



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS Y MAR Y LIMNOLOGÍA

“El factor transcripcional p63 y la proliferación epidermal durante
el desarrollo larvario de pez cebra”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
Emma Rangel Huerta

Director de Tesis:
Dr. Ernesto Maldonado Olvera
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

COMITÉ TUTORAL:
Dra. Berenice García Ponce de León.
Instituto de Ecología, UNAM

Dra. Susana Castro Obregón
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Quintana Roo. Mayo, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Agradezco al posgrado en Ciencias Biomedicas de la UNAM por aceptarme como estudiante de doctorado.

Agradezco al CONACYT por otorgarme la beca durante mi doctorado.

Doy las gracias al Dr. Ernesto Maldonado-Olvera por aceptarme en su laboratorio y por depositar su confianza en la realización de éste proyecto, así como su apoyo y palabras de aliento para seguir esforzandome y enamorandome de la ciencia.

Agradezco a mi comité tutorial a las Dras, Berenice García Ponce de León y Susana Castro Obregón por sus contribuciones constructivas a mi tesis y su apoyo en la finalización de éste proyecto.

Mi agradecimiento a la Dra. Maribel Hernández Rosales del Langebio-Irapuato, por todo su inmensurable apoyo, comprensión y cariño, a lo largo de mi doctorado

Agradezco a Nydia Hernández-Rios de la Unidad de Microscopia del Instituto e Neurobiología Campus Juriquilla-UNAM por su apoyo y asistencia en el montaje y toma de imágenes.

Doy a gracias a mi familia, mi padre Esteban, mi madre Emma y mi hermana Nelhy por su apoyo y amor incondicional, me considero afortunada que ellos puedan ser parte de mis logros profesionales.

Mi agradecimiento a los integrantes del laboratorio, Dra. Patricia Thome por su apoyo académico y personal, Dra. Tania Islas por su amistad, Raúl, Evelyn y Elizabeth por su comprensión.

Agradezco el excelente apoyo y asistencia en todo momento del personal académico de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales del ICML, de Puerto Morelos: M.C. Fernando Negrete Soto, M.C. Edgar Escalante Mancera, M.I. Miguel Angel Gómez R, M.C. Laura Celis Gutiérrez, Dr. Edén Magaña Gallegos y al M.T.I.A. Gustavo Villareal Brito.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
GRAPHICAL ABSTRACT	8
ABREVIATURAS	9
I. INTRODUCCIÓN	12
1.1. La piel, principal órgano de defensa ante el medio ambiente.	12
1.2. El pez cebra como organismo modelo de estudio.	12
1.3. Desarrollo de la epidermis.	13
1.3.1. Desarrollo de la epidermis en mamíferos.	13
1.3.2. Desarrollo epidermal durante la embriogénesis en pez cebra.	14
1.3.3. Epidermis de pez cebra adulto.	15
1.4. El factor transcripcional p63 es el principal regulador de las células troncales en la epidermis.	16
1.5. Establecimiento de poblaciones celulares con capacidad pluripotencial.	19
1.5.1. Células troncales.	19
1.5.2. Progenitores celulares de SC o Células de Amplificación Transitoria.	19
1.6. Células Troncales y Progenitores Celulares Epidermales.	20
1.7. De la proliferación celular a la diferenciación y estabilidad del factor transcripcional p63. 23	
1.8. Mecanismos de División Asimétrica involucrados en la estratificación epidermal.	23
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
III. JUSTIFICACIÓN	29
IV. OBJETIVOS	30
4.1. OBJETIVO GENERAL	30
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	30
V. MATERIAL Y MÉTODOS	31
5.1. Mantenimiento para crianza y crecimiento de larvas de pez cebra.	31
5.2. Medición de larvas en estadios post-larvarios.	31
5.3. Tinciones histológicas y mediciones de la forma celular.	31
5.4. Inmunofluorescencia y Western Blot.	32

5.5.	Incorporación de EdU y marcajes en secciones histológicas.	35
5.6.	Gráficos y estadísticos.	36
5.7.	Cultivo primario de queratinocitos.	36
5.8.	RT-PCR a partir de larvas de pez cebra.	36
VI.	RESULTADOS.	39
6.1.	El cambio en la forma de las células epidermales contribuye al engrosamiento epidermal.	39
6.2.	Identificación de Poblaciones Celulares Heterogéneas en las capas epidermales basal y suprabasal antes y durante la estratificación.	43
6.3.	p63 y la fosforilación de p63 co-existen durante el engrosamiento epidermal.	54
6.4.	Divisiones asimétricas ocurren durante la estratificación.	57
6.5.	Signos de la diferenciación celular durante la estratificación epidermal.	64
VII.	DISCUSION.	67
7.1.	El papel de las Células troncales y Progenitores epidermales durante la estratificación de la epidermis.	67
7.2.	Divisiones asimétricas y expresión de Notch forman parte de la estratificación epidermal.	72
VIII.	CONCLUSIONES.	78
IX.	PERSPECTIVAS.	80
X.	BIBLIOGRAFÍA.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación morfológica entre la epidermis de mamíferos y peces.	13
Figura 2. Regionalización en un embrión de pez cebra en la etapa de blástula.	14
Figura 3. Esquema de la estructura del gen p63.....	17
Figura 4. La relación de p63 con sus blancos transcripcionales.....	18
Figura 5. Modelos de división celular en condición de homeostasis propuestos para Células Troncales, Células de Amplificación Transitoria y Células Progenitoras.....	22
Figura 6. Modelo de la estratificación epidermal, a través de divisiones asimétricas propuesto por Byrd et al.	24
Figura 7. Esquemas de los complejos de polaridad que participan en división asimétrica.....	26
Figura 8. Cambios morfológicos a nivel celular y tisular de la epidermis durante el desarrollo post-larvario en el pez cebra.	41
Figura 9. Proliferación celular y distribución de dos tipos celulares (EpSCs y PCs) en etapas iniciales de la estratificación epidermal.....	45
Figura 10. Distribución de poblaciones celulares troncales y progenitoras durante la estratificación epidermal.	47
Figura 11. Detección por EdU y anti-p63 de diferentes tipos celulares durante las etapas iniciales de la estratificación epidermal.....	49
Figura 12. Identificación de una población de LRCs y su dinámica durante las etapas post-larvarias de pez cebra.	52
Figura 13. Presencia de p63 fosforilado en EpSCs y PCs en la epidermis y su distribución en cultivo primario de queratinocitos de pez cebra.	55
Figura 14. Diferencias en la distribución de componentes del complejo de división asimétrica (Par3, LGN y NuMA) en las EpSCs antes y durante la estratificación de la epidermis en el pez cebra.	60
Figura 15. Orientación heterogénea de la luna creciente con los componentes del complejo de división asimétrica en la epidermis de larvas de 8 mm SL.	62
Figura 16. Expresión diferencial de los genes Notch de pez cebra durante las etapas post-larvarias.	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Complejos que establecen la polaridad ápico-basal en epitelios y que participan en la división asimétrica.....	25
Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las inmunofluorescencias.	33
Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el Western Blot.	35
Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos para la amplificación de los genes Notch.....	38
Tabla 5. EpSCs y PCs presentes en la pre-estratificación epidermal.	44
Tabla 6. Resumen de los diferentes tipos celulares que participan en la estratificación epidermal.	65

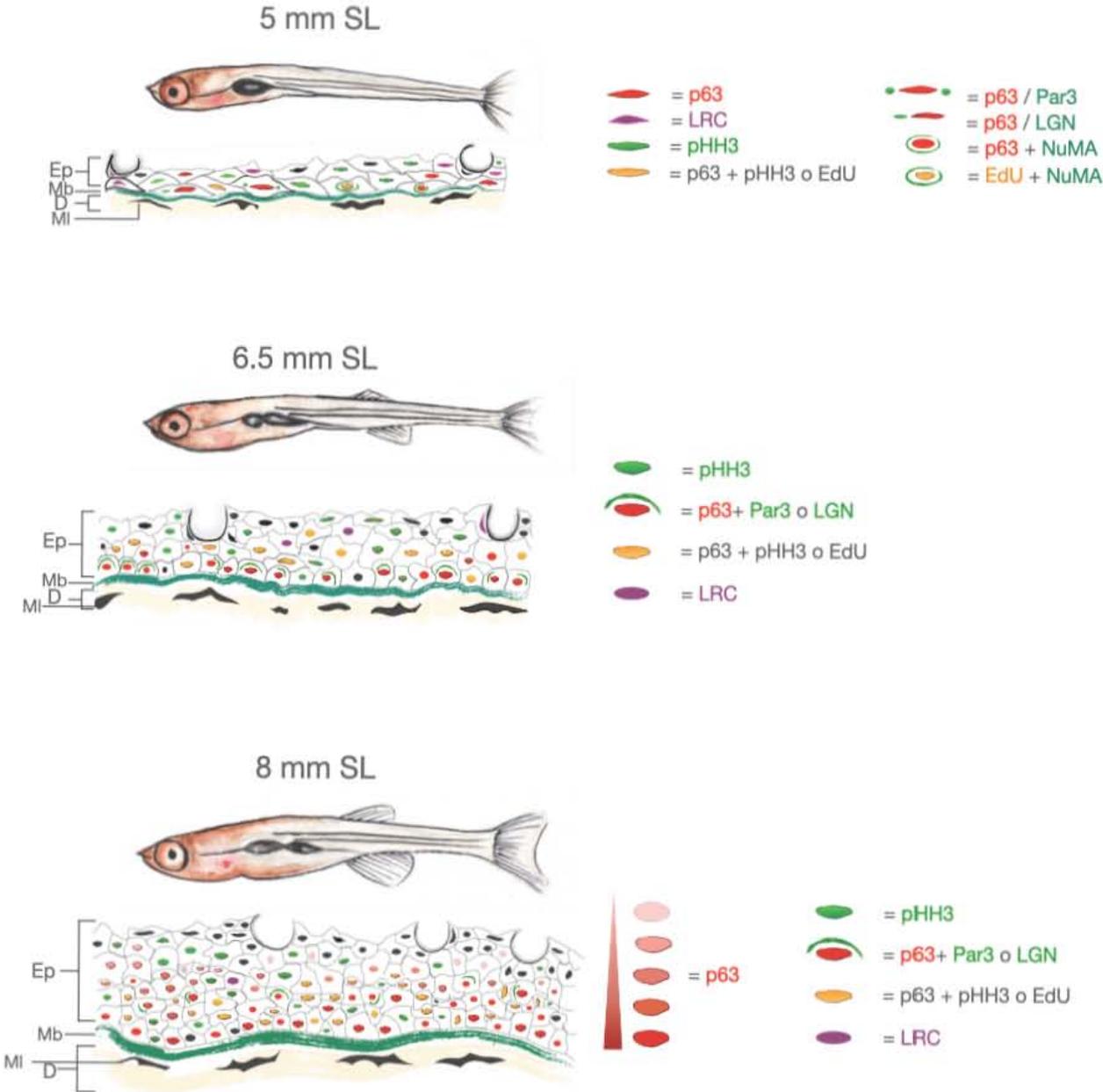
RESUMEN

La epidermis ha funcionado como una barrera de defensa en los animales a lo largo de su evolución. Durante el desarrollo post-larvario, la epidermis de pez cebra se engrosa través de la estratificación o adición de nuevas capas celulares, un evento que ocurre en los estadios de 5 a 8 mm de Longitud estándar (por las siglas en inglés *Standard Length*, SL). Para llevar a cabo este proceso, son esenciales las células troncales epidermales, las cuales expresan el factor transcripcional p63. La estratificación epidermal en larvas de pez cebra es un sistema adecuado y atractivo para estudiar cómo las células troncales participan en la formación y el crecimiento de los órganos. Nosotros encontramos que la estratificación epidermal es una consecuencia de dos eventos, cambios en la forma y en la proliferación celular. Primero identificamos dos subpoblaciones de células epidermales. Una de ellas, compuesta por células troncales basales, en un estado quiescente y expresando altos niveles de p63, mientras que la otra subpoblación de células epidermales mostró ser altamente proliferativa, con niveles bajos o nulos de p63 localizada en capas basales o suprabasales de la epidermis. Consistentemente estos dos tipos celulares se encontraron contiguos, lo que sugiere que tienen un origen común. Una tercera subpoblación fue detectada por incorporación de EdU en el DNA por experimentos de pulso y caza. Estas células permanecieron quiescentes de los 6 días post-fertilización hasta 5 – 8 mm SL y no expresan p63. Todos estos tipos celulares son parte de la dinámica de la estratificación epidermal. Adicionalmente, describimos distintos mecanismos que participan en el proceso de estratificación, incluyendo la proliferación celular, la fosforilación de p63 y la división asimétrica de células troncales. Nos enfocamos en los patrones de expresión intracelular de proteínas involucradas en la división asimétrica, como as Par3, LGN, NuMA e Insc. En la etapa de pre-estratificación (5 mm SL), Par3 y LGN muestran una distribución uni-lateral y bilateral sugiriendo su participación en divisiones celulares laterales. Después, durante el pico de la estratificación (6.5 mm SL), estas proteínas se distribuyen en forma de luna creciente en la zona apical de las células basales epidermales, que es típico de divisiones asimétricas. A los 8 mm SL detectamos a Par3 y a Insc en patrones de división asimétrica, expresando también p63, pero solo en células localizadas en capas suprabasales y reflejando divisiones celulares con orientaciones heterogéneas. También observamos la expresión de diferentes genes Notch entre 5 a 8 mm SL, sugiriendo que estos genes pudieran participar en diferenciación celular durante la estratificación epidermal de pez cebra, como se ha observado en otros organismos.

ABSTRACT

The epidermis, as a defensive barrier, is one consistent trait throughout animal evolution. During post-larval development, the zebrafish epidermis thickens by stratification or the addition of new cell layers at the stages of 5 to 8 mm of Standard Length (SL). Essential for this process are the epidermal basal stem cells, that express the transcription factor p63. The epidermal stratification, that takes place during zebrafish post-larval development, is a tractable system to study how stem cells participate in organ growth. In this work we found that epidermis stratification is the consequence of two events, changes in cell shape and active cell proliferation. First, we detected two different subpopulation of epidermal cells. One of them was composed by basal stem cells in a quiescent state that express high levels of p63, while the other subpopulation of epidermal cells was highly proliferative, with low or null levels of p63, and located at both basal and suprabasal layers. We often found these two cell types contiguous suggesting a common origin. A third subpopulation was detected by EdU incorporation into DNA in pulse-chase experiments. These cells were quiescent from 6 days post-fertilization to 5 – 8 mm SL, and do not express p63. All these epidermal cell types seem to be part of the dynamics of epidermal stratification. Additionally, we described different mechanisms that participate in the stratification process, including, cell proliferation, p63 stability, and asymmetric cell division from stem cells. We focus on the intracellular expression patterns of proteins involved in asymmetric cell division as Par3, LGN, NuMA and Insc. At the pre-stratification stage (5 mm SL) Par3 and LGN shows an unilateral and bilateral distribution suggesting lateral divisions. Thereafter, at the peak of stratification (6.5 mm SL), these proteins distribute in a crescent-moon shape located at the apical region of epidermal basal cells, suggesting that these cells divided by asymmetric divisions. At 8 mm SL we detected Par3 and Insc in the asymmetric cell division pattern (crescent moon-shape) but in suprabasal layers, in cells expressing p63 but in orientations that are heterogenous. We also observed the expression of different Notch genes at 5, 6.5 and 8 mm SL concluding that this pathway may participate in cell differentiation during epidermal stratification in zebrafish, in the same way as it has been observed in other organisms.

GRAPHICAL ABSTRACT



ABREVIATURAS

aPKC	Atypical protein kinase C
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
Cb	Células basales
CC	Coiled-coils domain
CD	Células diferenciadas
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
Crbs	Crumbs
Csb	Células suprabasales
Cx	Células externas
D	Dermis
DBD	Dominio de unión a DNA
Dlg	Discs Large
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
dpf	días post-fertilización
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
Ep	Epidermis
EpSCs	Epidemal Stem Cells – Células Troncales Epidermales
EPU	Epidermal Proliferative Units – Unidades de Proliferación Epidermal
EVL	Enveloping Layer - Capa envolvente
FHA	Forkhead-associated domain
GK	Guanylate kinase
GL	GoLoco domain
HKs	Cultivo primario de queratinocitos humanos
HPD	Homeo-prospero domain
hpf	horas post-fertilización
hrs	horas
Insc	Inscuteable spindle orientation adaptor protein
JNK	Jun N-terminal
KO	Knockout
K14	Citoqueratina-14

K1	Citoqueratina-1
KIF13B	Kinesin family member 13B,
<i>lgfbp2</i>	<i>insulin-like growth factor-binding protein2</i>
Lgl	Lethal 2 giant larvae
LGN	Leu-Gly-Asn repeat protein (gen GPSM2)
LRCs	Label Retaining Cells - Células con Retención de Marcaje
M	Músculo
Mb	Membrana basal
Mc	Célula mucosa
Ml	Melanocitos
mm	milímetros
µm	micras
MT	Microtúbulos
Myo6	Myosin-VI protein
NBT	nitro-blue tetrazolio
NIH	United States National Institutes of Health
NTD	Nuclear transfer domain
NudE	Nuclear distribution protein nudE homolog
NuMA	Nuclear Mitotic Apparatus Protein 1
Numb	Partner of numb protein
OD	dominio de oligomerización
OLAW	Office of Laboratory Animal Welfare
Pals1	Protein associated with Lin-7
Par3	Partitioning defective 3 homolog
Patj	Pals1-associated tight junction
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCP	planar cell polarity
PCs	Progenitors Cells – Progenitores celulares
PDZ	Dlg homologous region
pHH3	Fosfo-Histona-3
Plk1	Polo-like kinase

P-p63	p63-fosforilado
Prox1	Prospero Homeobox 1
PTB	phosphotyrosine binding domain
RBD	RNA binding domain
SAM	dominio alfa estéril,
SC	Stem Cells - Células Troncales
Scrib	Scribble
SEM	Standard error of the mean
<i>Sfrp1</i>	<i>secreted frizzled-related protein 1</i>
SH3	Src homology 3
<i>Shha</i>	Sonic hedgehog-a
SL	Standard Length - Longitud estándar
RT	Transcriptasa reversa
STAU1	Staufen protein
TA	Dominio de Transactivación
TACs	Transit-Amplifying Cells - Células de Amplificación Transitoria
TAp63	Isoforma p63 con dominio de transactivación
Δ Np63	Isoforma de p63 sin dominio de transactivación
TI	Dominio inhibidor de la transcripción
TPR	Tetratricopeptide repeats
Trim32	Tripartite motif protein.
Wnt	Wingless and Int-1
ZIRC	Zebrafish International Resource Center

I. INTRODUCCIÓN

1.1. La piel, principal órgano de defensa ante el medio ambiente.

La piel ha sido el órgano más grande del cuerpo durante la historia evolutiva de los animales. La piel no sólo es la principal barrera que protege al cuerpo de la deshidratación, traumas mecánicos e infecciones bacterianas, sino es esencial para la sobrevivencia. Su origen embrionario está conservado entre las especies; sin embargo, su morfología y sus funciones pueden ser altamente diversas entre los animales [1, 2]. Su complejidad y composición celular depende de las interacciones del organismo y su medio ambiente [2, 3] al punto que, en algunos casos incluso se han convertido en armaduras como en los cocodrilos y tortugas [4, 5]. La piel se divide en tres capas siendo la epidermis la más externa seguida de la dermis y la hipodermis. La epidermis y la dermis están separadas por una membrana basal y una matriz extracelular de colágena [6].

La epidermis es un epitelio muy especializado con una organización estratificada, el cual constantemente se encuentra en transición y mantiene una alta tasa de división celular, esta cualidad provee un sistema accesible para estudiar las propiedades de las células troncales (*Stem Cells*, SCs). Los queratinocitos son las células más abundantes en la epidermis y alteraciones o defectos durante su formación lleva a la generación de tumores epidermales o carcinomas [7, 8]. Diversos estudios sobre las SCs epidermales han estado encaminados a encontrar marcadores moleculares para identificar subpoblaciones de SCs y de su progenie. Así como también determinar la localización de diferentes nichos y describir las vías que regulan la proliferación y la diferenciación de las SCs. Dicho conocimiento será útil en diseñar terapias alternativas para pacientes con diversas patologías tales como psoriasis o cáncer [9].

1.2. El pez cebra como organismo modelo de estudio.

El pez cebra (*Danio rerio*) es un miembro de los peces teleosteos (peces que tienen un esqueleto osificado) y tienen una divergencia evolutiva con los animales terrestres de 400 millones de años. El pez cebra es un pequeño organismo de agua dulce, utilizado como modelo de estudio en biología del desarrollo. Una comparación con el genoma humano reveló que aproximadamente el 70% de nuestros genes se encuentran en pez cebra y cerca del 84% de los genes que causan enfermedades en humanos presenta un gen ortólogo en dicho modelo [10]. Algunas ventajas de utilizar a pez cebra como modelo de estudio es que presentan un rápido desarrollo, los embriones de pez cebra

son transparentes, se desarrollan externamente, tienen alta fecundidad y actualmente su genoma se encuentra secuenciado. El pez cebra es un sistema genético muy útil, hay diversas mutantes con defectos epidermales; todas estas cualidades hacen del pez cebra un organismo modelo ideal para estudiar la formación de la epidermis [11, 12].

1.3. Desarrollo de la epidermis.

1.3.1. Desarrollo de la epidermis en mamíferos.

En el ratón se ha establecido que la epidermis se forma en aproximadamente 10 días (entre los estadios E8.5 y E18.5). Inicialmente las células del ectodermo no-neural adquieren un destino epidermal y forman una capa de células basales que eventualmente dan origen a una segunda capa de células denominada peridermis. La formación de los estratos epidermales comienza a partir de la proliferación de las células basales que son consideradas SCs, las cuales se pueden identificar porque expresan al factor transcripcional p63. Posteriormente se forman las capas intermedias. La maduración de las células suprabasales da lugar a las células espinosas, las células granulares y las células cornificadas. El estrato córneo es la capa más externa de la epidermis y se desprende continuamente, así se forma una barrera epidermal compuesta principalmente de proteínas entrelazadas a una capa de lípidos que evita la deshidratación (Figura 1A) [7]. El tiempo que le toma a la progenie de las células basales en diferenciarse y alcanzar la superficie es de aproximadamente 28 días en humano y 9 días en ratón.

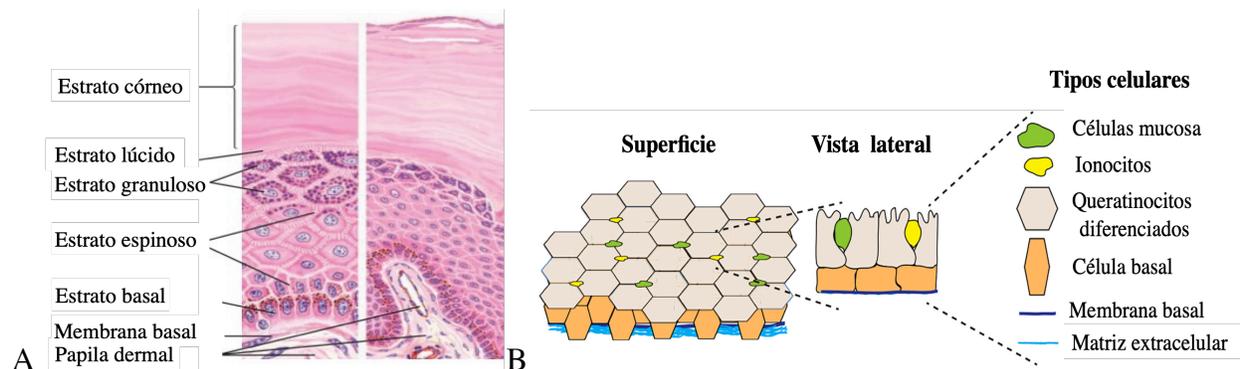


Figura 1. Comparación morfológica entre la epidermis de mamíferos y peces. A, Organización de la epidermis en mamíferos, la membrana basal separa la dermis de la epidermis, sobre la membrana basal se

encuentra la capa de células basales, seguida de la capa de células espinosas, el estrato granular y en la parte más superficial se localiza el estrato córneo, el cual se descama continuamente. **B**, Esquema de epidermis de pez cebra formada por dos capas de células durante las etapas de desarrollo embrionario y larvaria temprana. Las células basales se encuentran sobre la membrana basal y en la capa externa se localizan diferentes tipos de células especializadas. Tanto en mamíferos como en peces las células basales son consideradas células troncales.

1.3.2. Desarrollo epidermal durante la embriogénesis en pez cebra.

Durante el desarrollo embrionario de pez cebra, en la etapa de blástula ocurren eventos importantes, tales como: la epibolia, la transición *midblastula* (donde inicia la transcripción de genes cigóticos) y la formación de la capa sincicial del vitelo. Los blastómeros externos comienzan a formar la capa envolvente denominada EVL (por sus siglas en inglés *Enveloping Layer*), descrita como un peridermo transitorio (Figura 2B) [13-15]. Durante la fase de gastrulación las células profundas del blastodermo (*Deep cells*) localizadas cerca del polo animal, dan lugar a la epidermis como parte del ectodermo no-neural (Figura 2B) [11], e inician la expresión del marcador epidermal p63 [16, 17].

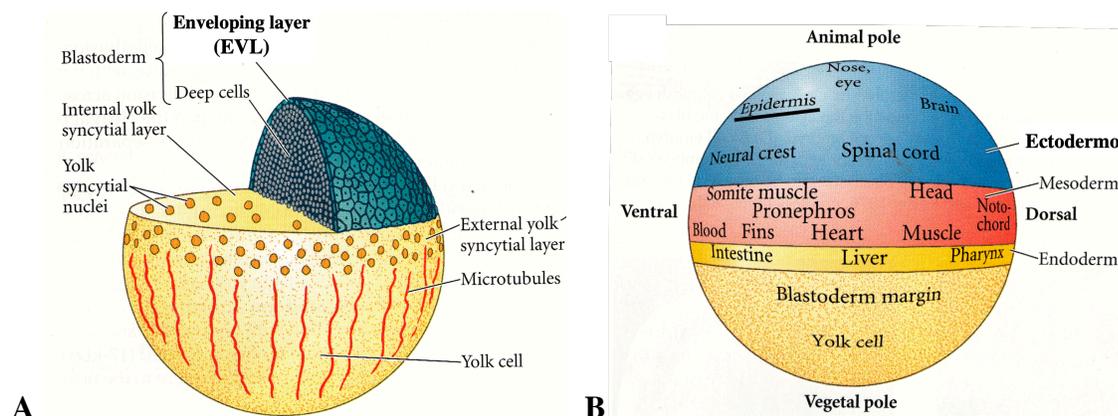


Figura 2. Regionalización en un embrión de pez cebra en la etapa de blástula. **A**, Antes de la gastrulación, las células profundas se encuentran rodeadas de la capa envolvente (EVL), la superficie del vitelo se encuentran los núcleos de la capa sincicial del vitelo. **B**, Mapa esquemático del destino final de las células profundas de un embrión de pez cebra, las regiones que darán lugar a los órganos se encuentran marcadas. Imágenes tomadas de [18].

A las 24 horas post-fertilización (hpf), la epidermis se encuentra formada por solo dos capas: la EVL que da lugar a la capa externa y la capa basal. Ésto contrasta con la epidermis de un pez adulto, que presenta entre 6 a 10 capas de células, lo cual varía entre las partes ventrales y las diferentes regiones del tronco. La expresión de p63 está restringida a las células basales y ausente en la EVL. Hay trabajos recientes que muestran que al mes de edad, la EVL se pierde y es remplazado por una población derivada de los progenitores basales, similar a la epidermis de mamíferos [15, 19].

1.3.3. Epidermis de pez cebra adulto.

La estructura y función de la piel de pez cebra tiene varias similitudes con la de vertebrados. Como en los mamíferos, la piel de este pez está compuesta de una capa dermal y una epidermis superficial. De la misma forma, el destino de la epidermis durante la embriogénesis es establecida por la expresión del factor transcripcional p63 [20-23]. Así mismo, existen diferencias morfológicas entre la epidermis de los peces y mamíferos que son consecuencia de los diferentes ambientes que habitan [16]. La epidermis de los teleósteos puede ser subdividida en capa basal, intermedia y superficial. La capa intermedia está compuesta de células altamente especializadas, incluyendo cinco tipos de ionocitos [24], células de Langerhans [25], metafocitos presentadores de antígenos [26] y neuronas HCS, que sensan la dinámica de fluidos [3] (Figura 1B). Diversas mutantes en pez cebra han revelado algunos genes que participan en el mantenimiento, morfogénesis, integridad y homeostasis de la epidermis; entre los genes se incluyen determinantes de la polaridad celular como *penner*, componentes de uniones celulares como E-caderina y reguladores de la proliferación celular como p63. Así mismo, genes como *romeharsha*, *clint1*, involucrados en el transporte intracelular de vacuolas, aparentemente tienen un papel crucial en el mantenimiento de la epidermis del pez cebra. La pérdida de función de ambos genes junto con el gen *goosepimples*, llevan a un incremento en el flujo de la membrana plasmática debido al incremento de endocitosis y acumulación de lisosomas, provocando disminución en el tamaño celular, particularmente en las células que conforman el EVL generando disminución en el área de superficie. La reducción en el área de la superficie del EVL es compensada por el incremento en la proliferación celular de las células basales, como un mecanismo compensatorio para mantener la integridad del tejido. Sin embargo, las diferencias en el tamaño celular y su relación con la

proliferación celular producidas por las alteraciones en el transporte intracelular, aún no están del todo claro [27].

Estudios de ganancia y pérdida de función empleando morfolidos (oligómeros antisentido de cadenas modificadas de DNA) han establecido que los ionocitos y los queratinocitos son derivados del mismo precursor epidermal, el cual expresa la isoforma $\Delta Np63$ del factor transcripcional p63. Así mismo, se ha determinado que la diferenciación de los ionocitos es independiente de $\Delta Np63$ y es dirigida por la vía de señalización de Notch y los factores transcripcionales de cajas tipo Forkhead *Foxi3a* y *Foxi3b* [16, 28].

En las etapas post-larvianas es difícil seguir el desarrollo basándose solamente en la edad de los peces, dada la variabilidad en la velocidad para desarrollarse. Se ha establecido Longitud Estándar (por las siglas en inglés de *Standard Length*, SL) como una medida de tamaño, que es el mejor indicador del progreso del desarrollo en etapas post-larvianas [29]. Como antecedente previo en nuestro laboratorio, se identificaron las etapas post-larvianas donde ocurre la estratificación y que se relacionan con un aumento en la tasa de proliferación celular [19].

1.4. El factor transcripcional p63 es el principal regulador de las células troncales en la epidermis.

El factor transcripcional p63 es miembro de la familia de factores de transcripción p53, que consiste en tres genes p53, p63 y p73. La proteína p63 es compleja e interesante ya que tiene varias funciones que dependen de variaciones en su transcripción, tiene dos promotores alternos que dan lugar a las isoformas TAp63 y $\Delta Np63$, que a su vez generan otros transcritos por escisión alternativa (en inglés “*alternative splicing*”) generando las isoformas $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$, $-\delta$ y $-\epsilon$ con y sin dominio de transactivación [30]. Las 10 isoformas contienen el dominio de unión a DNA (DBD) y el dominio de oligomerización (OD). Las isoformas- α adicionalmente contienen un motivo alfa estéril (SAM ó dominio de interacción proteína-proteína) y un dominio de inhibición de la transcripción (TI). Las isoformas- β presentan un segundo dominio transactivación (TA2) que se encuentra en el exón 11. Traducción de las isoformas- δ generan proteínas que termina a la mitad

del TA2 y finalmente las isoformas-ε resultan en la prematura transcripción en el exón 10, después del dominio de oligomerización, (Figura 3) [30].

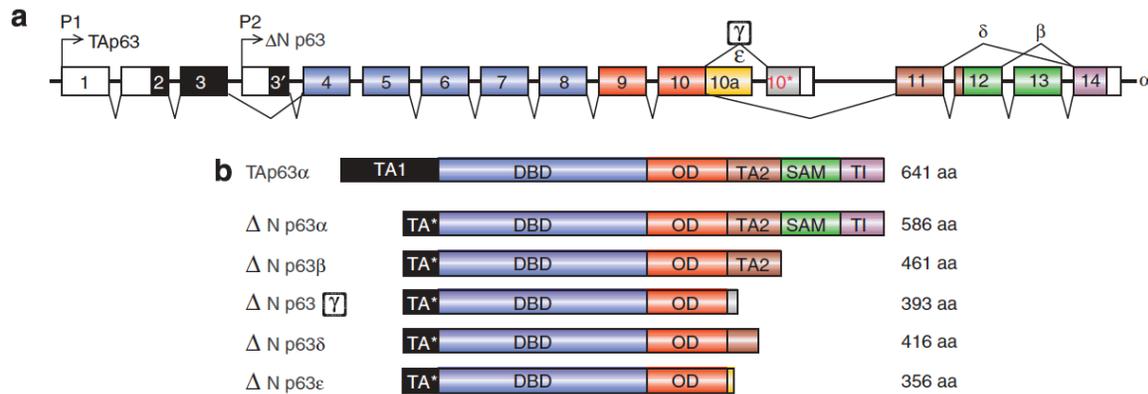


Figura 3. Esquema de la estructura del gen p63. **A**, Representación esquemática de la organización del gen p63 en exones-intrones y eventos alternativos de escisión. Promotores alternativos usados, P1 para generar la isoforma TAp63 y P2 para generar la isoforma ΔNp63. **B**, Esquema de las isoformas TAp63 y ΔNp63 y sus respectivos dominios. Además, existen cinco isoformas con diferentes extremos-carboxilo que son resultado de escisión alternativa. TA: Dominio de transactivación, DBD: dominio de unión a DNA, OD: dominio de oligomerización, SAM: dominio alfa estéril, TI: dominio inhibidor de la transcripción [30].

Durante la morfogénesis epidermal, la isoforma ΔNp63-α reveló altos niveles de expresión en las SC en la capa basal y su progenie, en donde su expresión es necesaria para mantener el potencial de proliferación celular [15, 31-33]. Así mismo se ha propuesto a ΔNp63-α como una isoforma de p63 con funciones de un factor dominante – negativo, ya que tiene la habilidad de bloquear la transactivación de TAP63, p53 o genes relacionados a p73 [21]. Tanto TAp63-α y ΔNp63-α tienen funciones antagónicas; mientras que ΔNp63-α mantiene a las células como troncales y tiene una alta expresión en las SCs de tejidos epiteliales, TAp63-α induce apoptosis en estas [34, 35].

La relevancia del factor transcripcional p63 fue evidenciada con ratones knockout (KO) los cuales carecían de estratificación epidermal y la falta de estructuras como dientes, folículos pilosos y glándulas mamarias [36]. La epidermis de los ratones p63 ^{-/-} consistía en una sola capa celular y

y carecía de la expresión de marcadores de diferenciación como Citoqueratina- 5 y 14 (K15 y K14, respectivamente). La pérdida de la estratificación y la ausencia de la barrera epidermal resultó en la deshidratación y muerte temprana de los animales. Así mismo se ha demostrado que el factor transcripcional p63 actúa a través de sus genes blanco para dirigir y controlar la especificación y el desarrollo de epitelios, actuando en distintos mecanismos como son el crecimiento celular, proliferación, apoptosis y la diferenciación celular (Figura 4) [37, 38].

El fenotipo del KO $\Delta Np63$, reveló defectos similares a los reportados en ratones KO del gene p63; tales como: defectos en la piel, defectos epitelios de la cavidad oral y glándulas mamarias, extremidades truncadas y anomalía en el desarrollo craneofacial [39]. El KO en ratón de la isoforma TAp63 (delatando los exones 2 y 3) mostró, una morfogénesis epidermal normal y desarrollo normal de extremidades [40]; indicando que las isoformas $\Delta Np63$ tienen una mayor distribución en los epitelios y un papel relevante durante el desarrollo embrionario [41].

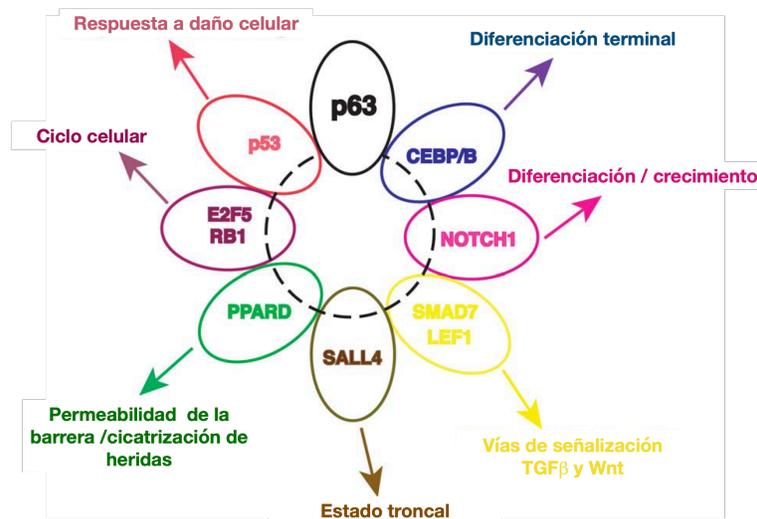


Figura 4. La relación de p63 con sus blancos transcripcionales. Representación esquemática de la interacción funcional de p63 y algunos de sus blancos transcripcionales para dirigir distintas vías de señalización y funciones de la piel [38].

1.5. Establecimiento de poblaciones celulares con capacidad pluripotencial.

Es importante definir las características de las poblaciones celulares que nos permitan comprender su comportamiento e implicaciones en un tejido. Autores como L.G. Lajtha desde los años 60s a 80s junto con C.S. Potten en los 80s y 90s se han enfocado en definir las poblaciones celulares, en diferentes tejidos y que son pluripotenciales. A continuación, describiremos principalmente las poblaciones de SCs y progenitores celulares (PCs) de acuerdo a dichos autores [42-44].

1.5.1. Células troncales.

Las células tipo SC se pueden definir a partir de las siguientes características: a) deben ser células indiferenciadas, b) mantenerse quiescentes o ser capaces de proliferar, c) ellas mismas pueden autorenovarse y mantener la población de células SCs, d) al mismo tiempo tienen la capacidad de producir un gran número de células diferenciadas, una progenie funcional y por esta misma propiedad ser capaces de regenerar tejidos dañados [43].

1.5.2. Progenitores celulares de SC o Células de Amplificación Transitoria.

Laszlo G. Lajtha postuló en 1979, la existencia de “células transitorias” diferentes a las SCs, que eran producidas como poblaciones celulares de corta vida. El “tiempo de transición” fue definido como un proceso de maduración que limita su capacidad de proliferación [44]. Así mismo M. Loeffler y C. S. Potten en 1997, establecieron los criterios que definen a las TACs y que son los siguientes: a) las TACs comienzan a expresar marcadores de diferenciación durante sus divisiones celulares, b) tienen una alta tasa de proliferación celular, c) no pueden auto-renovarse, d) son capaces de producir numerosas células diferenciadas, e) estos progenitores celulares son temporalmente capaces de regenerar un tejido dañado; sin embargo, no una regeneración a largo plazo, f) una característica esencial de las TACs es que su transición a células diferenciadas o maduración es irreversible [43].

Básicamente las TACs funcionan como una maquinaria de amplificación generando numerosas células diferenciadas a partir de pocas SCs que inician el sistema de amplificación. Sin embargo, no se sabe ¿Cómo es su regulación?, ¿Qué determina el número de generaciones transitorias?, ¿Sí

existe un reloj interno de la célula que contabiliza su número total de divisiones celulares antes de diferenciarse? y ¿Qué señales externas restringen su potencial de proliferación?

Aunque, algunos autores no están de acuerdo y contradicen el modelo de homeostasis epidermal propuesto por C.S. Potten, donde establece que las SCs basales soportan la unidad clonal de TACs y células diferenciadas, formando las unidades proliferativas epidermales (Figura 5A) [45].

En el 2007, Clayton, E., Jones P.H. y colaboradores [46, 47] en base a sus experimentos de seguimiento de linaje celular, convencionales histologías y reconstrucciones de imágenes confocales, en la epidermis de la cola de ratones transgénicos; observaron una gran cantidad de células en proliferación en el plano basal identificándolos como PCs destinados a un número ilimitado de divisiones celulares antes de diferenciarse; permitiendo mantener la homeostasis epidermal sin necesidad de reclutar SC en cada división.

Los autores predicen tres posibles destinos de los PCs en base a las probabilidades, que tienen de entrar a tres destinos celulares: 1) el 8% de probabilidad que ambas células pueden permanecer proliferando, 2) el 8% de probabilidad que ambas pueden diferenciarse y convertirse en células post-mitóticas y 3) el 84% que una hija puede mantenerse proliferando y la otra se convierta en post-mitótica (Figura 5B). Concluyendo que una población de PCs con un ilimitado potencial de proliferación son los que mantienen la homeóstasis epidermal en adultos [46, 47]. Varios de estos comportamientos celulares difieren de los esperados para las TACs.

Así mismo distintos autores suelen describir a las TACs como las células hijas de las SC o PC, estableciéndolas como poblaciones pluripotentes que dan lugar a la población de células terminalmente diferenciadas [48-50]. Esa es la razón principal que en los resultados de este trabajo preferimos emplear el término progenitores celulares (PCs) en lugar de TACs.

1.6. Células Troncales y Progenitores Celulares Epidermales.

En la epidermis existen diferentes subpoblaciones de queratinocitos que pueden ser distinguidos por su localización en el tejido, morfología y también por su potencialidad, es decir que tienen la

capacidad de dar lugar a varios tipos celulares. Para la formación correcta de la epidermis es necesario un balance adecuado entre proliferación y diferenciación celular [51, 52].

Las poblaciones de SCs y PCs son críticas para una continua regeneración de la epidermis. Se ha propuesto un modelo en el cual, el mantenimiento de la homeostasis epidermal depende de divisiones asimétricas de las SCs. En este modelo las SCs se dividen para dar lugar a una célula hija idéntica y otra célula hija con características de PC, la cual está destinada a diferenciarse (Figura 5A) [53, 54]. Sin embargo, ha sido difícil diferenciar entre ambas poblaciones debido a la falta de marcadores específicos, aún cuando se reconoce que tienen propiedades diferentes [23, 55].

La principal función de la capa basal es producir queratinocitos destinados a diferenciarse, con la finalidad de generar una epidermis mecánicamente estable y funcional. Los estratos epidermales están dados por la posición que ocupan las células y a los cambios morfológicos asociados a la expresión de queratinas como marcadores de diferenciación en los queratinocitos [7].

En el ratón, se sabe que durante la morfogénesis epidermal, el mantenimiento de la capa basal es controlado en parte por Δ NP63- α , que mantienen la expresión de K14 y el potencial de proliferación de los queratinocitos. Adicionalmente Δ NP63- α junto con componentes de la vía de Notch, inducen la expresión de Citoqueratina-1 (K1) en queratinocitos suprabasales [56]. La maduración de las células intermedias a células espinosas es asociada con la salida del ciclo celular controlada por ciertos factores transcripcionales tales como, IRF6, 14-3-3 σ , IKKa y Ovol1 [57, 58]. Los queratinocitos espinosos post-mitóticos se diferencian en queratinocitos granulares, controlado principalmente por señales de calcio que activan a proteínas Quinasa C, la cual controla la formación de las células granulares [59]. Finalmente la formación de la barrera epidermal requiere de células de adhesión, así como la expresión de genes involucrados en la síntesis y metabolismo de lípidos [7].

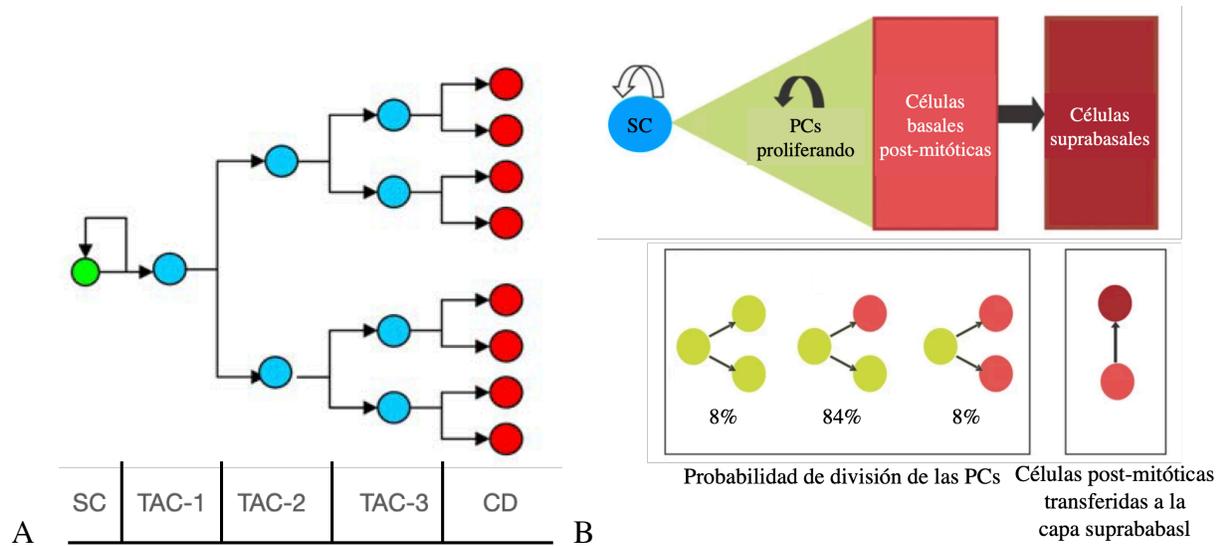


Figura 5. Modelos de división celular en condición de homeostasis propuestos para Células Troncales, Células de Amplificación Transitoria y Células Progenitoras. **A**, Modelo propuesto por Potten en 1983 [60], para el mantenimiento de las Unidades Epidermales Proliferativas derivadas a partir de una división de SCs; la división de una SC (círculo verde) genera una SC y la primer generación de TACs (TAC-1, círculos azules). La TAC-1 entonces se divide simétricamente para generar la segunda generación de TACs (TAC-2), la cual entonces produce la tercera generación (TAC-3). Las TACs-3 entonces se diferencian en células post-mitóticas las cuales salen de la capa basal y migran hacia las capas superiores (círculos rojos). **B**, Modelo propuesto, en el 2007 por Clayton E., sobre el destino del compartimento de los progenitores epidermales. La población de PCs con un ilimitado potencial de auto renovación, mantienen la homeostasis de la epidermis (triángulo verde). Las células post-mitóticas en la capa basal (rojo claro) son transferidas a las capas suprabasales (rojo oscuro). El modelo propone a las SCs (azul) en un estado estable, pero con una población de células quiescentes que podrían jugar un papel importante en la regeneración después de una lesión (flecha blanca). En este modelo se predicen tres posibles destinos celulares de la población de PCs que se encuentran proliferando en base a las probabilidades que tiene una célula de entrar a uno de los tres destinos: 1) el 8% de las células permanece proliferando (círculos verdes), 2) el 84% una célula permanece proliferando y otra se diferencia y 3) el 8% de las células se diferencian (círculos rojos). El comportamiento de cada célula es estocástico y no es determinado por el número de divisiones celulares [46].

1.7. De la proliferación celular a la diferenciación y estabilidad del factor transcripcional p63.

La importancia del factor transcripcional p63 en una gran variedad de procesos biológicos tales como crecimiento celular, proliferación, apoptosis y diferenciación, se refleja en el hecho de que su expresión es altamente regulada [61]. Diversos estudios sugieren que es necesaria una disminución de los transcritos de $\Delta Np63-\alpha$ junto con la degradación de la proteína para la diferenciación [36]. La degradación vía el proteosoma dependiente de ubiquitina es la ruta más importante de eliminación de la proteína p63. Ensayos realizados en cultivo primario de queratinocitos humanos (HKs) analizaron el efecto del estrés celular en la fosforilación de $\Delta Np63-\alpha$ y regulación de la estabilidad de la proteína. Al adicionar el inhibidor de proteosoma MG-132 al cultivo HKs se evitó su degradación después de tratamiento con radiación UV, indicando que $\Delta Np63-\alpha$ es degradado de manera dependiente de proteosoma [57].

Adicionalmente, la estabilidad de p63 es modulada por diversas modificaciones post-traduccionales tales como la fosforilación, la ubiquitinación y la SUMOilación. Algunos reguladores importantes en la degradación de p63 incluyen ubiquitinas-ligasas E3, Nedd4, Itch WWP1, Fbw7 y Pirch2 [17, 62-64], además de cinasas tales como ATM, CDK2, p70s6K, Plk1 y GSK3 [57, 61]. La fosforilación de p63 es un evento que aún no está del todo claro; sin embargo, trabajos recientes realizados por Suzuki y colaboradores muestran, bajo condiciones de homeostasis, un incremento de la forma fosforilada de p63 (P-p63) durante la transición temprana de SCs a PCs en epidermis de humano. Lo anterior sugiere que el incremento de P-p63 esta correlacionado con el potencial de proliferación en las células progenitoras. En conclusión, bajos niveles de fosforilación indica un alto potencial proliferativo y de manera inversa, altos niveles de fosforilación resultan en un bajo potencial de proliferación. Es decir que P-p63 es un biomarcador para la salida del estado troncal [65, 66].

1.8. Mecanismos de División Asimétrica involucrados en la estratificación epidermal.

En las divisiones asimétricas de las SCs epidermales se crea una célula troncal y una célula diferenciada, lo cual es una forma simple y elegante de equilibrar la autorenovación y la diferenciación de las SCs [67]. En las células epiteliales se consideran dos formas de polaridad: 1) la polaridad ápico-basal, que se refiere a la localización de específicas moléculas en ciertos

dominios de la membrana celular, los cuales se establecen en superficies opuestas. En el polo apical su superficie se encuentra en contacto con el lumen y el polo basal cuya superficie se encuentra paralela a la lamina basal. 2) La Polaridad Celular Planar se define como la orientación coordinada de las células en el plano del tejido que es fundamental de los epitelios [68].

La polaridad celular es crucial para varios procesos celulares, incluidos la proliferación, diferenciación, crecimiento y migración. La integridad mecánica de un tejido epitelial, nervioso o muscular depende en gran parte de la capacidad de las células en interactuar entre ellas. Las conexiones físicas de la matriz extracelular o células adyacentes se da a través de sus uniones intercelulares mediadas en parte por filamentos asociados a citoesqueleto generando resistencia al tejido (Figura 6) [69].

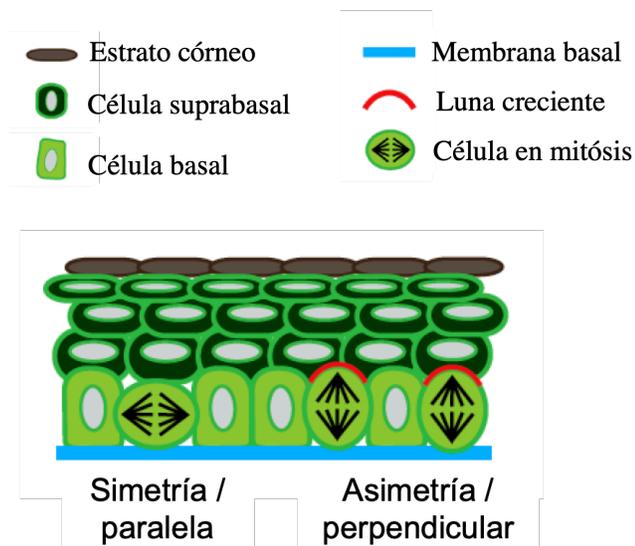


Figura 6. Modelo de la estratificación epidermal, a través de divisiones asimétricas propuesto por Byrd et al. En la estratificación de la epidermis ocurren divisiones asimétricas de las SCs, un indicador de este evento es la acumulación de ciertas proteínas en forma de luna creciente (en color rojo) en el córtex apical de la célula basal. Como consecuencia se producen divisiones celulares en forma perpendicular a la membrana basal, lo cual contribuirá al engrosamiento de la epidermis. Estas divisiones perpendiculares generan una SC basal y una célula diferente (posiblemente una PC) posicionada en la capa suprabasal.

La membrana plasmática de una célula epidermal tiene una región apical, regiones laterales y una región basal. Las estructuras colindantes y sus interacciones con ellas definen en gran medida la función y el estado de una célula. En los epitelios, las regiones laterales interaccionan con células vecinas y la región basal se conecta con una membrana basal. La conexión con otras células es mediada por uniones estrechas inter-celulares [70]. El establecimiento y mantenimiento de la polaridad ápico-basal en el epitelio son controlados por complejos de polaridad que incluyen proteínas evolutivamente conservadas, que conforman los complejos apicales: Par y Crb y el complejo basolateral: Scrib [71] (Tabla 1).

Tabla 1. Complejos que establecen la polaridad ápico-basal en epitelios y que participan en la división asimétrica.

Complejo Par	Complejo Crb	Complejo Scrib
-Par3 (Partitioning defective 3 homolog) -Par6 (Partitioning defective 6 homolog) -aPKC (atypical protein kinase C)	-Crbs (Crumbs) -Pals1 (Protein associated with Lin-7) -Patj (Pals1-associated tight junction)	-Scrib (Scribble) -Dlg (Discs Large) -Lgl (Lethal (2) giant larvae protein)

Las proteínas que conforman el complejo de Par son proteínas de tipo andamio y son multi-modulares, siendo capaces de unirse con un amplio rango de proteínas que regulan la polaridad. Dichas interacciones son necesarias para garantizar su localización espacial y temporalmente en regiones específicas de la membrana [72]. El complejo Crb es el principal regulador de la arquitectura de la célula epitelial y promueve la formación de dominios de membrana apical, además es un determinante crucial para organizar las uniones estrechas, regulando los límites entre los dominios apical y lateral [71]. El complejo basolateral Scrib es esencial para establecer y mantener la polaridad epitelial. Por su parte Lgl se asocia con filamentos de actina a través de la directa unión de su extremo C-terminal a Miosina II.

En muchos epitelios, la polaridad celular y la orientación del huso mitótico están íntimamente relacionados. La proteína Par3 se encuentra en la corteza apical asociada junto con las proteínas Par6 y aPKC. Par3 a su vez interactúa con mInsc el cual se une directamente a LGN. LGN es una proteína intermediaria que se une a las proteínas mInsc y NuMA y lo hace a través de sus regiones repetidas TPR de su extremo N-terminal. A su vez se une con la proteína Gai-GDP (que se encuentran anclada a la membrana) mediante sus dominios GoLoco en su extremo C-terminal, formando así un complejo tripartito (Figura 7A). NuMA junto con la proteína motor Dinactina generan fuerzas de tracción en los microtúbulos astrales y reorientan el huso mitótico (Figura 7B) [73] [71].

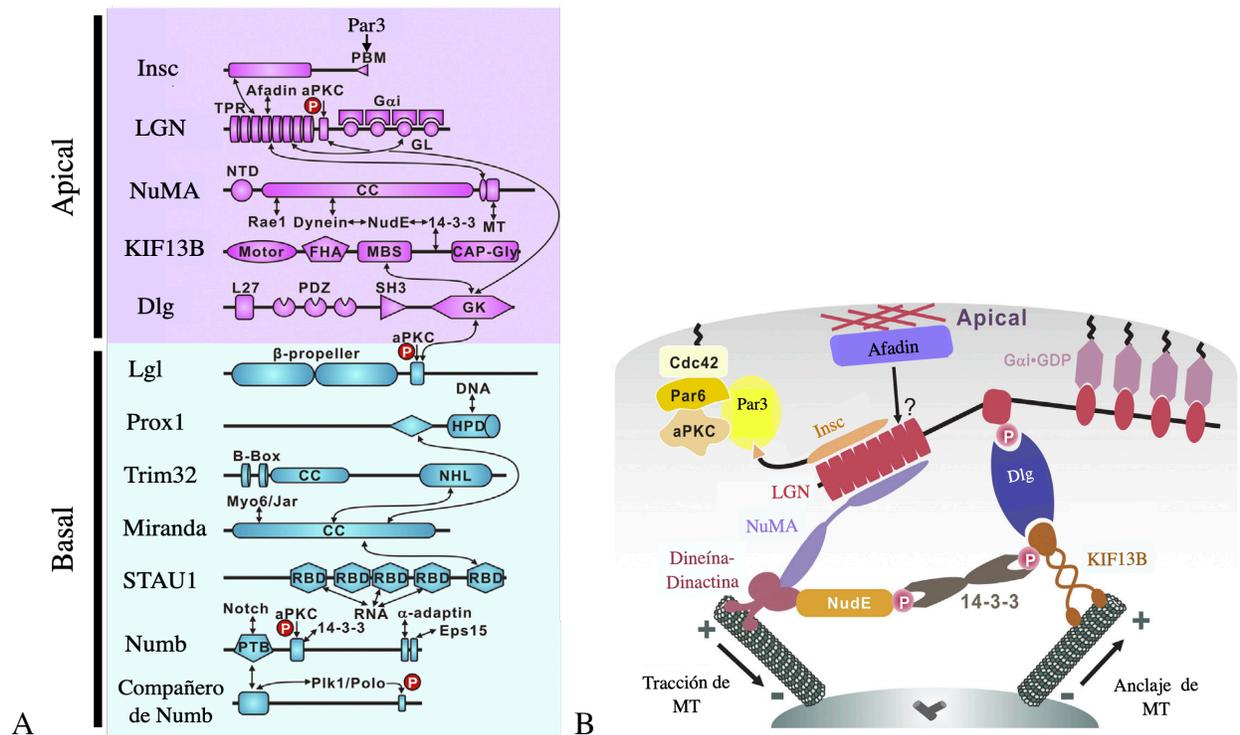


Figura 7. Esquemas de los complejos de polaridad que participan en división asimétrica. **A**, Diagrama del ensamblaje las proteínas que participan en la división asimétrica, en púrpura las del complejo apical y en azul claro el complejo de la región basal [71]. **B**, Esquema que muestra las interacciones de los complejos de división asimétrica. Significado de las abreviaciones en los esquemas: aPKC: Atypical protein kinase C, CC: Coiled-coils domain, Cdc42: Cell division control protein 42 homolog, Dlg: Discs large protein, FHA:

Forkhead-associated domain, GK: Guanylate kinase, GL: GoLoco domain, HPD: Homeo-prospero domain, Insc: Inscuteable spindle orientation adaptor protein, KIF13B: Kinesin family member 13B, Lgl: Lethal Giant Larvae protein, , LGN: Leu-Gly-Asn repeat protein, Myo6: Myosin-VI protein, NTD: Nuclear transfer domain, NudE: Nuclear distribution protein NudE homolog, NuMA: Nuclear mitotic apparatus protein, Numb: Partner of numb protein, MT: Microtúbulos, P: Fosfato, Par3: Partitioning defective 3 homolog protein, PDZ: Dlg homologous region, Plk1: Polo-like kinase, Prox1: Prospero Homeobox 1, PTB: phosphotyrosine binding domain, RBD: RNA binding domain, SH3: Src homology 3, STAU1: Staufen protein, TPR: Tetratricopeptide repeats, Trim32: Tripartite motif protein.

La división asimétrica en las células epidermales activa la señalización de Notch [74]. El receptor transmembranal Notch es activado por medio de la unión de sus ligandos membranales Delta y Serrate/Jagged. La señalización de Notch es fundamental para una variedad de procesos durante el desarrollo embrionario. Notch también regula los nichos de las SCs, no solo en la piel, sino también en otros tejidos como, el intestino, y los sistemas nervioso y hematopoyético [75]. En la epidermis, Notch activa la diferenciación celular [76, 77], para lo cual activa la salida del ciclo celular [78] y a su vez suprime la expresión de integrinas basales y p63 [79].

Finalmente, la alteración de las rutas de señalización que afecten la homeostasis de tejidos puede ser un factor importante en la patogénesis de un gran número de enfermedades incluyendo el cáncer [34, 80, 81]. La mayoría de los mecanismos moleculares que regulan la proliferación y la diferenciación en las células de la epidermis no son aún del todo claros y son necesarios muchos estudios mas.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La epidermis es la capa mas externa de la piel, su espesor se relaciona con la protección que protege al organismo y por tanto varia de un organismo a otro, así como la etapa del ciclo de vida. En vertebrados el engrosamiento de la epidermis durante el desarrollo se da por un fenómeno conocido como estratificación epidermal y su estudio es esencial para entender como se forma la piel.

Mientras que los mamíferos (ratón y humano) son los sistemas modelo principalmente utilizado para estudios de formación de la epidermis, estos se han complementado con estudios del desarrollo de la epidermis empleando al pez cebra como modelo de estudio. En particular la estratificación de la epidermis en ratón y humano ocurre cuando estos mamíferos se desarrollan intrauterinamente, mientras que la estratificación de la epidermis del pez cebra ocurre con la larva en el medio externo. Esto convierte al pez cebra en un sistema mas accesible para la experimentación en aspectos de Biología del Desarrollo, un ejemplo de ello es que se puede manipular y observar la epidermis durante su estratificación con el organismo vivo. En el pez cebra la arquitectura y la ontogenia de la epidermis aún no están del todo estudiados y este trabajo estuvo encaminado a estudiar como ocurre la estratificación epidermal en las etapas post-larvarias de pez cebra.

La maduración de la piel en vertebrados es frecuentemente acompañada por la aparición de apéndices dermales, tales como los folículos pilosos en mamíferos y plumas en aves y hay estudios que indican que la estratificación epidermal en el pez cebra esta dirigida por las señales relacionadas con la formación de las escamas. Este trabajo estuvo encaminado a establecer los factores y eventos a nivel celular y molecular involucrados en el proceso de estratificación epidermal en el pez cebra, entre ellos el papel del factor transcripcional p63 y las poblaciones de SCs y PCs epidermales involucrados en este fenómeno.

III. JUSTIFICACIÓN

La arquitectura, ontogenia y los mecanismos que regulan la estratificación de la epidermis en el pez cebra, durante las etapas juveniles aún no están del todo comprendidos. En cierto momento del crecimiento post-larvario la epidermis del pez cebra se engrosa por estratificación epidermal y esto ocurre previamente a la formación de escamas. Es en esta ventana de desarrollo post-larvario que es necesario analizar los eventos que a nivel celular y molecular participan en la estratificación epidermal en el contexto del crecimiento y desarrollo del pez.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer como se forma la epidermis del pez cebra y cual es el papel de las diferentes poblaciones celulares de SCs y PCs, estableciendo cómo estas en conjunto con la actividad del factor transcripcional p63 regulan el desarrollo epidermal durante etapas post-larvarias.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 4.2.1. Identificar los cambios morfológicos que ocurren a nivel celular durante la estratificación epidermal en las etapas post-larvarias del pez cebra
- 4.2.2. Establecer las poblaciones celulares que participan en la estratificación epidermal.
- 4.2.3. Determinar la distribución y tasa de proliferación celular de las SCs y PCs lo largo de la estratificación epidermal en las etapas post-larvarias del pez cebra.
- 4.2.4. Monitorear la expresión del factor transcripcional p63 y su forma fosforilada P-p63 durante la estratificación de la epidermis del pez cebra.
- 4.2.5. Estudiar la expresión de proteínas de división celular asimétrica durante la estratificación de la epidermis en el pez cebra en etapas post-larvarias.
- 4.2.6. Analizar la expresión de genes Notch durante el desarrollo post-larvario del pez cebra y su posible papel en la estratificación epidermal (algunos marcadores de diferenciación).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Mantenimiento para crianza y crecimiento de larvas de pez cebra.

Los embriones y larvas de peces cebra (*Danio rerio*) utilizados para los experimentos fueron crecidos y mantenidos en un acuario semi-automatizado de recirculación continua (AquaticHabitats), siguiendo las normativas de la “Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) of the United States National Institutes of Health (NIH)”. La temperatura del agua se mantuvo a 26 °C y el pH de 6.8 a 7.2, mientras que el vivario se mantuvo a 22°C con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Los embriones de pez cebra de cepa silvestre fueron obtenidos de la cruce natural de nuestra cepa Tab-WIK, que es derivada de cruces de las cepas TAB-14 y WIK obtenidas del Zebrafish International Resource Center (ZIRC). Las larvas fueron cultivadas en cuatro distintos pasos: 1) los embriones se mantuvieron en incubadoras a 28.5°C por 5 días. 2) Al sexto día post-fertilización (dpf) se colocaron 30 larvas en cada vaso de precipitado de vidrio, en agua de acuario estéril y alimentándolos 3 veces al día con alimento en polvo para larvas a base de camarón de 40-150 micras (Biogrow®). 3) A los 16 dpf se colocaron 30 larvas en cilindros de tanques de acuario, colocándolos en los sistemas recirculación (Nursery3, Aquatic Habitats) a 26°C, alimentándolos con 5 ml de Artemia salina y alimento en polvo 3 veces al día. 4) A los 23 dpf se cambiaron 30 larvas a tanques con rejillas (AHN400, AquaticHabitats) conservando el régimen de alimentación hasta alcanzar el tamaño deseado.

5.2. Medición de larvas en estadios post-larvarios.

A partir del día 24 (estadios post-larvarios) se comenzaron a medir las larvas con respecto a su SL en milímetros (mm) que va de la boca (el punto más anterior de la cabeza) al pedúnculo caudal (la región mas posterior del cuerpo donde se insertan los radios de la aleta caudal) tal como lo describen Parichy y colaboradores [29]. Las larvas fueron agrupadas en 5 mm, 6.5 mm y 8 mm SL. Posteriormente fueron sacrificadas en una solución de tricáína 0.025% (ácido 3-aminobenzoico-etil-ester, A5040 Sigma) y después se fijaron toda la noche en paraformaldehído al 4%, después se lavaron y deshidrataron para procesarlas e incluirlas en bloques de parafina.

5.3. Tinciones histológicas y mediciones de la forma celular.

Las secciones histológicas fueron obtenidas a partir de larvas de pez cebra y fueron teñidas utilizando la tinción modificada tricrómica de Masson. Brevemente, las larvas de las diferentes

etapas (5, 6.5, 8 mm SL) fueron fijadas en solución de Bouin y embebidas en bloques de parafina y los cortes se hicieron a un espesor de 5 μ m. Las laminillas fueron desparafinadas con xylol y rehidratadas en concentraciones decrecientes de etanol. Las muestras fueron teñidas con solución de Hematoxilina de Mayer, seguido de lavados con agua corriente. Subsecuentemente las laminillas fueron teñidas con fuscina al 1% y para detectar las fibras de colágena, se embebieron en solución de ácido fosfomolíbico al 1% para después teñirlas con una solución de verde de metilo. Este paso fue seguido de lavados y deshidrataciones rápidas, clarificación con xilol y montaje.

Para determinar la forma de las células basales epidermales de larvas de 5 mm y 9 mm SL, se seleccionaron 15 células basales de cada etapa que provenían de tres muestras distintas de las tinciones tricrómicas de Masson. Para visualizar el contorno de las células, primero el contraste de las imágenes fue mejorado con el programa Photoshop (Adobe). De cada célula, se midió el largo máximo (paralelo a la membrana basal) y el ancho máximo (perpendicular a la membrana basal). Los promedios y la desviación estándar se calcularon con Excel (Microsoft).

5.4. Inmunofluorescencia y Western Blot.

A partir de los bloques de parafina, cada uno conteniendo varias larvas se hicieron cortes de 3 mm de grosor empleando un micrótopo semi-motorizado (Leica). Las laminillas fueron permeabilizadas con acetona absoluta de 1-2 min a -20 °C. Después de la permeabilización, las laminillas fueron lavadas con PBS en frío (4 a 8 °C), en seguida se realizó la recuperación antigénica en buffer de citrato de sodio 10 mM/ Tween20 0.05% empleando un microondas. Las laminillas fueron bloqueadas con Albúmina sérica bovina al 2% / Tween20 0.05% y posteriormente se colocó el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C. Posteriormente se añadió el anticuerpo secundario por 2 hrs a temperatura ambiente (dilución de anticuerpos primarios y secundarios, Tabla 2). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), para finalmente montar las laminillas con medio de montaje. Las larvas de 6 dpf y 5 mm SL fueron incubadas por 1.5 h con EdU en medio para embriones a 28 °C posteriormente, las larvas fueron colocadas en medio para embriones para eliminar el exceso del reactivo de EdU y fueron introducidas al acuario semi-automatizado de recirculación continua hasta su colección.

Las imágenes fueron capturadas con el microscopio AxioImager utilizando la cámara MRc AxioCam y el software AxioVision 4.8 de Zeiss. La microscopia confocal se llevó a cabo empleando el microscopio Zeiss LSM 780. Las mediciones y análisis de imágenes se realizaron utilizando el programa “ImageJ/Fiji” y el ensamblaje y mejoramiento se realizaron utilizando el programa Photoshop (Adobe). Todos los experimentos se realizaron en por al menos tres diferentes individuos. Los anticuerpos utilizados se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las inmunofluorescencias.

Anticuerpo	Huésped	Compañía/Catálogo	Dilución
Anti-p63	Ratón	Biorbyt #orb27455	Listo para usar
Anti- Phospho-p63 (se une a las Ser370/Ser372 de pez cebra)	Conejo	Biorbyt #orb6608	1:50
Anti-Histone H3 (phospho S10)	Conejo	Abcam #ab5176	1:200
Anti-Par3	Conejo	Millipore, #07-330	1:300
Anti- GPSM2 (también conocido como LGN)	Conejo	Abcam #ab84571	1:200
Anti-pan Citoqueratina (AE1+AE3)	Ratón	Abcam #ab961	1:100
Anti-conejo Alexa Fluor 488 / 594	Cabra Anti-Conejo	Jackson ImmunoResearch #111-545-003/ #111-585-003	1:1000

Anti-ratón Alexa Fluor 488 / 594	Cabra Anti-Ratón	Jackson ImmunoResearch #115-545-003/ #115-585-003	1:1500
Alexa Flour 555		Thermo Fisher Scientific #C10338	Siguiendo las indicaciones del fabricante, se prepara un mezcla de reactivos que incluyen: buffer de reacción Click-iT®, CuSO ₄ , Alexa Flour 555 y un buffer aditivo de la reacción.

El análisis de “western blot” se hizo a partir de larvas de pez cebra homogenizadas en amortiguador RIPA (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% SDS y 1% de desoxicolato de sodio) suplementado con 1 tableta de cOmplete™, un coctel de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science, # 04693116001) por cada 10 ml. Los extractos de proteína se corrieron por electroforesis en geles 8% de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare). Los blots se bloquearon con TBST (amortiguador de Tris salino y Tween 20) con 5% de Albúmina sérica bovina y después incubados con los anticuerpos primarios por toda la noche a 4 °C. Después de varios lavados el blot fue incubado con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina a temperatura ambiente por 4 hrs (Dilución de anticuerpos utilizados en Tabla 3). La detección de reconocimiento antígeno-anticuerpo fue revelada al detectar la actividad de la fosfatasa alcalina con una mezcla de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) y NBT (nitro-blue tetrazolio). Se empleó un anticuerpo contra actina para normalizar el cargado del gel.

Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el Western Blot.

Anticuerpo	Huésped	Compañía/Catálogo	Dilución
Anti-p63/TP73L	Ratón	R&D System #MAB1916	1:1000
Anti- Phospho-p63 (se une a las Ser370/Ser372 de pez cebra)	Conejo	Biorbyt #orb6608	1:500
Anti- α Actina cepa 4	Ratón	Sigma-Aldrich #MAB1501	1:2000
Anti-ratón IgG conjugado a Fosfatasa Alcalina	Cabra	Thermo Fisher Scientific #31320	1:5000
Anti-conejo IgG conjugado a Fosfatasa Alcalina	Cabra	Thermo Fisher Scientific #65-6122	1:1500

5.5. Incorporación de EdU y marcajes en secciones histológicas.

El marcaje con EdU es un protocolo cuyo objetivo es visualizar las células que están proliferando en un tejido marcando específicamente a las células cuando están sintetizando DNA. Este marcaje se basa en la incorporación en el DNA de un nucleósido que es análogo de la timidina y que se llama 5-etinil-2-deoxiuridina (EdU). La detección se basa en la reacción de “Click” catalizada por la interacción de un grupo alquino (en el EdU) y un grupo azida en una molécula fluorescente (Alexa Fluor 594 en nuestro caso). Larvas de 6 dpf fueron incubadas con 50 μ M de EdU en medio para embriones por 1.5 horas a 28°C. Posteriormente las larvas fueron lavadas con Medio Embrionario y devueltas a sus tanques de crecimiento hasta su posterior colecta durante las etapas de 5 – 8 mm SL. Una vez que las larvas alcanzaron el tamaño deseado fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, se lavaron y deshidrataron para procesarlas e incluirlas en bloques de parafina. Para obtener la señal de inmunofluorescencia del EdU en cortes histológicos a partir de las larvas de 5 – 8 mm SL, se siguieron las indicaciones del fabricante utilizando los reactivos de revelado por 30 minutos en oscuridad (PBS, CuSO₄, AlexaFluor-594 y amortiguador).

Posteriormente se procedió con el protocolo de inmunotinción en los casos en donde el marcaje de EdU se combinó con la detección de proteínas por anticuerpos.

5.6. Gráficos y estadísticos.

El análisis estadístico, gráficos e histogramas fueron realizados utilizando el programa Prism 7 (GraphPad). Cada grupo de datos siempre fue representado con promedios y con su error estándar del promedio (standard error of the mean, SEM). Así mismo, para cada grupo de datos se verificó su normalidad utilizando las pruebas D'Agostino-Pearson ó Shapiro-wilk. Para analizar la significancia estadística entre más de dos grupos se utilizó el análisis de ANOVA seguido por método de comparación de multiparámetros de Tukey. El gráfico de violín representa la distribución de los datos y la densidad de probabilidad. Los gráficos de radiales fueron generados en la plataforma de *R studio*.

5.7. Cultivo primario de queratinocitos.

Peces cebra adultos fueron anestesiados con 0.16% de Tricaína para cortar una porción de la aleta caudal. El fragmento de aleta fue disociado con solución de Acutasa® e incubados por 1h a 36 °C, posteriormente la mezcla fue centrifugada y las células de la pastilla fueron resuspendidas y propagadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM™ Sigma), suplementado con 1% de L-glutamina (GlutaMAX™-1, 200mM, Gibco # 35050061), 3% de Bicarbonato de Sodio al 7.5%, Antibióticos (Penicilina 100 U/ ml, Estreptomicina 100 mg/ml) y 10% de Suero Fetal Bovino. El cultivo primario fue mantenido en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37 °C utilizando una laminilla de 8 pozos hasta que las células alcanzaron el 50% de su confluencia. Las células epidermales fueron lavadas y fijadas en paraformaldehído al 4% y para posteriormente llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia.

5.8. RT-PCR a partir de larvas de pez cebr.

Para llevar a cabo la obtención del RNA total se colectaron al menos 5 larvas de las tres distintas etapas (5, 6.5 y 8 mm SL). Brevemente las larvas fueron colocadas en una solución de Trizol®Reagent y maceradas con pistilo por acción mecánica en hielo. Se realizó una primera extracción de los ácidos nucleicos colocando una cuarta parte del volumen total de cloroformo a los macerados con Trizol®Reagent y se centrifugaron con la finalidad de obtener la fase acuosa.

Posteriormente se hizo una segunda extracción de los ácidos nucleicos empleando fenol:cloroformo, seguido de una precipitación con alcohol isopropílico. Una vez precipitados los ácidos nucleicos la pastilla fue lavada con etanol al 75% para finalmente ser resuspendido en agua-DEPC libre de RNAsas.

Para la eliminación del DNA genómico, se utilizó el kit de DNAsa Turbo™ (ThermoFisher Scientific, #AM2238) siguiendo las indicaciones del fabricante. La pastilla previamente obtenida fue incubada con 2U de la DNAsa a 37°C por 1h, para la inactivación de la enzima se colocó el reactivo inactivador de la Turbo DNAsa incubándose a 65°C por 10 min, finalmente la muestra fue almacenada a -70°C o utilizada para la RT-PCR.

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit Superscript III First-Strand synthesis system for RT-PCR (ThermoFisher Scientific, #18080051). Inicialmente 2 µg de RNA fueron incubados en una mezcla con dNTPs (10 mM), oligo dT (50 µM) y agua-DEPC a 65°C por 5 min. Para la síntesis del cDNA se colocó una segunda mezcla que contenía una concentración final de: 1X del buffer de la enzima Transcriptasa Inversa (RT) RT, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2U de RNAsa OUT y 10U de la enzima RT Superscript™ III y ambas mezclas una vez combinadas fueron incubadas a 50 °C por 50 min. Posteriormente la enzima RT fue inactivada a 85°C por 5 min. Y para la eliminación de las cadenas de RNA se agregaron 2U de la enzima RNAsa H por 20 min a 37 °C. Finalmente, el cDNA fue almacenado a -20 °C o utilizado directamente en la realización de PCRs. En la PCR se utilizó la mezcla maestra de la enzima Taq polimerasa (ThermoScientific DreamTaq Green PCR Master Mix, #K1081). Para ello se preparó una mezcla que contenía 1 µg de cDNA, 0.5 µM de iniciador sentido, 0.5 µM de iniciador reverso, y 1X de la mezcla maestra de la DreamTaq para un volumen final de 50 µl.

Cada una de las respectivas mezclas se colocó en el termociclador con las siguientes condiciones: 1) Desnaturalización inicial: 95 °C por 1 min; 2) 30 ciclos desnaturalización inicial de 95 °C por 30 seg, alineación a 56 °C por 30 seg y extensión a 72 °C por 1 min, y 3) una extensión final de 5 min a 72 °C. En la Tabla 4 se indican la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la PCR.

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos para la amplificación de los genes Notch.

Nombre del iniciador	Secuencia	Temperatura de alineamiento
Notch1a	Sentido: 5'-CGAGGCGGAGTTATGAAC-3'	55°C
	Reverso: 5'-GGCAGGGAGAGTTCATGCAA-3	57.7°C
Notch1b	Sentido: 5'-AGAGCAGGAGAATGAAGCCCT-3'	58.2°C
	Reverso: 5'-GATTGGAAGCAAGGGTTGCG-3'	57.1°C
Notch2	Sentido: 5'-TTGGTGATTCACACTCGTGC-3'	55.6°C
	Reverso: 5'-TTCAAGCGGTTGCACAGACA-3'	57.6°C
Notch3	Sentido: 5'-CTCACCAACCCCAACTCTC-3'	57.7°C
	Reverso: 5'-CCGTTGGACTCCTGGACTTG-3'	57.8°C

VI. RESULTADOS.

6.1. El cambio en la forma de las células epidermales contribuye al engrosamiento epidermal.

Con la finalidad de entender cómo se engrosa la epidermis del pez cebra en etapas post-larvarias, estudiamos la morfología de las células y los cambios moleculares durante el engrosamiento epidermal en el pez cebra. El engrosamiento ocurre durante el desarrollo post-larvario, antes de la formación de las escamas. Se seleccionaron tres etapas del desarrollo post-larvario que corresponden a 5 mm, 6.5 mm y 8 mm SL (Figura 8A-C). El SL es una medida para medir la madurez de los peces normalizando la población por tamaño, en lugar de los días posteriores a la fertilización (ver Materiales y Métodos) [29].

Así mismo, seguimos el desarrollo de las aletas dorsal y anal ya que son buenos indicadores del crecimiento y maduración de los peces [82]. A los 5 mm SL ambas aletas estaban ausentes. A los 6.5 mm SL los huesos radiales de ambas aletas comenzaron a ser evidentes y finalmente a los 8 mm SL ambas aletas estaban completamente formadas (Figuras 8A-C). Para evidenciar el engrosamiento epidermal, utilizamos la tinción tricrómica de Masson a partir de cortes histológicos longitudinales de las tres distintas etapas post-larvarias, evidenciando la epidermis sobre la membrana basal. Esta tinción permite visualizar en color verde-azul las fibras de colágena que se encuentran justo por debajo de la membrana basal (Figura 8D-F).

Empleamos un anticuerpo contra la isoforma $\Delta Np63-\alpha$ del factor transcripcional p63, el cual es un marcador clásico de células epidermales. Este anti-p63 nos permitió detectar la transición de una epidermis de dos capas (5 mm SL) a más de tres capas (principalmente en la región dorsal) (6.5 y 8 mm SL) durante el desarrollo post-larvario (Figura 8 G-I). Para su descripción, dividimos la epidermis en tres capas: 1) la capa de células basales unidas a la membrana basal, 2) la capa de células suprabasales, formada por capas intermedias, arriba de las basales y 3) capa externa, compuesta por las células más externas en contacto con el medio ambiente (Figura 8I). Esta adición de nuevas capas intermedias suprabasales también se le conoce como estratificación epidermal.

Durante las etapas post-larvarias de pez cebra medimos el grosor total de la epidermis, a partir de secciones histológicas y encontramos que a los 5 mm SL, la epidermis mantiene un grosor de

alrededor de 10 μm . Posteriormente al inicio de la estratificación, a los 6.5 mm SL, la epidermis incrementa su grosor a un total de 10-18 μm y finalmente a los 8 mm SL, antes del proceso de escamación, el grosor de la epidermis en algunas regiones dorsales de la larva alcanza hasta 50 μm (Figura 8J).

De acuerdo con nuestras observaciones, hay dos factores que contribuyen al engrosamiento de la epidermis: 1) cambio en la forma de las células y 2) aumento de la proliferación celular. A los 5 mm SL las células epidermales son aplanadas, pero conforme avanza el desarrollo éstas, adquieren una apariencia redondeada. Con la finalidad de comprobar esta observación, seleccionamos 15 células epidermales basales tanto de 5 mm SL, como de 9 mm SL, y que corresponden a estadios al inicio y avanzado de la estratificación, respectivamente. En estas células medimos su largo máximo (en su eje paralelo a la membrana basal) y su ancho máximo (perpendicular a la membrana basal) (Figura 8K-L). A los 5 mm, su largo promedio fue de 17.43 μm (\pm 3.37 μm) que es mucho mayor que su ancho promedio, el cual fue de 4.66 μm (\pm 2.18 μm). Estas medidas claramente corresponden a una forma típica de células elongadas o aplanadas. En contraste, cuando se tomaron las mismas medidas en células basales a los 9 mm SL encontramos un largo promedio de 8.82 μm (\pm 1.34 μm) y un ancho promedio de 7.83 μm (\pm 2.51 μm), lo cual prueba que las células adquieren una forma redondeada durante la estratificación de la epidermis.

Los cambios en la morfología celular y la adición de nuevas capas epidermales también van a acompañado de la aparición de células positivas para el factor transcripcional p63 (p63+) en las capas suprabasales (Figura 8H-I). En la embriogénesis y al inicio de etapa post-larvaria, p63 se localiza en las células de la capa basal y detectamos que la proporción de células p63+ de la capa suprabasal con respecto a la capa basal incrementa en 6.5 y 8 mm SL (Figura 8M). Así mismo, observamos que la intensidad en la señal de fluorescencia de células p63+ gradualmente va disminuyendo de capas basales a suprabasales y permanece ausente en las células externas (Figura 8N). Indicando que p63 no está restringido a las SC basales y la estratificación está acompañada por una expansión de los progenitores epidermales.

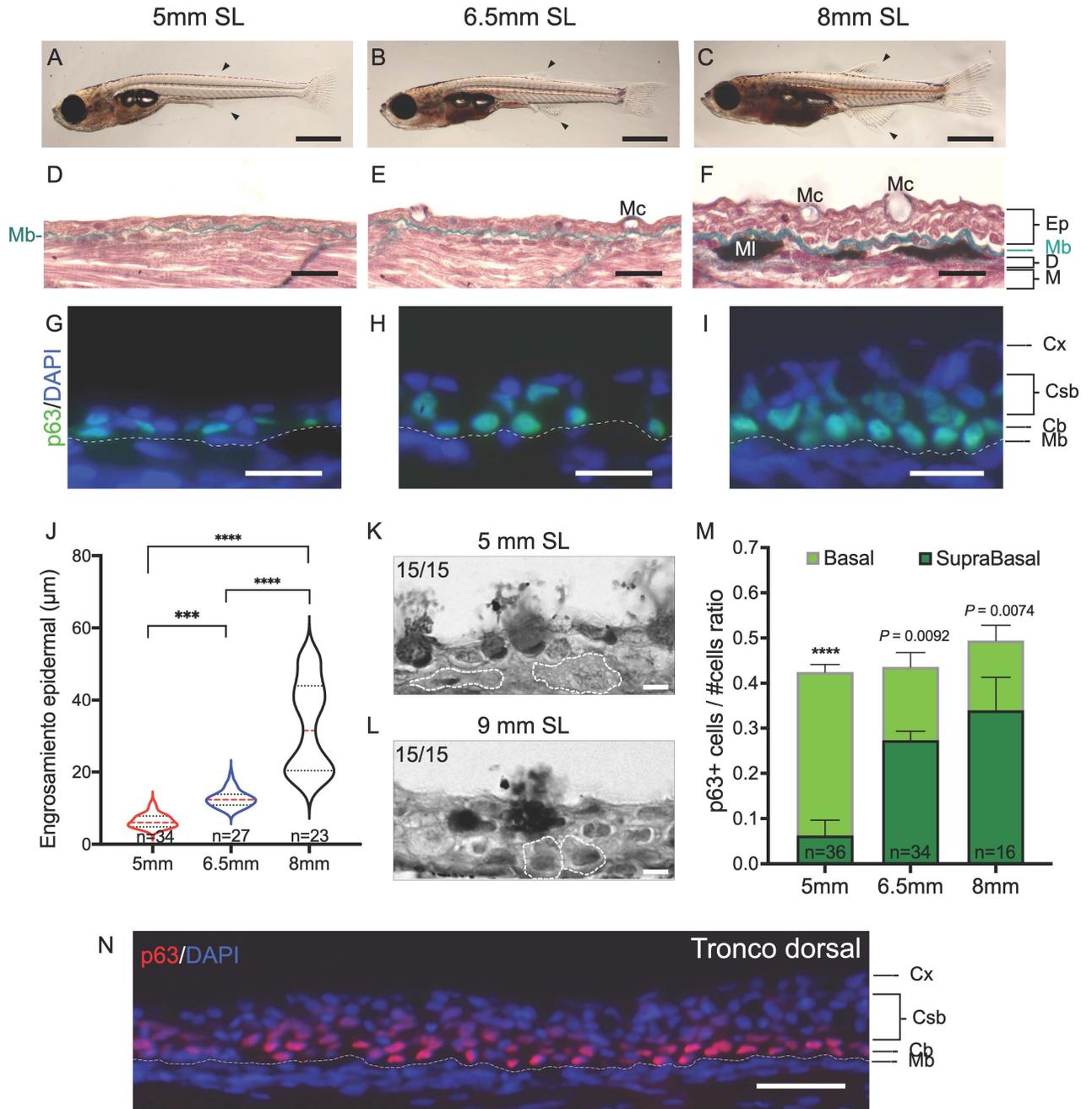


Figura 8. Cambios morfológicos a nivel celular y tisular de la epidermis durante el desarrollo post-larvario en el pez cebra. **A-C**, Etapas del desarrollo post-larvario 5, 6.5 y 8 mm SL (las cabezas de flecha indican las aletas dorsal y anal). **D-F**, Secciones longitudinales que muestran la epidermis de la región dorsal teñida con la tinción tricrómica de Masson en 5, 6.5 y 8 mm SL. F, A los 8 mm SL la epidermis se ha engrosado considerablemente y la colágena se puede observar sobre los melanocitos (MI) localizados en la dermis (D). **G-I**, Marcaje de p63 y DAPI en la epidermis de la región dorsal. Inicialmente en 5 mm SL la mayoría de las células p63+ se localizan basalmente y en etapas posteriores cambia su distribución detectándose también en las células suprabasales. **J**, Gráfico de violín donde se compara el engrosamiento epidermal a lo largo de las 3 etapas post-larvarias; las mediciones fueron tomadas de los cortes histológicos y las líneas rojas indican la media del engrosamiento epidermal en μm . **K-L**, Se muestra el contorno de las células (líneas punteadas) mostrando cambios en la forma de las células basales. **J**, Gráfico de barras de la proporción de células p63+ con respecto al total de células y normalizado con la tinción de DAPI. El gráfico compara el número de células p63+ entre células basales y suprabasales en las tres distintas etapas. **N**, Distribución de la señal de p63 en una epidermis formada por varias capas a partir de una larva de 6.5mm SL. Ep=Epidermis, Mb= membrana basal, Mc= célula mucosa, M= Músculo, Cb= Células basales, Csb= Células suprabasales y Cx= Células externas. Gráficos J y M, ***P= 0.0003, ****P=<0.0001. Imágenes mostradas en A-C fueron obtenidas con microscopio estereoscópico. D-F, K y L, obtenidas con objetivo 40X y G-I obtenidas con objetivo 63X y N con el objetivo 20X. La escala de la barra: A-C en 1 mm; D-F, G-I y N 20 μm , K y L en 5 μm .

6.2. Identificación de Poblaciones Celulares Heterogéneas en las capas epidermales basal y suprabasal antes y durante la estratificación.

En un trabajo anterior de nuestro grupo de investigación se empleó el marcaje del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para identificar las células en división durante la estratificación epidermal, en estadios entre 5 a 10 mm SL [19]. En este trabajo también exploramos los eventos de proliferación celular antes y durante la estratificación epidermal por métodos de marcaje diferentes.

En preparaciones de peces cebras de 5 mm SL, justo antes del inicio de la estratificación, utilizamos un anticuerpo contra la Fosfo-Histona-3 (pHH3), como marcador de división celular, para identificar, por inmunocitoquímica, a las células en fase de mitosis. En un corte longitudinal de la larva completa de 5 mm SL, pudimos observar una señal constante de este marcador mitótico en toda la epidermis alrededor de la larva, indicando una alta tasa de proliferación celular (Figura 9A). Como se mencionó en la introducción, las células epidermales basales con expresión nuclear de p63 se les considera células troncales. Con la finalidad de establecer la capacidad proliferativa de las células p63+, realizamos doble inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-p63 junto con anti-pHH3.

En la Figura 9B se describen 3 casos (I, II y III) de dos tipos celulares en base a su localización, presencia, ausencia de p63 y pHH3. En el caso I, observamos un grupo de células con 3 distintos marcajes y localización: la célula marcada como 1, corresponde a una Célula Troncal Epidermal (EpSCs) localizada basalmente que tiene p63. La célula suprabasal marcada como 2 tiene ambos marcajes (p63 y pHH3) y la consideramos PCs. Las células marcadas como “2” localizadas a ambos lados de la EpSCs (identificada como 1) la consideramos como posibles PCs por la ausencia de p63 y alta señal de pHH3, dichas células las observamos en posiciones basal o suprabasal, éstas siempre tienen pHH3 y poca ó nula señal de p63. En el Caso II, la célula 1 es una EpSC diferente al caso anterior, esta tiene tanto señal de p63 como de pHH3, lo que nos lleva a pensar que esta saliendo del estado SC. Por su lado la célula 2 con casi nula presencia de p63 y alta señal de pHH3 se encuentra en una posición suprabasal y la consideramos un PCs, aunque ambas células tienen pHH3 o alta capacidad proliferativa, solo la EpSC es una célula troncal. Caso III, la EpSCs ó célula

1, es similar a la del caso II, localizada basalmente, es p63+ y tiene poca señal de pHH3. La célula 2 ó PCs, es diferente a los casos anteriores ya que se localiza basalmente; es decir el PCs pueden localizarse en la capa basal ó suprabasal, las EpSCs p63+ siempre se localizan en la capa basal. En la Tabla 5 se describen las poblaciones de EpSCs y PCs en larvas de 5 mm SL basados en su localización, presencia y/o ausencia de p63 y pHH3.

Tabla 5. EpSCs y PCs presentes en la pre-estratificación epidermal.

1) Células Troncales Epidermales, “EpSCs”	2) Progenitores Celulares comprometidas a diferenciarse, “PCs”.
a) Células basales b) p63+ c) Ausencia o poca señal de marcadores de división celular	a) Células basales o suprabasales b) Reducida o nula la señal de p63 c) Presencia de marcador de división celular, pHH3

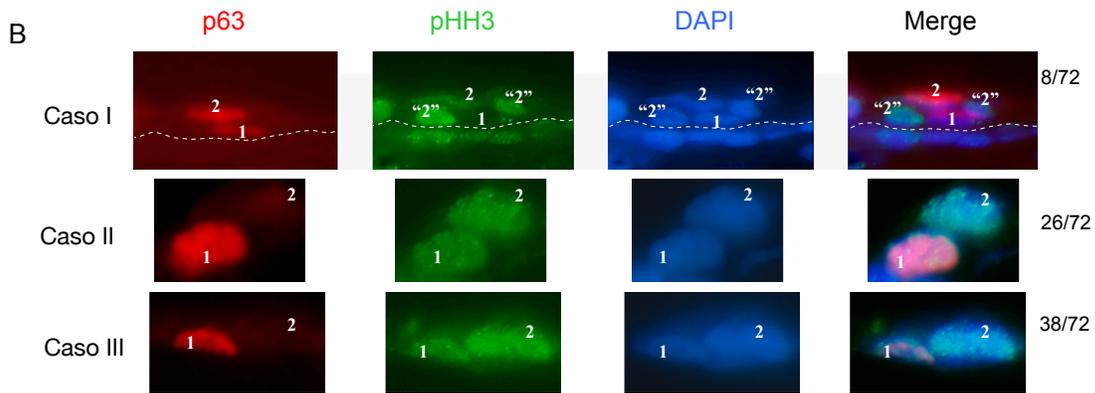
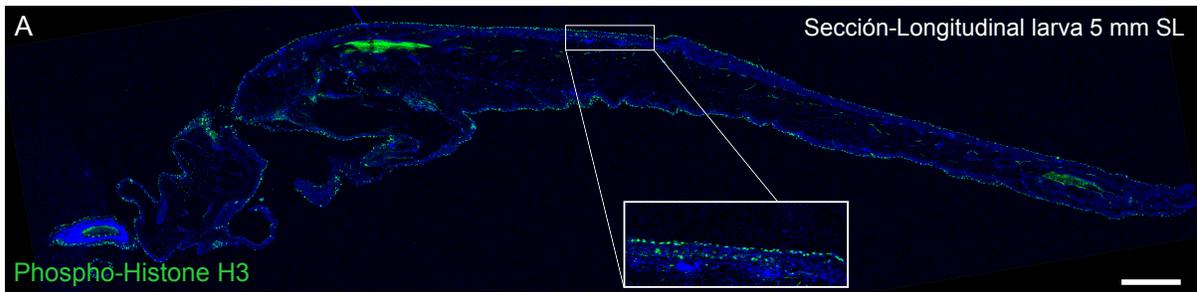


Figura 9. Proliferación celular y distribución de dos tipos celulares (EpSCs y PCs) en etapas iniciales de la estratificación epidermal. **A**, Inmunofluorescencia en un corte longitudinal de una larva de 5mm SL, utilizando el anticuerpo pHH3 (verde). El recuadro inferior es una ampliación y acercamiento a la región dorsal y que muestra la señal del marcador de proliferación en la epidermis. **B**, Doble-inmunofluorescencia anti-p63 y anti-pHH3 en la epidermis dorsal de larvas de 5 mm SL. Se muestran tres patrones observados de distribución de las, EpSCs (1) y PCs (2) y ejemplificado en los casos I, EpSC (1) se localiza basal y la PC (2) lateral o sobre la EpSC; caso II la EpSC (1) se localiza basal y la PC (2) por encima de la EpSC y caso III la EpSC (1) se localiza basal y la PC (2) se localiza lateralmente a la EpSC. La barra de escala en A es de 20 μ m.

En las post-larvas de 5 mm SL observamos de manera consistente, que ambos tipos de células, EpSCs y PCs, se localizaban una al lado de la otra (Figura 10A-D). Como se menciona anteriormente en la introducción algunos autores sugieren que los PCs corresponden a las llamadas TACs; sin embargo, su asignación actualmente permanece controversial. Por un lado, es difícil su identificación debido a que comparten marcadores de SCs y células diferenciadas y además aún se sabe poco acerca de sus propiedades; por lo anterior, decidimos nombrarlas PCs. Al estar contiguas a las EpSCs sugerimos que los PCs podrían ser derivadas de las EpSCs y son la principal fuente de las nuevas capas de células durante la estratificación epidermal.

De acuerdo a nuestras observaciones los dos tipos de células, EpSCs y PCs permanecen a los 6.5mm SL, cuando nuevas capas de células suprabasales aparecen en la epidermis aunque con una distribución diferencial. Las EpSCs permanecen predominantemente en la capa basal, mientras que los PCs se localizan contiguas a las EpSCs, pero mayormente en las capas suprabasales. A partir de lo que sería la primera capa suprabasal hasta la capa externa, observamos una disminución del marcaje de p63 conforme incrementa el número de capas suprabasales (Figura 10E). Un análisis cuantitativo de la proporción entre células p63 y pHH3 en las tres etapas, muestra que el número de PCs (marcadas con anti-pHH3) disminuye con respecto al total de número de células en la epidermis (Figura 10F), sugiriendo que la tasa de proliferación celular está disminuyendo a medida que la epidermis se engrosa.

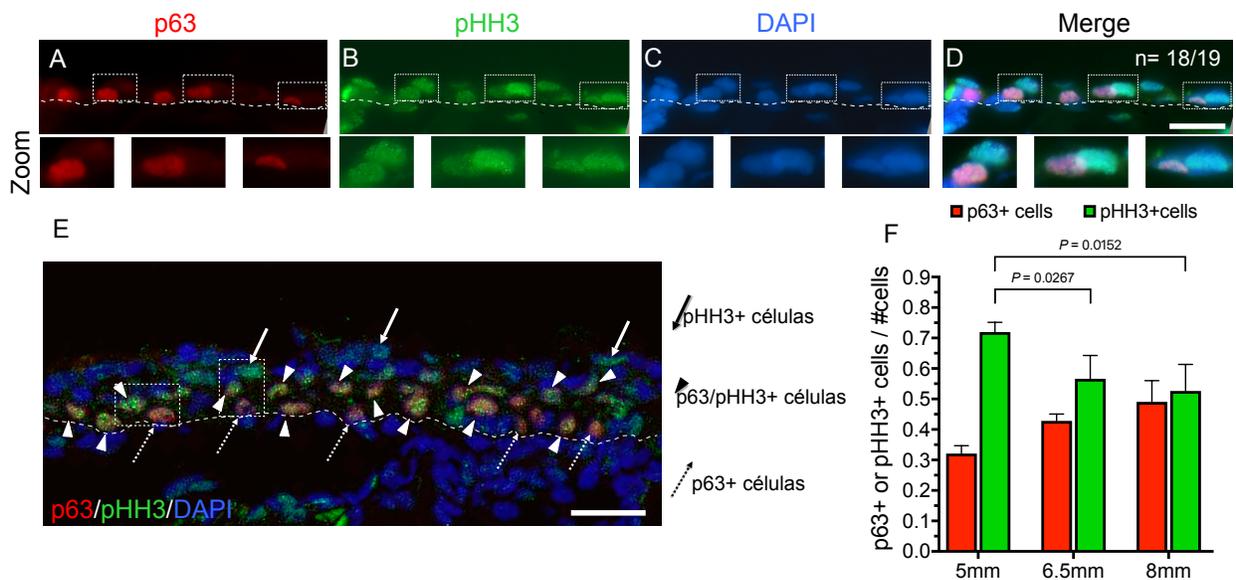


Figura 10. Distribución de poblaciones celulares troncales y progenitoras durante la estratificación epidermal. **A-D**, Doble inmunofluorescencia con anticuerpos anti-pHH3 y anti-p63 que marcan células de la epidermis de una larva de 5 mm SL. Los paneles inferiores muestran una ampliificación de las células que se encuentran contiguas en los paneles superiores. **E**, Doble inmunofluorescencia con los anti-pHH3 y anti-p63 en una larva de 6.5 mm SL. Las flechas punteadas indican células p63+ en la capa basal, las cabezas de flecha indican células en donde colocalizan p63+ y pHH3. En las capas basal y suprabasal y las flechas indican células pHH3+ en las capas más superiores. **F**, Gráfico de barras intercaladas que indica la proporción entre células p63+ y pHH3, normalizado con el marcaje nuclear empleando DAPI, en las tres distintas etapas. Los datos se derivan del análisis de larvas independientes, 5 mm (n=30), 6.5 mm (n=15), 8 mm (n=8) de SL. Las imágenes en A fueron obtenidas con un objetivo 10X, B-F, con un objetivo de 63X y G con un objetivo de 40X. La barra de escala de A-E es de 20 μ m.

La observación de la presencia de dos tipos de células, cuyo balance es importante para pasar de la epidermis larvaria a la del adulto nos pareció muy relevante. Por esa razón decidimos confirmarlo pero empleando un método diferente. Otro marcador de la proliferación celular es el EdU, el cual es un análogo del nucleósido de timidina. El EdU es incorporado en el DNA durante la replicación y luego es marcado con una azida fluorescente, al ser un método que no se basa en el marcaje de proteínas y no utiliza ningún anticuerpo, lo consideramos diferente al inmunomarcaje con anti-pHH3. Inicialmente establecimos las concentraciones necesarias que nos permitía detectar la señal de proliferación en las etapas larvarias. Establecimos que 1.5 horas de incubación con 50 μM de EdU en medio para embriones, a 28 °C es suficiente para observar el marcaje epidermal en larvas de 6 dpf (Figura 11A-F). Posteriormente realizamos un doble marcaje utilizando EdU y anti-p63 en larvas de 5 mm SL. La señal de EdU la observamos distribuida a lo largo de la larva (Figura 11G-H), confirmando que los altos niveles de proliferación celular en 5 mm SL. Nosotros encontramos principalmente dos tipos de células: 1) células p63+ / sin marcaje de EdU y de manera inversa, 2) células EdU+ / sin p63 (Figura 11 I-P). Estos dos tipos de células son similares a las encontradas en las dobles inmunotinciones de pHH3 y p63, sugiriendo que ambos tipos de células observadas corresponden a EpSCs y PCs. De igual manera, ambos tipos de células se encuentran contiguas y en las mismas posiciones, ya que observamos a las EpSCs en la capa basal y a los PCs en ambas capas, basal ó suprabasal (Figura 11 I-P, paneles inferiores).

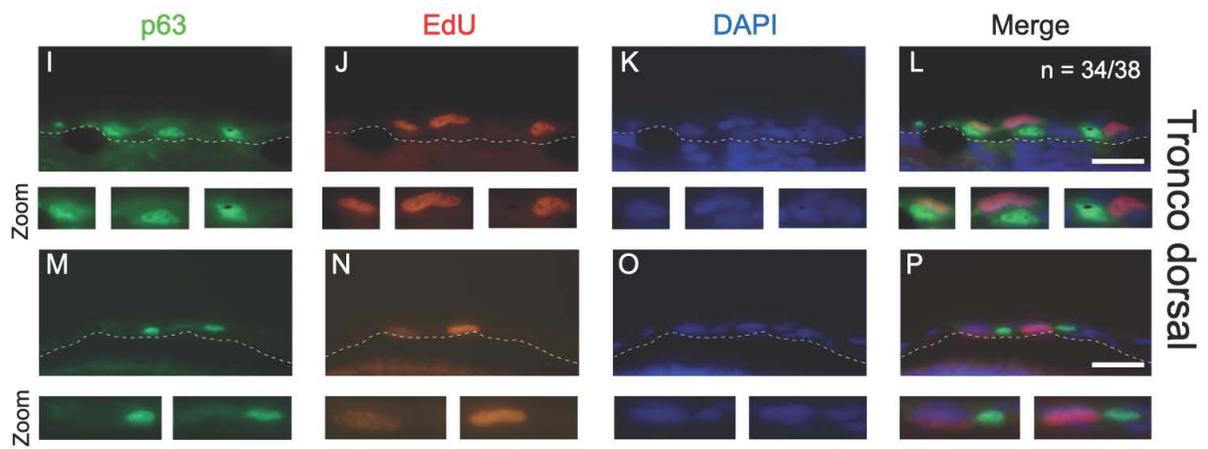
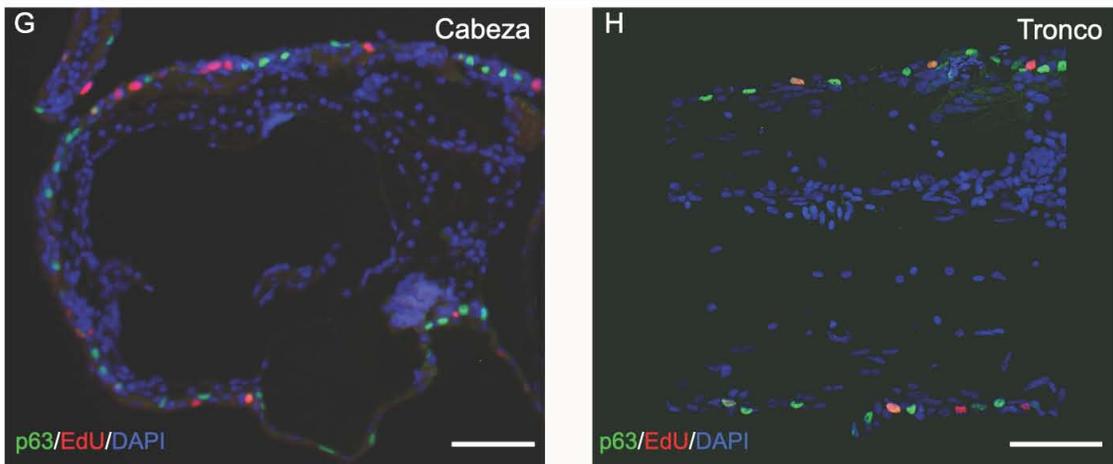
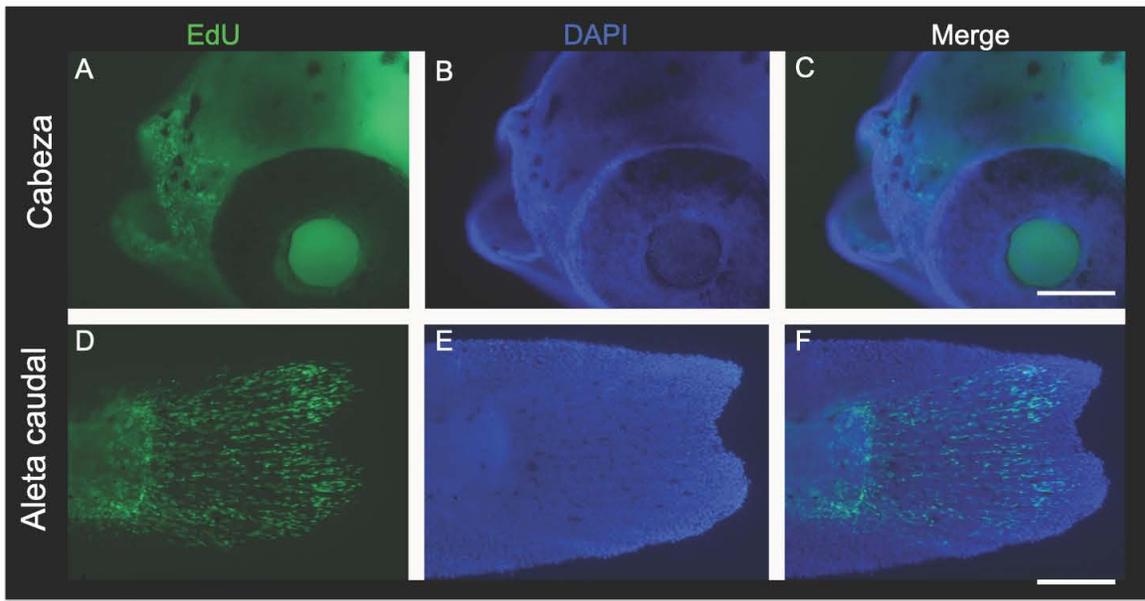
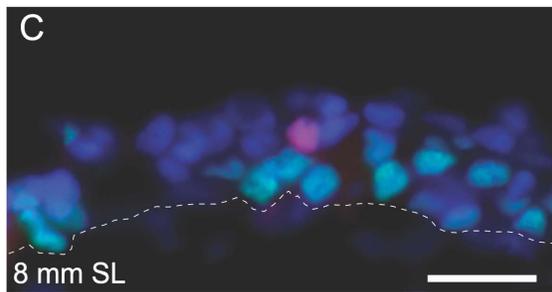
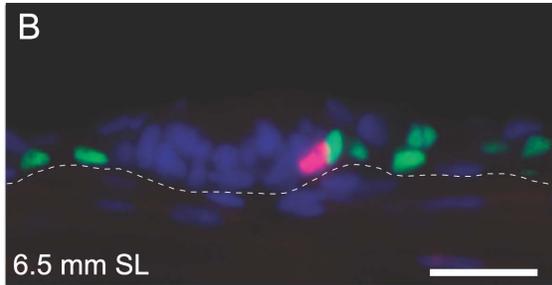
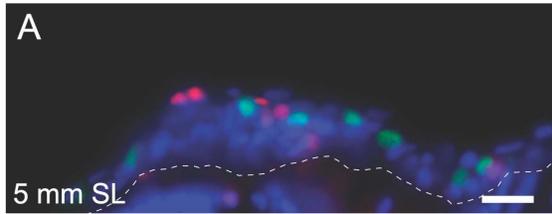


Figura 11. Detección por EdU y anti-p63 de diferentes tipos celulares durante las etapas iniciales de la estratificación epidermal. **A-F**, Detección por incorporación del análogo de timidina de EdU en larva completa de 6 días post-fertilización (dpf). **A-C**, Células marcadas con EdU en la región de la cabeza y **D-F**, en la región de la aleta caudal. **G-H**, Corte histológico longitudinal de larva de 6 dpf con detección de EdU y anti-p63. **I-P**, Doble-inmunofluorescencia con anti-p63 y EdU en sección longitudinal de larva de 5 mm SL. Los recuadros inferiores muestran una amplificación de los núcleos seleccionados de los paneles superiores. El número de imágenes que mostraron el mismo patrón de contigüidad fue de 34 de 38, de tres experimentos independientes. La barra de escala de **A-H** es de 100 μm y en **I-P** es 20 μm .

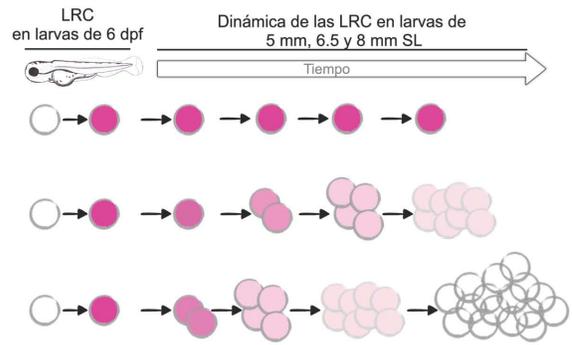
Una de las características del marcaje con EdU es que permite diseñar experimentos de pulso y caza en donde células vivas son expuestas al EdU y varios días después se pueden identificar y distinguir entre las células proliferantes de las quiescentes. Nosotros realizamos un ensayo de EdU pulso y caza con la intención original de establecer el comportamiento de la población de EpSCs a lo largo del desarrollo y de la estratificación de la epidermis. Para ello realizamos el tratamiento con EdU por 1.5 horas en larvas de 6 dpf y posteriormente estas larvas fueron mantenidas individualmente hasta alcanzar la talla de 5, 6.5 y 8 mm SL (de 25 a 45 días después), para finalmente hacer la detección para EdU y p63 (Figura 12A-C).

Este ensayo nos permitió examinar la progenie celular de la epidermis y distinguir entre las células que se dividieron más (aquellas que perdieron el marcaje) de las células que no se dividieron (las que retuvieron el marcaje) (Figura 12D). En las tres etapas 5, 6.5 y 8 mm SL detectamos un grupo de células que retuvieron el marcaje por más de 20 días, nosotros las nombramos “LRCs” por su nombre en inglés “*Label-Retaining-Cells*” (Tabla 6). Las LRCs no co-localizaron con p63 y no se limitan a la capa basal epidermal (Figura 12A-C) lo que indica que no son EpSCs. Al cuantificar su abundancia, durante las diferentes etapas de la estratificación de la epidermis, encontramos que mientras las células p63+ incrementan, las LRCs disminuyen con respecto al número total de células epidermales (Figura 12E). La identificación de las LRCs revela otro tipo de población celular que se mantiene en un estado quiescente por varias semanas.

p63/EdU/DAPI



D



E

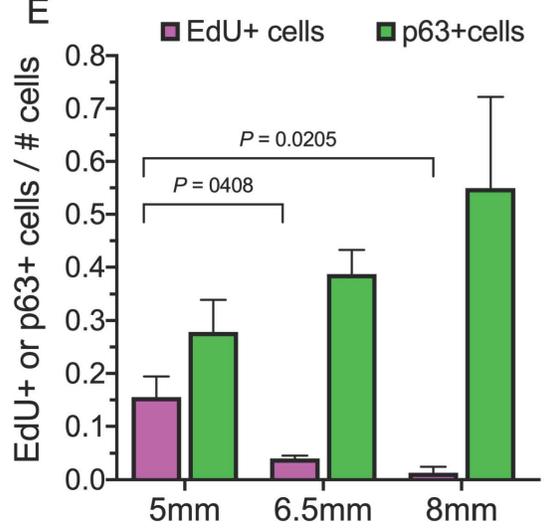


Figura 12. Identificación de una población de LRCs y su dinámica durante las etapas post-larvarias de pez cebra. **A-C**, Doble marcaje con detección de EdU y anti-p63 en larvas de 5, 6.5 y 8 mm SL. **D**, Representación esquemática del ensayo de pulso-y-caza con EdU. Incubación de EdU por 1.5 hrs a los 6 dpf, posteriormente las larvas fueron colectadas a los 5, 6.5 y 8 mm SL. La señal de EdU se diluye progresivamente en las células cuando se dividen, pero aquellas que son quiescentes retienen el marcaje (LRCs). **E**, Gráfico de barras intercaladas en donde se muestra la proporción de células p63+ y EdU+ con respecto al total de células marcadas con DAPI en las tres distintas etapas. La Barra escala en A-C es de 20 μm .

6.3. p63 y la fosforilación de p63 co-existen durante el engrosamiento epidermal.

Como se mencionó anteriormente los PCs incrementan su número a lo largo de la estratificación, principalmente en las capas suprabasales y presentan diferentes niveles de p63 o incluso p63 puede estar ausente (Figuras 8N y 10E). Ésto nos hizo pensar que p63 pudiera ser degradado durante la estratificación epidermal.

La estabilidad de la proteína p63 es regulada por modificaciones post-traduccionales, principalmente su fosforilación, ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma. Las PCs muestran altos niveles de proliferación y reducción en la señal de p63. Mediante ensayos de inmunofluorescencia y utilizando los anticuerpos anti-p63 y anti-p63-fosforilado (P-p63) en las tres distintas etapas 5, 6.5 y 8 mm SL, observamos a P-p63 en el citoplasma de células epidermales, detectándose con mayor intensidad en células suprabasales en comparación con las células basales (Figura 13A-B). Algunas de estas células se marcaron también con el anti-p63 (nuclear) pero otras no lo hicieron. Con la finalidad de corroborar la especificidad de los anticuerpos realizamos un análisis de Western Blot en donde observamos un desplazamiento de la banda de P-p63 con respecto a la de p63 (Figura 13C).

La expresión de p63 en el núcleo es lo que se espera de un factor transcripcional, y la detección de P-p63 en el citoplasma junto con la reducción de p63 en las capas suprabasales sugiere que p63 se relocaliza del núcleo al citoplasma cuando se fosforila. Para comprobar la presencia de P-p63 en el citoplasma de las células epidermales establecimos un cultivo primario de queratinocitos a partir de escamas y de fragmentos de la aleta caudal de un pez adulto. En el cultivo primario pudimos observar la propagación de distintos tipos celulares tales como: melanóforos, xantóforos, ionóforos (Figura 13 D-F) y queratinocitos, que fueron identificados con el anticuerpo anti-pan Citoqueratina (Figura 13 G-I). La localización de P-p63 en el cultivo primario se observó en el núcleo y en el citoplasma indicando que cuando p63 se fosforila se mueve del núcleo al citoplasma muy posiblemente para su degradación mediada por el proteosoma, para iniciar su diferenciación (Figura 13J-L).

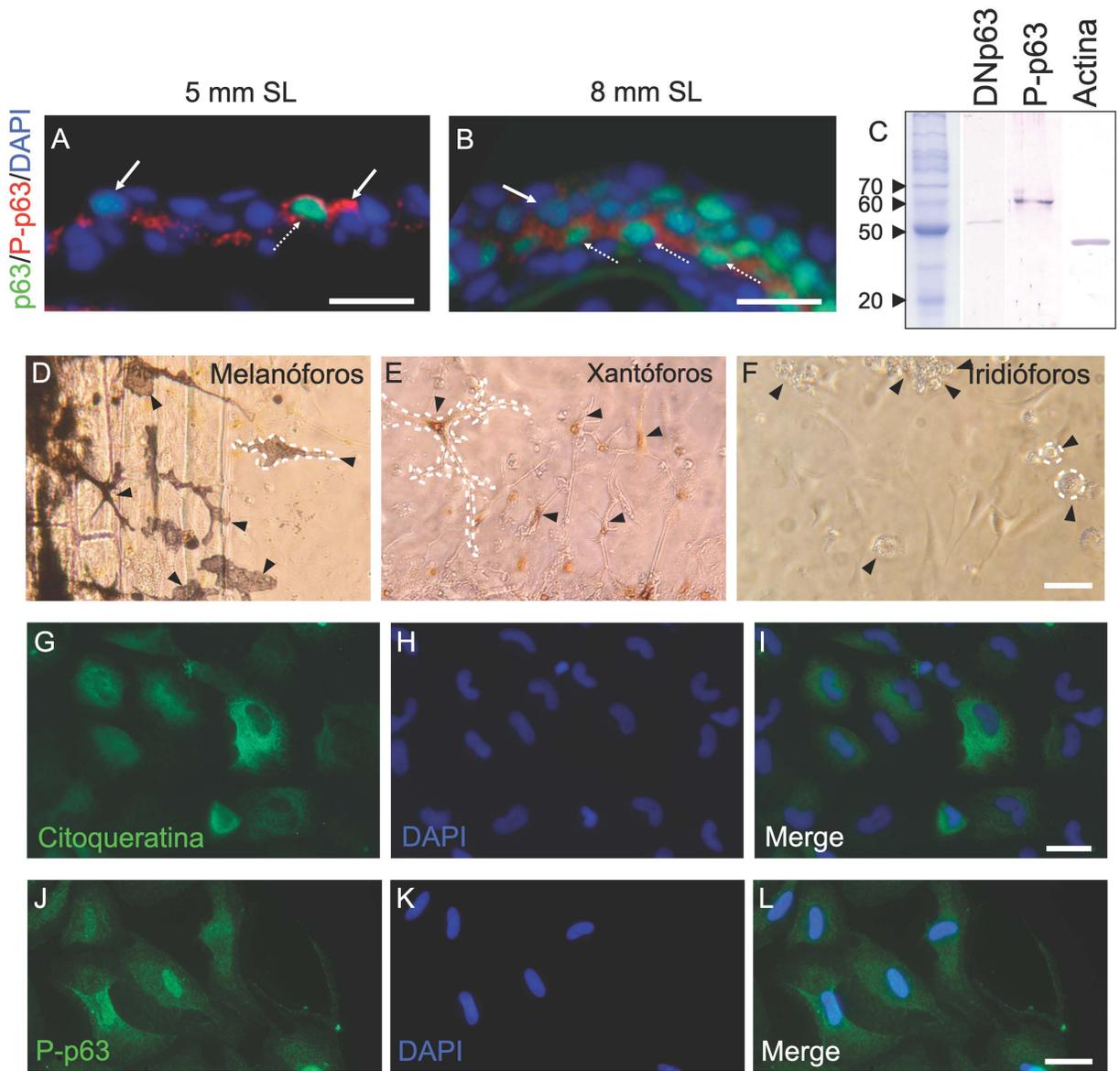


Figura 13. Presencia de p63 fosforilado en EpSCs y PCs en la epidermis y su distribución en cultivo primario de queratinocitos de pez cebra. **A-B**, Doble- inmunotinción con anti-p63 y anti-P-p63 en cortes histológicos de larvas de 5 y 8 mm SL. Las flechas punteadas indican a células basales con alta intensidad de p63 y P-p63, las flechas blancas indican células suprabasales con P-p63 y poca o nula señal de p63. **C**, Western blot de extractos post-larvarios para confirmar la especificidad de los anticuerpos contra DNp63-a (p63) y P-p63 junto con un anti-Actina como control de carga. **D-L**, Cultivo primario de células epidermales a partir de escamas y fragmentos de aleta caudal. **D-F**, Propagación de diferentes tipos celulares observados en el cultivo primario, las líneas punteadas delimitan a las células correspondientes a Melanóforos, Xantóforos y Iridióforos respectivamente. **G-L**, Cultivos primarios de queratinocitos. **G-I**, Inmunomarcaje con un anticuerpo anti-pan-citoqueratina. **J-L** inmunolocalización de P-p63. Las imágenes en A-B fueron obtenidas con el objetivo de 40X, mientras que las imágenes de D-L fueron obtenidas con 63X. Escala de barra en A-B y D-L es 20 μ m.

6.4. Divisiones asimétricas ocurren durante la estratificación.

Las divisiones asimétricas son importantes para generar nuevas capas epidermales en mamíferos. Como anteriormente mencionamos Par3, LGN, NuMA e Insc son requeridos para re-orientar el huso mitótico antes de las divisiones asimétricas. Evaluamos el patrón de expresión de proteínas que participan en la división asimétrica antes y durante la estratificación epidermal, utilizando anticuerpos dirigidos contra Par3, LGN, NuMA e Insc.

Primero observamos que en 5 mm SL, el patrón de expresión de Par3, LGN y NuMA (Figura 14A-I) es distinto del observado en 6.5 mm SL (Figura 14O-T). En la fase de pre-estratificación, a los 5 mm SL; la localización de Par3 se encuentra en el citoplasma de la célula, a un lado del núcleo (unilateral) y en ambos lados (bilateral) (Figura 14A-C). LGN se observó una distribución unilateral, bilateral y alrededor del núcleo (Figura 14D-F); de igual manera NuMA se observó principalmente distribuida alrededor del núcleo (Figura 14G-I). Así mismo, la co-localización de p63 y Par3 en células basales muestra la expresión de Par3 en células EpSCs, a los 5 mm SL. Nuestros datos indican que antes de la estratificación (5 mm SL), también hay eventos celulares en que participan Par3, LGN y NuMA. Sin embargo, no se distribuyen en un arreglo en forma de luna creciente, que es el típico patrón de expresión que se observa en las divisiones asimétricas, sino que lo observamos en una localización uni o bilateral y / o alrededor del núcleo.

Dada la expresión atípica de estas proteínas de división asimétrica, nos preguntamos si las células que expresan LGN y NuMA están proliferando. Para ello realizamos un co-marcaje de LGN con EdU y de NuMA con EdU (Figuras 14J-N). Observamos que las células que expresan tanto LGN como NuMA están en una fase de proliferación activa.

A los 6.5 mm SL, que es un estado avanzado de la estratificación epidermal, localizamos la expresión de Par3 y LGN en una posición apical; más específicamente la señal se observa entre el núcleo y la membrana basal, del lado contrario a la membrana basal. Ambas proteínas se distribuyen en forma de luna creciente, ésta distribución se refiere a la señal del anticuerpo que detecta a los componentes del complejo de división asimétrica, asemeja a la forma de una luna creciente en el citoplasma entre el núcleo y la membrana celular (Figura 14O-T). Experimentos de doble inmunomarcaje anti-Par3/anti-p63 o anti-LGN/anti-p63 sugieren que las EpSCs se dividen

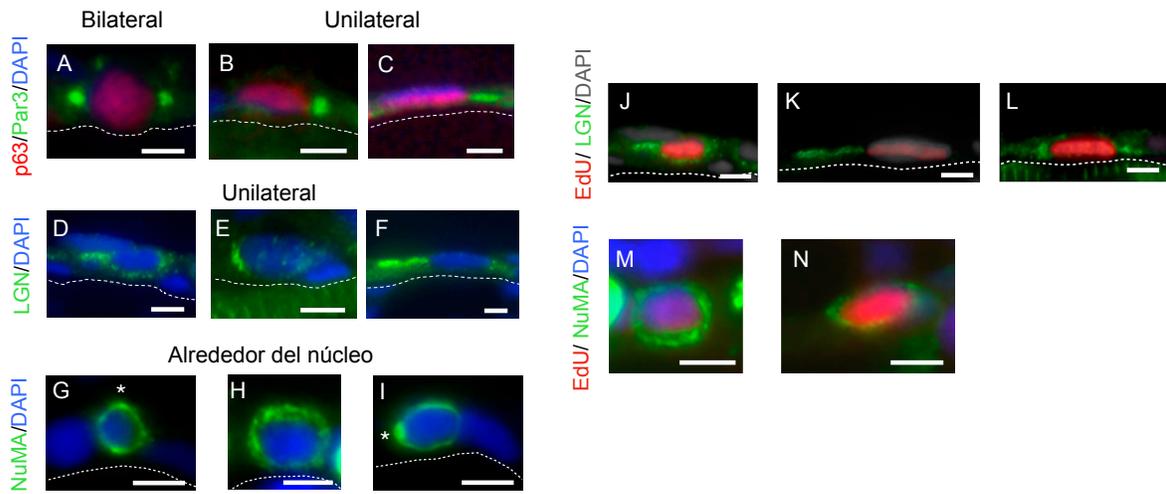
por divisiones asimétricas. A diferencia de Par3 y LGN no pudimos detectar células positivas a NuMA en cortes histológicos de 6.5 mm SL como lo hicimos en 5 mm SL y 8 mm SL.

Se sabe que la dirección del huso mitótico define la posición que tendrán las células hijas durante la división celular y como se mencionó anteriormente, tanto Par3 como LGN reorientan el huso mitótico durante las divisiones asimétricas. La localización apical de la luna creciente de Par3 y LGN nos indica que el plano de la citocinesis (separación de las células hijas) ocurrirá apicalmente. Es decir que las células hijas quedarán una sobre la otra. Nosotros cuantificamos el ángulo en el que se ubica el centro de la luna creciente tomando como ángulo de 0° a un eje imaginario a la altura del núcleo y paralelo a la membrana basal (Figura 14U-V, recuadros laterales a la izquierda). La orientación para la mayoría de las formas de luna creciente de Par3 se encontraban casi perpendicular a la membrana basal con ángulos entre 70-85° y en LGN alrededor de 90° (Figura 14U-V). Si consideramos a la célula como un círculo de 360°, los tamaños de las lunas crecientes de LGN fueron de 150° a 180°; en comparación con los de Par3 que iban de 80° a 180° (Figura 14W); aunque hubo algunas ligeras variaciones en el tamaño de las lunas crecientes principalmente para Par3, la orientación perpendicular a la membrana basal para Par3 y LGN fueron similares.

Finalmente, también exploramos las divisiones asimétricas en las etapas tardías de la estratificación. En la etapa de 8 mm SL, la epidermis se encuentra formada por varias capas de células (Figura 15A). En nuestras observaciones detectamos algunas células con señal de Par3 formando el patrón de luna creciente y alrededor del núcleo, principalmente en las células de la capa suprabasal (Figura 15B-C). A lo largo de nuestra caracterización utilizamos todos los marcadores posibles que participan en las divisiones asimétricas, además de los observados en 5 y 6.5 mm SL (Par3, NuMA y LGN), detectamos algunas células expresando a la proteína Insc, también en forma de luna creciente y en células suprabasales (Figura 15D-E). La distribución de NuMA en 8 mm SL fue similar a la observada en 5 mm SL, alrededor del núcleo pero con pequeños puntos distribuidos en forma uni o bilateralmente (Figura 15F-G). Las células positivas a Par3, Insc y NuMA fueron observadas en las capas suprabasales y externa, estas se observaron en algunas ocasiones en presencia ó ausencia de p63 (Figura 15A-G). La orientación de las lunas crecientes de Par3, Insc y NuMA no presentan una orientación definida como en 6.5 mm SL, observándolas tanto perpendicular como lateralmente (Figura 15H). Esto es un indicio de la

dinámica de división celular que ocurre en las distintas etapas de la estratificación y que podría reflejar que el papel que tienen las células basales, al inicio de la estratificación de la epidermis, lo asumen posteriormente las células suprabasales.

5mm SL



6.5 mm SL

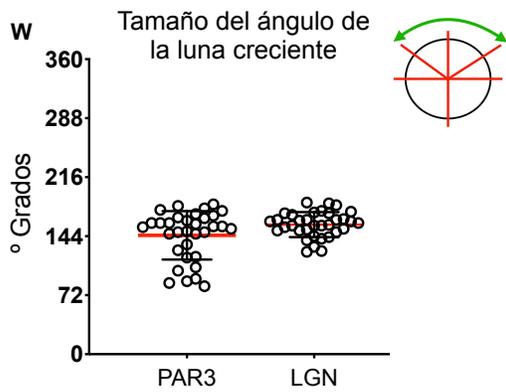
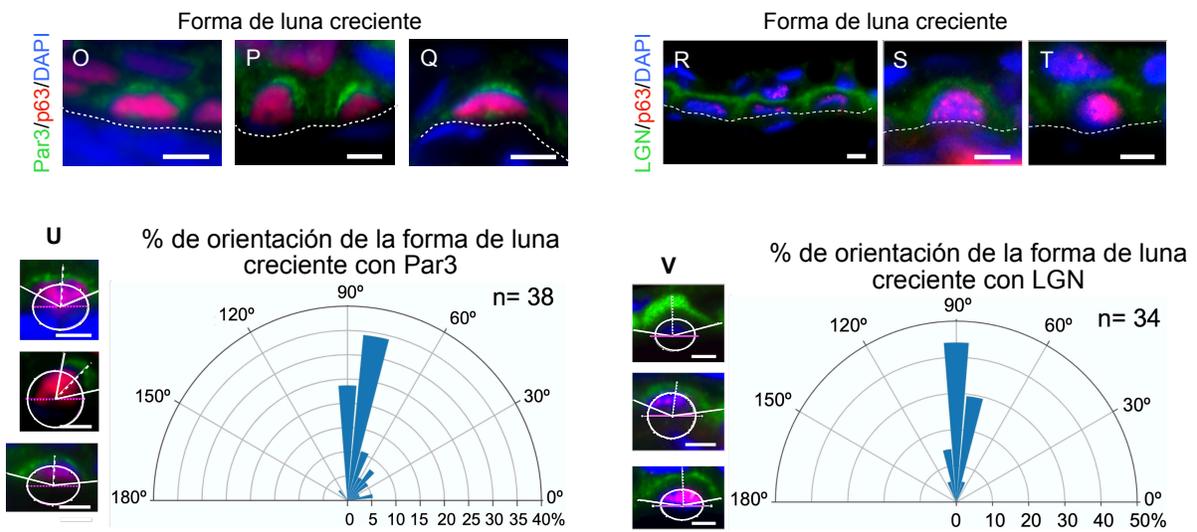
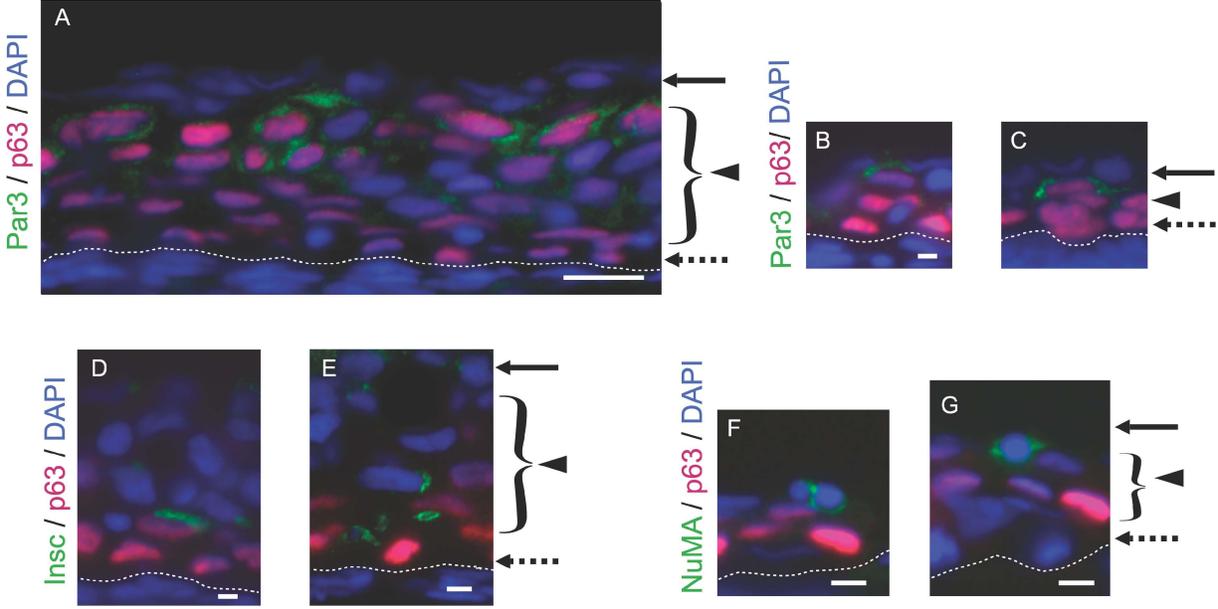


Figura 14. Diferencias en la distribución de componentes del complejo de división asimétrica (Par3, LGN y NuMA) en las EpSCs antes y durante la estratificación de la epidermis en el pez cebra.

A-I, Patrón de distribución de las proteínas Par3 (y p63), LGN y NuMA durante la etapa de pre-estratificación, a los 5 mm SL. Estas se distribuyen en forma bilateral, unilateral y alrededor del núcleo, respectivamente. Los asteriscos en G e I marcan lo que parecieran agregados de NuMA. **J-N**, Co-marcaje de anti-LGN o anti-NuMA con el marcador mitótico EdU. **O-T**, Etapa de estratificación de 6.5 mm SL. Patrón de distribución de las proteínas Par3 y LGN en la epidermis y orientación perpendicular de la forma de luna creciente. Ambas co-localizan con p63. **U-V**, Histograma radial que agrupa a las lunas crecientes de Par3 y LGN de acuerdo al ángulo en que se orientan cada una de estas estructuras. Los paneles de la izquierda ejemplifican como se obtuvo el ángulo del marcado en forma de luna creciente. En algunos de estos ejemplos el núcleo se ve morado por la co-localización de p63 con DAPI. **W**, Gráfico de dispersión de puntos que muestra el tamaño de las lunas crecientes para Par3 y LGN. Las imágenes fueron obtenidas con el objetivo 63X. Escala de la barra es 5 μm .

8 mm SL



% de orientación de la forma de luna creciente con Par3, Insc y NuMA

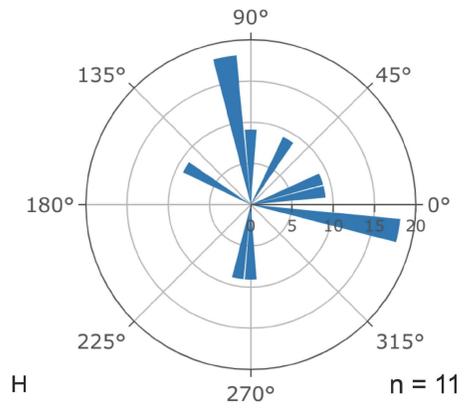


Figura 15. Orientación heterogénea de la luna creciente con los componentes del complejo de división asimétrica en la epidermis de larvas de 8 mm SL.

A-G, Expresión de proteínas de división asimétrica en el estadio de 8 mm SL. Las flechas punteadas marcan la zona de células basales, la flecha continua la capa de células externas y la cabeza de flecha (y corchete) a la zona suprabasal. **A-C**, Doble inmunotinción de anti-Par3 y anti-p63, empleando a DAPI como marcador nuclear. Se observa el patrón de luna creciente en células suprabasales, aunque no en distribución apical, es notoria la orientación heterogénea del marcado en forma de la luna creciente. **D-E**, Doble inmunotinción de anti-Insc y anti-p63, combinado con un marcaje nuclear con DAPI. Se observa un patrón de luna creciente, aunque no siempre en posición apical y preferentemente en células basales. **F-G**, Doble inmunomarcaje con los anticuerpos anti-NuMA y anti-p63, las mismas preparaciones fueron tratadas con DAPI para marcar los nucleos. Se detecto la señal enriquecida (asteriscos) de NuMA en un solo lado (unilateral) o en ambos lados de las células (bilateral). **H**, Histograma radial que agrupa a las lunas crecientes de Par3 y Insc y NuMA de acuerdo al ángulo en que se orientan cada una de estas estructuras. Éste gráfico, fue construido con datos de experimentos hechos con anti-Par3, anti-Insc y anti-NuMA y fueron colocados en el mismo gráfico para su comparación. Escala de la barra en A es 20 μm y en B-G es 5 μm .

6.5. Signos de la diferenciación celular durante la estratificación epidermal.

La vía de señalización de Notch regula interacciones celulares, proliferación, diferenciación, destino celular, apoptosis y desarrollo embrionario, tanto en vertebrados como en invertebrados [83]. En la epidermis la señalización de Notch orquesta el proceso de diferenciación celular y proliferación a través de una actividad secuencial de su diferentes ligandos, receptores y vía de señalización río-abajo [84]. La división asimétrica y la señalización de Notch actúan en una ruta en común promoviendo el cambio celular de basal a suprabasal en la diferenciación [85]. Por eventos de duplicación, el pez cebra presentan dos genes *notch1* (*notch1a*, *notch1b*), un *notch2* (o *notch6*) y un *notch3* (o *notch5*), nosotros exploramos los niveles de expresión de los distintos transcritos de Notch en las tres etapas post-larvares (5-8 mm SL).

En el análisis de RT-PCR, observamos el perfil de expresión de los distintos genes Notch. Los genes *notch1a* mantiene poca expresión en las tres etapas, *notch1b* sólo se observa su leve expresión en 8mm SL, en comparación con *notch2* y *notch3* que se mantienen expresados a lo largo de las tres etapas post-larvares (Figura 16).

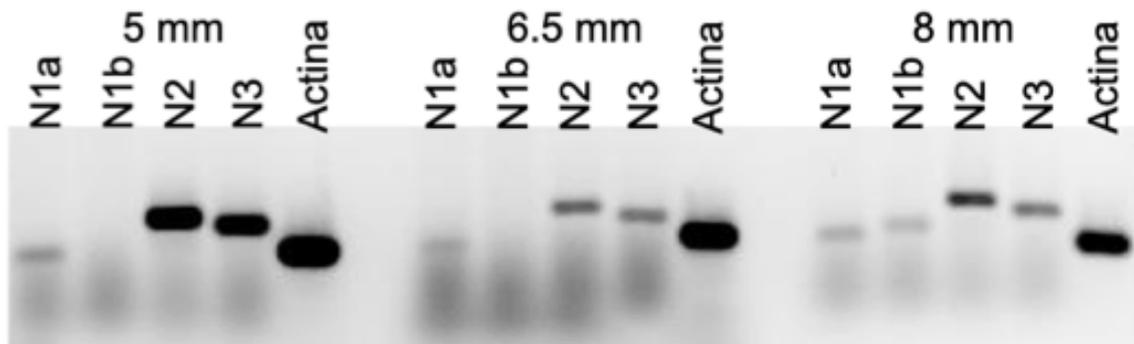


Figura 16. Expresión diferencial de los genes Notch de pez cebra durante las etapas post-larvares.

A, RT-PCR cualitativo del perfil de expresión de los genes *notch1a*, *notch1b*, *notch2* y *notch3* en larvas completas de los estadios post-larvares de 5, 6.5 y 8 mm SL.

Finalmente, en la Tabla 6 se resumen los distintos tipos de poblaciones que identificamos a lo largo del proceso de estratificación en las etapas post-larvarias del pez cebra, indicando su localización y posible papel en la estratificación epidermal.

Tabla 6. Resumen de los diferentes tipos celulares que participan en la estratificación epidermal.

Tipo celular	Método de detección	Locación durante la estratificación epidermal	Función durante la estratificación epidermal
Células Troncales Epidermales (EpSCs)	Señal elevada de p63 y señal reducida o nula de marcadores división celular (pHH3 y EdU)	Capa basal en 5-8mm SL	Mantienen el reservorio de células troncales para la formación y renovación de la epidermis.
Progenitores Celulares comprometidas a diferenciarse (PCs)	Señal reducida o nula de p63 y señal elevada de marcadores división celular (pHH3 y EdU)	Capas basales y suprabasales, observadas en 5 y 6.5 mm SL.	Proliferan durante la estratificación epidermal y forman nuevas capas de células.
Células de Retención de Marcaje	Incorporación y retención por más de 1 mes del marcador (EdU).	Se observaron en todas las capas epidermales.	Células Troncales Quiescentes.

(LRCs)			
Células de transición de SCs a PCs.	Células con presencia de p63 fosforilado.	Capas basales y Suprabasales	Podría reflejar un paso de la degradación de p63.
Células con División Asimétrica (EpSCs)	Con anticuerpos anti-Par3 y anti-LGN, se observó una distribución en forma de luna creciente en la región apical de las células basales.	Capas basales.	Formación de nuevas capas de células.

VII. DISCUSION.

7.1. El papel de las Células troncales y Progenitores epidermales durante la estratificación de la epidermis.

El desarrollo, la homeostasis y la dinámica celular de la epidermis de pez cebra, proveen un modelo experimental para estudiar aspectos fundamentales en la construcción de los tejidos [86]. En este trabajo describimos los cambios epiteliales que ocurren antes y después de la estratificación epidermal durante el desarrollo post-larvario (5 - 8 mm SL) del pez cebra; ya que en estas etapas es cuando ocurre el engrosamiento de la epidermis. Nosotros observamos que inicialmente en la epidermis (5 mm SL) se observan solo dos capas de células aplanadas que eventualmente y conforme progresa la estratificación se vuelven más redondeadas; además, de que se agregan nuevas células que forman capas suprabasales.

En la epidermis de mamíferos un incremento en los niveles de proliferación celular produce una sobrepoblación en la capa basal, generando una compresión lateral, baja tensión cortical y un aumento de la adhesión celular. Lo anterior resulta en la disminución gradual en el área de contacto superficial, causando que algunas células cambien su forma y se muevan a posiciones sobre la capa basal o suprabasales. Los cambios dinámicos en la forma y el movimiento ascendente requieren un intrincado control de fuerzas mecánicas y contacto célula-célula, estableciendo la importancia de tensiones mecánicas junto con la adhesión en la diferenciación celular [87]. Connely J.T., y colaboradores en el 2010 utilizaron el cultivo de queratinocitos en áreas de crecimiento muy restringidas, para generar una sobrepoblación celular y estudiar los arreglos del citoesqueleto y su relación en la inducción de la diferenciación celular. Cuando las células se mueven de capas basales a suprabasales cambian su forma e incrementan su tamaño, iniciando la expresión de marcadores de diferenciación celular. Sugiriendo que rearrreglos en el citoesqueleto de actina incrementa su potencial de proliferación [88, 89] [90]. La combinación de cambios biomecánicos acoplado a la proliferación celular y diferenciación celular definen la organización de un tejido de múltiples capas [91]. Procesos como estos podrían estar conectados con el cambio que observamos en la forma de las células epidérmicas del pez cebra durante la estratificación epidermal.

Como mencionamos anteriormente, el factor transcripcional p63 es esencial para el desarrollo y mantenimiento de la piel, su regulación y expresión es regulada en diferentes niveles [7, 92]. p63 es utilizado como el principal marcador de células troncales epidermales tanto en pez cebra como en otros organismos [93-95]. En ratón, la ausencia de p63 durante la embriogénesis, reveló múltiples defectos; la superficie cubierta por la piel fue del 60-80%, además se reportó hipoplasia, erosión, adelgazamiento y pérdida en el desarrollo folicular, finalmente resultando en una muerte prematura de los ratones [95-97]. En pez cebra la expresión de p63 inicia desde la embriogénesis (20 hpf) y el *Knock-down* resultó en embriones con defectos en la formación de las aletas y piel, similar al fenotipo de ratón [21]. Nosotros observamos altos niveles de p63 durante la estratificación epidermal, principalmente en la capa basal y en las primeras capas suprabasales.

El incremento de proliferación celular que detectamos (5 mm SL), pareciera indicar una fase de preparación para la estratificación de la epidermis del pez cebra. Las señales que lo desencadenan aún son desconocidas. Sin embargo, en ratones se ha descrito que durante la proliferación de células epidermales, dos proteínas secretadas por las células dermales: *secreted frizzled-related protein 1 (Sfrp1)* y *insulin-like growth factor-binding protein2 (igfbp2)* inducen la proliferación de células basales y progenitores epidermales [98]. Como se mencionó anteriormente una alta proliferación celular se traduce en fuerzas mecánicas que producen cambios en la morfología celular. En epitelios en monocapa, la sobrepoblación resulta en extrusión celular, lo cual es esencial para mantener la homeóstasis en los tejidos [99]. En el caso de la epidermis, a los 5 mm SL que solo tiene dos capas de células (basales y externas) una delaminación de las células basales podría traducirse en células basales formando nuevas capas suprabasales [87].

Una vez que la epidermis tiene múltiples capas (6.5 - 8 mm SL) la piel adquiere nuevas funciones, como las asociadas con la formación de apéndices cutáneos como escamas y rayos en las aletas. Para ello es importante la participación de vías de señalización como en las que participan Sonic hedgehog-a (*Shha*) y Wnt/PCP, por ejemplo, para regular a los osteoblastos que forman las escamas [100-102]. Es claro que primero es necesario un engrosamiento de la epidermis que de un soporte y sustento durante el surgimiento de las escamas [82, 103].

Además de la inducción y expresión de distintas moléculas de señalización; diferentes cambios morfológicos ocurren relacionados a las interacciones epidermis-dermis, como acumulación de colágena debajo de la membrana basal. Nuestras observaciones coinciden con las de Le Gallec y colaboradores en el 2004, quienes enfatizan la deposición y organización de la colágena en la dermis cuando la epidermis de pez cebra se encuentra formada por 4 capas de células. Según estos autores en las células basales abunda una red de cisternas del Retículo Endoplásmico Rugoso y regiones del Aparato de Golgi, sugiriendo una mayor actividad de síntesis de proteínas y actividad de moléculas de señalización [3].

Para determinar la proliferación celular en las distintas etapas post-larvarias utilizamos dos formas diferentes de marcar a las células en división (inmunodetección e incorporación de nucleótidos). Antes del engrosamiento epidermal en la etapa de 5mm SL, detectamos dos distintas poblaciones de células: las EpSCs y las PCs (Tabla 5). Diversos autores coinciden que las células basales epidermales que expresan a p63 corresponden a SC [8, 15, 19, 21, 104]. Las EpSCs que estudiamos siempre expresan a p63 y co-existen con diferentes poblaciones de PCs que tienen nula o poca señal de p63 y alta tasa de proliferación celular, los PCs se localizan tanto en capas basales como suprabasales. La contigüidad entre EpSCs (p63+) y PCs (pHH3+) se observó de manera constante en todos los individuos pero parece ser un fenómeno solo observado en el pez cebra hasta ahora. Su asociación nos hace pensar que podrían tener un origen en común como el ser las células hijas de la misma división celular, sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales como de marcaje y rastreo o seguimiento *in vivo* para demostrarlo.

Durante un análisis clonal en ratones entre los 3.5 días a 4 semanas de edad se estableció que las células troncales en la epidermis se dividen lentamente, mientras que las células progenitoras comprometidas se dividen hasta diez veces más rápido. Las células progenitoras mostraron una constante expansión. En contraste las células troncales mostraron una amplificación inicial y posteriormente regresan a un estado quiescente [55]. Las células troncales y las progenitoras comprometidas descritas anteriormente se comportan en forma similar a las EpSCs y a los PCs de pez cebra descritas en este trabajo.

Además de las EpSCs, nosotros identificamos otro subconjunto de posibles células troncales. Estas fueron identificadas por un experimento de pulso y caza con EdU. Dichas células (llamadas LRCs) permanecieron sin dividirse o se dividieron con menor frecuencia desde los 6 dpf hasta las etapas de 5,6.5 y 8 mm SL. Ésto es interesante, ya que inicialmente las LRCs se encontraban en fase de síntesis celular por lo que incorporaron el análogo a timidina (EdU) y posteriormente entraron a un estado quiescente en el cual las encontramos, más de 30 días después (5 – 8 mm SL). Se sabe que hay subtipos de SCs que pueden mantenerse en un estado quiescente y que tienen funciones diferentes a las SCs que se dividen con mayor frecuencia [105, 106]. Algunos tejidos adicionales a la epidermis donde se han descrito las SC quiescentes son el folículo piloso [107] y los sistemas nervioso y hematopoyético [108]. Nosotros creemos que las LRCs fueron capaces de reingresar al ciclo celular y dividirse de manera continua en el mayor pico de proliferación celular durante la estratificación de la epidermis. Esto es por que observamos que conforme progresaba la estratificación epidermal el número de LRCs era más difícil de detectar, sugiriendo una mayor dilución del marcaje retenido, conforme incrementaban las divisiones celulares. Este hallazgo consideramos necesita una mayor exploración para conocer el papel de las LRCs en el desarrollo, homeostasis y regeneración epidermal. El mecanismo que las células quiescentes utilizan para entrar, mantenerse y salir del estado quiescente y/ o reingresar al ciclo celular aún no esta del todo claro. Algunos autores sugieren que las SC quiescentes funcionan como un reservorio de células para remplazar a las células que se encuentran activamente dividiéndose bajo condiciones de estrés celular o daño en el tejido [105, 109]

Otro de los hallazgos de este trabajo tiene que ver con el factor transcripcional p63. Durante nuestros ensayos encontramos que mientras las EpSCs expresan altos niveles de p63, los PCs tienen bajos niveles, lo cual se puede deber a menor expresión genética o a que se está degradando. Se ha visto, en cultivos de queratinocitos epidermales de mamíferos, que un pulso de Ca^{2+} (de 0.05 mM a 0.1 mM) induce diferenciación celular [110] y que la diferenciación no solo reduce la expresión de p63, si no que produce una forma fosforilada de p63 [111]. La fosforilación de p63 es una señal para su posterior degradación, la cual es mediada por ubiquitinación [57] estudiado en ratones y cultivo de células humanas [66, 111]. Nuestras observaciones sugieren que durante la estratificación epidermal en pez cebra, p63 comienza su fosforilación para su posible degradación. A diferencia de p63 que sólo lo localizamos en el núcleo, P-p63 se observaba tanto en el núcleo

como en el citoplasma de células basales y suprabasales y tanto en presencia como en ausencia de p63. La localización de P-p63 en ambos compartimentos fue confirmada a través de un explante de queratinocitos a partir del corte de la aleta caudal y escama de peces adultos, sugiriendo un probablemente mecanismo de exportación del núcleo al citoplasma para su posible degradación; lo cual podría reflejar diferentes estados de degradación de p63.

La red de regulación de p63 es extensamente compleja [112], con funciones regulatorias en células troncales epidermales a diferentes niveles [92]. En ratón, la pérdida de p63 también genera hendiduras faciales y pérdida de extremidades, por alteraciones en la cresta ectodérmica apical [96]. Debido a la complejidad de su red de regulación, sus funciones permanecen aún controversiales, ya que se requiere para el mantenimiento y renovación de SCs, pero también para la diferenciación celular, lo cual involucra a diversas proteínas de secreción como son Fibronectina-1, Interleucina-1b y Jagged-1 [92, 95, 113]. La función de p63 en diferentes contextos celulares podrían explicar estas discrepancias, aunado a las diversas isoformas de p63, en donde promotores alternos y “*splicing*” alternativo juegan un papel durante su expresión [97, 114, 115]. Sin embargo, esta clara la relación entre la fosforilación de p63 y la proliferación y diferenciación de los PCs [66, 97, 111, 116].

Sin duda los eventos celulares que ocurren durante la formación de la piel son importantes para establecer un tejido que dará soporte y protección al pez a lo largo de su vida. Un tema directamente relacionado con la piel es su alta capacidad de reemplazar por completo el tejido dañado con nuevo tejido o regeneración que reestablece la continuidad del tejido y mantiene la homeostasis de los órganos [117]. En heridas hechas en ratón los queratinocitos adyacentes a la zona dañada tienen una transición epitelio-mesénquima, migrando hacia el sitio de la herida. Este proceso es controlado a nivel molecular involucrando pérdida de uniones intercelulares, cambios morfológicos y un incremento en la motilidad [118, 119]. También en el pez cebra se ha observado que los queratinocitos migran al sitio de la herida desde áreas adyacentes formando una “neo-epidermis” [120].

La re-epitelización requiere un reordenamiento epitelial, que involucra intercalaciones radiales y elongación de células, procesos que son dependientes de las cinasas Rho y la cinasa Jun N-terminal

(JNK), por mencionar algunos componentes. Estos rearrreglos llevan al reclutamiento de queratinocitos de la epidermis adyacente, en una re-epitelización que es independiente de la proliferación celular [121]. Sin embargo, las áreas colindantes a la herida se adelgazan por la pérdida de células y eventualmente estas áreas se engrosan por eventos que sí involucran proliferación celular [121]. Postulamos que la re-epitelización de las áreas colindantes se asemeja al proceso de estratificación como lo observamos en este trabajo.

7.2. Divisiones asimétricas y expresión de Notch forman parte de la estratificación epidermal.

La división celular asimétrica es un proceso generalizado que ocurre en organismos que van desde procariontes hasta organismos multicelulares altamente complejos. Las proteínas Par3, LGN, NuMA e Insc son componentes conservados de complejos de polaridad celular [71]. En organismos multicelulares, las divisiones asimétricas son fundamentales para la diversificación celular [67]. Las células epidermales requieren de una polaridad ápico - basal para establecer su función como barrera protectora [122]. Trabajos previos en la epidermis de ratones demostraron que las proteínas de estos complejos de polaridad celular son esenciales en el inicio de la estratificación durante la morfogénesis epidermal [73, 85, 123, 124]. En la embriogénesis de pez, cebra se ha descrito la importancia de las divisiones asimétricas en progenitores neurales [125, 126], angiogénesis [127] y durante la fase de gastrulación [128], pero no se han descrito durante la estratificación epidermal. Uno de los hallazgos mas importantes de este trabajo es que durante la estratificación epidermal en el pez cebra, las EpSCs se dividen, en la etapa de 6.5 mm SL, por divisiones asimétricas. Esto implica que al dividirse las EpSCs dan lugar a dos células hijas que son intrínsecamente diferentes.

Un hallazgo interesante es que la localización y distribución de Par3, LGN y NuMA es diferente entre las etapas de pre-estratificación (5 mm SL), estratificación (6.5 mm) y estratificación tardía (8 mm SL) de la epidermis. Inicialmente en la etapa de pre-estratificación observamos que Par3 y LGN se distribuyen uni o bilateralmente en las células basales, lo cual es una distribución poco común. Sin embargo, Byrd y colaboradores describieron que, en el epitelio de la cavidad oral de ratón, LGN se distribuye en agregados uni y bipolares, en la etapa de E15.5, justo al comienzo de la estratificación de este epitelio, lo que sugiere divisiones celulares laterales [124].

NuMA forma parte de un complejo junto con LGN y Gai, que son proteínas involucradas en la reorientación del huso mitótico [73, 123]. Sin embargo, en nuestros experimentos NuMA tuvo una distribución distinta a LGN. NuMA se detectó alrededor del núcleo, aunque con cierta tendencia a acumularse en agregados uni o bilateralmente. Esta distribución podría reflejar la dinámica de reclutamiento en el ensamblaje de los complejos. Las células epidermales con Par3 y LGN fueron también positivas a p63 y EdU lo cual sugiere la salida de las EpSC de su estado troncal mientras se dividen lateralmente. Es decir que antes del pico de la estratificación las células se dividen activamente pero no para el engrosamiento epidermal sino probablemente para incrementar el área de la superficie.

En el pico de la estratificación (6.5 mm SL) Par3 y LGN cambiaron su distribución a una forma de luna creciente en la región apical de las células basales. En ratones, Par3 se localiza apicalmente en las células epidermales [129], de manera similar a LGN, la cual se localiza en el córtex apical de células basales de la epidermis, en donde promueve divisiones celulares en una dirección perpendicular [124]. La distribución que observamos para Par3 y LGN es muy similar pero no idéntica, mientras que Par3 tiende a formar la luna creciente en una posición oblicua, la forma de luna creciente de LGN fue distribuida en su mayoría en un ángulo recto con respecto a la membrana basal. Simultáneamente, se observaron variaciones en el tamaño de la forma de luna creciente entre Par3 y LGN. Igualmente detectamos la expresión de p63 en células con Par3 y LGN, indicando que las EpSCs en la etapa de 6.5 mm SL en pez cebra se dividen asimétricamente muy posiblemente participando en el engrosamiento epidermal.

En larvas de 8 mm SL, el número de células positivas para los marcadores del complejo de polaridad no fue tan abundante como a los 6.5 mm SL y aunque Par3 siguió observándose en un patón de luna creciente se perdió la orientación apical o paralela a la membrana. Además, las células que expresaron Par3 se localizaron en las capas suprabasales en donde algunas de estas coexpresaron a p63. De manera adicional, un elemento interesante del complejo de polaridad es la proteína Insc el cual se sabe que es el regulador entre las divisiones simétrica y asimétricas ya que cuando en otros organismos modelo se bloquea su expresión se observó un incremento significativo en las divisiones asimétricas [74]. La proteína Insc de pez cebra sólo fue detectada

en larvas de 8 mm SL. Cabe mencionar que Par3, LGN, NuMA e Insc no se encuentran necesariamente en los mismos complejos aunque todos son parte del mecanismo de división asimétrica [71], probablemente por ello su distribución no es exactamente igual.

Podemos resumir que en pez cebra, durante la etapa de pre-estratificación las divisiones celulares de las EpSCs son laterales incrementando el área de la superficie. En el pico de la estratificación (6.5 mm SL), las células de la capa basal se dividen asimétricamente dirigiendo a una de las células hijas hacia la capa suprabasal. Finalmente, antes del surgimiento de las escamas hay células en las capas suprabasales que se dividen asimétricamente. En la morfogénesis epidermal de ratón se encontró una mayor proporción de divisiones asimétricas (67%), que divisiones simétricas (33%) [129]. Lo anterior sugiere que células basales se dividen simétricamente primero para incrementar el área de la superficie, y posteriormente las divisiones asimétricas promueven la estratificación, indicando una directa relación entre la orientación de la división celular y el destino de la progenie epidermal [123].

Existen algunos reportes que relacionan la división asimétrica con el tamaño de las células hijas, por ejemplo, en *Drosophila* las SCs germinales se dividen normalmente produciendo dos células hijas del mismo tamaño; sin embargo, en ausencia de la cinasa Klp10A (que despolimeriza microtúbulos) el centrómero madre se alarga anormalmente resultando en una célula hija pequeña destinada a muerte celular. Lo anterior sugiere que la regulación en el tamaño de la célula es un aspecto crítico durante las divisiones asimétricas [67, 130].

No hay reportes sobre si hay relación entre el tamaño de la luna creciente (como la de Par3 y LGN) con respecto al tamaño de las células resultantes de la división asimétrica y es algo que valdría la pena explorarse en nuestro sistema de estudio. Lo que sí es claro, es que la formación de la luna creciente a partir del complejo de polaridad, es importante para anclar y orientar al huso mitótico y determinar el destino de las células hijas [67].

La señal de polaridad de algunas SCs se relaciona con su adherencia a la membrana basal [67]. Por ejemplo, la epidermis de ratones KO a Beta1-Integrina o de Alfa-Catenina mostraron defectos en su unión con la membrana basal, y alteraciones en la formación de la luna creciente formada

por el complejo LGN-Ins. La localización aberrante de LGN e Insc resultaron en una orientación aleatoria de los husos mitóticos, sugiriendo que Beta1-Integrina y Alfa-Catenina también son importantes en la dirección celular en las divisiones asimétricas [85, 123, 129, 131]. Otros mecanismos, como la migración celular podrían también contribuir a la división asimétrica [72]. La orientación de las SCs con respecto a la membrana basal, como una señal de polaridad durante la división asimétrica, se observó también en las SC intestinales en *Drosophila* [132], en las SCs neuroepiteliales de la médula espinal de ratón [133] y en células satélite de músculo también de ratón [134].

Como mencionamos anteriormente, en larvas de 6.5 mm SL las EpSCs se formaba la luna creciente de Par3 o de LGN, en una orientación paralela a la membrana basal. Sin embargo, a los 8 mm SL la luna creciente de Par3 no tiene una dirección definida. Estos resultados resaltan la importancia de las señales provenientes de la membrana basal en la orientación del complejo de polaridad que definen el plano de división celular asimétrica y el destino de las células hijas. Con frecuencia las células que expresaron proteínas de los complejos de polaridad también fueron positivos a p63. Se sabe que p63 controla las interacciones entre célula-membrana basal y regula la expresión de varias Integrinas y componentes de la matriz extracelular. En ratones deficientes a p63, las células epidermales pierden su polaridad y por consiguiente la estratificación [129].

No solo las señales intracelulares definen la polaridad celular, también hay señales extrínsecas que confieren identidad a los nichos de SC. Estos nichos pueden ser influenciados por moléculas de señalización que activan redes transcripcionales que influyen a las SCs y definen su comportamiento, por ejemplo las células pueden sentir la posición del ligando vía receptores, y emplear esto como señales para orientar el huso mitótico hacia el ligando [67].

Nuestras observaciones podrían ser el inicio para explorar y comprender cómo los complejos de polaridad se ensamblan en las divisiones asimétricas durante la estratificación epidermal en pez cebra. Ésto no sería una labor fácil ya que pez cebra hay cuatro genes para Par3 (*pard3aa*, *pard3ab*, *pard3ba* y *pard3bb*) y cinco genes para LGN (*gpsm1a*, *gpsm1b*, *gpsm2*, *gpsm2-like* y *gpsm3*), de acuerdo a la base de datos de pez cebra (www.zfin.org).

Por otra parte, hay reportes que han establecido una relación entre las divisiones asimétricas y la vía de Notch. Experimentos de *Knock-down* de LGN, NuMA y Par3 muestran una interrupción en la diferenciación epidermal y una expresión anormal de componentes de la vía de Notch. Las divisiones asimétricas promueven la estratificación y al mismo tiempo, estimulan la diferenciación celular mejorando la señalización de la vía de Notch [85]. La vía de Notch está implicada en determinar el tipo celular en que se convertirán progenitores celulares y mantener un balance, entre la renovación de SCs y su diferenciación [76, 135, 136]. En humanos los queratinocitos comprometidos a diferenciarse muestran una reducción en los niveles de Notch1, pero un incremento en Notch2 y Notch3 [137]. Aunque nuestras observaciones no son concluyentes, basados en la literatura, es claro que la vía de Notch participa durante la diferenciación celular; aunque, en la epidermis del pez cebra no ésta muy claro el papel de los distintos genes *notch*, ni su regulación durante la transición de SC a CD. Lo cual permitiría posteriormente profundizar en un análisis cuantitativo a lo largo de las distintas etapas del desarrollo post-larvario, incluso se podría definir su localización tanto en la capa basal como suprabasales a través de hibridaciones *in-situ*, por mencionar un ejemplo. Trabajos anteriores en ratón, muestran que *notch2* y *notch3* se expresan en las capas suprabasales de la epidermis mientras que sus ligandos (*dll1* y *jag2*) se localizan en la capa basal [85].

Finalmente, en este trabajo describimos la dinámica celular básica involucrada durante la estratificación epidermal. Comenzando a los 5 mm SL e involucra cambios en la morfología celular e incremento en la proliferación celular. En este punto, distintos subtipos de poblaciones celulares epidermales coexisten, incluyendo LRCs, EpSCs y PCs (Tabla 6). En la etapa de 6.5 mm SL, las células troncales basales comienzan a dividirse asimétricamente, y posteriormente células en capas suprabasales (posiblemente PCs) también se dividen asimétricamente. Además, existen eventos de diferenciación celular a lo largo de la estratificación con base al perfil de expresión de los diferentes genes Notch.

Los PCs destinados a diferenciarse o como algunos autores las nombran “TACs” son importantes en la regulación de la estratificación y son capaces de expandir la población epidermal [138]. Incluso en el folículo pilosos son capaces de orquestar la proliferación de dos distintas poblaciones diferentes de células troncales, [107]. La regulación de las TACs en los últimos años ha cobrado

importancia ya que un cambio en el número de divisiones celulares genera efectos dramáticos en la población final de células epidermales y que conlleva a enfermedades hiperproliferativas como psoriasis. Por todo lo anterior, es importante estudiar los mecanismos que dan lugar a los distintos tipos celulares de un tejido, ya que este conocimiento nos permitirá diseñar terapias alternas en el trasplante de células progenitoras en el tratamiento de lesiones cutáneas y enfermedades crónicas [23, 138].

VIII. CONCLUSIONES

- 1) Durante la estratificación de la epidermis del pez cebra, esta sufre cambios en la arquitectura celular y en el arreglo epitelial.
- 2) En las etapas post-larvarias de 5 a 8 mm SL, del pez cebra, identificamos tres diferentes tipos de células EpSCs (Células troncales epidermales), PCs (Células Progenitores comprometidas a diferenciarse) y LCRs (Células que retienen la marca de EdU). Las cuales participan a lo largo de la estratificación de la epidermis.
- 3) Las LRCs son posiblemente células troncales quiescentes que permanecen sin dividirse por largos periodos de tiempo distintas a las EpSCs, ya que las LRCs no expresan al factor transcripcional p63.
- 4) Debido a la disminución en el número de LRCs de 5 mm a 8 mm SL consideramos posiblemente que las LRCs fueron capaces de re-ingresar al ciclo celular y dividirse de manera continua en el mayor pico de la estratificación de la epidermis.
- 5) Los mecanismos de división asimétrica son fundamentales en la estratificación de la epidermis:
 - a. Inicialmente en 5 mm SL hay eventos de división lateral de las células basales pero no inducen la estratificación epidermal.
 - b. En 6.5 mm SL las EpSCs proliferan por divisiones asimétricas que ocurren en dirección perpendicular con respecto a la membrana basal. Una posibilidad es que produzcan una EpSC y una PC cuando se dividen. Mientras que las EpSC permanece en la capa basal, los PCs forma parte de las capas suprabasales, lo cual favorece el engrosamiento epidermal.
 - c. En 8 mm SL los PCs se dividen por el mecanismo de división asimétrica el cual parece ser lateral (paralelo a la membrana basal).

- 6) Identificamos una correlación entre la fosforilación del factor transcripcional p63 y el avance de la estratificación epidermal, lo que sugiere que la degradación de P-p63 es necesaria para la formación de los PCs y su diferenciación posterior.

IX. PERSPECTIVAS

- 1) Por medio de técnicas de imagenología realizar el seguimiento de la progenie celular de queratinocitos individuales durante la estratificación de la epidermis. Para esto se podrían emplear líneas transgénicas de pez cebra con marcadores fluorescentes (GFP, RFP, etc) de la epidermis (skinbow o $\Delta Np63$ o microtúbulos). Combinando esta metodología con el empleo de marcadores de tipos celulares específicos se podrían contestar las siguientes preguntas:
 - ¿Cuántos tipos de PCs están involucrados en la estratificación epidermal?
 - ¿Cuál es el destino de la progenie celular de las LRCs durante la estratificación de la epidermis?
 - ¿Cuál es la progenie celular resultante de las SCs que se dividen por divisiones asimétricas entre las etapas post-larvares de 6.5 a 8 mm SL?
- 2) Con el uso de microscopía confocal generar imágenes tridimensionales de las células basales y suprabasales de la epidermis entre los estadios de 5 a 6.5 mm SL para determinar a mayor profundidad los cambios en la forma que tienen las células basales. Con la información obtenida hacer modelos que nos permitan calcular las fuerzas mecánicas involucradas en el engrosamiento y estratificación epidermal.
- 3) En un sistema de cultivo de queratinocitos inducir diferenciación celular para posteriormente por medio de marcadores específicos y citometría de flujo separar las diferentes poblaciones de queratinocitos. En estas distintas poblaciones celulares de queratinocitos establecer los perfiles de expresión por medio de transcriptómica.
- 4) Generar mutantes de pez cebra en genes de división asimétrica (como Par3, LGN o Numa) y estudiar el efecto de bloquear las divisiones celulares asimétricas de las SCs durante la etapa de 6.5 mm SL.
- 5) Empleando PCR de tiempo real cuantificar la expresión de los diferentes genes de Notch de pez cebra a lo largo de la estratificación de la epidermis. Al mismo tiempo por hibridaciones *in situ* determinar la ubicación de los transcritos de los genes de Notch durante la estratificación epidermal. Empleando inhibidores de la vía de Notch (como el inhibidor de la gamma-secretasa) determina la importancia de la vía de Notch en la estratificación epidermal.

- 6) Comparar las poblaciones de queratinocitos que participan en la estratificación epidermal (como SCs, PCs y LRCs) con aquellas poblaciones celulares que juegan un papel importante en la regeneración de la epidermis en el pez cebra, después de daño a la piel o a la remoción de escamas.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Chambers, E.S. and M. Vukmanovic-Stejic, *Skin barrier immunity and ageing*. Immunology, 2020. **160**(2): p. 116-125.
2. Cheng, L.C., et al., *Cellular, ultrastructural and molecular analyses of epidermal cell development in the planarian Schmidtea mediterranea*. Dev Biol, 2018. **433**(2): p. 357-373.
3. Le Guellec, D., G. Morvan-Dubois, and J.Y. Sire, *Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (Danio rerio)*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(2-3): p. 217-31.
4. Holthaus, K.B., et al., *Comparative Genomics Identifies Epidermal Proteins Associated with the Evolution of the Turtle Shell*. Mol Biol Evol, 2016. **33**(3): p. 726-37.
5. Holthaus, K.B., et al., *Comparative Analysis of Epidermal Differentiation Genes of Crocodylians Suggests New Models for the Evolutionary Origin of Avian Feather Proteins*. Genome Biol Evol, 2018. **10**(2): p. 694-704.
6. Turksen, K., *Epidermal cells : methods and protocols*. Methods in molecular biology. 2005, Totowa, N.J.: Humana Press. xv, 480 p.
7. Koster, M.I. and D.R. Roop, *Mechanisms regulating epithelial stratification*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 93-113.
8. Eisenhoffer, G.T., et al., *A toolbox to study epidermal cell types in zebrafish*. J Cell Sci, 2017. **130**(1): p. 269-277.
9. Ghadially, R., *25 years of epidermal stem cell research*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(3 Pt 2): p. 797-810.
10. Santoriello, C. and L.I. Zon, *Hooked! Modeling human disease in zebrafish*. J Clin Invest, 2012. **122**(7): p. 2337-43.
11. Webb, A.E. and D. Kimelman, *Analysis of early epidermal development in zebrafish*. Methods Mol Biol, 2005. **289**: p. 137-46.
12. Li, Q. and J. Uitto, *Zebrafish as a model system to study skin biology and pathology*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(6): p. e21.
13. Kimmel, C.B., et al., *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Developmental dynamics, 1995. **203**(3): p. 253-310.
14. Kimmel, C.B., R.M. Warga, and T.F. Schilling, *Origin and organization of the zebrafish fate map*. Development, 1990. **108**(4): p. 581-94.
15. Lee, R.T., P.V. Asharani, and T.J. Carney, *Basal keratinocytes contribute to all strata of the adult zebrafish epidermis*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e84858.
16. Chang, W.J. and P.P. Hwang, *Development of zebrafish epidermis*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2011. **93**(3): p. 205-14.
17. Bakkens, J., et al., *Destabilization of DeltaNp63alpha by Nedd4-mediated ubiquitination and Ubc9-mediated sumoylation, and its implications on dorsoventral patterning of the zebrafish embryo*. Cell Cycle, 2005. **4**(6): p. 790-800.
18. Gilbert, S.F., *Developmental biology*. 9th ed. 2010, Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. xxi, 711, 80 p.
19. Guzman, A., et al., *A stem cell proliferation burst forms new layers of P63 expressing suprabasal cells during zebrafish postembryonic epidermal development*. Biol Open, 2013. **2**(11): p. 1179-86.

20. Bakkers, J., et al., *Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm*. Dev Cell, 2002. **2**(5): p. 617-27.
21. Lee, H. and D. Kimelman, *A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish*. Dev Cell, 2002. **2**(5): p. 607-16.
22. Navarro, R.E., et al., *Pigment dilution mutants from fish models with connection to lysosome-related organelles and vesicular traffic genes*. Zebrafish, 2008. **5**(4): p. 309-18.
23. Rangel-Huerta, E. and E. Maldonado, *Transit-Amplifying Cells in the Fast Lane from Stem Cells towards Differentiation*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 7602951.
24. Guh, Y.J., C.H. Lin, and P.P. Hwang, *Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation*. EXCLI J, 2015. **14**: p. 627-59.
25. Lin, X., et al., *An Ectoderm-Derived Myeloid-like Cell Population Functions as Antigen Transporters for Langerhans Cells in Zebrafish Epidermis*. Dev Cell, 2019. **49**(4): p. 605-617 e5.
26. Lin, X., et al., *Endoderm-Derived Myeloid-like Metaphocytes in Zebrafish Gill Mediate Soluble Antigen-Induced Immunity*. Cell Rep, 2020. **33**(1): p. 108227.
27. Phatak, M. and M. Sonawane, *Functional characterisation of romeharsha and clint1 reaffirms the link between plasma membrane homeostasis, cell size maintenance and tissue homeostasis in developing zebrafish epidermis*. J Biosci, 2018. **43**(4): p. 605-619.
28. Janicke, M., T.J. Carney, and M. Hammerschmidt, *Foxi3 transcription factors and Notch signaling control the formation of skin ionocytes from epidermal precursors of the zebrafish embryo*. Dev Biol, 2007. **307**(2): p. 258-71.
29. Parichy, D.M., et al., *Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish*. Dev Dyn, 2009. **238**(12): p. 2975-3015.
30. Vanbokhoven, H., et al., *p63, a story of mice and men*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(6): p. 1196-207.
31. Yang, A., et al., *p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities*. Mol Cell, 1998. **2**(3): p. 305-16.
32. Pellegrini, G., et al., *p63 identifies keratinocyte stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3156-61.
33. Parsa, R., et al., *Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(6): p. 1099-105.
34. Barbieri, C.E. and J.A. Pietenpol, *p63 and epithelial biology*. Exp Cell Res, 2006. **312**(6): p. 695-706.
35. Little, N.A. and A.G. Jochemsen, *p63*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(1): p. 6-9.
36. Koster, M.I., *Making an epidermis*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1170**: p. 7-10.
37. Romano, R.A., et al., *Delta Np63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation*. Development, 2012. **139**(4): p. 772-782.
38. Pozzi, S., et al., *Transcriptional network of p63 in human keratinocytes*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e5008.
39. Romano, R.A., et al., *DeltaNp63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation*. Development, 2012. **139**(4): p. 772-82.

40. Su, X., et al., *Tap63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(1): p. 64-75.
41. Sethi, I., et al., *A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues*. BMC Genomics, 2015. **16**: p. 584.
42. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. ed. 2015, New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group. 1 volume (various pagings).
43. Potten, C.S., *Stem Cells*. 1997, Great Britain by The University Press, Cambridge: Academic Press. 474.
44. Lajtha, L.G., *Stem cell concepts*. Nouv Rev Fr Hematol, 1979. **21**(1): p. 59-65.
45. Hume, W.J. and C.S. Potten, *Proliferative units in stratified squamous epithelium*. Clin Exp Dermatol, 1983. **8**(1): p. 95-106.
46. Clayton, E., et al., *A single type of progenitor cell maintains normal epidermis*. Nature, 2007. **446**(7132): p. 185-9.
47. Jones, P.H., B.D. Simons, and F.M. Watt, *Sic transit gloria: farewell to the epidermal transit amplifying cell?* Cell Stem Cell, 2007. **1**(4): p. 371-81.
48. Lavker, R.M. and T.T. Sun, *Epidermal stem cells: properties, markers, and location*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13473-5.
49. Yang, A., et al., *p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 714-8.
50. De Craene, B., et al., *Epidermal Snail expression drives skin cancer initiation and progression through enhanced cytoprotection, epidermal stem/progenitor cell expansion and enhanced metastatic potential*. Cell Death Differ, 2014. **21**(2): p. 310-20.
51. Wu, W.Y. and R.J. Morris, *In vivo labeling and analysis of epidermal stem cells*. Methods Mol Biol, 2005. **289**: p. 73-8.
52. Larouche, D., et al., *Keratin 19 as a stem cell marker in vivo and in vitro*. Methods Mol Biol, 2005. **289**: p. 103-10.
53. Hsu, Y.C. and E. Fuchs, *A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(2): p. 103-14.
54. Watt, F.M., *Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(4): p. 410-7.
55. Mascré, G., et al., *Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 257-62.
56. Nguyen, B.C., et al., *Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation*. Genes Dev, 2006. **20**(8): p. 1028-42.
57. Westfall, M.D., et al., *Ultraviolet radiation induces phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of DeltaNp63alpha*. Cell Cycle, 2005. **4**(5): p. 710-6.
58. Richardson, R.J., et al., *Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch*. Nat Genet, 2006. **38**(11): p. 1329-34.
59. Dlugosz, A.A. and S.H. Yuspa, *Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C*. J Cell Biol, 1993. **120**(1): p. 217-25.
60. Potten, C.S. and J.C. Bullock, *Cell kinetic studies in the epidermis of the mouse. I. Changes in labeling index with time after tritiated thymidine administration*. Experientia, 1983. **39**(10): p. 1125-9.
61. Li, C. and Z.X. Xiao, *Regulation of p63 protein stability via ubiquitin-proteasome pathway*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 175721.

62. Rossi, M., et al., *The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(34): p. 12753-8.
63. Li, Y., Z. Zhou, and C. Chen, *WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 targets p63 transcription factor for ubiquitin-mediated proteasomal degradation and regulates apoptosis*. Cell Death Differ, 2008. **15**(12): p. 1941-51.
64. Jung, Y.S., et al., *Pirh2 E3 ubiquitin ligase modulates keratinocyte differentiation through p63*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(5): p. 1178-87.
65. Suzuki, D. and M. Senoo, *Increased p63 phosphorylation marks early transition of epidermal stem cells to progenitors*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(10): p. 2461-4.
66. Suzuki, D. and M. Senoo, *Expansion of epidermal progenitors with high p63 phosphorylation during wound healing of mouse epidermis*. Exp Dermatol, 2013. **22**(5): p. 374-6.
67. Venkei, Z.G. and Y.M. Yamashita, *Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division*. J Cell Biol, 2018. **217**(11): p. 3785-3795.
68. Butler, M.T. and J.B. Wallingford, *Planar cell polarity in development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(6): p. 375-388.
69. Pollard, T.D., W.C. Earnshaw, and J. Lippincott-Schwartz, *Cell biology*. 2nd ed. 2008, Philadelphia: Saunders/Elsevier. xix, 905 p.
70. St Johnston, D. and J. Ahringer, *Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity*. Cell, 2010. **141**(5): p. 757-74.
71. Wen, W. and M. Zhang, *Protein Complex Assemblies in Epithelial Cell Polarity and Asymmetric Cell Division*. J Mol Biol, 2018. **430**(19): p. 3504-3520.
72. Poulson, N.D. and T. Lechler, *Asymmetric cell divisions in the epidermis*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **295**: p. 199-232.
73. Williams, S.E., et al., *Par3-mInsc and Galphai3 cooperate to promote oriented epidermal cell divisions through LGN*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(8): p. 758-69.
74. Williams, S.E. and E. Fuchs, *Oriented divisions, fate decisions*. Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(6): p. 749-58.
75. Mizutani, K., et al., *Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors*. Nature, 2007. **449**(7160): p. 351-5.
76. Blanpain, C., et al., *Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage*. Genes Dev, 2006. **20**(21): p. 3022-35.
77. Moriyama, M., et al., *Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development*. Dev Cell, 2008. **14**(4): p. 594-604.
78. Missero, C., et al., *The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression*. Genes Dev, 1996. **10**(23): p. 3065-75.
79. Fuchs, E. and S. Raghavan, *Getting under the skin of epidermal morphogenesis*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(3): p. 199-209.
80. Alonso, L. and E. Fuchs, *Stem cells in the skin: waste not, Wnt not*. Genes Dev, 2003. **17**(10): p. 1189-200.
81. Fuchs, E., *The tortoise and the hair: slow-cycling cells in the stem cell race*. Cell, 2009. **137**(5): p. 811-9.
82. Sire, J.Y., et al., *Scale development in zebrafish (Danio rerio)*. J Anat, 1997. **190 (Pt 4)**: p. 545-61.

83. Theodosiou, A., et al., *Evolutionary scenarios of Notch proteins*. Mol Biol Evol, 2009. **26**(7): p. 1631-40.
84. Massi, D. and J. Panelos, *Notch signaling and the developing skin epidermis*. Adv Exp Med Biol, 2012. **727**: p. 131-41.
85. Williams, S.E., et al., *Asymmetric cell divisions promote Notch-dependent epidermal differentiation*. Nature, 2011. **470**(7334): p. 353-8.
86. Marques, I.J., E. Lupi, and N. Mercader, *Model systems for regeneration: zebrafish*. Development, 2019. **146**(18).
87. Miroshnikova, Y.A., et al., *Adhesion forces and cortical tension couple cell proliferation and differentiation to drive epidermal stratification*. Nat Cell Biol, 2018. **20**(1): p. 69-80.
88. Connelly, J.T., et al., *Actin and serum response factor transduce physical cues from the microenvironment to regulate epidermal stem cell fate decisions*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(7): p. 711-8.
89. Watt, F.M. and H. Green, *Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells*. Nature, 1982. **295**(5848): p. 434-6.
90. Nanba, D., et al., *Actin filament dynamics impacts keratinocyte stem cell maintenance*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(4): p. 640-53.
91. Luxenburg, C. and R. Zaidel-Bar, *From cell shape to cell fate via the cytoskeleton - Insights from the epidermis*. Exp Cell Res, 2019. **378**(2): p. 232-237.
92. Soares, E. and H. Zhou, *Master regulatory role of p63 in epidermal development and disease*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(7): p. 1179-1190.
93. Sonawane, M., et al., *Zebrafish penner/lethal giant larvae 2 functions in hemidesmosome formation, maintenance of cellular morphology and growth regulation in the developing basal epidermis*. Development, 2005. **132**(14): p. 3255-65.
94. Kouwenhoven, E.N., et al., *Transcription factor p63 bookmarks and regulates dynamic enhancers during epidermal differentiation*. EMBO Rep, 2015. **16**(7): p. 863-78.
95. Shalom-Feuerstein, R., et al., *DeltaNp63 is an ectodermal gatekeeper of epidermal morphogenesis*. Cell Death Differ, 2011. **18**(5): p. 887-96.
96. Mills, A.A., et al., *p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 708-13.
97. Suzuki, D., et al., *The carboxy-terminus of p63 links cell cycle control and the proliferative potential of epidermal progenitor cells*. Development, 2015. **142**(2): p. 282-90.
98. Ichijo, R., et al., *Tbx3-dependent amplifying stem cell progeny drives interfollicular epidermal expansion during pregnancy and regeneration*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 508.
99. Eisenhoffer, G.T., et al., *Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia*. Nature, 2012. **484**(7395): p. 546-9.
100. Aman, A.J., A.N. Fulbright, and D.M. Parichy, *Wnt/beta-catenin regulates an ancient signaling network during zebrafish scale development*. Elife, 2018. **7**.
101. Armstrong, B.E., et al., *Shh promotes direct interactions between epidermal cells and osteoblast progenitors to shape regenerated zebrafish bone*. Development, 2017. **144**(7): p. 1165-1176.
102. Iwasaki, M., et al., *Epidermal regulation of bone morphogenesis through the development and regeneration of osteoblasts in the zebrafish scale*. Dev Biol, 2018. **437**(2): p. 105-119.

103. Sire, J.Y. and M.A. Akimenko, *Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (Danio rerio)*. *Int J Dev Biol*, 2004. **48**(2-3): p. 233-47.
104. Santos-Pereira, J.M., et al., *Pioneer and repressive functions of p63 during zebrafish embryonic ectoderm specification*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 3049.
105. van Velthoven, C.T.J. and T.A. Rando, *Stem Cell Quiescence: Dynamism, Restraint, and Cellular Idling*. *Cell Stem Cell*, 2019. **24**(2): p. 213-225.
106. Tumber, T., et al., *Defining the epithelial stem cell niche in skin*. *Science*, 2004. **303**(5656): p. 359-63.
107. Hsu, Y.C., L. Li, and E. Fuchs, *Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration*. *Cell*, 2014. **157**(4): p. 935-49.
108. Cho, I.J., et al., *Mechanisms, Hallmarks, and Implications of Stem Cell Quiescence*. *Stem Cell Reports*, 2019. **12**(6): p. 1190-1200.
109. Liu, H., et al., *A transcriptional program mediating entry into cellular quiescence*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(6): p. e91.
110. Koster, M.I., et al., *p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program*. *Genes Dev*, 2004. **18**(2): p. 126-31.
111. Suzuki, D. and M. Senoo, *Increased p63 phosphorylation marks early transition of epidermal stem cells to progenitors*. *J Invest Dermatol*, 2012. **132**(10): p. 2461-2464.
112. Wu, N. and X. Gidrol, *The wind rose of human keratinocyte cell fate*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(24): p. 4697-702.
113. Wu, N., et al., *p63 regulates human keratinocyte proliferation via MYC-regulated gene network and differentiation commitment through cell adhesion-related gene network*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(8): p. 5627-38.
114. Koster, M.I., D. Dai, and D.R. Roop, *Conflicting roles for p63 in skin development and carcinogenesis*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(3): p. 269-73.
115. Yao, J.Y. and J.K. Chen, *Roles of p63 in epidermal development and tumorigenesis*. *Biomed J*, 2012. **35**(6): p. 457-63.
116. Senoo, M., *Epidermal Stem Cells in Homeostasis and Wound Repair of the Skin*. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2013. **2**(6): p. 273-282.
117. Coletti, D., et al., *Restoration versus reconstruction: cellular mechanisms of skin, nerve and muscle regeneration compared*. *Regen Med Res*, 2013. **1**(1): p. 4.
118. Haensel, D. and X. Dai, *Epithelial-to-mesenchymal transition in cutaneous wound healing: Where we are and where we are heading*. *Dev Dyn*, 2018. **247**(3): p. 473-480.
119. Rhea, L., et al., *Interferon regulatory factor 6 is required for proper wound healing in vivo*. *Dev Dyn*, 2020. **249**(4): p. 509-522.
120. Chen, C.H., et al., *Multicolor Cell Barcoding Technology for Long-Term Surveillance of Epithelial Regeneration in Zebrafish*. *Dev Cell*, 2016. **36**(6): p. 668-80.
121. Richardson, R., et al., *Re-epithelialization of cutaneous wounds in adult zebrafish combines mechanisms of wound closure in embryonic and adult mammals*. *Development*, 2016. **143**(12): p. 2077-88.
122. Campanale, J.P., T.Y. Sun, and D.J. Montell, *Development and dynamics of cell polarity at a glance*. *J Cell Sci*, 2017. **130**(7): p. 1201-1207.
123. Lechler, T. and E. Fuchs, *Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin*. *Nature*, 2005. **437**(7056): p. 275-80.

124. Byrd, K.M., et al., *LGN plays distinct roles in oral epithelial stratification, filiform papilla morphogenesis and hair follicle development*. *Development*, 2016. **143**(15): p. 2803-17.
125. Das, T., et al., *In vivo time-lapse imaging of cell divisions during neurogenesis in the developing zebrafish retina*. *Neuron*, 2003. **37**(4): p. 597-609.
126. Alexandre, P., et al., *Neurons derive from the more apical daughter in asymmetric divisions in the zebrafish neural tube*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(6): p. 673-9.
127. Costa, G., et al., *Asymmetric division coordinates collective cell migration in angiogenesis*. *Nat Cell Biol*, 2016. **18**(12): p. 1292-1301.
128. Segalen, M., et al., *The Fz-Dsh planar cell polarity pathway induces oriented cell division via Mud/NuMA in Drosophila and zebrafish*. *Dev Cell*, 2010. **19**(5): p. 740-52.
129. Poulson, N.D. and T. Lechler, *Robust control of mitotic spindle orientation in the developing epidermis*. *J Cell Biol*, 2010. **191**(5): p. 915-22.
130. Chen, C., et al., *Klp10A, a stem cell centrosome-enriched kinesin, balances asymmetries in Drosophila male germline stem cell division*. *Elife*, 2016. **5**.
131. Seldin, L., et al., *NuMA localization, stability, and function in spindle orientation involve 4.1 and Cdk1 interactions*. *Mol Biol Cell*, 2013. **24**(23): p. 3651-62.
132. Goulas, S., R. Conder, and J.A. Knoblich, *The Par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2012. **11**(4): p. 529-40.
133. Loulier, K., et al., *beta1 integrin maintains integrity of the embryonic neocortical stem cell niche*. *PLoS Biol*, 2009. **7**(8): p. e1000176.
134. Bentzinger, C.F., et al., *Fibronectin regulates Wnt7a signaling and satellite cell expansion*. *Cell Stem Cell*, 2013. **12**(1): p. 75-87.
135. Lenkiewicz, A.M., *Epidermal Stem Cells*. *Adv Exp Med Biol*, 2019. **1201**: p. 239-259.
136. Watt, F.M., S. Estrach, and C.A. Ambler, *Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(2): p. 171-9.
137. Negri, V.A., et al., *Delta-like 1-mediated cis-inhibition of Jagged1/2 signalling inhibits differentiation of human epidermal cells in culture*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 10825.
138. Lehrer, M.S., T.T. Sun, and R.M. Lavker, *Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation*. *J Cell Sci*, 1998. **111 (Pt 19)**: p. 2867-75.