayor parte de las células Atoh7:nls-EGFP positivas (verde) se localizan en esta capa, aunque aparecen unas pocas células marcadas por fuera de la misma, las cuales presentan una señal menos intensa. Estas células se encuentran tanto en la capa nuclear externa (ne) como interna (ni), separadas por la capa plexiforme externa (pe). Se observa un marcado en mosaico típico tras la inyección de una construcción como ADN plasmídico. NO: Nervio óptico; C: Cristalino. Barras de escala: 30 μm .



con la de RFP en embriones transgénicos Atoh7:Gap43-mRFP (Figura 18). Observamos que aquellas células que presentan señal de EGFP también muestran señal de RFP, pero no todas las células marcadas con RFP presentan señal de nls-EGFP. En aquellas células en las que la señal nuclear de nls-EGFP es más intensa es posible observar una señal citoplásmica más débil, de lo que se deduce que el marcado no es únicamente nuclear.

Una vez establecido que la construcción Atoh7:nls-EGFP funciona como un marcador nuclear de las células Atoh7 positivas, realizamos una inyección sobre embriones transgénicos Atoh7:Gap43-mRFP en etapa de una célula. Estos embriones fueron fijados a las 42 hpf, sometidos a una inmunodetección de GFP *in toto* con peroxidasa y procesados utilizando la técnica de rutina para MET. En los cortes de retina observamos la presencia de algunas células con núcleos electrón-densos (Figura 19A). Estas células muestran a su vez un citoplasma más electrón-denso que aquellas que no presentan un núcleo electrón-denso. La señal citoplásmica, sin embargo, es de menor intensidad que la señal nuclear. En algunas de estas células es posible observar la presencia de cilias que se extienden desde la superficie apical (Figura 19Ab,c). Debido a la fijación débil del material, no se observa un axonema claro, pero es posible distinguir un centriolo asociado a una prolongación de la membrana plasmática. En estos preparados observamos a su vez una cantidad de núcleos picnóticos superior a la habitual (Figura 19Aa). Al realizar cortes ultrafinos del piso del romboencéfalo de estos embriones no encontramos células con núcleos electrón-densos (Figura 19B).

Figura 18. Expresión de Atoh7:nls-EGFP en células del linaje de células ganglionares de la retina. Imágenes de microscopía de barrido láser confocal de retina neural de embriones de pez cebra transgénicos para Atoh7:Gap43-mRFP que fueron inyectados con ADN plasmídico conteniendo la construcción Atoh7:nls-EGFP y fijados a las 35 hpf. Las células nls-EGFP positivas (verde) muestran a su vez señal de mRFP (flechas), aunque muchas de las células marcadas con mRFP (rojo) no muestran señal de nls-EGFP (asterisco) debido al mosaicismo esperado en la expresión de nls-EGFP. En algunas células con una señal nuclear más intensa de nls-EGFP se observa un débil marcado citoplásmico (cabezas de flecha). **A.** Imagen construida a partir de una proyección de máxima intensidad de 5 secciones ópticas tomadas cada 1 μm . **B.** Imagen construida a partir de una proyección de máxima intensidad de 6 secciones ópticas tomadas cada 1 μm . Barras de escala: 20 μm .

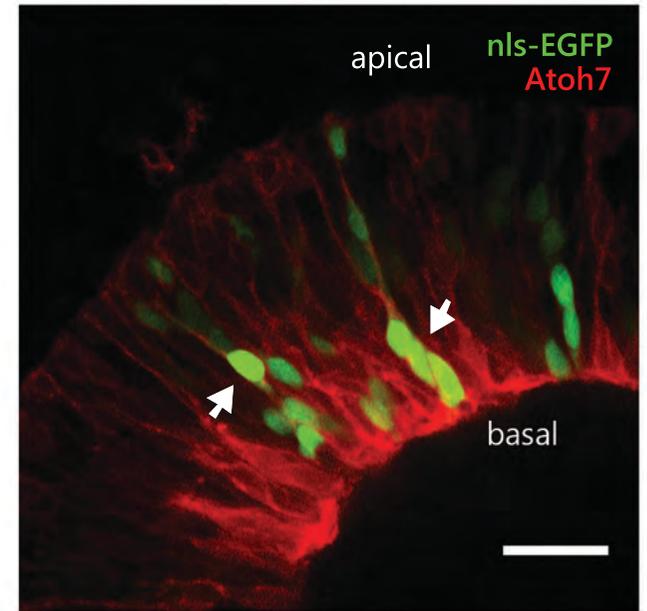
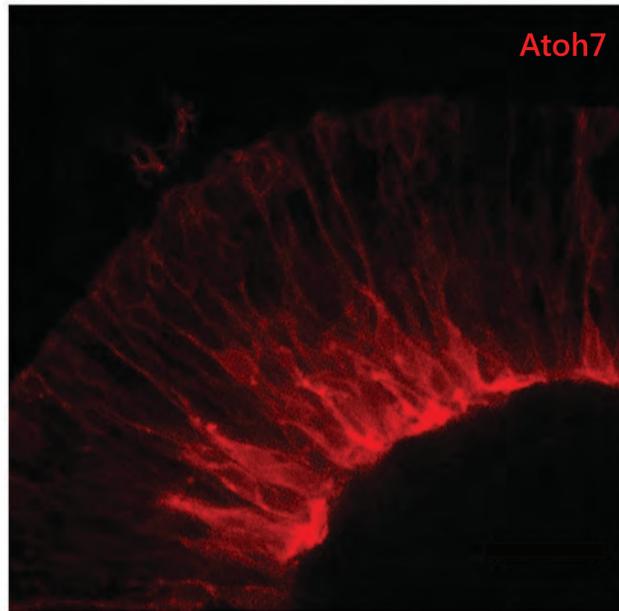
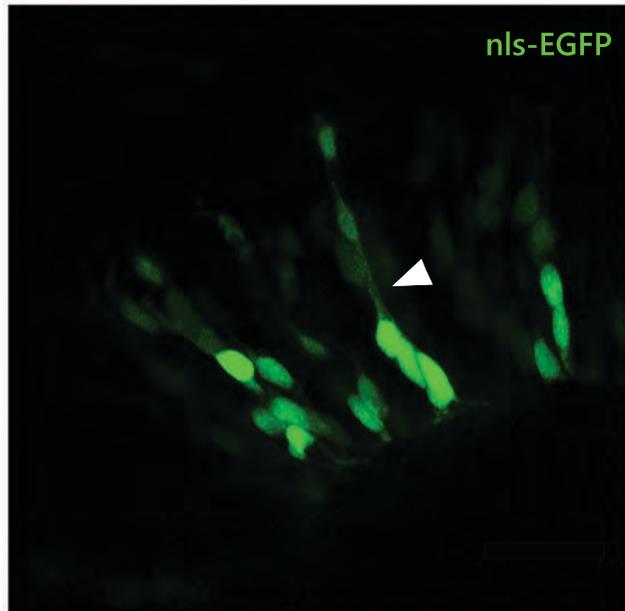
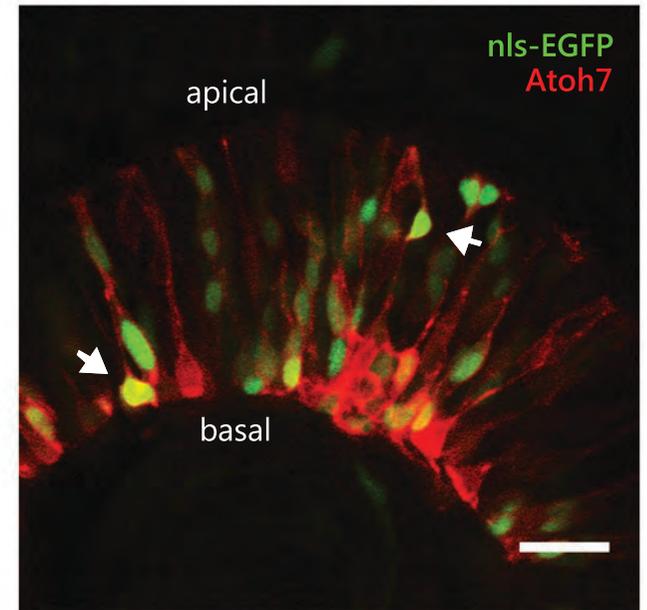
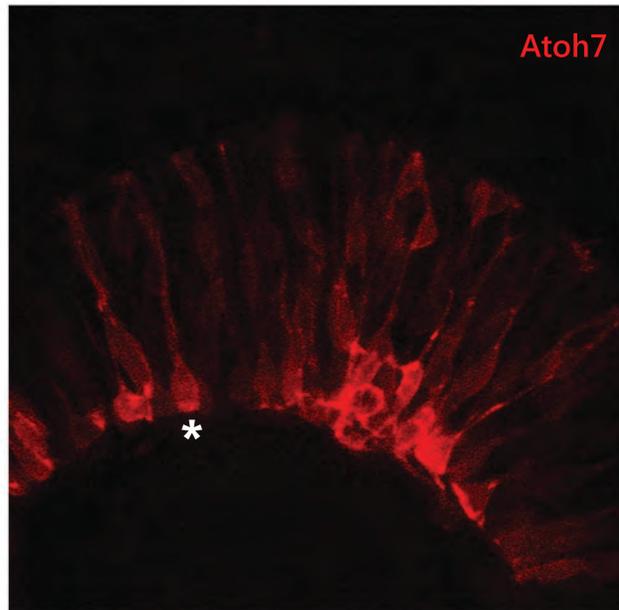
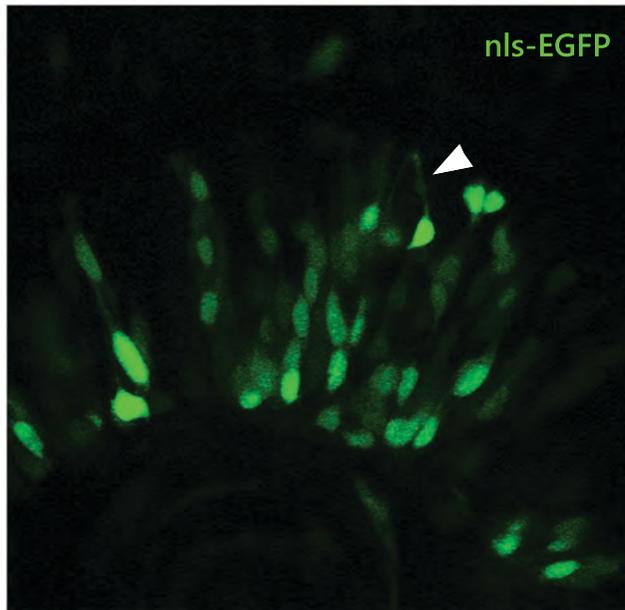
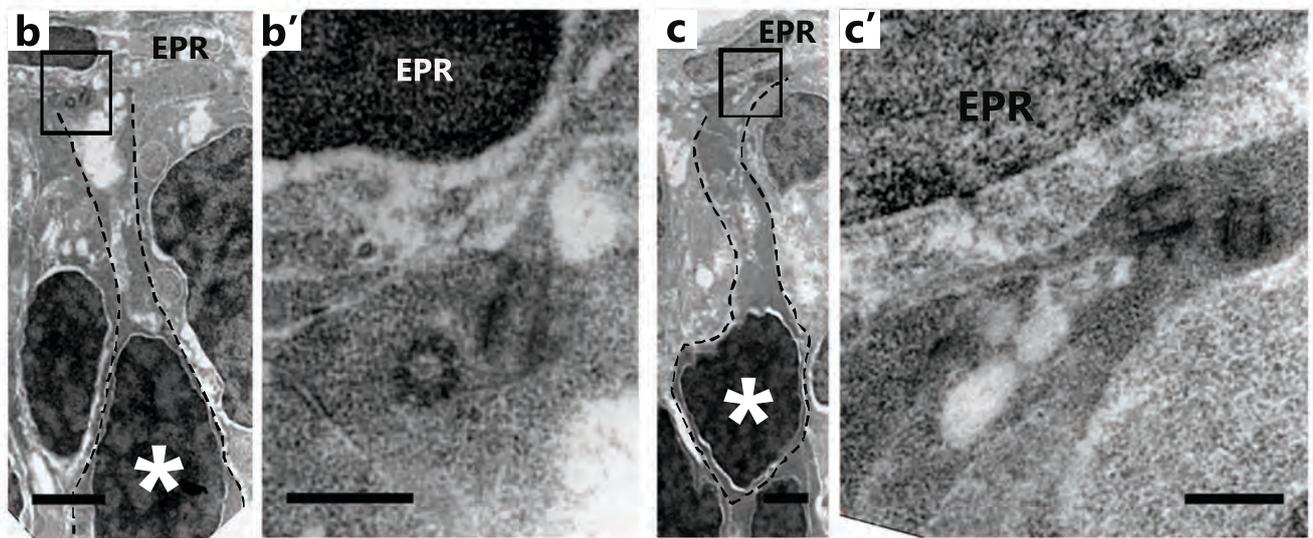
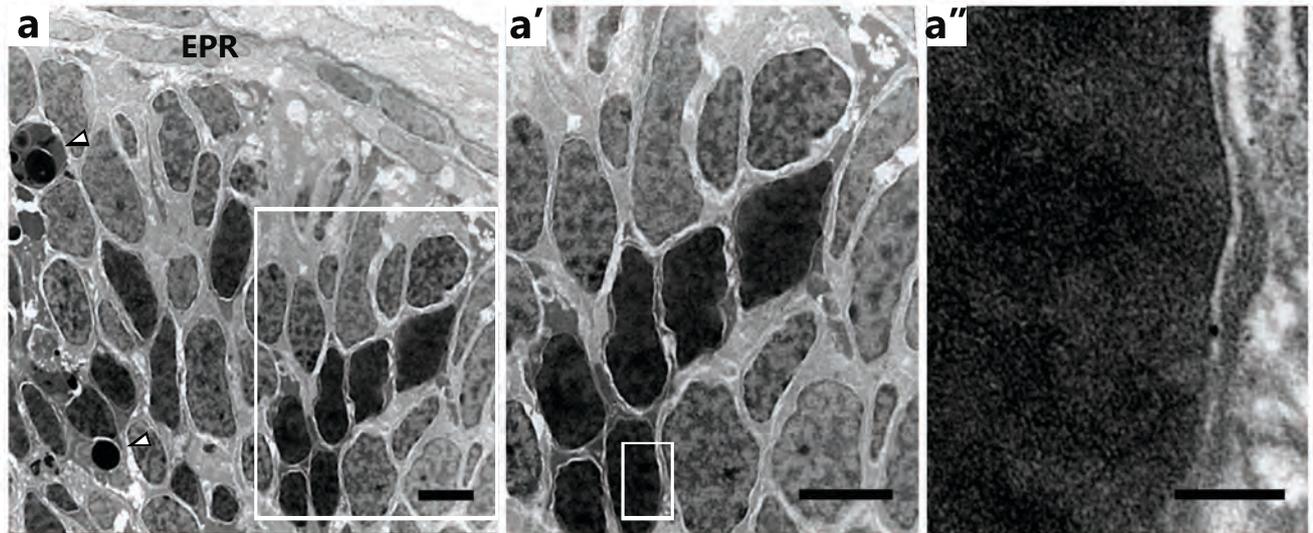
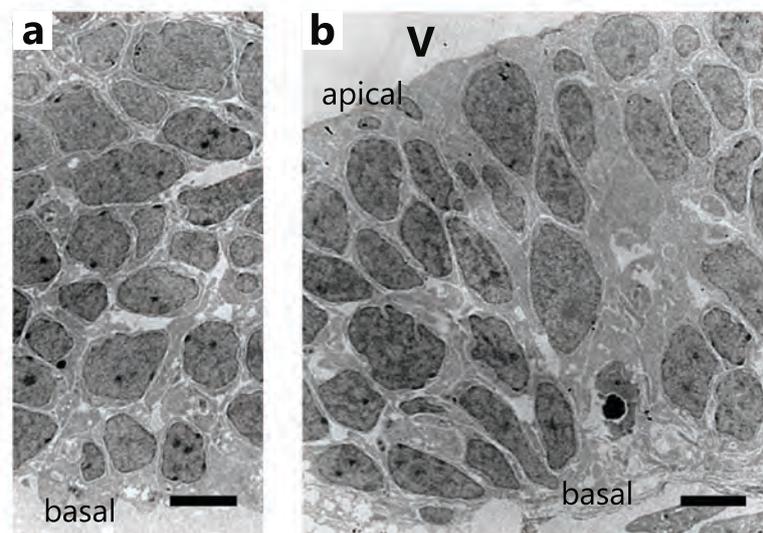
A**B**

Figura 19. Visualización de las células Atoh7:nls-EGFP-positivas mediante microscopía electrónica de transmisión. Imágenes de embriones de pez cebra transgénicos Atoh7:Gap43-mRFP inyectados con ADN plasmídico conteniendo la construcción Atoh7:nls-EGFP. Estos embriones fueron fijados a las 42 hpf, sometidos a una inmunodetección de GFP *in toto* con peroxidasa-DAB y procesados posteriormente utilizando la técnica de rutina para microscopía electrónica de transmisión. **A.** Imágenes obtenidas de cortes ultrafinos de la retina, donde se observan células que presentan núcleos significativamente más electrón-densos que otras. El citoplasma de estas células también se observa levemente más electrón-denso. **(a)** Imagen panorámica de una región de la retina, en la que se observa la cantidad relativa de células electrón-densas. **(a')** Ampliación del recuadro indicado en (a). **(a'')** Ampliación del recuadro indicado en (a'), donde se observa claramente una electrón-densidad intensa en el núcleo, y más débil en el citoplasma, de una posible célula inmunopositiva para GFP. **(b,c)** Imágenes panorámicas de células electrón-densas (límites marcados con línea punteada negra; núcleos marcados con asterisco blanco) en las que se observan cilias que se extienden desde la membrana apical (recuadros). **(b',c')** Ampliaciones de los recuadros indicados en b y c, respectivamente, en las que se observa la orientación de las cilias. Las membranas no son visibles debido a la fijación débil del material sometido a inmunodetección. Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical del neuroepitelio hacia arriba. **B.** Imágenes obtenidas de cortes ultrafinos del piso del romboencéfalo, donde no aparecen células con núcleos más electrón-densos que otras. Todas las imágenes están orientadas con la superficie apical hacia arriba. EPR: Epitelio pigmentario de la retina. Cabezas de flecha: Núcleos picnóticos. V: Cuarto ventrículo. Barras de escala: A(a,a'): 5 μm ; A(a''): 0,5 μm ; A(b,c): 2 μm ; A(b',c'): 0,5 μm ; B(a,b): 5 μm .

A



B



Discusión

Las neuronas que forman la retina neural, al igual que las demás neuronas del sistema nervioso central, derivan de células progenitoras que forman parte de un neuroepitelio, un tejido con una polaridad de tipo epitelial (Zolessi, 2009). Esta polaridad está determinada, en parte, por la presencia de una cilia primaria que protruye desde la superficie apical (Hinds y Hinds, 1974). En la retina del pez cebra, encontramos que en la mayor parte de las células neuroepiteliales esta cilia se extiende desde la membrana apical hacia el espacio subretiniano, y se encuentra asociada a un bolsillo ciliar. Esta estructura está formada por expansiones de la membrana plasmática que rodean a la cilia en su región proximal, y ha sido descrita en diversos tipos celulares, tales como fibroblastos y células musculares (Sorokin, 1962), neuronas (Han et al., 2008), y queratinocitos (Smith et al., 1969). Se ha planteado que el bolsillo ciliar podría actuar como un dominio endocítico o exocítico especializado de membrana (Molla-Herman et al., 2010), pero su función no se encuentra completamente clara. Observamos que la mayor parte de las ciliadas que se extienden desde la membrana apical de los progenitores de la retina presenta un bolsillo completo, en el que las expansiones de membrana que lo conforman se observan a ambos lados de la cilia en los cortes ultrafinos. Sin embargo, una menor proporción de las ciliadas presenta un bolsillo incompleto, de forma que solo una parte de la base de la cilia se encuentra rodeada por expansiones de la membrana plasmática. La presencia de un bolsillo ciliar completo podría permitir la formación de un microambiente especializado alrededor de la región proximal de la cilia, lo cual no sería posible con un bolsillo incompleto. No encontramos en la literatura descripciones previas de este tipo de bolsillo, por lo que desconocemos su posible función.

En aquellos casos en los que encontramos ciliadas con bolsillo completos realizamos sobre ellas una serie de medidas de distintos parámetros. De acuerdo con estas medidas, la profundidad del bolsillo ciliar se encuentra alrededor de un tercio de la longitud de la cilia. Esta profundidad varía levemente entre distintas regiones de la cilia, tal como revela la diferencia entre las medidas tomadas de un lado y otro en los cortes ultrafinos. Además de

variar en profundidad, las expansiones de membrana que conforman el bolsillo muestran variaciones de espesor a medida que el bolsillo rodea la cilia. Estos datos señalan que, en estas células, el bolsillo no es una estructura simétrica.

Las cilias que encontramos en las células neuroepiteliales de la retina del pez cebra miden, en promedio, menos de 1,5 μm , lo cual las hace cortas en comparación con las cilias primarias presentes en otros tejidos. Las cilias presentes en las neuronas diferenciadas del cerebro de ratón, por ejemplo, varían en largo entre las distintas regiones del mismo, midiendo entre 2,1 μm y 9,4 μm (Fuchs y Schwark, 2004), mientras que las cilias del epitelio de los ductos pronéfricos en el pez cebra miden en promedio 5,2 μm (Rbaibi et al., 2012). Las cilias presentes durante la diferenciación de las interneuronas corticales varían de longitud en distintas etapas de este proceso, pero en promedio se encuentran entre las 4 y las 5 μm (Higginbotham et al., 2012). Sin embargo, la longitud de las cilias que se extienden desde la superficie apical de otro neuroepitelio, el de la placa tectal de embrión de ratón, miden entre 0,7 y 2,5 μm (Cohen y Meininger, 1987), un rango similar al que observamos en el neuroepitelio retiniano del pez cebra.

Uno de los parámetros que encontramos que varía en mayor grado es el ángulo en que se orienta la cilia con respecto al epitelio pigmentario de la retina (EPR). Existe un direccionamiento del extremo distal hacia la retina ventro-nasal o ventro-temporal que parece ser independiente de la región en la que se encuentre la cilia. Esto podría indicar que no es necesario que la cilia primaria se oriente en una dirección particular para percibir las señales extracelulares que podría encargarse de transmitir.

Si bien la mayor parte de las medidas tomadas a partir de las cilias apicales presenta una variación considerable, existe un parámetro que no presenta desviaciones significativas: el diámetro ciliar. Esto no es de sorprender si se tiene en cuenta que esta medida refleja el arreglo regular de los microtúbulos que componen el axonema, los cuales se disponen siempre en forma de nueve dobletes periféricos (Fisch y Dupuis-Williams, 2011).

Muchas de las cilias apicales que observamos presentan una región de membrana plasmática electrón-densa cerca de la base, lo cual probablemente refleje una zona de concentración de proteínas. Se ha descrito la existencia de una barrera de difusión en la base de la cilia formada por septinas, la cual permite mantener las diferencias en composición de la membrana plasmática y la membrana ciliar. Esta barrera, sin embargo, se encuentra en la membrana ciliar (Hu et al., 2010), por lo que estas regiones más electrón-densas de la membrana plasmática no corresponderían a esta barrera de difusión. Parecen, por el contrario, encontrarse en las regiones de la membrana a las que se asocian las fibras de transición que se extienden desde el centriolo madre, las cuales se ha descrito que son necesarias para la ciliogénesis (Hoyer-Fender, 2010). Regiones de membrana electrón-densas similares se han encontrado en otros tipos celulares, tales como células 3T3 en cultivo (Rohatgi y Snell, 2010), células pancreáticas (Aughsteen, 2001), y células neuroepiteliales de la placa tectal de ratón (Cohen y Meininger, 1987), aunque en dichos trabajos no se hace mención a las mismas. Por tanto, desconocemos la identidad de la proteína o proteínas que podrían acumularse en estos sitios de asociación.

Una pequeña proporción de las células neuroepiteliales que observamos en la retina presenta una cilia que no se encuentra asociada a un bolsillo ciliar. Unas pocas cilias que carecen de bolsillo se encuentran asociadas a invaginaciones de las células del EPR. Se ha descrito que este tejido es importante para el desarrollo de la retina neural, ya que su disrupción, en etapas tempranas, lleva a una desorganización de la misma (Pearson et al., 2005). Teniendo en cuenta el rol sensorial que se le ha asignado a la cilia primaria en otros tejidos (Berbari et al., 2009), podría ser que su estrecha asociación con las células del EPR facilite la recepción de señales provenientes de las mismas. Una de las señales secretadas por el EPR es el ATP, el cual actúa, por medio de receptores P2Y, para promover la proliferación de las células neuroepiteliales durante las etapas tempranas del desarrollo (Pearson et al., 2005). Existen evidencias de que estos receptores se localizan en la cilia primaria en algunos tipos celulares (Masyuk et al., 2008), aunque esto no ha sido descrito para las células del neuroepitelio retiniano.

Otra vía de señalización que ha sido fuertemente vinculada con la cilia primaria es la de Sonic Hedgehog (Shh) (Berbari et al., 2009). Se sabe que las células del EPR secretan Shh, pero su expresión comienza entre las 39 y las 45 hpf, y es recién a las 81 hpf que es posible observar la expresión de Shh en todo el EPR (Stenkamp et al., 2000). Por tanto, a las 35 hpf, la edad a la cual realizamos la observación, la secreción de Shh desde el EPR aún no ha comenzado, por lo que no se esperaría que la ubicación particular de estas cilia responda a este fenómeno. La expresión de Shh por parte del EPR ocurre concomitantemente con o justo antes de la diferenciación de los fotorreceptores, de lo que se desprende una relación causal entre ambos procesos (Stenkamp et al., 2000). La diferenciación de las CGRs, sin embargo, ocurre más tempranamente. Las primeras células post-mitóticas aparecen a las 28 hpf, y para las 81 hpf, las CGRs ya se encuentran restringidas a la capa de células ganglionares (Hu y Easter, 1999). Por tanto, es poco probable que la secreción de Shh por parte de las células del EPR se relacione con la diferenciación de las CGRs, ya que comienza luego de que éstas han diferenciado. De hecho, la reducción de la expresión de Shh en el EPR resulta en una disminución no significativa en el número de CGRs y otros tipos neuronales de la retina, aunque sí tiene efectos importantes sobre la diferenciación de los fotorreceptores (Stenkamp et al., 2000).

Como se mencionó anteriormente, la mayor parte de las células neuroepiteliales de la retina que observamos presentan cilia que se extienden desde la membrana apical, las cuales suelen asociarse a un bolsillo ciliar. Estas cilia se encuentran en contacto con el espacio subretiniano, y tienen su extremo orientado hacia el EPR. Sin embargo, en algunas de las células encontramos cilia que muestran una orientación diferente: si bien se localizan próximas a la superficie apical del neuroepitelio, estas cilia tienen su extremo dirigido hacia la superficie basal. Algunas de ellas protruyen desde la membrana basolateral hacia el medio extracelular, extendiéndose desde una región que se encuentra por debajo de los complejos de unión apicales. Cilia con una localización y orientación similares fueron descritas en el neuroepitelio que dará origen a la corteza cerebral de ratón. Utilizando marcadores moleculares específicos, se determinó que estas cilia corresponden a los progenitores basales que han sufrido la división mitótica previa a la

delaminación, un proceso que involucra el desprendimiento de los complejos de unión apicales (Wilsch-Bräuninger et al., 2012). Si bien en la retina no existen progenitores basales, los neuroblastos que darán lugar a las CGRs pasan por un desprendimiento similar luego de su última división mitótica, previo al comienzo de la retracción del proceso apical (Zolessi et al., 2006). Podría plantearse entonces la existencia de un mecanismo conservado por el cual, luego de la división mitótica previa al desensamblaje de las uniones apicales, la cilia que se forma se extiende desde la membrana basolateral de la célula. En la corteza cerebral, se ha planteado que este reposicionamiento de la cilia podría aislarla de señales que se encuentren en el fluido ventricular, y exponerla a señales provenientes de la membrana basolateral de las células neuroepiteliales vecinas. Estas señales podrían estar involucradas en el desencadenamiento de los mecanismos necesarios para que ocurra la delaminación (Wilsch-Bräuninger et al., 2012). De forma similar, el reposicionamiento de la cilia en las células post-mitóticas de la retina podría alterar las señales recibidas por las mismas, lo cual podría a su vez asociarse al desencadenamiento del desprendimiento del proceso apical.

Con el objetivo de explorar la posible existencia de un mecanismo por el cual las células de la retina que han pasado por su última división mitótica, comprometidas a la delaminación, forman una cilia orientada hacia la superficie basal del neuroepitelio, comenzamos el análisis de la retina de embriones de 26 hpf. Debido a que las primeras células en volverse post-mitóticas en la retina lo hacen a las 28 hpf (Hu y Easter, 1999), se espera que a esta edad aún no haya células post-mitóticas. En estos embriones encontramos unas pocas células cuyas cilias se encuentran orientadas con su extremo hacia la superficie basal. Esto indicaría que el reposicionamiento basolateral de la cilia no está necesariamente relacionado a la post-mitosis o a la delaminación en la retina del pez cebra, tal como ocurre en el neuroepitelio de la corteza cerebral de ratón (Wilsch-Bräuninger et al., 2012). Se debe notar, sin embargo, que no podemos determinar con claridad si las cilias orientadas hacia la superficie basal del neuroepitelio retiniano que encontramos a las 26 hpf se extienden desde la membrana basolateral, sino que es posible que se encuentren dentro de vesículas membranosas. De hecho, algunas de las cilias que

en los embriones de 35 hpf aparecen orientadas hacia la superficie basal también parecen encontrarse dentro de vesículas. Estas cilia podrían haber sido internalizadas por la célula, lo cual, al aislar a la cilia del contacto con el espacio subretiniano, podría prevenir la recepción de determinadas señales extracelulares que la cilia podría encargarse de transducir. Estudios anteriores han descrito la presencia de cilia intracelulares en diversos tipos de células, tanto en cultivo (Geerts et al., 2011; Alieva y Vorobjev, 2004) como *in situ* (Warfvinge y Elofsson, 1988; Nikai et al., 1970). Muchas de estas cilia, sin embargo, son cortas en comparación con las que protruyen desde la membrana celular (Alieva y Vorobjev, 2004; Warfvinge y Elofsson, 1988), por lo que se ha planteado la posibilidad de que correspondan a etapas intermedias de la ciliogénesis.

Esto supone un mecanismo de formación de la cilia similar al propuesto a partir del análisis de células no epiteliales, tales como fibroblastos y células musculares (Sorokin, 1962). Según este modelo, el crecimiento de la cilia comienza con la fusión de una vesícula, denominada vesícula ciliar primaria, al extremo distal del centriolo madre. El origen de esta vesícula parece estar en el aparato de Golgi, el cual se encuentra consistentemente en la proximidad de la cilia primaria y del cuerpo basal (Gerdes et al., 2009). Una vez que la vesícula ciliar primaria se une al centriolo madre comienza el crecimiento del axonema dentro de dicha vesícula, y su posterior fusión con la membrana plasmática permite la exposición de la cilia al espacio extracelular (Sorokin, 1962).

La presencia de cilia cortas dentro de vesículas que observamos próximas a la superficie apical en el neuroepitelio retiniano podría indicar que el mecanismo de ciliogénesis que opera en este tejido sigue una serie de pasos similar. Sin embargo, las cilia orientadas con su extremo dirigido hacia la superficie basal descritas previamente, si bien parecen encontrarse internalizadas en vesículas, tienen una longitud comparable a la de aquellas que se encuentran en contacto con el espacio subretiniano, a diferencia de las cilia intracelulares que han sido descrito en otros tipos de células (Alieva y Vorobjev, 2004; Warfvinge y Elofsson, 1988). Es posible, por tanto, que en el neuroepitelio retiniano la extensión del axonema se encuentre avanzada al momento de la exposición de la cilia al

medio extracelular. De hecho, se ha descrito que el grado de crecimiento de la cilia dentro de la vesícula antes de que ocurra este evento es variable (Sorokin, 1962).

La falta de resolución temporal en los estudios por microscopía electrónica plantea una segunda posibilidad: que la cilia sea internalizada en vesículas membranosas en lugar de comenzar su crecimiento dentro de ellas. Esto podría relacionarse con observaciones realizadas en el neuroepitelio que dará origen a la corteza cerebral de ratón, donde se encontró que el centriolo madre permanece asociado a la membrana ciliar durante la mitosis de los progenitores apicales, formando una vesícula. En algunos casos, este centriolo nuclea un axonema que se extiende hacia la luz de la vesícula (Paridaen et al., 2013). En las células neuroepiteliales de la retina, sin embargo, las cilias que observamos dentro de vesículas no aparecen en células que presenten características que indiquen que se trata de células mitóticas, por lo que no encontramos evidencias que indiquen la existencia de un mecanismo análogo. A su vez, algunas de estas cilias cortas que encontramos dentro de vesículas presentan una expansión distal, la cual ha sido descrita previamente como una característica de las cilias en crecimiento (Cohen et al., 1988; Sorokin, 1962; Arellano et al., 2012; Sotelo y Trujillo-Cenoz, 1958).

Si bien muchas de las cilias cortas que encontramos aparecen dentro de vesículas, en algunas células neuroepiteliales observamos cilias cortas que se extienden desde la membrana plasmática, lo cual podría sugerir la existencia de un segundo mecanismo de ciliogénesis para estas células. Este mecanismo, planteado a partir de estudios realizados en células neuroepiteliales de embrión de pollo, plantea que la cilia crece a partir de una asociación directa del centriolo madre con la membrana celular luego de ocurrida la mitosis. Una vez que se da este contacto, la membrana comienza a abultarse, y este abultamiento se alarga a medida que los microtúbulos se organizan para formar el axonema (Sotelo y Trujillo-Cenoz, 1958). Las cilias cortas que encontramos en el neuroepitelio retiniano podrían corresponder a los primeros momentos del crecimiento luego de finalizada la división. La imposibilidad de hacer análisis de dinámica celular

mediante microscopía electrónica, sin embargo, deja lugar nuevamente a la posibilidad de que se trate de un proceso de resorción previo a la entrada en mitosis.

Algunas de estas ciliias cortas se extienden desde la membrana apical hacia el espacio subretiniano, y podrían corresponder a distintas etapas del crecimiento o resorción de las ciliias más largas que se observan en la misma posición en otras células neuroepiteliales. Debe tenerse en cuenta que estas ciliias muestran una estrecha asociación con el aparato de Golgi, lo cual podría apuntar hacia un proceso de ciliogénesis en lugar de uno de resorción. Esto se debe a que la ciliogénesis requiere del transporte de vesículas derivadas de aparato de Golgi hacia el cuerpo basal y la cilia por medio de la asociación a moléculas que componen la maquinaria de transporte intraflagelar (Ishikawa y Marshall, 2011).

En algunas células neuroepiteliales observamos que las ciliias cortas no protruyen desde la membrana apical, sino desde la membrana basolateral, ubicándose por debajo de los complejos de unión apicales. Estas ciliias podrían corresponder a distintas etapas de la resorción o el crecimiento de las ciliias más largas que observamos extendiéndose desde la membrana basolateral en otras células. En caso de tratarse de un proceso de resorción, esto da lugar a dos posibilidades. La primera es que dicha resorción responda a la entrada de la célula en una nueva fase M del ciclo celular. Esto indicaría que las ciliias basolaterales no se encuentren exclusivamente en células comprometidas al desprendimiento del proceso apical, como sí sucede en las progenitoras basales de la corteza cerebral de ratón (Wilsch-Bräuninger et al., 2012). La segunda posibilidad es que las células que presentan estas ciliias cortas sí estén comprometidas al desprendimiento de la superficie, pero por algún motivo deban perder la cilia previo a la retracción del proceso apical. Este mecanismo se ha observado en células de la médula espinal en embrión de pollo, las cuales experimentan una abscisión apical previo al desprendimiento de la superficie. Esta abscisión involucra la pérdida de la cilia primaria, así como de otros componentes de polaridad, tal como aPKC, los cuales no se encuentran en los procesos en retracción (Das y Storey, 2014). Sin embargo, no se ha encontrado la presencia de un mecanismo similar que opere durante la diferenciación de las CGRs. De hecho, hay evidencias de que, en estas

células, algunos componentes de la polaridad, como aPKC y Par-3, sí se localizan en el proceso en retracción (Zolessi et al., 2006), por lo que no se perderían durante el desprendimiento.

Las observaciones anteriores plantean la posibilidad de que en las células neuroepiteliales de la retina existan dos mecanismos alternativos de ciliogénesis: uno que se inicia con la asociación del centriolo madre con una vesícula (Sorokin, 1962) y otro que comienza con un contacto directo del mismo con la membrana celular (Sotelo y Trujillo-Cenoz, 1958). La existencia simultánea de ambos mecanismos ha sido descrita en los progenitores basales de la corteza cerebral de ratón (Wilsch-Bräuninger et al., 2012). En este caso, la ciliogénesis que da origen a las cilias apicales parece iniciarse predominantemente en vesículas intracelulares, mientras que aquella que da lugar a las cilias basolaterales comienza preferentemente de forma directa sobre la superficie celular. Desconocemos la existencia de un mecanismo similar que opere en las células del neuroepitelio retiniano, aunque algunos de nuestros resultados parecen contradecir esta hipótesis. En primer lugar, algunas de las vesículas que contienen cilias cortas se encuentran muy cerca de la membrana basolateral. En segundo lugar, algunas de las cilias cortas que se extienden desde la membrana apical presentan un axonema muy corto, lo cual, en caso de tratarse de un proceso de ciliogénesis, señalaría que ésta ha comenzado de forma reciente.

Las células neuroepiteliales de la retina proliferan hasta el comienzo de la neurogénesis. Las primeras células en iniciar este proceso y volverse post-mitóticas son las CGRs (Kay et al., 2001). Los precursores pasan por su última división cerca de la superficie apical, y posteriormente el núcleo de los neuroblastos se transloca hacia la región basal. Luego, el proceso apical se desprende de la superficie y comienza a retraer, acercándose al núcleo. La extensión del axón comienza simultáneamente desde la región basal de la célula (Zolessi et al., 2006). Trabajos anteriores realizados en pez cebrá muestran que el centrosoma permanece asociado al extremo del proceso apical durante la retracción (Zolessi et al., 2006), y que existe una cilia primaria asociada (Lepanto et al., sin publicar). Nuestro análisis por medio de microscopía electrónica muestra que estas cilias tienen una

longitud comparable a la de aquellas que se extienden desde la membrana apical de las células neuroepiteliales, y se encuentran orientadas con su extremo dirigido hacia el EPR. Estos resultados concuerdan con los obtenidos a partir de un estudio similar realizado en retina de ratón (Hinds y Hinds, 1974). Algunas de las cilias que observamos en el extremo del proceso apical en retracción de las CGRs parecen presentar un bolsillo ciliar, mientras que otras carecen de esta estructura. La mayor parte de las cilias asociadas a un bolsillo son aquellas presentes en las CGRs con una retracción avanzada, mientras que las que se encuentran en CGRs en etapas tempranas de este proceso suelen carecer de dicha estructura. Podría suceder, por tanto, que el bolsillo no esté presente al comienzo de la retracción, pero que aparezca cuando ésta se encuentra más avanzada, aunque es difícil asegurarlo con los pocos casos observados.

En uno de los procesos apicales en retracción encontramos una particularidad: este proceso presenta estructuras electrón-densas en la membrana que se asemejan mucho a complejos de unión adherentes. El desprendimiento del proceso apical de los neuroblastos de la superficie implica el desensamblaje de los complejos de unión que mantienen firmemente unidas a las células neuroepiteliales, lo cual permitiría la posterior retracción. Se ha encontrado que determinados componentes de estos complejos de unión, como son la α -catenina y la F-actina, permanecen en el extremo del proceso apical durante la retracción (Zolessi et al., 2006), aunque no se esperaría que formaran complejos de unión funcionales, ya que el desprendimiento depende de una reducción de la expresión de N-cadherina (Wong et al., 2012). Sin embargo, las estructuras electrón-densas que observamos en este proceso parecen encontrarse tanto en la membrana de la célula que se encuentra en retracción como en la célula vecina. De ser así, esto indicaría que ambas células se encuentran unidas, lo cual es incompatible con la retracción del proceso apical. Es posible que la unión se desensamble previo al comienzo de la retracción y se forme nuevamente de forma transitoria cuando ésta se encuentre más avanzada.

A medida que avanza la diferenciación, la retracción del proceso apical finaliza, y, en esta etapa, los núcleos de los neuroblastos se encuentran próximos a la lámina basal. En

algunos de estos neuroblastos encontramos una cilia primaria, la cual se observa en posiciones variables. En algunas ocasiones, la cilia aparece en posición apical, con su extremo dirigido de forma lateral o hacia el EPR. Otras cilias, sin embargo, se extienden desde regiones más basales de la célula, ya sea con su extremo dirigido hacia la lámina basal o hacia la superficie apical. Esto parece señalar que existe una deslocalización de la cilia de la región apical durante las etapas tardías de la diferenciación de las CGRs. Estudios de time-lapse por microscopía confocal revelan que, en efecto, una vez culminada la retracción apical de algunas CGRs, la cilia pierde momentáneamente la posición apical, y ocupa otras posiciones en el soma de la célula. Previo a la formación del árbol dendrítico, la cilia adopta nuevamente una localización apical (Lepanto et al., sin publicar). Las cilias que encontramos mediante observaciones por microscopía electrónica extendiéndose desde regiones más basales podrían corresponder, por tanto, a distintas etapas de este movimiento que ocurre cuando el proceso apical ha terminado la retracción. Las cilias que aparecen en posiciones más apicales, por otro lado, podrían corresponder a un momento previo a dicho movimiento, poco después de terminada la retracción del proceso apical, o a etapas posteriores a esta deslocalización, antes de la formación del árbol dendrítico. Es posible a su vez que este movimiento de la cilia no ocurra durante la diferenciación de todas las CGRs, tal como parece indicar el análisis por microscopía confocal (Lepanto et al., sin publicar).

Una de las dificultades que presenta el análisis de la diferenciación de las CGRs mediante microscopía electrónica es que las células neuroepiteliales que darán origen a las mismas no presentan características estructurales que permitan identificarlas de forma clara. Los neuroblastos, a su vez, tampoco resultan fácilmente diferenciables, si bien la localización del núcleo, cuando es posible observarlo, cerca de la lámina basal es un buen indicador de que ese neuroblasto dará lugar a una CGR. Debido a que estas células comienzan la diferenciación a las 28 hpf (Hu y Easter, 1999), es altamente probable que los neuroblastos que se observan a las 35 hpf sean futuras CGRs. Sin embargo, no es posible afirmarlo en ausencia de marcadores moleculares específicos. Por esta razón, nos propusimos llevar a cabo un marcado de las CGRs que resulte visible a bajos aumentos, y que a su vez permita

la identificación de los precursores cuando éstos aún no han sufrido el desprendimiento del proceso apical. Para ello, utilizamos la expresión de EGFP bajo la regulación de la región promotora del gen codificante para el factor de transcripción Atoh7 como marcador molecular. Se ha descrito la expresión de Atoh7 como un marcador post-fase S de los progenitores de la retina, que aparece previo a la última división mitótica (Poggi et al., 2005). A partir de esto, intentamos llevar a cabo un marcado de las células Atoh7 positivas mediante una inmunodetección con peroxidasa, utilizando embriones de la línea transgénica Atoh7:Gap43-EGFP (Zolessi et al., 2006). La observación por microscopía electrónica de los embriones sometidos a inmunodetección *in toto* reveló la presencia de células con un citoplasma levemente más electrón-denso que otras. Sin embargo, es difícil asegurar que esto corresponda a la señal obtenida mediante la inmunodetección. La señal que encontramos se localiza en el citoplasma, y no en la membrana plasmática, como sería de esperar teniendo en cuenta las características de la proteína de fusión Gap43-EGFP. Esto podría deberse a la fijación débil a la que es sometida la muestra durante el procesamiento de inmunodetección, la cual, al generar una preservación pobre de las membranas, podría hacer que la señal parezca citoplásmica. Aún si consideramos que se trata de un marcado específico de las células Atoh7 positivas, la señal obtenida es débil, y no parece encontrarse homogéneamente distribuida en el citoplasma. Esto hace que las células positivas no sean claramente identificables, uno de los objetivos inicialmente planteados para la realización de esta técnica.

Frente a estas dificultades, decidimos generar una construcción Atoh7:nls-EGFP que nos permitiera realizar un marcado nuclear de las células Atoh7 positivas mediante la misma técnica. Una vez generada la construcción, realizamos ensayos con el fin de evaluar si su microinyección en forma de ADN plasmídico permite un marcado eficiente de las CGRs, comparando la señal obtenida en los embriones inyectados con la de otros marcadores específicos de este linaje celular. La inmunofluorescencia con el anticuerpo zn-5 realizada sobre embriones inyectados reveló que, a las 48 hpf, la mayor parte de las células marcadas con nls-EGFP se encuentra en la capa de células ganglionares, si bien hay unas pocas células que se localizan fuera de la misma. Esto es de esperar si se tiene en cuenta

que las CGRs no son el destino exclusivo de los progenitores Atoh7 positivos, sino que éstos también dan origen a fotorreceptores, células amacrinas y células horizontales (Poggi et al., 2005). Efectivamente, en nuestro análisis aparecen marcadas células que se localizan tanto en la capa nuclear externa (futuros fotorreceptores) como interna (futuras células amacrinas u horizontales). La señal más débil que observamos en estas células en comparación con las CGRs podría explicarse por una expresión más baja del transgen, tal como ha sido observado en otros estudios (Almeida et al., 2014).

La comparación de la expresión de nls-EGFP que obtuvimos mediante la microinyección de ADN plasmídico conteniendo la construcción Atoh7:nls-EGFP con la expresión de mRFP bajo el control del mismo promotor en un embrión de una línea transgénica estable revela un cierto grado de mosaicismo. Se sabe que el ADN difunde poco en el citoplasma, por lo que, a pesar de ser inyectado directamente en la célula en lugar del vitelo, podría existir una distribución heterogénea del plásmido entre las blastómeras que explicaría el mosaicismo observado (Westerfield et al., 1992). La variación en la intensidad de la señal de nls-EGFP que observamos entre las distintas células marcadas, refleja variaciones en el nivel de expresión de la proteína, dadas probablemente por la distribución desigual del plásmido. La co-localización de la señal de nls-EGFP con la del verde de metilo (marcador de ADN) indica que esta señal es nuclear. La aparición de algo de señal citoplasmática en aquellas células que presentan una señal nuclear de nls-EGFP más intensa es consistente con un ensayo de sobre-expresión.

Estos ensayos nos permitieron determinar que la microinyección de la construcción Atoh7:nls-EGFP en forma de ADN plasmídico permite un marcado eficiente de las CGRs y sus precursores, y que este marcado es mayoritariamente nuclear. El paso siguiente fue por tanto una inmunodetección con peroxidasa sobre embriones inyectados. El análisis mediante microscopía electrónica reveló la presencia de células cuyo núcleo es significativamente más electrón-denso que los de otras células. Estas células presentan a su vez un citoplasma más electrón-denso que sus vecinas, lo cual se encuentra en concordancia con los resultados que obtuvimos mediante microscopía confocal. El núcleo

de algunas células aparece levemente más electrón-denso que los otros, y estas células no presentan una señal notoria en el citoplasma. Esto podría corresponder a niveles intermedios de expresión de nls-EGFP, tal como encontramos en los análisis mediante microscopía confocal. En los embriones que fueron inyectados encontramos un número de núcleos picnóticos superior al observado en embriones no inyectados, lo cual podría deberse a las altas concentraciones de ADN esperables en un ensayo de sobre-expresión. Los resultados obtenidos apuntan a que es posible que los núcleos que se observan más electrón-densos sean en efecto pertenecientes a células Atoh7 positivas. La ausencia de núcleos con estas características en otra región del sistema nervioso central en la que no se espera expresión de Atoh 7 (el piso del romboencéfalo) apoya esta afirmación, ya que la observación de los embriones inyectados en un microscopio estereoscópico de fluorescencia reveló la presencia de señal de nls-EGFP únicamente en los ojos.

En algunas de las células más electrón-densas encontramos cilias, las cuales resultan visibles a pesar de la preservación pobre del material. Si bien no observamos un axonema, se distingue claramente el cuerpo basal asociado a una extensión de la membrana celular. Todas las cilias que encontramos protruyen desde la membrana apical de células que se encuentran unidas a la superficie, y, si bien presentan una orientación variable, no encontramos ninguna que protruyera desde la membrana basolateral de la célula. No llegamos a observar en estos embriones células que se hayan desprendido de la superficie.

Unas horas después de que ha terminado la retracción del proceso apical, los neuroblastos de las CGRs comienzan la dendritogénesis a partir de la región apical (Zolessi et al., 2006; Choi et al., 2010). En nuestro análisis por microscopía electrónica de las CGRs de embriones de 48 hpf encontramos solo unas pocas cilias primarias. Estas cilias se extienden lateralmente desde la región apical, probablemente desde el tronco del árbol dendrítico, y presentan una longitud variable. Unas pocas son relativamente largas, y se orientan con su extremo dirigido hacia la lámina basal. Estas cilias, a diferencia de lo que observamos en las células neuroepiteliales en etapas más tempranas, no se encuentran asociadas a un bolsillo ciliar. En algunos trabajos se ha planteado que el bolsillo ciliar es

una estructura transitoria que se encuentra en etapas tempranas de la ciliogénesis, pero que desaparece más tarde (Sotelo y Trujillo-Cenoz, 1958; Molla-Herman et al., 2010). Esto es consistente con la presencia de un bolsillo en las células neuroepiteliales que se encuentran en proliferación y su ausencia en las CGRs post-mitóticas. Sin embargo, se ha observado que el número de cilias con bolsillo no varía de forma notoria al inducir la ciliogénesis, y se han encontrado cilias con bolsillo en células diferenciadas que ya no se dividen, lo cual parece contradecir este modelo (Molla-Herman et al., 2010).

La mayor parte de las cilias que observamos en las CGRs a las 48 hpf son cortas. Estas cilias se extienden desde la misma región de las células que las cilias más largas, lo cual indica que podrían corresponder a etapas de crecimiento o resorción de las mismas. Algunas de las características que presentan estas cilias han sido observadas durante la ciliogénesis en otros tipos celulares. Un ejemplo son las neuronas piramidales de hipocampo de ratón, cuyos precursores presentan una cilia primaria que desaparece previo al comienzo de la migración hacia la placa cortical, y crece luego de que la célula ha alcanzado su localización dentro de la misma (Arellano et al., 2012). En estas células, el crecimiento de la cilia comienza con una asociación directa del centriolo madre con la membrana plasmática, y a partir de esta región crece una "procilia", un rudimento de cilia que carece de un axonema organizado. Estas cilias presentan una forma redondeada, y su axonema solo es claramente visible en la región proximal, mientras que en la región distal se observa un material granular amorfo y, en algunos casos, vesículas membranosas (Arellano et al., 2012). Este tipo de cilia ha sido descrito en varios trabajos, tanto para tejidos neuroepiteliales (Cohen et al., 1988; Sotelo y Trujillo-Cenoz, 1958) como para células no epiteliales (Sorokin, 1962), siempre asociado a un proceso de ciliogénesis. Muchas de las características de estas cilias son similares a las que observamos en las cilias cortas que se extienden desde la región apical de las CGRs jóvenes. Estas cilias también presentan una expansión distal, con un axonema que solo se observa claramente en la región proximal. En algunos casos, observamos la presencia de un material granular en su interior, aunque no se distinguen vesículas. Todo esto podría indicar que estas cilias cortas presentes en la retina del pez cebra representan distintas etapas de la ciliogénesis.

En la mayor parte de las CGRs en las que encontramos un centriolo asociado a la membrana plasmática, sin embargo, no es posible observar un axonema organizado a partir de él. En la zona de la membrana con la que establece contacto el centriolo aparecen regiones electrón-densas, así como un leve abultamiento. Esto podría representar los primeros momentos de la ciliogénesis o las etapas finales de la resorción de la cilia. De corresponder a la formación de la cilia, esto indicaría que, en estas células, este proceso se inicia con la asociación del centriolo madre a la membrana plasmática, tal como fue descrito en las células del neuroepitelio de embrión de pollo (Sotelo y Trujillo-Cenoz, 1958). El que no hayamos encontrado cilias dentro de vesículas membranosas es consistente con este planteo. La baja proporción de cilias que se observa en la capa de células ganglionares en etapas avanzadas del desarrollo de la retina se encuentra en concordancia con resultados obtenidos mediante estudios por microscopía confocal (Lepanto et al., sin publicar).

El hecho de que hayamos encontrado CGRs jóvenes que carecen de una cilia primaria plantea dos hipótesis alternativas acerca de la transición de esta estructura durante la diferenciación de estas células. Una primera posibilidad es que la cilia desaparezca después de finalizada la retracción del proceso apical, para volver a aparecer luego, cuando la capa de células ganglionares ya se encuentra formada. Existen observaciones realizadas mediante estudios de time-lapse por microscopía confocal que apoyan esta hipótesis (Lepanto et al., sin publicar). De ser así, el proceso sería similar al observado en neuronas piramidales de hipocampo de ratón (Arellano et al., 2012). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el modo de diferenciación de ambos tipos neuronales presenta algunas diferencias fundamentales. Las CGRs no sufren una verdadera migración durante la diferenciación, sino un simple movimiento del núcleo hacia la región basal del neuroepitelio (Zolessi et al., 2006; Randlett et al., 2011b). Las neuronas corticales, por el contrario, deben migrar desde su lugar de origen en la zona ventricular o subventricular hasta la placa cortical, recorriendo largas distancia (Funahashi et al., 2014). Debido a la participación del centrosoma durante la migración neuronal, no sorprende que el axonema solo se extienda una vez que ésta ha terminado (Arellano et al., 2012). Las CGRs, al carecer

de una migración verdadera durante su diferenciación, no presentarían un impedimento mecánico similar que hiciera necesario el desensamblaje de la cilia durante este proceso. No obstante, la similitud entre las cilias cortas que encontramos en las CGRs jóvenes y las cilias en formación que han sido descritas en trabajos previos (Arellano et al., 2012; Cohen et al., 1988; Sotelo y Trujillo-Cenoz, 1958; Sorokin, 1962) parece apoyar un modelo según el cual hay una pérdida de la cilia en algún momento luego de finalizada la retracción apical, y un crecimiento posterior de esta estructura en etapas más avanzadas de la diferenciación.

Una segunda hipótesis que podría explicar por qué algunas de las CGRs jóvenes carecen de una cilia primaria es que, luego de que termina la retracción del proceso apical, la cilia desaparezca de forma permanente. En este caso, las cilias más cortas y los centriolos asociados a la membrana representarían diferentes estadios de la resorción ciliar. De ser así, las CGRs presentes en la retina completamente desarrollada deberían carecer de una cilia primaria. No obstante, estudios realizados en retina de ratón (Kim et al., 2013), humanos y conejillos de indias (Allen, 1965) describen la presencia de cilias en la capa de células ganglionares. A pesar de que no encontramos en la literatura estudios similares realizados en pez cebra, es posible que, dada la estructura conservada de la retina entre los vertebrados, las CGRs en este organismo también presente una cilia primaria. Existen a su vez otros tipos neuronales diferenciados en los que se ha descrito la presencia de este organelo, tal como las células granulares del giro dentado, y neuronas del cerebelo, el hipotálamo y la corteza cerebral. En estas neuronas, las cilias cumplen una función sensorial (Fuchs y Schwark, 2004; Arellano et al., 2012), la cual sería posible que mediaran también en las CGRs diferenciadas.

Los eventos de ciliogénesis y resorción ciliar que ocurren durante la diferenciación neural varían en los distintos tipos celulares. En el caso de las neuronas piramidales de hipocampo de ratón, el crecimiento post-natal de la cilia primaria parece indicar que la formación de esta estructura no es esencial para la polarización ni para la migración de estas células. De hecho, se ha observado que defectos en la ciliogénesis no afectan la

polaridad normal de estas neuronas ni la organización laminar de la corteza (Arellano et al., 2012). En otros tipos neuronales, sin embargo, el mantenimiento de la cilia parece ser necesario durante la diferenciación. En las interneuronas GABAérgicas corticales se ha observado que la disrupción de la cilia lleva a defectos en la migración, por lo que este organelo parece ser clave para guiar este proceso (Baudoin et al., 2012). Durante la diferenciación de estas neuronas, el centrosoma alterna de posición entre el proceso líder y la región perinuclear. Cuando se encuentra en el proceso líder, este organelo nuclea una cilia primaria, la cual es capaz de transducir la señal de Shh. Esta señalización induce cambios morfológicos y movimientos celulares, tal como la reorganización del citoesqueleto de microtúbulos y de los compartimentos membranosos, que permiten la reorientación de las neuronas durante la migración. Cuando se localiza en el compartimento perinuclear, el centriolo madre se asocia con una vesícula distal, y en algunos casos nuclea un axonema corto que protruye hacia la luz de la vesícula. De esta forma, la cilia es formada y removida de la superficie celular por fusión/fisión de la vesícula centriolar durante la migración (Baudoin et al., 2012).

Sin embargo, parece ser que el desensamblaje de la cilia primaria no siempre es una condición necesaria para la migración neuronal, tal como evidencian estudios realizados sobre algunas interneuronas corticales. Los precursores de estas neuronas presentan una cilia primaria que se mantiene durante la migración. A su vez, la función de *Arl13b*, una proteína de localización ciliar, parece ser necesaria para el posicionamiento correcto de estas neuronas, pero no para la diferenciación post-migratoria temprana. Esta función podría relacionarse con la recepción de distintas vías de señalización que guían la migración de estas células (Higginbotham et al., 2012).

Estos estudios señalan que la cilia primaria es necesaria durante el desarrollo de algunos tipos neuronales pero no de otros, y que su importancia radica en la recepción y transducción de distintas vías de señalización que dirigen la diferenciación neuronal. En el caso de las CGRs, nuestros resultados indican que la cilia primaria se encuentra presente durante las etapas tempranas de la diferenciación. Esto podría indicar que su

mantenimiento es importante para que este proceso ocurra en forma correcta. Es posible que en estas células la cilia cumpla una función sensorial, tal como ha sido descrito para otros tipos celulares. En etapas más avanzadas de la diferenciación, esta función podría dejar de ser necesaria, ya que, al menos en algunas CGRs, la cilia primaria desaparece.

Conclusiones

En el presente trabajo encontramos que los precursores neuroepiteliales de la retina neural presentan una cilia primaria. Esta estructura también se encuentra presente en los neuroblastos en distintas etapas de la retracción, donde aparece asociada al extremo del proceso apical. Luego de que dicha retracción finaliza, la cilia parece sufrir una deslocalización momentánea de la región apical. En etapas posteriores de la diferenciación, algunas células ganglionares presentan una cilia primaria, mientras que en otras esta estructura está ausente.

Nuestros resultados indican que la cilia primaria se encuentra presente durante las etapas tempranas de la diferenciación de las células ganglionares de la retina del pez cebra, pero, al menos en algunos casos, se pierde luego de finalizada la retracción del proceso apical. Esto podría indicar que este organelo cumple una función particular al comienzo de la diferenciación, la cual se vuelve dispensable en etapas más avanzadas. El estudio de estas células en la retina desarrollada podría aportar información acerca de la existencia o no de una cilia primaria en las mismas.

Perspectivas

Los ensayos que realizamos con el fin de evaluar la eficiencia y las mejores condiciones para llevar a cabo un marcado de las CGRs y sus precursores tomaron un largo tiempo. Por este motivo, solo pudimos realizar el análisis por microscopía electrónica de unos pocos embriones marcados. En estos embriones, no llegamos a observar neuroblastos en proceso de retracción o en etapas posteriores de la diferenciación que presentaran señal. Sería importante, por tanto, continuar con estos análisis, de forma de poder identificar claramente las cilias presentes en las CGRs y sus precursores.

En segundo lugar, dado que la cilia primaria permanece al menos en las etapas tempranas de la diferenciación de las CGRs, sería interesante determinar cuál es su posible función durante este proceso. En mucho tejidos se ha descrito una función sensorial de este organelo (Berbari et al., 2009). La señal que presenta una relación más establecida tanto con la cilia primaria como con el desarrollo de las CGRs es la de Shh. En la retina neural, se ha descrito una ola de expresión de Shh que corresponde temporal y espacialmente con la ola de neurogénesis que genera las CGRs (Neumann y Nueslein-Volhard, 2000), y que parecería, a su vez, inducir la expresión de Atoh7 (Neumann, 2001; Kay et al., 2005). El estudio de los mutantes de pez cebra para este locus revela que este factor de transcripción es necesario para la inducción del destino de los precursores neuroepiteliales hacia CGRs (Kay et al., 2001). En estos mutantes, los neuroblastos no pueden especificarse hacia este tipo celular y permanecen en el ciclo celular, dando lugar a tipos neuronales de nacimiento más tardío (Neumann, 2001; Kay et al., 2001). La cilia primaria de los precursores neuroepiteliales podría, por tanto, cumplir una función en la recepción y transducción de la señalización por Shh, permitiendo la inducción de la expresión de Atoh7, necesario para la diferenciación de las CGRs. Para evaluar esta posibilidad, sería necesario realizar estudios funcionales que implicaran el bloqueo de la cilia primaria o de la vía de Shh en el neuroepitelio retiniano.

Una segunda vía de señalización involucrada en varios eventos del desarrollo de las CGRs es la mediada por las proteínas solubles Slit y sus receptores Robo. En el pez cebra existen cuatro proteínas Slit (Slit1a, 1b, 2 y 3) y cuatro receptores Robo (Robo1-4) (Hutson et al., 2003). Se ha descrito que la señalización Slit-Robo actúa principalmente como una señal repulsora importante durante la guía axonal de varios tipos neuronales, incluyendo las CGRs (Wong et al., 2002). A su vez, el bloqueo de la expresión de Slit1b ocasiona la inhibición de la retracción apical de los neuroblastos de CGRs (Zolessi et al., 2006), lo cual parece deberse a que la señalización por medio de Slit1b-Robo3 lleva a una disminución en la expresión de N-cadherina, ocasionando una pérdida de la adhesión celular (Wong et al., 2012). Hay estudios que indican que los receptores Robo1 y 2 se localizan en la cilia primaria durante la diferenciación de las interneuronas corticales (Higginbotham et al., 2012), aunque no existen evidencias similares provenientes de otros tipos celulares. Es posible, por tanto, que la cilia primaria sea necesaria para la recepción y transducción de la señalización Slit-Robo durante la diferenciación de las CGRs, por lo que su presencia sería necesaria para que la polarización de estas células se dé en forma correcta. La evaluación de esta hipótesis requeriría, nuevamente, la realización de estudios funcionales de bloqueo o sobre-expresión de las proteínas Slit, de sus receptores Robo, o de proteínas ciliares.

Bibliografía

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2007). *Molecular biology of the cell*. 5ta edición, Nueva York, Garland Science.

Albrecht-Buehler, G. (1977). Phagokinetic tracks of 3T3 cells: Parallels between the orientation of track segments and of cellular structures which contain actin or tubulin. *Cell*. 12(2):333-9.

Alieva, I.B.; Vorobjev, I.A. (2004). Vertebrate primary cilia: A sensory part of centrosomal complex in tissue cells, but a "sleeping beauty" in cultured cells? *Cell Biol Int*. 28(2):139-50.

Allen, R.A. (1965). Isolated cilia in inner retinal neurons and in retinal pigment epithelium. *J Ultrastruct Res*. 12(5):730-47.

Almeida, A.D.; Boije, H.; Chow, R.W.; He, J.; Tham, J.; Suzuki, S.C.; Harris, W.A. (2014). Spectrum of fates: A new approach to the study of the developing zebrafish retina. *Development*. 141(9):1971-80.

Arellano, J.L.; Guadiana, S.M.; Breunig, J.J.; Rakic, P.; Sarkisian, M.R. (2012). Development and distribution of neuronal cilia in mouse neocortex. *J Comp Neurol*. 520(4):848-73.

Arimura, N.; Kaibuchi, K. (2005). Key regulators in neuronal polarity. *Neuron*. 48(6):881-4.

Aughstee, A.A. (2001). The ultrastructure of primary cilia in the endocrine and excretory duct cells of the pancreas of mice and rats. *Eur J Morphol*. 39(5):277-83.

Azimzadeh, J.; Bornens, M. (2007). Structure and duplication of the centrosome. *J Cell Sci*. 120(Pt 13):2139-42.

Baudoin, J.P.; Viou, L.; Launay, P.S.; Luccardini, C.; Espeso, Gil S.; Kiyasova, V.; Irinopoulou, T.; Alvarez, C.; Rio, J.P.; Boudier, T.; Lechère, J.P.; Kessaris, N.; Spassky, N.; Métin, C. (2012). Tangentially migrating neurons assemble a primary cilium that promotes their reorientation to the cortical plate. *Neuron*. 76(6):1108-22.

- Berbari, N.F.; O'Connor, A.K.; Haycraft, C.J.; Yoder, B.K. (2009). The primary cilium as a complex signaling center. *Curr Biol.* 19(3):R526-35.
- Calderón de Anda, F.; Pollarolo, G.; Da Silva, J.S.; Camoletto, P.G.; Feiguin, F.; Dotti, C.G. (2005). Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature.* 436(7051):704-8.
- Calderón de Anda, F.; Meletis, K.; Ge, X.; Reï, D.; Tsai, L.H. (2010). Centrosome motility is essential for initial axon formation in the neocortex. *J Neurosci.* 30(31):10391-406.
- Choi, J.H.; Law, M.Y.; Chien, C.B.; Link, B.A.; Wong, R.O. (2010). In vivo development of dendritic orientation in wild-type and mislocalized retinal ganglion cells. *Neural Dev.* 5:29.
- Cohen, E.; Binet, S.; Meininger, V. (1988). Ciliogenesis and centriole formation in the mouse embryonic nervous system. An ultrastructural analysis. *Biol Cell.* 62(2):165-9.
- Cohen, E.; Meininger, V. (1987). Ultrastructural analysis of primary cilium in the embryonic nervous tissue of mouse. *Int J Dev Neurosci.* 5(1):43-51.
- Craig, A.M.; Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci.* 17:267-310.
- Das, R.M.; Storey, K.G. (2014). Apical abscission alters cell polarity and dismantles the primary cilium during neurogenesis. *Science.* 343(6167):200-4.
- Distel, M.; Hocking, J.C.; Volkman, K.; Köster, R.W. (2010). The centrosome neither persistently leads migration nor determines the site of axonogenesis in migrating neurons in vivo. *J Cell Biol.* 191(4):875-90.
- Dotti, C.G.; Simons, K. (1990) Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell.* 62(1):63-72.
- Fadool, J.M.; Dowling, J.E. (2008). Zebrafish: A model system for the study of eye genetics. *Prog Retin Eye Res.* 27(1):89-110.

- Fan, S.; Hurd, T.; Liu, C.; Straight, S.; Weimbs, T.; Hurd, E.; Domino, S.; Margolis, B. (2004). Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions. *Curr Biol.* 14(16):1451-61.
- Fisch, C.; Dupuis-Williams, P. (2011). Ultrastructure of cilia and flagella – back to the future! *Biol Cell.* 103(6):249-70.
- Fuchs, J.L.; Schwark, H.D. (2004). Neuronal primary cilia: A review. *Cell Biol Int.* 28(2):111-8.
- Funahashi, Y.; Namba, T.; Nakamuta, S.; Kaibuchi, K. (2014). Neuronal polarization in vivo: Growing in a complex environment. *Curr Opin Neurobiol.* 27:215-23.
- Geerts, W.J.; Vocking, K.; Schoonen, N.; Haarbosch, L.; van Donselaar, E.G.; Regan-Klapisz, E.; Post, J.A. (2011). Cobblestone HUVECs: A human model system for studying primary ciliogenesis. *J Struct Biol.* 176(3):350-9.
- Gerdes, J.M.; Davis, E.E.; Katsanis, N. (2009). The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell.* 137(1):32-45.
- Gestri, G.; Link, B.A.; Neuhauss, S.C.F. (2012). The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases. *Dev Neurobiol.* 72(3):302-27.
- Ghossoub, R.; Molla-Herman, A.; Bastin, P.; Benmerah, A. (2011). The ciliary pocket: A once-forgotten membrane domain at the base of cilia. *Biol Cell.* 103(3):133-44.
- Goetz, S.C.; Anderson, K.V. (2010). The primary cilium: A signaling center during vertebrate development. *Nat Rev Genet.* 11(5):331-44.
- Han, Y.G.; Spassky, N.; Romaguera-Ros, M.; Garcia-Verdugo, J.M.; Aguilar, A.; Schneider-Maunoury, S.; Alvarez-Buylla, A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci.* 11(3):277-84.
- Hao, L.; Scholey, J. M. (2009). Intraflagellar transport at a glance. *J Cell Sci.* 122(Pt 7):889-92.

Higginbotham, H.; Eom, T.Y.; Mariani, L.E.; Bachleda, A.; Hirt, J.; Gukassyan, V.; Cusack, C.L.; Lai, C.; Caspary, T.; Anton, E.S. (2012). Arl13b in primary cilia regulates the migration and placement of interneurons in the developing cerebral cortex. *Dev Cell*. 23(5):925-38.

Higginbotham, H.R.; Gleeson, J.G. (2007). The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci*. 30(6):276-83.

Hinds, J.; Hinds, P. (1974). Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: An electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Dev Biol*. 37(2):381-416.

Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M. et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 496(7446):498-503.

Hoyer-Fender, S. (2010). Centriole maturation and transformation to basal body. *Semin Cell Dev Biol*. 21(2):142-7.

Hu, M.; Easter, S.S., Jr. (1999). Retinal neurogenesis: The formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev Biol*. 207(2):309-21.

Hu, Q.; Milenkovic, L.; Jin, H.; Scott, M.P.; Nachury, M.V.; Spiliotis, E.T.; Nelson, W.J. (2010). A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science*. 329(5990):436-9.

Hutson, L.D.; Jurynek, M.J.; Yeo, S.Y.; Okamoto, H.; Chien, C.B. (2003). Two divergent slit1 genes in zebrafish. *Dev Dyn*. 228(3):358-69.

Irigoín, F.; Badano, J.L. (2011). Keeping the balance between proliferation and differentiation: The primary cilium. *Curr Genomics*. 12(4):285-97.

Ishikawa, H.; Marshall, W.F. (2011). Ciliogenesis: Building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12(4):222-34.

Jeffery, G.; Erskine, L. (2005). Variations in the architecture and development of the vertebrate optic chiasm. *Prog Retin Eye Res*. 24(6):721-53.

- Kawakami, K. (2007). Tol2: A versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol.* 8(Suppl 1):S7.
- Kay, J.N.; Finger-Baier, K.C.; Roeser, T.; Staub, W.; Baier, H. (2001). Retinal ganglion cell genesis requires lakritz, a zebrafish atonal homolog. *Neuron.* 30(3):725-36.
- Kay, J.N.; Link, B.A.; Baier, H. (2005). Staggered cell-intrinsic timing of ath5 expression underlies the wave of ganglion cell neurogenesis in the zebrafish retina. *Development.* 132(11):2573-85.
- Kim, Y.K.; Kim, J.H.; Yu, Y.S.; Ko, H.W.; Kim, J.H. (2013). Localization of primary cilia in mouse retina. *Acta Histochem.* 115(8):789-94.
- Kimmel, C.B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S.R.; Ullmann, B.; Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 203(3):253-310.
- 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.; Chien, C.B. (2007). The Tol2kit: A multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev Dyn.* 236(11):3088-99.
- Laessing, U.; Stuermer, C.A. (1996). Spatiotemporal pattern of retinal ganglion cell differentiation revealed by the expression of neurolin in embryonic zebrafish. *J Neurobiol.* 29(1):65-74.
- Louvi, A.; Grove, E.A. (2011). Cilia in the CNS: The quiet organelle claims center stage. *Neuron.* 69(6):1046-60.
- Lowery, L.A.; Sive, H. (2004). Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mech Dev.* 121(10):1189-97.
- Marshall, W.F.; Nonaka, S. (2006). Cilia: Tuning in to the cell's antenna. *Curr Biol.* 16(15):R604-14.
- Masai, I.; Lele, Z.; Yamaguchi, M.; Komori, A.; Nakata, A.; Nishiwaki, Y.; Wada, H.; Tanaka, H.; Nojima, Y.; Hammerschmidt, M.; Wilson, S.W.; Okamoto, H. (2003). N-cadherin mediates

retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development*. 130(11):2479-94.

Masyuk, A.I.; Gradilone, S.A.; Banales, J.M.; Huang, B.Q.; Masyuk, T.V.; Lee, S.O.; Splinter, P.L.; Stroope, A.J.; Larusso, N.F. (2008). Cholangiocyte primary cilia are chemosensory organelles that detect biliary nucleotides via P2Y12 purinergic receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 295(4):G725-34.

Mesa-Tejada, R.; Pascal, R.R.; Fenoglio, C.M. (1977). Immunoperoxidase: A sensitive immunohistochemical technique as a "special stain" in the diagnostic pathology laboratory. *Hum Pathol*. 8(3):313-20.

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.; Benmerah, A. (2010). The ciliary pocket: An endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci*. 123(Pt 10):1785-95.

Neumann, C.J. (2001). Pattern formation in the zebrafish retina. *Semin Cell Dev Biol*. 12(6):485-90.

Neumann, C.J.; Nueslein-Volhard, C. (2000). Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science*. 289(5487):2137-9.

Nikai, H.; Rose, G.G.; Cattoni, M. (1970). Electron microscopy of solitary cilia in human gingiva and rat oral mucosa. *J Dent Res*. 49(5):1141-53.

Paridaen, J.T.; Wilsch-Bräuninger, M.; Huttner, W.B. (2013). Asymmetric inheritance of centrosome-associated primary cilium membrane directs ciliogenesis after cell division. *Cell*. 155(2):333-44.

Pearson, R.A.; Dale, N.; Llaudet, E.; Mobbs, P. (2005). ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron*. 46(5):731-44.

- Poggi, L.; Vitorino, M.; Masai, I.; Harris, W.A. (2005). Influences on neural lineage and mode of division in the zebrafish retina in vivo. *J Cell Biol.* 171(6):991-9.
- Purves, D.; Augustine, G.J.; Fitzpatrick, D.; Hall, W.C.; LaMantia, A.S.; McNamara, J.O.; Williams, S.M. (2004). *Neuroscience*. 3ra edición, Massachusetts, Sinauer Associates Inc.
- Randlett, O.; Norden, C.; Harris, W.A. (2011a). The vertebrate retina: A model for neuronal polarization in vivo. *Dev Neurobiol.* 71(6):567-83.
- Randlett, O.; Poggi, L.; Zolessi, F.R.; Harris, W.A. (2011b). The oriented emergence of axons from retinal ganglion cells is directed by laminin contact in vivo. *Neuron.* 70(2):266-80.
- Rbaibi, Y.; Cui, S.; Mo, D.; Carattino, M.; Rohatgi, R.; Satlin, L.M.; Szalinski, C.M.; Swanhart, L.M.; Fölsch, H.; Hukriede, N.A.; Weisz, O.A. (2012). OCRL1 modulates cilia length in renal epithelial cells. *Traffic.* 13(9):1295-305.
- Rohatgi, R.; Snell, W.J. (2010). The ciliary membrane. *Curr Opin Cell Biol.* 22(4):541-6.
- Schmitt, E.A.; Dowling, J.E. (1994). Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Comp Neurol.* 344(4):532-42.
- Schmitt, E.A.; Dowling, J.E. (1999). Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: Light and electron microscopic analyses. *J Comp Neurol.* 404(4):515-36.
- Schneider, L.; Cammer, M.; Lehman, J.; Nielsen, S.K.; Guerra, C.F.; Veland, I.R.; Stock, C.; Hoffmann, E.K.; Yoder, B.K.; Schwab, A. (2010). Directional cell migration and chemotaxis in wound healing response to PDGF-AA are coordinated by the primary cilium in fibroblasts. *Cell Physiol Biochem.* 25(2-3):279-92.
- Shi, S.H.; Jan, L.Y.; Jan, Y.N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell.* 112(1):63-75.
- Smith, J.W.; Christie, K.N.; Frame, J. (1969). Desmosomes, cilia and acanthosomes associated with keratocytes. *J Anat.* 105(Pt 2):383-92.

- Sorokin, S. (1962). Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 15(2):363-77.
- Sotelo, J.R.; Trujillo-Cenoz, O. (1958). Electron microscope study on the development of ciliary components of the neural epithelium of the chick embryo. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 49(1):1-12.
- Spassky, N.; Han, Y.G.; Aguilar, A.; Strehl, L.; Besse, L.; Laclef, C.; Ros, M.R.; Garcia-Verdugo, J.M.; Alvarez-Buylla, A. (2008). Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Dev Biol.* 317(1):246-59.
- Stenkamp, D.L. (2007). Neurogenesis in the fish retina. *Int Rev Cytol.* 259:173-224.
- Stenkamp, D.L.; Frey, R.A.; Prabhudesai, S.N.; Raymond, P.A. (2000). Function for Hedgehog genes in zebrafish retinal development. *Dev Biol.* 220(2):238-52.
- Takeda, S.; Narita, K. (2012). Structure and function of vertebrate cilia, towards a new taxonomy. *Differentiation.* 83(2):S4-11.
- Tarboush, R.; Chapman, G.B.; Connaughton, V.P. (2012). Ultrastructure of the distal retina of the adult zebrafish, *Danio rerio*. *Tissue Cell.* 44(4):264-79.
- Taverna, E.; Huttner, W.B. (2010). Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron.* 67(6):906-14.
- Warfvinge, K.; Elofsson, R. (1988). Single modified cilia displayed by cells of human internal stratified epithelia (oral cavity, vagina). *Cell Tissue Res.* 251(2):237-41.
- Westerfield, M.; Wegner, J.; Jegalian, B.G.; De Robertis, E.M.; Püschel, A.W. (1992). Specific activation of mammalian Hox promoters in mosaic transgenic zebrafish. *Genes Dev.* 6(4):591-8.
- Wilsch-Bräuninger, M.; Peters, J.; Paridaen J.T.; Huttner, W.B. (2012). Basolateral rather than apical primary cilia on neuroepithelial cells committed to delamination. *Development.* 139(1):95-105.

Wong, G.K.; Baudet, M.L.; Norden, C.; Leung, L.; Harris, W.A. (2012). Slit1b-Robo3 signaling and N-cadherin regulate apical process retraction in developing retinal ganglion cells. *J Neurosci.* 32(1):223-8.

Wong, K.; Park, H.T.; Wu, J.Y.; Rao, Y. (2002). Slit proteins: Molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. *Curr Opin Genet Dev.* 12(5):583-91.

Zmuda, J.F.; Rivas, R.J. (1998). The Golgi apparatus and the centrosome are localized to the sites of newly emerging axons in cerebellar granule neurons in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton.* 41(1):18-38.

Zolessi, F.R. (2009). Vertebrate neurogenesis: Cell polarity. En: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons.

Zolessi, F.R.; Poggi, L.; Wilkinson, C.J.; Chien, C.B.; Harris, W.A. (2006). Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo. *Neural Dev.* 1:2.