

EL PEIX ZEBRA COM A SISTEMA MODEL PER A L'ESTUDI DE MALALTIES HUMANES

ANDREA DURÁN I HERNÁN LÓPEZ-SCHIER

Laboratori de Biologia Cel·lular i Organogènesi Sensorial, CRG, Barcelona

Adreça per a la correspondència: Hernán López-Schier. Laboratori de Biologia Cel·lular i Organogènesi Sensorial, Centre de Regulació Genòmica. C. del Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona. Adreça electrònica: hernan.lopez@crg.es.

RESUM

El potencial dels estudis de malalties humanes en organismes model ha crescut substancialment durant els últims anys. L'herència evolutiva compartida entre els vertebrats permet l'ús d'organismes genèticament modificables per modelitzar malalties humanes de difícil estudi *in vitro*, i també faciliten l'estudi de malalties multifactorials complexes que en humans es presenten amb diferències d'expressivitat i penetrància, cosa que en dificulta la caracterització. Estudis en diversos organismes model han demostrat que diversos gens el producte dels quals permet el desenvolupament i assemblatge de teixits i òrgans també estan involucrats en malalties hereditàries i congènites comunes. Els desenvolupaments tecnològics aconseguits durant els darrers anys també ens permeten modelitzar malalties rares en organismes model. En aquest article intentarem demostrar que el peix zebra és un sistema que presenta qualitats que el fan ideal per a aquests estudis. En particular, presentarem com a exemple algunes malalties neurodegeneratives i la pèrdua d'audició i equilibri. Finalment, també discutirem la utilitat del peix zebra per a estudis de regeneració de cèl·lules sensorials.

Paraules clau: organisme model, peix zebra, malaltia humana, degeneració, regeneració.

THE ZEBRAFISH AS A MODEL SYSTEM FOR THE STUDY OF HUMAN PATHOLOGIES

SUMMARY

The potential of studying human pathologies in model organisms has grown substantially over the past few years. The shared evolutionary history among all vertebrates al-

lows the use of genetically modified organisms to model human diseases that cannot be studied *in vitro*. It also facilitates the study of multifactorial complex pathologies that in humans present differences in expressivity and penetrance, which complicates their characterization. Studies in several model organisms have demonstrated that genes products that direct the development and assembly of tissues and organs are also involved in common genetic and congenital diseases. Additionally, technological developments permit the modeling of rare diseases in model organisms. In this chapter we will try to demonstrate that the zebrafish is a model that presents several qualities that make it ideal for this kind of studies. In particular, we will present some neurodegenerative diseases and loss of hearing and balance as examples. Finally, we will discuss the use of the zebrafish for studies on the regeneration of sensory cells.

Key words: model organism, zebrafish, human disease, degeneration, regeneration.

INTRODUCCIÓ

Una de les motivacions de la recerca biomèdica és el descobriment de les causes que provoquen el desenvolupament de malalties en els éssers humans. Al mateix temps, la millora de mètodes diagnòstics i d'estratègies terapèutiques complementen els descobriments bàsics sobre els factors casuals de les malalties. Amb els mitjans actuals de detecció de malalties es diagnostiquen cada any malalties greus en milions de persones. Moltes malalties són tractables en qualsevol moment, però d'altres, si no són tractades a temps, poden derivar en trastorns físics i emocionals permanents i en un conseqüent deteriorament de la qualitat i l'expectativa de vida del pacient. Moltes altres, eventualment poden conduir a la invalidesa permanent o a la mort de la persona afectada. Les característiques de moltes malalties fan que el diagnòstic es faci posteriorment a l'aparició de símptomes severos o irreversibles. Moltes vegades, això significa que la malaltia està massa avançada per poder ser tractada farmacològicament, i cal decantar-se per tractaments quirúrgics. Freqüentment, les complicacions de la cirurgia en molts pacients involucren alguna debilitat permanent. Per exemple, aproximadament la meitat dels

pacients operats de schwannoma vestibular perdran part de l'audició en l'orella afectada i en casos més severos es podran presentar danys en altres nervis, cosa que derivarà en una paràlisi facial. Conseqüentment, el diagnòstic precoç de moltes malalties és de summa importància per prevenir-ne les conseqüències més serioses. Un dels problemes fonamentals de moltes malalties és que els mecanismes cel·lulars involucrats en el procés de la seva generació encara són desconeguts. Això és deu, principalment, al fet que l'observació directa dels òrgans afectats està obstaculitzada per la seva situació profunda dintre de cavitats corporals o protegits pels ossos, com és el cas del cervell. La lentitud del procés de generació de moltes malalties en humans n'impedeix l'anàlisi i caracterització. Aquestes dificultats han creat una gran manca de coneixement sobre el desenvolupament inicial de les malalties, i n'ha dificultat el diagnòstic precoç. Les investigacions que intenten modelitzar malalties humanes en animals model tenen la finalitat d'analitzar i caracteritzar, en detall, els mecanismes cel·lulars i moleculars que deriven en la formació de malalties. Molts d'aquests estudis tenen l'objectiu de trobar dianes moleculars per desenvolupar mètodes diagnòstics precoços que ajudin al

tractament farmacològic o quirúrgic dels pacients. La modelització i l'estudi de les primeres etapes del desenvolupament de malalties humanes en sistemes model, usant animals de laboratori, està motivat per la necessitat de solucionar aquestes dificultats (Strome i Doudet, 2007).

EL PEIX ZEBRA COM A SISTEMA EXPERIMENTAL PER MODELITZAR MALALTIES HUMANES

Els sistemes experimentals amb animals de laboratori són una condició *sine qua non* per a l'estudi de malalties humanes, atès que moltes d'aquestes no poden modelitzar-se *in vitro* o *in silico*. Cada espècie animal de laboratori posseeix qualitats específiques superiors, però no existeix el sistema experimental universal (Hirsch *et al.*, 2003; Hirsch, 2006, 2007). Per aquesta raó, l'elecció del sistema experimental ideal dependrà de la malaltia que es vulgui modelitzar i del tipus d'investigacions que es planegi fer. Amb la finalitat d'exemplificar aquest concepte, es podrien comparar la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) i el ratolí (*Mus musculus*). Tot i que el ratolí és un animal evolutivament més proper a l'ésser humà, molts estudis que involucrin la utilització de milers d'animals, com per exemple el cribratge mutagènic, serien poc pràctics i extremadament costosos. En aquests casos, l'ús de *Drosophila* seria una decisió més encertada, ja que la manutenció i el cribratge de centenars de milers de mosques és relativament fàcil i econòmic. No obstant això, la mosca no és adequada per a molts estudis, ja que no posseeix alguns dels òrgans característics dels mamífers. Per aquestes raons, durant molts anys es va intentar adoptar un sistema animal model que presentés característiques atractives des del punt de vista pràctic, i que

també fos suficientment proper a l'humà per permetre l'estudi de la major quantitat possible de malalties. Durant els anys setanta, George Streisinger va advertir que el peix zebra, *Danio rerio*, seria un model apropiat, ja que posseeix molts sistemes orgànics funcionalment molt semblants a l'humà, encara que freqüentment anatòmicament molt més simples (Streisinger *et al.*, 1981; Walker i Streisinger, 1983; Amsterdam i Hopkins, 2006; Lieschke i Currie, 2007). El peix zebra és un petit teleosti tropical originari del sud-est asiàtic (vegeu la figura 1). Un criteri fonamental que s'utilitza per valorar la possibilitat de modelitzar una malaltia humana en un animal és la identificació d'elements comuns o homòlegs entre ambdues espècies. Així mateix, les alteracions presentades pels models animals han de reproduir exactament aquelles que desenvolupen els pacients humans. En aquest sentit, els grups de recerca abocats a l'estudi del peix zebra l'han validat com a model experimental moltes vegades. Per exemple, ja s'ha demostrat que la formació i funció de molts tipus cel·lulars i les seves activitats fisiològiques són similars o idèntiques a les humanes. Fins i tot, mutacions en el peix zebra que produeixen ceguera o sordesa profunda també en causen en humans, i alteracions genètiques que produeixen càncer en humans, també ho fan en el peix. Finalment, fàr-

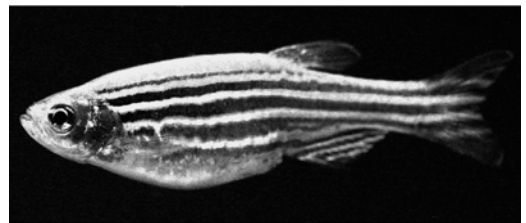


FIGURA 1. Fotografia d'una femella adulta de peix zebra. L'animal rep el seu nom comú a partir del patró «zebrat» (o amb dibuix de zebra) que conté la pigmentació.

macs amb activitat tòxica i que alternativament posen remei a una malaltia o símptoma, actuen de manera semblant en ambdues espècies. La capacitat de generar coneixement valuós sobre l'adquisició i progressió d'una malaltia ha estat freqüentment limitada per la tecnologia disponible. Per tant, les millores en la capacitat de modificar i de visualitzar les cèl·lules involucrades en una malaltia permetrien adquirir grans quantitats de dades de valor diagnòstic. Per aquestes raons, durant els últims anys, molts investigadors han dedicat un gran esforç per desenvolupar i millorar les tecnologies per al peix zebra (Grunwald *et al.*, 1988; Ritter *et al.*, 2001; Lawson i Weinstein, 2002; Brustein *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2003; McLean i Fetcho, 2008; Rao *et al.*, 2009; Bandmann i Burton, 2010; Kabli *et al.*, 2010; Paquet *et al.*, 2010; Sager *et al.*, 2010). Gràcies a aquest fet, s'ha avançat significativament en la generació de noves eines que permeten manipular genèticament i visualitzar dinàmicament les cèl·lules individuals en el context dels òrgans complets (vegeu la figura 2).

Des del punt de vista tecnològic, el peix zebra es compara favorablement amb altres animals model de recerca genètica, i ofereix un gran nombre d'avantatges, com ara:

a) És molt més econòmic de mantenir i produir que el ratolí.

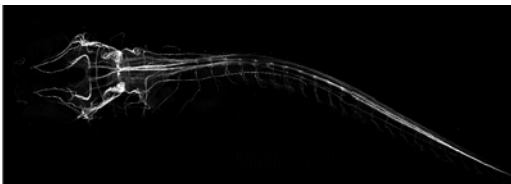


FIGURA 2. Fotografia d'un peix zebra aleví de set dies de vida, tenyit amb l'anticòs monoclonal 3A 10, que marca els neurofilaments. En aquest cas, la pigmentació revela el sistema nerviós perifèric de l'animal.

b) Un peix zebra madura sexualment als tres mesos, cosa que permet l'obtenció de diverses generacions a l'any.

c) Cada parella d'animals és capaç de produir més d'un centenar d'ous per setmana.

d) El seu desenvolupament és accelerat. La majoria dels òrgans presents en el peix adult es formen durant els primers tres dies de la vida de l'embrió.

e) El desenvolupament de l'animal és extern. A més, durant les primeres setmanes de vida, el peix zebra és pràcticament transparent, cosa que facilita la simple inspecció visual dels òrgans interns.

f) És possible expressar gens forans en el peix mitjançant tècniques d'electroporació (Rambabu *et al.*, 2005; Cerda *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2008).

g) L'estudi funcional de gens mitjançant la pèrdua o el guany de la funció és ràpid i molt senzill. Només requereix la microinjecció en l'ou fertilitzat de DNA o de RNA missatger, o de nucleòtids antisentit (Draper *et al.*, 2001; Bill *et al.*, 2009). Una sola persona amb certa pràctica pot injectar fins a cinc-cents ous per dia.

h) La generació de peixos transgènics no requereix mà d'obra especialitzada o instrumental sofisticat (Jessen *et al.*, 1998; Grabher *et al.*, 2004; Kawakami, 2004).

i) La producció d'un gran nombre de peixos mutants utilitzant agents químics o a partir d'insercions de material genètic forà és relativament fàcil.

j) Ja s'ha desenvolupat la tecnologia que permet generar mutacions en gens d'interès, anomenada *inducció de lesions dirigida en genomes* (TILLING, per les seves sigles en anglès) (Sood *et al.*, 2006; Moens *et al.*, 2008).

Aquestes característiques reforcen la convicció que el peix zebra és un sistema idoni per modelitzar malalties humanes (Zon, 1999; Barut i Zon, 2000; Penberthy *et*

al., 2002; Ward i Lieschke, 2002; Keller i Murtha, 2004; Guyon *et al.*, 2007; Kari *et al.*, 2007; Ingham, 2009). De fet, moltes malalties ja han estat replicades amb èxit en el peix. Seguidament farem ressaltar alguns casos puntuals.

MALALTIES NEURODEGENERATIVES

Les malalties neurodegeneratives són aquelles que presenten un quadre de pèrdua progressiva de grups neuronals en els sistemes nerviosos central o perifèric. Els efectes de la disminució de la capacitat motriu o cognitiva, entre d'altres, dependran del tipus neuronal en degeneració. En molts casos la pèrdua neuronal és una conseqüència directa de l'efecte genètic o mediambiental que la produeix. En altres, la degeneració neuronal està indirectament causada per problemes en altres cèl·lules, com per exemple la glia. Algunes malalties neurodegeneratives que ja han estat replicades en el peix i actualment són estudiades en detall són la corea de Huntington, les malalties de Parkinson i d'Alzheimer, l'esclerosi múltiple, la degeneració de la retina, etc. (Karlovič *et al.*, 1998; Daly i Sandell, 2000; Strome i Doudet, 2007; Paquet *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Paquet *et al.*, 2010; Ramesh *et al.*, 2010; Xia, 2010). Bàsicament, hi ha quatre maneres de generar un peix model per a una malaltia neurodegenerativa i l'elecció de la més adequada dependrà de diversos factors. Si la malaltia és de naturalesa genètica dominant, o els gens responsables del seu desenvolupament es coneixen i el tipus neuronal afectat també és conegut, l'opció ideal és la creació d'un animal transgènic que expressi el gen mutat en les neurones rellevants. Aquesta estratègia experimental s'adequa a les malalties d'Alzheimer, d'atàxia espinocerebral, o

a la corea de Huntington. Per exemple, un nombre important de neurones degeneren quan s'expressen proteïnes amb llargues cadenes repetides de trinucleòtids, perquè produeixen agregats proteïnics que interfereixen amb la viabilitat cel·lular. Les cadenes de glutamina en la proteïna ATXN1 produeixen l'atàxia espinocerebral de tipus 1 i en la proteïna ATXN3 produeixen la malaltia de Joseph-Machado (Bettencourt *et al.*, 2009; Carlson *et al.*, 2009). Encara que algunes malalties podrien replicar-se en un model transgènic, la mort neuronal també pot generar-se farmacològicament mitjançant l'aplicació directa d'una neurotoxina. Per exemple, la degeneració de les neurones dopaminèrgiques que es dona en la malaltia de Parkinson pot obtenir-se mitjançant la incubació de peixos amb Paraquat o MPTP (Bretaud *et al.*, 2004). Aquesta opció evita la necessitat de generar una línia transgènica, cosa que permet una recerca més ràpida i menys costosa. Si la malaltia neurodegenerativa és recessiva, o l'alteració genètica no està determinada, l'única opció per replicar-la en un animal model és la generació d'un mutant mitjançant cribratges específics. Si el tipus cel·lular que degenera és conegut, el cribratge podria utilitzar marcadors moleculars que remarquin la viabilitat cel·lular. Per exemple, la modelització de les esclerosis amiotròfica o múltiple, o les neuropaties autoimmunitàries o sensorials, podria basar-se en aquesta estratègia. En cas contrari, el cribratge hauria de fer-se mesurant les respostes de comportament associades a la malaltia que es vulgui modelitzar en el peix (Nicolson *et al.*, 1998; Artinger *et al.*, 1999; Seiler *et al.*, 2004; Jing i Mallick, 2009). Un exemple d'un cribratge mutacional amb molt èxit és aquell en què, basant-se en observacions preliminars que indiquen que la glia perifèrica en el peix té un perfil d'expressió gènica similar a la humana, un

grup d'investigadors de la Universitat de Standford va cribrar animals mitjançant mutagènesi química amb la finalitat d'identificar mutacions que afectaran la producció d'una proteïna de la glia perifèrica (Lyons *et al.*, 2005; Pogoda *et al.*, 2006). Aquesta recerca va generar diverses línies de peixos mutants, una de les quals va presentar problemes en la mielinització dels axons, de manera idèntica a la descrita en la síndrome Goldberg-Shprintzen. Aquest és un desordre congènit caracteritzat per microcefàlia, dimorfisme facial i retard mental. Actualment és una condició incurable. Recentment, mutacions en el gen codificant de la proteïna KBP (proteïna d'unió a la família 1 de cinesines), anomenat *KIAA1279*, han estat identificades com a responsables del desenvolupament d'aquesta malaltia. Poc després, es va identificar una mutació en aquest mateix gen en el peix, i es va generar el primer model animal de la síndrome de Goldberg-Shprintzen (Lyons *et al.*, 2008). Gràcies al model en el peix, es va poder establir que la funció de KBP és necessària per al creixement i manteniment dels axons de les neurones dels sistemes nerviosos central i perifèric. Un dels avantatges mencionats anteriorment del peix zebra va permetre analitzar les neurones *in vivo* mitjançant videomicroscòpia, la qual cosa va demostrar que la velocitat de creixement dels axons és menor en els animals mutants. Estudis ultraestructurals van revelar defectes en l'estructura dels microtúbuls i en la localització dels mitocondris als axons.

SORDESA I PÈRDUA D'EQUILIBRI

La percepció sensorial és un procés complex que permet als éssers humans i altres animals interpretar senyals provinents del medi ambient i reaccionar conseqüent-

ment. L'enorme impacte negatiu de la pèrdua de les funcions sensorials invariablement resulta en la disminució de la qualitat de vida de l'individu afectat. Entre els humans, per exemple, els desordres auditius i de l'equilibri són condicions patològiques agudes o progressives, amb una prevalença de més del 30 % de la població major de seixanta anys d'edat. La hipoacúsia pot ser lleu, caracteritzada clínicament per la pèrdua d'agudes sensorial, o severa, i arriba en molts casos a la sordesa profunda (Lindsay, 1973; Hilgert *et al.*, 2009; Mackenzie i Smith, 2009). Els símptomes de la deficiència auditiva són causats majoritàriament per la pèrdua de funció de les cèl·lules mecanoreceptores de l'orella interna, anomenades *cèl·lules piloses* (Petit, 1996; Estivill *et al.*, 1998; Hudspeth, 2000; Michel *et al.*, 2003; Petit, 2006; Petit i Richardson, 2009). A l'orella interna, a la zona coneguda com la còclea, les cèl·lules piloses es dediquen a l'audició pròpiament dita, mentre que aquelles que es distribueixen pel sistema vestibular (canals semicirculars, sàcul i utricle) estan dedicades al manteniment de l'equilibri. Per actuar com a receptors en l'orella interna, les cèl·lules piloses han de ser capaces de produir senyals mecanoelèctrics, és a dir, generar potencials elèctrics en resposta a una estimulació mecànica externa. Estímuls mecànics, com ara el so o l'acceleració, produeixen una flexió en els estereocilis o microvellositats apicals, que resulta en l'acoblament de canals mecànics de traducció, l'apertura dels quals permet l'entrada d'un corrent iònic que despolaritza la membrana plasmàtica cel·lular, amb el conseqüent alliberament de neurotransmissors que generen una transmissió sinàptica aferent al llarg del nervi cranial VIII (vestibulococlear). Més d'un centenar de locus han estat associats a la falta d'audició hereditària en humans. En alguns casos, els gens lesionats ja han estat

identificats molecularment mitjançant el mapatge genètic de posició. Les causes de moltes formes d'hipoacúsia encara són desconegudes, malgrat que alguns resultats indiquen que els factors ambientals tenen un paper important en el progrés de la pèrdua d'audició. Estudis clínics en humans i experimentals en models animals han demostrat que els antibiòtics d'ampli espectre de la família dels aminoglicòsids tenen efectes ototòxics que deriven en la pèrdua irreversible de l'audició. Altres estudis experimentals i epidemiològics indiquen que l'exposició a sons d'alt nivell és una de les principals causes de la disminució progressiva de la capacitat auditiva en la població adulta de països industrialitzats. Segons un informe de l'Organització Mundial de la Salut, Espanya es troba entre els països amb més soroll ambiental del món. Els peixos posseeixen capacitats sensorials molt desenvolupades. La visió i l'audició en el peix zebra utilitzen mecanismes fisiològics idèntics als dels humans. L'estructura tissular de l'ull i l'orella interna en ambdues espècies és molt similar, i també ho són les bases genètiques que permeten la construcció d'aquests òrgans i el seu funcionament. Aquestes característiques han permès l'obtenció de peixos mutants que desenvolupen ceguera, degeneració macular, microftàlmia, sordesa i problemes d'equilibri. L'any 1996 es van publicar una sèrie d'articles que descriuen la generació i caracterització de centenars de línies mutants del peix zebra (Driever i Fishman, 1996; Driever *et al.*, 1996; Haffter *et al.*, 1996; Haffter i Nusslein-Volhard, 1996). Moltes d'aquestes produeixen alteracions estructurals en l'orella interna (Mallick *et al.*, 1996; Whitfield *et al.*, 1996). Per exemple, el mutant *dog eared* presenta defectes en el gen codificant de la proteïna Eya1. La falta de funció d'aquesta proteïna en humans causa la síndrome anomena-

da *branquiotorenal* (BOR), també anomenada *síndrome de Melnick-Fraser*. Aquesta malaltia és de caràcter hereditari i freqüentment s'expressa de manera dominant, amb una incidència d'un entre quaranta mil nadons. Es caracteritza per defectes embriològics branquials, displàsia i insuficiència renal i defectes estructurals de l'orella amb hipoacúsia severa. Els defectes en els peixos mutants d'Eya1 són idèntics als presents en humans, tot i que encara no s'ha trobat una expressió dominant de BOR en el peix (Kozłowski *et al.*, 2005; Nica *et al.*, 2006). Les similituds entre ambdues espècies han permès caracteritzar amb detall els defectes associats a la falta de funció d'Eya1. En particular, s'ha determinat que Eya1, juntament amb la proteïna Six1, a la qual s'associa per funcionar com a factor de transcripció, permet la producció de les cèl·lules ciliades mecanoreceptores i, al mateix temps, inhibeix la formació de neurones mitjançant una regulació alternativa de la proliferació i la mort cel·lular en aquests dos llinatges cel·lulars (Bricaud i Collazo, 2006). Una altra forma de sordesa profunda en els humans, els ratolins i també el peix, és aquella derivada de mutacions en el gen codificant de la proteïna TMIE (en anglès, *transmembrane inner ear*) (Mitchem *et al.*, 2002; Naz *et al.*, 2002). TMIE és una petita proteïna que travessa la membrana plasmàtica cel·lular, la funció de la qual en humans i ratolins va romandre desconeguda fins a la descoberta i caracterització en el peix zebra (Gleason *et al.*, 2009). A partir d'acurats i detallats estudis fenotípics en aquests animals es va determinar que l'absència de TMIE produeix problemes en les microvellositats apicals de les cèl·lules piloses. Encara que aquestes cèl·lules es desenvolupen normalment i mantenen connexions neuronals, no tenen la capacitat de respondre als senyals mecànics. En conseqüència, els canals mecano-

transductors resten tancats. Atès que les mateixes cèl·lules que participen en l'audició també són necessàries per a l'equilibri, tant ratolins com persones, i també els peixos mutants *TMIE*, pateixen problemes vestibulars. En el cas del peix, aquests defectes s'evidencien a partir de la trajectòria circular de la natació del peix (vegeu la figura 3). Per descomptat, alguns defectes de l'audició en éssers humans no poden modelitzar-se en el peix, ateses algunes diferències anatòmiques; per exemple, el peix no posseeix els tres petits ossos de l'orella mitjana (martell, enclusa i estrep) que martel·legen sobre el timpà per transmetre els senyals auditius cap a l'orella interna.

DESENVOLUPAMENT, DANY I REGENERACIÓ DELS ÒRGANS SENSORIALS

A més de la modelització de malalties, el peix zebra es presenta com un sistema ideal per dissenyar i validar mètodes terapèutics. En particular, la capacitat regenerativa del peix permet analitzar factors i condicions que permeten la reparació d'un dany en qualsevol òrgan o teixit (Poss *et al.*, 2003; Becker i Becker, 2008; Brittijn *et al.*, 2009). El camp de la medicina regenerativa creixerà sobre la necessitat de noves teràpies destinades a alleugerir les malalties associades a la vellesa, la qual cosa és cada

cop més rellevant, atès l'increment sostingut de l'expectativa de vida de la població humana. Les línies terapèutiques d'aquesta naturalesa dependran de la disponibilitat d'informació sobre el comportament de les cèl·lules troncales adultes i de la seva resposta a l'administració de fàrmacs. Malgrat que totes les funcions sensorials són propenses a deteriorar-se durant la vida d'un animal, alguns òrgans sensorials posseeixen la capacitat de recuperar-se després d'un dany. En canvi, d'altres com l'orella interna dels mamífers són incapaços de fer-ho. En humans, les cèl·lules piloses es formen només entre el primer i el segon trimestre de gestació i han de mantenir-se saludables durant la resta de la vida de l'individu, ja que la pèrdua és normalment irreversible. Una sèrie de treballs publicats a mitjan anys vuitanta van demostrar que altres vertebrats com ara peixos, amfibis i ocells, poden regenerar cèl·lules piloses de la seva orella o línies laterals (Corwin i Cotanche, 1988; Corwin *et al.*, 1991; Cotanche *et al.*, 1991; Cotanche i Lee, 1994; Jones i Corwin, 1996). Encara que s'ha progressat enormement durant les últimes dues dècades, fins avui es desconeix la resposta a les preguntes més fonamentals del procés regeneratiu. Per exemple, es desconeix la identitat de les cèl·lules progenitores residents, o quins mecanismes controlen la producció de cèl·lules ciliades durant la regeneració. És més, encara hi ha la contro-

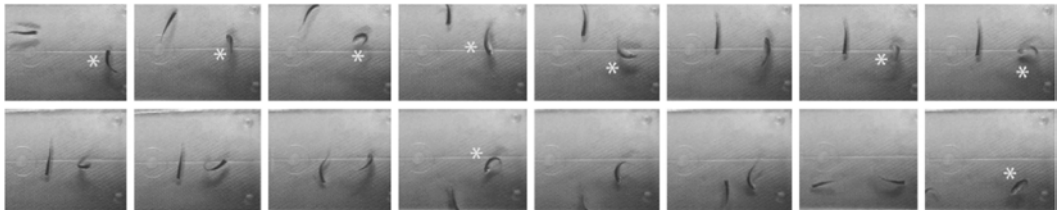


FIGURA 3. Sèrie de fotografies d'una filmació de dos peixos adults, un de normal i l'altre amb una sordesa profunda i falta d'equilibri (asterisc), mentre naden dintre un aquari. El peix que és sord és homocigot en un allel mutant del gen *TMIE*. Noteu el seu patró de natació circular.

vèrsia sobre si el procés de regeneració depèn de la proliferació de les cèl·lules de suport que envolten les cèl·lules ciliades danyades. Alguns investigadors sostenen que noves cèl·lules piloses s'originen a partir de la diferenciació de les cèl·lules de suport sense la intervenció de divisions mitòtiques. Una possibilitat molt atractiva és que el neuroepiteli auditiu posseeixi cèl·lules progenitores pluripotents capaces de regenerar cèl·lules piloses. Aquesta hipòtesi ha pres força a partir d'unes publicacions que indiquen la possible presència de cèl·lules troncales adultes en l'utricle, l'única part de l'orella que manté cèl·lules proliferatives en el mamífer adult. Cèl·lules utriculars murines condicionades amb un còctel de factors de creixement en cultiu van poder contribuir a la regeneració de cèl·lules piloses quan van ser empeltades a la càpsula òtica d'embrions de pollastre (Brigande i Heller, 2009). No obstant això, també van generar una multitud d'altres tipus cel·lulars, pertanyents a les tres capes germinals. Altres grups d'investigació han informat de resultats idèntics utilitzant cèl·lules troncales embrionàries, cosa que suggereix que l'utricle podria estar desproveït de cèl·lules troncales adultes dedicades al reemplaçament de cèl·lules piloses danyades. Les cèl·lules troncales són cèl·lules multipotents amb capacitat d'autorenovació. Ocasionalment, poden generar un o més tipus cel·lulars diferenciats mitjançant divisions asimètriques. Una diferència important entre les cèl·lules troncales cultivades i condicionades i aquelles residents en els teixits adults és la capacitat proliferativa i de diferenciació que les caracteritza. Les cèl·lules troncales adultes, ja sigui pel fet de tenir característiques intrínseques de diferenciació, o per estar influïdes pel microambient cel·lular que les envolta, generalment donen lloc a tipus cel·lulars diferenciats característics dels teixits o òrgans que les ac-

llen. Un exemple d'això són les cèl·lules troncales nervioses: sempre que romanguin confinades a la zona neurogènica de l'òrgan que les allotja, només generaran neurones, astròglia i oligodendròcits. Tot i així, fora del seu context natural, les cèl·lules troncales nervioses presenten més plasticitat, i són capaces de proliferar activament i de donar lloc a una varietat cel·lular molt més àmplia. Aquesta característica les fa potencialment perilloses, ja que la proliferació descontrolada podria esdevenir en tumors. A més, en cas de ser portat al camp clínic, l'empelt de cèl·lules troncales requerria una intervenció quirúrgica invasiva i seguiments postoperatoris constants. Per aquestes raons, la possibilitat de recuperar teixits malmesos o envellits a partir de cèl·lules troncales adultes residents és una alternativa amb un gran potencial terapèutic. No obstant això, un dels principals obstacles en el camp de la medicina regenerativa és la falta d'informació sobre l'existència, perfil molecular i localització de cèl·lules troncales adultes en els òrgans.

Malgrat la seva gran importància, els mecanismes que governen el procés de regeneració de les cèl·lules piloses encara són desconeguts. Ni tan sols no s'ha pogut visualitzar directament la formació o regeneració d'aquestes cèl·lules. Això es deu principalment al fet que l'observació directa de l'epiteli auditiu es veu obstaculitzada per la localització de l'orella interna, situada profundament dins de l'os temporal en mamífers, ocells i amfibis. Més encara, la lentitud del procés de regeneració cel·lular en aquests animals en dificulta la visualització de manera contínua. Idealment, estudis bàsics sobre l'existència i el comportament de progenitors endògens haurien de portar-se a terme en models animals amb neuroepitelis accessibles i capaços de regenerar cèl·lules piloses ràpidament. Els tractaments que produeixen sordesa en mamí-

fers també són letals per a les cèl·lules piloses en el peix zebra. La pèrdua d'aquestes cèl·lules en el peix zebra és només momentània, ja que aquests animals poden reemplaçar les cèl·lules ciliades malmeses amb molta rapidesa. Per al futur es preveuen un gran nombre de línies d'investigació bàsica sobre aquests temes en animals model com ara el peix zebra (Fan i Collodi, 2006; Chen i Zon, 2009; Kaslin *et al.*, 2009). El coneixement dels factors moleculars que influeixen en el comportament de les cèl·lules troncales en animals capaços de regenerar òrgans serà de gran utilitat per als estudis comparatius i d'extrapolació als humans. Els projectes de recerca d'aquesta índole podrien examinar directament si els òrgans amb baixa capacitat regenerativa estan igualment proveïts de cèl·lules troncales adultes. Per aquests motius, la caracterització de la capacitat regenerativa en el peix zebra és una àrea d'investigació bàsica amb un gran potencial biomèdic.

BIBLIOGRAFIA

- AMSTERDAM, A.; HOPKINS, N. (2006). «Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease». *Trends Genet.*, 22: 473-478.
- ARTINGER, K. B.; CHITNIS, A. B.; MERCOLA, M.; DRIEVER, W. (1999). «Zebrafish narrowminded suggests a genetic link between formation of neural crest and primary sensory neurons». *Development*, 126: 3969-3979.
- BANDMANN, O.; BURTON, E. A. (2010). «Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases». *Neurobiol. Dis.* [En premsa]
- BARUT, B. A.; ZON, L. I. (2000). «Realizing the potential of zebrafish as a model for human disease». *Physiol. Genomics*, 2: 49-51.
- BECKER, C. G.; BECKER, T. (2008). «Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration». *Restor. Neurol. Neurosci.*, 26: 71-80.
- BETTENCOURT, C.; SANTOS, C.; MONTIEL, R.; KAY, T.; VASCONCELOS, J.; MACIEL, P.; LIMA, M. (2009). «The (CAG)_n tract of Machado-Joseph Disease gene (ATXN3): a comparison between DNA and mRNA in patients and controls». *Eur. J. Hum. Genet.*, 18: 621-623.
- BILL, B. R.; PETZOLD, A. M.; CLARK, K. J.; SCHIMMEN- TI, L. A.; EKKER, S. C. (2009). «A primer for morpholino use in zebrafish». *Zebrafish*, 6: 69-77.
- BRETAUD, S.; LEE, S.; GUO, S. (2004). «Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease». *Neurotoxicol. Teratol.*, 26: 857-864.
- BRICAUD, O.; COLLAZO, A. (2006). «The transcription factor *six1* inhibits neuronal and promotes hair cell fate in the developing zebrafish (*Danio rerio*) inner ear». *J. Neurosci.*, 26: 10438-10451.
- BRIGANDE, J. V.; HELLER, S. (2009). «Quo vadis, hair, cell regeneration?» *Nat. Neurosci.*, 12: 679-685.
- BRITTIJN, S. A. [et al.] (2009). «Zebrafish development and regeneration: new tools for biomedical research». *Int. J. Dev. Biol.*, 53: 835-850.
- BRUSTEIN, E.; MARANDI, N.; KOVALCHUK, Y.; DRAPEAU, P.; KONNERTH, A. (2003). «*In vivo* monitoring of neuronal network activity in zebrafish by two-photon Ca²⁺ imaging». *Pflugers. Arch.*, 446: 766-773.
- CARLSON, K. M.; MELCHER, L.; LAI, S.; ZOGHBI, H. Y.; CLARK, H. B.; ORR, H. T. (2009). «Characterization of the zebrafish *atxn1/axh* gene family». *J. Neurogenet.*, 23: 313-323.
- CERDA, G. A.; THOMAS, J. E.; ALLENDE, M. L.; KARLSTROM, R. O.; PALMA, V. (2006). «Electroporation of DNA, RNA and morpholinos into zebrafish embryos». *Methods*, 39: 207-211.
- CHEN, A. T.; ZON, L. I. (2009). «Zebrafish blood stem cells». *J. Cell. Biochem.*, 108: 35-42.
- CORWIN, J. T.; COTANCHE, D. A. (1988). «Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma». *Science*, 240: 1772-1774.
- CORWIN, J. T.; JONES, J. E.; KATAYAMA, A.; KELLEY, M. W.; WARCHOL, M. E. (1991). «Hair cell regeneration: the identities of progenitor cells, potential triggers and instructive cues». *Ciba Found. Symp.*, 160: 103-120 [Discussió: 120-130]
- COTANCHE, D. A.; LEE, K. H. (1994). «Regeneration of hair cells in the vestibulocochlear system of birds and mammals». *Curr. Opin. Neurobiol.*, 4: 509-514.
- COTANCHE, D. A.; PETRELL, A.; PICARD, D. A. (1991). «Structural reorganization of hair cells and supporting cells during noise damage, recovery and regeneration in the chick cochlea». *Ciba Found. Symp.*, 160: 131-142. [Discussió: 142-150]
- DALY, F. J.; SANDELL, J. H. (2000). «Inherited retinal degeneration and apoptosis in mutant zebrafish». *Anat. Rec.*, 258: 145-155.

- DAS, T.; PAYER, B.; CAYOUILLE, M.; HARRIS, W. A. (2003). «*In vivo* time-lapse imaging of cell divisions during neurogenesis in the developing zebrafish retina». *Neuron*, 37: 597-609.
- DRAPER, B. W.; MORCOS, P. A.; KIMMEL, C. B. (2001). «Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown». *Genesis*, 30: 154-156.
- DRIEVER, W. [et al.] (1996). «A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish». *Development*, 123: 37-46.
- DRIEVER, W.; FISHMAN, M. C. (1996). «The zebrafish: heritable disorders in transparent embryos». *J. Clin. Invest.*, 97: 1788-1794.
- ESTIVILL, X.; FORTINA, P.; SURREY, S.; RABIONET, R.; MELCHIONDA, S.; D'AGRUMA, L.; MANSFIELD, E.; RAPPAPORT, E.; GOVEA, N.; MILA, M.; ZELANTE, L.; GASPARINI, P. (1998). «Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness». *Lancet*, 351: 394-398.
- FAN, L.; COLLODI, P. (2006). «Zebrafish embryonic stem cells». *Methods Enzymol.*, 418: 64-77.
- GLEASON, M. R.; NAGIEL, A.; JAMET, S.; VOLOGODSKAIA, M.; LOPEZ-SCHIER, H.; HUDSPETH, A. J. (2009). «The transmembrane inner ear (TMIE) protein is essential for normal hearing and balance in the zebrafish». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 21347-21352.
- GRABHER, C.; JOLY, J. S.; WITTBRODT, J. (2004). «Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease I-SceI». *Methods Cell Biol.*, 77: 381-401.
- GRUNWALD, D. J.; KIMMEL, C. B.; WESTERFIELD, M.; WALKER, C.; STREISINGER, G. (1988). «A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish». *Dev. Biol.*, 126: 115-128.
- GUYON, J. R.; STEFFEN, L. S.; HOWELL, M. H.; PUSACK, T. J.; LAWRENCE, C.; KUNKEL, L. M. (2007). «Modeling human muscle disease in zebrafish». *Biochim. Biophys. Acta*, 1772: 205-215.
- HAFFTER, P. [et al.] (1996). «The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*». *Development*, 123: 1-36.
- HAFFTER, P.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. (1996). «Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish». *Int. J. Dev. Biol.*, 40: 221-227.
- HILGERT, N.; SMITH, R. J. VAN; CAMP, G. (2009). «Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes». *Curr. Mol. Med.*, 9: 546-564.
- HIRSCH, E. C. (2006). «How to judge animal models of Parkinson's disease in terms of neuroprotection». *J. Neural. Transm., suppl.*: 255-260.
- HIRSCH, E. C. (2007). «Animal models in neurodegenerative diseases». *J. Neur. Transm., suppl.*: 87-90.
- HIRSCH, E. C. [et al.] (2003). «Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update». *J. Neural. Transm., suppl.*: 89-100.
- HUDSPETH, A. J. (2000). «Hearing and deafness». *Neurobiol. Dis.*, 7: 511-514.
- INGHAM, P. W. (2009). «The power of the zebrafish for disease analysis». *Hum. Mol. Genet.*, 18: R107-112.
- JESSEN, J. R.; MENG, A.; MCFARLANE, R. J.; PAW, B. H.; ZON, L. I.; SMITH, G. R.; LIN, S. (1998). «Modification of bacterial artificial chromosomes through chi-stimulated homologous recombination and its application in zebrafish transgenesis». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5121-5126.
- JING, X.; MALICKI, J. (2009). «Zebrafish *ale oko*, an essential determinant of sensory neuron survival and the polarity of retinal radial glia, encodes the p50 subunit of dynactin». *Development*, 136: 2955-2964.
- JONES, J. E.; CORWIN, J. T. (1996). «Regeneration of sensory cells after laser ablation in the lateral line system: hair cell lineage and macrophage behavior revealed by time-lapse video microscopy». *J. Neurosci.*, 16: 649-662.
- KABLI, S.; HE, S.; SPAINK, H. P.; HURLSTONE, A.; JAGALSKA, E. S.; DE GROOT, H. J.; ALIA, A. (2010). «*In vivo* magnetic resonance imaging to detect malignant melanoma in adult zebrafish». *Zebrafish*, 7: 143-148.
- KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. (2007). «Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery». *Clin. Pharmacol. Ther.*, 82: 70-80.
- KARLOVICH, C. A.; JOHN, R. M.; RAMIREZ, L.; STAINIER, D. Y.; MYERS, R. M. (1998). «Characterization of the Huntington's disease (HD) gene homologue in the zebrafish *Danio rerio*». *Gene*, 217: 117-125.
- KASLIN, J.; GANZ, J.; GEFFARTH, M.; GRANDEL, H.; HANS, S.; BRAND, M. (2009). «Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche». *J. Neurosci.*, 29: 6142-6153.
- KAWAKAMI, K. (2004). «Transgenesis and gene trap methods in zebrafish by using the Tol2 transposable element». *Methods Cell Biol.*, 77: 201-222.
- KELLER, E. T.; MURTHA, J. M. (2004). «The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease». *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 138: 335-341.
- KOZLOWSKI, D. J.; WHITFIELD, T. T.; HUKRIEDE, N. A.; LAM, W. K.; WEINBERG, E. S. (2005). «The zebra-

- fish dog-eared mutation disrupts *eya1*, a gene required for cell survival and differentiation in the inner ear and lateral line». *Dev. Biol.*, 277: 27-41.
- LAWSON, N. D.; WEINSTEIN, B. M. (2002). «*In vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish». *Dev. Biol.*, 248: 307-318.
- LI, L.; LI, Y.; CHEN, D.; SHAO, J.; LI, X.; XU, C. (2010). «Fishing for age-related visual system mutants: behavioral screening of retinal degeneration genes in zebrafish». *Curr. Aging. Sci.*, 3: 43-45.
- LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. (2007). «Animal models of human disease: zebrafish swim into view». *Nat. Rev. Genet.*, 8: 353-367.
- LINDSAY, J. R. (1973). «Profound childhood deafness. Inner ear pathology». *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 82 (supl. 5): 1-121.
- LYONS, D. A. [et al.] (2005). «*erbb3* and *erbb2* are essential for schwann cell migration and myelination in zebrafish». *Curr. Biol.*, 15: 513-524.
- LYONS, D. A.; NAYLOR, S.; MERCURIO, S.; DOMINGUEZ, C.; TALBOT, W. S. (2008). «KBP is essential for axonal structure, outgrowth and maintenance in zebrafish, providing insight into the cellular basis of Goldberg-Shprintzen syndrome». *Development*, 135: 599-608.
- MACKENZIE, I.; SMITH, A. (2009). «Deafness—the neglected and hidden disability». *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 103: 565-571.
- MALICKI, J.; SCHIER, A. F.; SOLNICA-KREZEL, L.; STEMPLE, D. L.; NEUHAUSS, S. C.; STAINIER, D. Y.; ABDELILAH, S.; RANGINI, Z.; ZWARTKRUIS, F.; DRIEVER, W. (1996). «Mutations affecting development of the zebrafish ear». *Development*, 123: 275-283.
- MCLEAN, D. L.; FETCHO, J. R. (2008). «Using imaging and genetics in zebrafish to study developing spinal circuits *in vivo*». *Dev. Neurobiol.*, 68: 817-834.
- MICHEL, V.; HARDELIN, J. P.; PETIT, C. (2003). «Molecular mechanism of a frequent genetic form of deafness». *N. Engl. J. Med.*, 349: 716-717.
- MITCHEM, K. L. [et al.] (2002). «Mutation of the novel gene *Tmie* results in sensory cell defects in the inner ear of spinner, a mouse model of human hearing loss DFNB6». *Hum. Mol. Genet.*, 11: 1887-1898.
- MOENS, C. B.; DONN, T. M.; WOLF-SAXON, E. R.; MA, T. P. (2008). «Reverse genetics in zebrafish by TILLING». *Brief Funct. Genomic Proteomic*, 7: 454-459.
- NAZ, S. [et al.] (2002). «Mutations in a novel gene, *TMIE*, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus». *Am. J. Hum. Genet.*, 71: 632-636.
- NICA, G.; HERZOG, W.; SONNTAG, C.; NOWAK, M.; SCHWARZ, H.; ZAPATA, A. G.; HAMMERSCHMIDT, M. (2006). «*Eya1* is required for lineage-specific differentiation, but not for cell survival in the zebrafish adenohypophysis». *Dev. Biol.*, 292: 189-204.
- NICOLSON, T.; RUSCH, A.; FRIEDRICH, R. W.; GRANATO, M.; RUPPERSBERG, J. P.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. (1998). «Genetic analysis of vertebrate sensory hair cell mechanosensation: the zebrafish circler mutants». *Neuron*, 20: 271-283.
- PAQUET, D. [et al.] (2009). «A zebrafish model of tauopathy allows *in vivo* imaging of neuronal cell death and drug evaluation». *J. Clin. Invest.*, 119: 1382-1395.
- PAQUET, D.; SCHMID, B.; HAASS, C. (2010). «Transgenic zebrafish as a novel animal model to study tauopathies and other neurodegenerative disorders *in vivo*». *Neurodegener. Dis.*, 7: 99-102.
- PENBERTHY, W. T.; SHAFIZADEH, E.; LIN, S. (2002). «The zebrafish as a model for human disease». *Front. Biosci.*, 7: d1439-1453.
- PETIT, C. (1996). «Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand». *Nat. Genet.*, 14: 385-391.
- (2006). «From deafness genes to hearing mechanisms: harmony and counterpoint». *Trends. Mol. Med.*, 12: 57-64.
- PETIT, C.; RICHARDSON, G. P. (2009). «Linking genes underlying deafness to hair-bundle development and function». *Nat. Neurosci.*, 12: 703-710.
- POGODA, H. M. [et al.] (2006). «A genetic screen identifies genes essential for development of myelinated axons in zebrafish». *Dev. Biol.*, 298: 118-131.
- POSS, K. D.; KEATING, M. T.; NECHIPORUK, A. (2003). «Tales of regeneration in zebrafish». *Dev. Dyn.*, 226: 202-210.
- RAMBABU, K. M.; RAO, S. H.; RAO, N. M. (2005). «Efficient expression of transgenes in adult zebrafish by electroporation». *BMC Biotechnol.*, 5: 29.
- RAMESH, T.; LYON, A. N.; PINEDA, R. H.; WANG, C.; JANSSEN, P. M.; CANAN, B. D.; BURGHESE, A. H.; BEATTIE, C. E. (2010). «A genetic model of amyotrophic lateral sclerosis in zebrafish displays phenotypic hallmarks of motoneuron disease». *Dis. Model Mech.* [En premsa]
- RAO, K. D.; ALEX, A.; VERMA, Y.; THAMPI, S.; GUPTA, P. K. (2009). «Real-time *in vivo* imaging of adult zebrafish brain using optical coherence tomography». *J. Biophotonics*, 2: 288-291.
- RAO, N. M.; RAMBABU, K. M.; RAO, S. H. (2008). «Electroporation of adult zebrafish». *Methods Mol. Biol.*, 423: 289-298.

- RITTER, D. A.; BHATT, D. H.; FETCHO, J. R. (2001). «*In vivo* imaging of zebrafish reveals differences in the spinal networks for escape and swimming movements». *J. Neurosci.*, 21: 8956-8965.
- SAGER, J. J.; BAI, Q.; BURTON, E. A. (2010). «Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases». *Brain Struct. Funct.*, 214: 285-302.
- SEILER, C. [et al.] (2004). «Myosin VI is required for structural integrity of the apical surface of sensory hair cells in zebrafish». *Dev. Biol.*, 272: 328-338.
- SOOD, R. [et al.] (2006). «Methods for reverse genetic screening in zebrafish by resequencing and TILLING». *Methods*, 39: 220-227.
- STREISINGER, G.; WALKER, C.; DOWER, N.; KNAUBER, D.; SINGER, F. (1981). «Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*)». *Nature*, 291: 293-296.
- STROME, E. M.; DOUDET, D. J. (2007). «Animal models of neurodegenerative disease: insights from *in vivo* imaging studies». *Mol. Imaging Biol.*, 9: 186-195.
- WALKER, C.; STREISINGER, G. (1983). «Induction of mutations by gamma-rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos». *Genetics*, 103: 125-136.
- WARD, A. C.; LIESCHKE, G. J. (2002). «The zebrafish as a model system for human disease». *Front. Biosci.*, 7:d827-833.
- WHITFIELD, T. T. [et al.] (1996). «Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line». *Development*, 123: 241-254.
- XIA, W. (2010). «Exploring Alzheimer's disease in zebrafish». *J. Alzheimers Dis.*, 20: 981-990.
- ZON, L. I. (1999). «Zebrafish: a new model for human disease». *Genome Res.*, 9: 99-100.