



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Estudios sobre la diferenciación de las células de la epidermis durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C Aída Gabriela Guzmán López

TUTOR DE TESIS: DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Estudios sobre la diferenciación de las células de la epidermis durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C Aída Gabriela Guzmán López

TUTOR DE TESIS: DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2013.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, celebrada el día 9 de septiembre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna, **GUZMÁN LÓPEZ AIDA GABRIELA** con número de cuenta **81180471** con la tesis titulada **"ESTUDIOS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA EPIDERMIS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA (DANIO RERIO)"**, realizada bajo la dirección del **DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA**:

Presidente: DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
Vocal: DRA. MARÍA GENOVEVA GONZÁLEZ MORÁN
Secretario: DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR
Suplente: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
Suplente: DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de octubre de 2013.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

A nuestra máxima casa de estudios la UNAM clave importante para el desarrollo de nuestro país.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haber otorgado la beca para la realización del Doctorado en Ciencias Biológicas (210995) y el apoyo del proyecto 166046.

Al proyecto PAPITT “Inmersión al desarrollo embrionario del pez cebra por microscopía de lapsos temporales”

Al los miembros de mi comité tutorial: el Dr. Ernesto Maldonado Olvera mi tutor, por su apoyo y valoración, a la Dra. María Imelda López Villaseñor y al Dr. Roberto Coria Ortega, por su preocupación, apoyo y comentarios para mi formación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Instituto de Fisiología Celular que me dio cobijo en el momento preciso

Al Dr. Ernesto Maldonado Olvera que me ayudo a salir del fango cuando me invito a participar con él.

Al Biol. José Luis Ramos Balderas que soporto todos los regaños y los abusos de los estudiantes, y por su apoyo incondicional en el trabajo y la vida diaria

A la Sra. Rocío Camarillo por su amistad y apoyo en esas cosas difíciles.

A la, ahora ya, M en C Samanta Carrillo por su comentarios y apoyo.

A los miembros del lab. 125 norte.

A mi gran amiga y comadre la M en C Consuelo Arce Ortiz por su gran apoyo en todo.

A la M C Lidia Ortega González Coordinadora del Consejo Académico del Bachillerato, por prestarme un pequeño espacio para reflexionar

DEDICATORIA

A mi hija Itaií que me ha bendecido la vida

A mi madre María de los Ángeles

A mi Abuela Elena

A mi tía María del Pilar

Y a mi padre que también participo con un granito de arena.

Indice

Abreviaturas

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
A. La piel	4
a. La piel de los mamíferos	4
b. La epidermis.....	5
c. La dermis	7
d. La piel en los peces	9
e. La epidermis	10
f. La dermis	12
g. El pez cebra como modelo animal en el estudio de la epidermis	12
B. Desarrollo de la epidermis	12
a. Desarrollo de la epidermis en mamíferos	12
b. Desarrollo de la epidermis en el pez cebra	15
C. Importancia del factor de transcripción p63 en el desarrollo y mantenimiento de la epidermis	16
D. El pez cebra (Danio rerio) como organismo modelo.....	19
Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivos	22
Material y métodos	23
A. Crianza de larvas	23
B. Medición de larvas	23
C. Procesamiento biológico y tinción de Pas-schiff	24
D. Inmunofluorescencia de cortes histológicos de larvas.....	25
Resultados	26
Resumen del artículo	27
Discusión	28
Conclusión	32
Perspectivas	32
Literatura citada	33

Abreviaturas

K 5 Queratina del tipo 5 de bajo peso molecular

K1 Queratina del tipo 1 de bajo peso molecular

K14 Queratina del tipo 14 de alto peso molecular

K8 Queratina del tipo 8 de bajo peso molecular

K18 Queratina del tipo 18 de alto peso molecular

K10 Queratina del tipo 10 de alto peso molecular

p63 factor de transcripción perteneciente a la familia de p53

E 8.5 estadio de desarrollo del ratón

E 18. 5 estadio de desarrollo del ratón

EVL Capa de células envolventes por las siglas en ingles "Enveloping Layer"

DEL capa de células profundas por sus siglas en ingles "Deep Layer"

hpf horas post fertilización

dpf días post fertilización

BEL capa basal epidérmica

EEL capa de células superficiales o externas

DBD dominio de unión al DNA

TA sitio de transactivación

TAp63 isoforma de p63 que posee sitio de transactivación

Δ p63 isoforma de p63 que no posee sitio de transactivación

TA2 sitio de transactivación en el carboxilo terminal de las isoformas de p63

SAM dominio proteína-proteína de algunas isoformas de p63

TID dominio de inhibición transcripcional

RE Elementos de respuesta

TAB-14/WIK cepa silvestre

SL longitud estándar de las larvas de pez cebra que va del hocico ala base de la cola

Resumen

La piel es un órgano complejo, su principal función es prevenir la pérdida de agua. Además, se le considera como el primer órgano de defensa y tiene la capacidad de renovarse continuamente debido a que posee células troncales. La epidermis es la barrera primordial de la piel. En los vertebrados las características de la epidermis están relacionadas con la adaptación al medio ambiente, por lo que existen dos vías de desarrollo, una relacionada con la queratinización y otro con la mucogénesis. La epidermis que se queratiniza se presenta predominantemente en animales terrestres, mientras que la epidermis que produce moco se encuentra en peces y anfibios. En los peces teleósteos como el pez cebra, la epidermis está formada únicamente por células vivas cubiertas de moco, no presenta un orden celular y está compuesta por varios tipos celulares, lo que no ocurre con la epidermis de los animales terrestres que está cubierta por una capa de células muertas que se queratinizan, posee un tipo celular predominante y está organizada en capas. El pez cebra es uno de los animales modelo ampliamente estudiado por su alta homología con los genes y sistemas corporales humanos. La epidermis de los humanos y los peces comparten características estructurales aunque evolutivamente presenten grandes diferencias. En ambos casos, la epidermis está formada por varias capas de células y separada de la dermis por una membrana basal, pero la epidermis de los peces está adaptada a la vida acuática. El estudio de la epidermis en el pez cebra sirve como un sistema para contestar preguntas básicas sobre su biología, cuyas respuestas son de utilidad para comprender su funcionamiento de la epidermis en el humano; ejemplo de ello son los estudios in vivo de acuaporinas ancestrales, de uniones intercelulares adherentes, así como, la similitud de proteínas como el factor de transcripción p63, isoformas de queratina, proteína de unión al retinol y apolipoproteína Eb, todas estas proteínas están relacionadas con el proceso de desarrollo de la epidermis. Durante el desarrollo del pez cebra en los estadios tempranos se sabe que la epidermis está formada por dos capas de células: una capa basal epidérmica (BEL), que contacta con una membrana basal, y una capa de células superficiales o externas (EEL) con microsurcos. Los procesos relacionados con la estratificación de la epidermis durante el desarrollo del pez cebra no se conocen. Se sabe que en el ratón en los estadios tempranos de desarrollo la estratificación de la epidermis se lleva a cabo debido a que las células se dividen de dos formas: simétrica y asimétrica. En la primera las células se dividen de forma paralela a la membrana basal generando células que cubren al embrión en desarrollo y la segunda se refiere a que las células se dividen perpendicularmente a la membrana basal, esta división da origen a dos tipos celulares, una célula que se quedará adherida a la membrana

basal y otra célula que no tiene contacto con la membrana basal, la cual inicia el proceso de diferenciación. Además, se propone que el p63 juega un papel importante en este proceso de estratificación. Por lo tanto es importante revisar si el proceso de estratificación de la epidermis del pez cebra es parecido a la del ratón, lo que indicaría que es un proceso conservado a través del tiempo. Para esto se obtuvieron larvas de peces en diferentes estadios de desarrollo, se determinó que el parámetro días post fertilización no era el correcto ya que la población de peces a esta edad presentan una variedad de tamaños, por lo cual se decidió tomar en cuenta el parámetro de la longitud estándar (SL), que propone medir al pez de la punta de la nariz al pedúnculo caudal. Las larvas se sacrificaron mediante el uso de triclaína al 0.025%, se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS, se colectaron y se procesaron mediante la técnica histológica de parafina para obtener cortes de 5 μ m de grosor, los cuales se tiñeron con la técnica de Pas-Schiff para detectar membranas basales y se detectó mediante inmunofluorescencia al factor de transcripción p63 un marcador de células basales de la epidermis y un factor implicado en la estratificación, α -catenina para detectar membranas basales y PCNA que es un marcador para células en proliferación. Mediante el uso de la técnica de Pas-schiff se observó que la epidermis de los peces que presentaban una SL de 6 mm estaba formada por varias capas celulares, lo que fue aumentado directamente proporcional al crecimiento de las larvas. Con la detección de PCNA y p63 se observó que estos marcadores son importantes para señalar el momento en que la epidermis comienza a estratificarse y se localizan en la capa basal de la epidermis, lo que indica proliferación celular, esta proliferación se observó también en la capa suprabasal de la epidermis, que es un indicativo que esta capa durante el desarrollo del pez cebra también prolifera y esto ayudó al proceso de estratificación. No se pudo detectar divisiones asimétricas. Por lo tanto la estratificación de la epidermis comienza cuando las larvas tienen una SL de 6mm, el factor p63 y PCNA son marcadores que ayudaron a indicar cuando la epidermis prolifera para estratificarse y es necesario establecer otro tipo de metodología para detectar como ocurre la estratificación de la epidermis en el pez cebra.

Abstract

Organ growth during development is a highly regulated process with both temporal and spatial constraints. Epidermal stratification is essential for skin growth and development. Although the zebrafish has been well studied, it is not known when and how epidermal stratification occurs. This is because beyond the first five days of development our knowledge is currently limited. We found that epidermal stratification in zebrafish begins when the larvae reach a standard length (SL) of 6 mm at approximately 25 days of age. Over the next four days (from a SL of 6 to 9 mm), epidermis thickness increases almost fourfold. This represents a sudden increase in organ size, since for the previous 20 days of development, the epidermis has been only two layers thick. This pattern is different from that observed in mammals that undergo continuous stratification from E14.5 – E18.5. To study how stem cell proliferation give rise to the new epidermal layers, we used a combination of markers; one for cell proliferation (proliferating cell nuclear-antigen PCNA) and one for epidermal stem cells (P63 transcription factor). We identified, throughout the stratification process, two different waves of cell division. Initially, the most basal epidermal cells divided and generated a subset of suprabasal cells (possibly transient amplifying cells); within the next several days, the basal cells stopped dividing, and the suprabasal cells began proliferation, giving rise to most of the cell types in the new layers. This part of the process is similar to what has been recently found during epidermal stratification in mammals.

Introducción

A. La piel

a. La piel en los mamíferos

El conocimiento acerca de la estructura, funciones y procesos de desarrollo de la piel han sido realizados en la piel de mamíferos adultos (Koster y Roop, 2007).

La piel es un órgano complejo, está compuesta por diversos tejidos y una variedad de estructuras accesorias. La función primaria de la piel humana, así como la de otros vertebrados terrestres, es prevenir la pérdida de agua a través del cuerpo y servir como una barrera permeable. La piel también lleva a cabo funciones metabólicas y de termorregulación. Además, a la piel se le considera como el primer órgano de defensa mecánica contra agentes externos, proveyendo protección contra insultos mecánicos, químicos, térmicos, luminosos e infecciosos y puede producir diferentes sustancias como feromonas, péptidos antimicrobianos, moco, etcétera. La piel depende de células troncales para repararse o reemplazar células viejas, las cuales, en el adulto, residen en folículos pilosos, glándulas sebáceas, dermis y epidermis (Blanpain y Fuchs, 2006; Breitkreutz y cols., 2009; Raker y cols., 2010; Forni y cols., 2012).

La piel se compone de tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis es la capa más externa, posee un grosor que varía de 0.06 a 1 mm y es un epitelio plano estratificado compuesto principalmente por queratinocitos. La dermis es la capa media, su grosor puede variar de 1 a 2 mm de profundidad, está compuesta por tejido conjuntivo y es la encargada de nutrir a la epidermis. La hipodermis, de 1 a 2 mm, es la capa inferior, compuesta de tejido adiposo que se adosa a los músculos y huesos por debajo de la piel (Vanbokhoven y cols., 2011; Baroni y cols., 2012; Forni y cols., 2012). Estas capas se comunican de varias formas y a diferentes niveles para establecer, mantener y restaurar la homeostasis de la piel (Breitkreutz y cols., 2009) (ver Fig. 1)

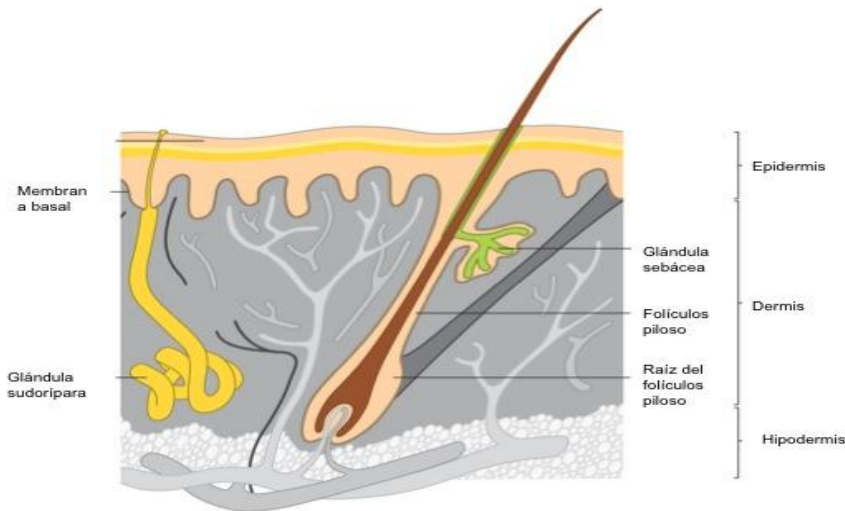


Fig. 1 Esquema representativo de la piel de mamíferos. La piel está formada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis es la capa más superficial y es la primera barrera de protección de los individuos, por debajo de ella se localiza la dermis. La estructura que separa a las dos primeras capas es la membrana basal. La capa más interna es la hipodermis (Staveley B. E. Molecular & Developmental Biology (BIOL3530)).

b. La Epidermis

La epidermis forma a la barrera primordial de la piel, esta barrera impide la penetración o pérdida de agua debido a que las células de la epidermis poseen lípidos especiales. Además, la epidermis provee resistencia a químicos y a microorganismos, ya que tiene una envoltura cornificada compuesta por entrecruzamiento de proteínas. La epidermis tiene como características principales su fuerza mecánica y tensil. La fuerza mecánica se debe a una red de filamentos intracelulares de queratina que interconectan a células vecinas por uniones específicas, los desmosomas, y la fuerza tensil es proporcionada por la dermis, situada por debajo de la epidermis, y está compuesta por una matriz extracelular que contiene fibras colágenas del tipo I y III, fibras elásticas que se encuentran rodeadas por proteoglicanos (Breitkreutz y cols., 2009; Kulukian y Fuchs, 2013).

En los mamíferos adultos, la epidermis es un epitelio estratificado compuesto por varias capas de células: basal, localizada justo arriba de la dermis, que después se continúa con las capas espinosa, granular y cornea; esta última es la más superficial. Además, se considera a la epidermis como un tejido epitelial que hospeda a linajes celulares derivados de la médula ósea y de las crestas neurales (Braun y Proese, 2006) (ver Fig. 2).

Como ya se mencionó, la epidermis está formada principalmente por queratinocitos, células especializada capaces de formar interacciones cohesivas para establecer una fuerte barrera de protección. Los

queratinocitos son células nucleadas que pueden presentar distintas formas y expresar diversos tipos de proteínas y lípidos, lo cual depende de la capa de la epidermis en la que se localicen. Además, dependiendo de la capa es el estado de maduración de los queratinocitos (Baroni y cols., 2012).

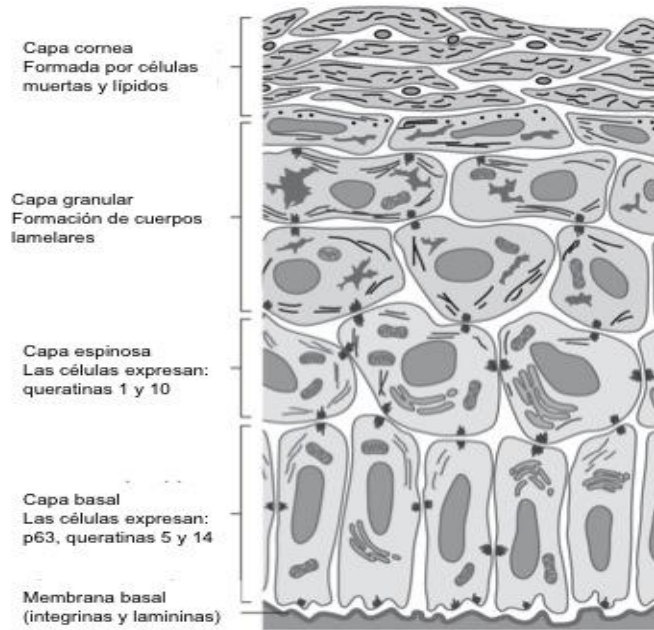


Fig. 2 Esquema representativo de la epidermis de mamíferos. La epidermis está formada por las capas: basal, espinosa, granular y cornea. Las principales células de la epidermis son los queratinocitos, que se unen mediante desmosomas (pequeñas regiones negras). La estructura por debajo de la epidermis es la membrana basal y es un sistema de unión entre la epidermis y la dermis (Staveley B. E. Molecular & Developmental Biology (BIOL3530)).

En las capas basal, espinosa y granular los queratinocitos presentan forma generalmente cúbica y se interconectan por desmosomas; tienen cambios morfológicos profundos en su estructura en los últimos pasos de maduración, debido a que se transforman en células planas y sin núcleo, contienen filamentos de queratina rodeados por fragmentos de membrana celular, así como de lípidos, todos ellos unidos mediante enlaces covalentes, y se localizan en la capa cornea (Baroni y cols., 2012).

La epidermis se renueva continuamente mediante el remplazo de células moribundas o muertas con células nuevas. El proceso de renovación se realiza principalmente por células de la capa basal de la epidermis, muchas de las cuales son células troncales, mitóticamente activas. Las células troncales son las responsables de la continua renovación mediante el proceso de proliferación celular. Después de que ocurre ésta, las células se colocan unas arriba de las otras y llevan a cabo el proceso de diferenciación celular, lo que se conoce como la estratificación de las células de la epidermis (Koster y Roop, 2004; Blanpain y Fuchs, 2006; Truong y Khavari., 2007).

El proceso de renovación, conocido como homeostasis de la epidermis, es continuo. Las células de la capa basal de la epidermis prolifera periódicamente para dar origen a células troncales y células de amplificación transitoria; ambas células expresan el factor de transcripción p63, el cual induce la expresión de genes que intervienen en los procesos de adhesión, proliferación, estratificación y diferenciación celular (Mc Dade y Mc Cancel, 2010).

Las células de amplificación transitoria tienen capacidad proliferativa limitada, lo que promueve que realicen una cuantas divisiones celulares; las células resultantes se separan de la capa basal, salen del ciclo celular, comienzan a diferenciarse (Koster y Roop, 2004; Blanpain y Fuchs, 2006; Truong y Khavari, 2007) y forman células de la capa espinosa, las cuales permanecen transcripcionalmente activas y producen grandes cantidades de filamentos de queratina que forman una red y ayudan a la formación de los desmosomas. Cuando las células de la capa espinosa entran en la siguiente fase de diferenciación se convierten en células de la capa granulosa, que se caracteriza porque las células producen gránulos lamelares junto con lípidos; además, estas células almacenan debajo de la membrana celular un complejo proteico que posteriormente formará a la capa cornificada de la epidermis (Kulukian y Fuchs, 2013).

En el último estadio de diferenciación de la epidermis todas las células cesan sus actividades metabólicas, hay un aumento del flujo de calcio hacia el interior celular, las células pierden su organelos celulares, por ruptura de la membrana celular, se libera el complejo proteico que se localizaba debajo de la membrana celular y éste comienza a cubrir la superficie de la epidermis junto con los restos celulares por lo que se forman estructuras escamosas, las cuales se distribuyen por la superficie y se caen, pero después son repuestas por células que están terminando su diferenciación (Kulukian y Fuchs, 2013).

Este programa de diferenciación de los queratinocitos en la epidermis madura mimetiza el desarrollo inicial de la epidermis durante la embriogénesis (Koster y Roop, 2004; Blanpain y Fuchs, 2006; Vanbokhoven y cols., 2011). Sólo el 15% de las células de la capa basal están relacionadas con el proceso de proliferación celular continua, las células restantes están en un estado quiescente o de arresto celular; estas últimas células salen de su arresto cuando hay la necesidad de un aumento de la proliferación celular, lo cual puede deberse a la presencia de daño en la epidermis o cuando la epidermis entra en un estado de rejuvenecimiento (Baroni y cols., 2012).

c. Dermis

La dermis es la capa intermedia de la piel, se localiza entre la epidermis y la hipodermis. La dermis está constituida por tejido conectivo, el cual contiene fibroblastos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos

y linfocitos, todos embebidos en una matriz extracelular compuesta por fibras colágenas y elásticas, glicosamin glicanos y proteoglicanos ricos en ácido hialurónico que llenan los espacios entre las células y las fibras (Forni y cols., 2012).

La dermis se subdivide en una capa superficial denominada dermis papilar y una capa inferior conocida como dermis reticular. Estos tipos de dermis difieren entre sí debido a la composición de la matriz extracelular y a su estructura. La dermis papilar contiene fibras colágenas compuestas principalmente por colágena tipo II y III en conjuntos desorganizados y delgadas fibras elásticas perpendiculares a la unión dermis-epidermis. La dermis reticular despliega conjuntos de fibras colágenas, compactas y delgadas fibras elásticas que tiende a ser paralelas a la superficie de la piel. El limite entre la dermis papilar y la epidermis muestran un patrón ondulante debido a la presencia de papilas dérmicas que contienen corpúsculos táctiles y componentes vasculares (Forni y cols., 2012).

Existe una estructura que une a la dermis con la epidermis, la membrana basal; que está formada por una matriz extracelular que soporta a la epidermis y es producida por los queratinocitos de la epidermis y los fibroblastos de la dermis. La membrana basal tiene cuatro componentes principales: por lo menos un miembro de la familia de las lamininas, la principal es la lamina 5, colágena tipo IV, nidogenn y el proteoglicanos perlecan (Yurchenco P., 2011; Breitkreutz y cols., 2009) (ver Fig. 3).

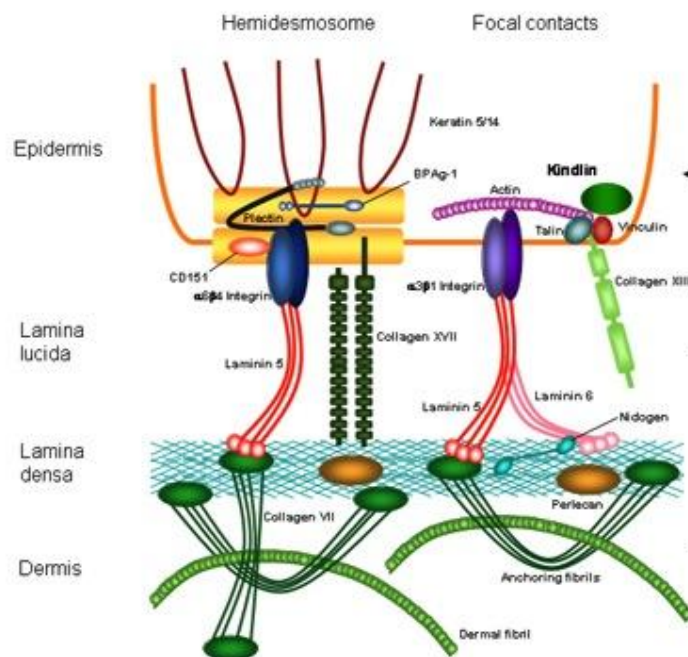


Fig. 3 Esquema de los componentes de la membrana basal. (2006 Netzwerk Epidermolysis bullosa).

Las células basales de la epidermis son las encargadas de interactuar con la membrana basal mediante una familia de proteínas, las integrinas, que son proteínas heterodiméricas transmembrana. Las integrinas están asociadas a microfilamentos de actina, lo que permite la migración y la adhesión celular. Únicamente las integrinas $\alpha6\beta4$ están conectadas con queratinas y ayudan a la formación de los hemidesmosomas que son los puntos de unión entre las células de la capa basal de la epidermis y la membrana basal. Cuando las células de la capa basal inician el proceso de diferenciación celular dejan de expresar integrinas y se desprenden de la membrana basal. Las integrinas, dependiendo el estado fisiológico celular, también ayudan al proceso de polaridad celular de las células de la epidermis (Yurchenco P., 2011; Breitkreutz y cols., 2009).

La membrana basal no sólo actúa como estructura de unión, también participa en el almacenaje e intercambio de señales moleculares como factores de crecimiento y citocinas; entre la epidermis y la dermis permite el tránsito de células inmunes y facilita la migración de los queratinocitos durante los procesos de remodelaje y reparación de la piel. La membrana basal es casi imperceptible debajo de la epidermis, pero es una estructura ondulante que puede ser evidenciada cuando se utilizan técnicas histoquímicas de Pas o Giemsa. La forma ondulante de la membrana basal se debe a la presencia de protuberancias epiteliales y a las papilas dérmicas (Breitkreutz y cols., 2009; Yurchenco P., 2011; Forni y cols., 2012).

d. La piel en los peces

La piel en los peces es el límite entre el cuerpo y el ambiente. Es delgada y consta de dos capas, epidermis y dermis, además de una capa hipodérmica subcutánea (Bonilla y cols., 2008).

Una de las principales funciones de la piel es de protección, ya que posee glándulas mucosas que secretan moco que cubre el cuerpo del pez, protegiéndolo contra bacterias, hongos y otros microorganismos. Adicionalmente, el moco lubrica la piel reduciendo la fricción corporal en el agua mientras nada, esto le permite alcanzar grandes velocidades.

Otra función importante que cumple la piel es la reparación de heridas superficiales. Inmediatamente después de una lesión el moco, que contiene un gran número de linfocitos, cierra la herida. Las células marginales de la herida pueden multiplicarse rápidamente para formar una delgada capa protectora y progresivamente se completa la curación de ésta.

e. La Epidermis

En los vertebrados las características de la epidermis están relacionadas con la adaptación al medio ambiente, por lo que existen dos vías de desarrollo, una relacionada con la queratinización y otro con la mucogénesis. La epidermis que se queratiniza se presenta predominantemente en animales terrestres (ver Fig. 4A), mientras que la epidermis que produce moco se encuentra en peces y anfibios (Henrikson y Matoltsy, 1968). En los peces teleósteos como el pez cebra, la epidermis está formada únicamente por células vivas cubiertas de moco, no presenta un orden celular y está compuesta por varios tipos celulares (ver Fig. 4b), lo que no ocurre con la epidermis de los animales terrestres que está cubierta por una capa de células muertas que se queratinizan, posee un tipo celular predominante y está organizada en capas (Chang y Hwang, 2011).

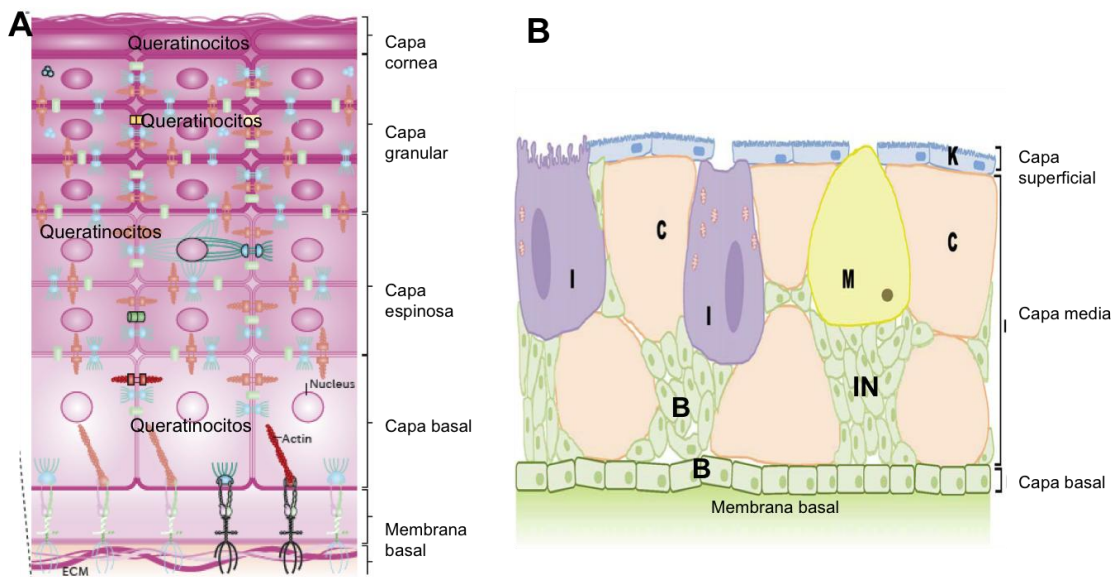


Fig. 4 . Representación esquemática de la epidermis dependiendo de la adaptación al medio. (A) epidermis de organismos terrestres, que presentan predominancia de un tipo celular, los queratinocitos y la última capa de células se queratiniza (Simpson y cols., 2011). (B) epidermis de un organismo acuático que no se queratiniza debido a que esta cubierta por moco y presenta diferentes tipos celulares como: células club (C), monocitos (I), células mucosas (M) células basófilas (B) y células indiferenciadas que se intercalan en la capa basal y media (IN) (Chang y Hwang, 2011).

La epidermis de los peces consta de un epitelio plano estratificado no queratinizado. El número de capas celulares puede variar de dos en las larvas hasta diez o más en los adultos. En las especies pelágicas, la epidermis frecuentemente es más gruesa en las áreas dorsales del cuerpo, mientras que en las especies bentónicas la epidermis presenta mayor grosor en la superficie que cubre la parte ventral (Bonilla y cols., 2008).

En general, la epidermis de los peces presenta diferentes tipos de células: las células epiteliales que son basófilas y relativamente pequeñas, entre las cuales se encuentran células mucosas, células “club”, células indiferenciadas, células sensoriales (botones gustativos, neuromastos) y fibras nerviosas (Henrikson y Matoltsy, 1968).

Las células basófilas son el tipo celular más numeroso en la epidermis, poseen grandes cantidades de filamentos proteicos intracelulares, que presentan diferentes formas dependiendo de su localización y son comparables a las células de la epidermis de otros vertebrados, ya que poseen filamentos (Henrikson y Matoltsy, 1968; Schlicwa, 1975).

Aunque las células de la epidermis de los peces teleósteos no están dispuestas en distintas capas en secuencias de diferenciación, la epidermis está subdividida por razones prácticas en tres capas: basal, media y superficial. En la capa basal y media, las células basófilas son de forma poligonal con su eje mayor perpendicular a la dermis y sus filamentos ocasionalmente forman cúmulos. En la capa superficial las células son generalmente planas en varios grados, poseen filamentos que forman una red terminal entre la membrana que da hacia la superficie y los organelos perinucleares; la superficie apical de las células forma microvellosidades que algunos autores denominan microsurcos y en la parte basal de estas células hay filamentos esparcidos relacionados con desmosomas que conectan a las células superficiales con la capa media. Las células superficiales poseen núcleo, están vivas y no se desprenden como las células corneas de la epidermis de los vertebrados terrestres (Schlicwa, 1975; Henrikson y Matoltsy, 1968; Bonilla y cols., 2008).

En el caso particular del pez cebra adulto, la capa basal es una capa de células que no prolifera activamente y une a la epidermis a la membrana basal por medio de uniones de tipo hemidesmosoma. La capa media contiene varios tipos de células especializadas: las células mucosas que producen *mucus*, sustancias anti-bacteriales y anti-fungicidas; las células “club”, que producen señales de alarma; las células sensitivas y las células indiferenciadas que son inducidas para proliferar y subsecuentemente ser reclutadas a la capa superficial. La capa superficial posee células vivas planas con microsurcos. Los microsurcos son ricos en actina y coadyuvan al mantenimiento de una capa mucosa en la superficie de la piel. La capa mucosa es producida por células mucosas residentes de la capa intermedia. Las células de la capa superficial no se desprenden como en los mamíferos pero pueden ser reemplazadas por células de la capa intermedia cuando han muerto o han sido dañadas. La epidermis del pez no se renueva constantemente y diversos mecanismos homeostáticos mantienen esta capa protectora (Hang y Hwang, 2011, Le Guellec, 2004)

f. La Dermis

La dermis está compuesta por tejido conjuntivo denso o fibroso; posee varios tipos de células: células de pigmento, melanocitos en la parte marginal entre la epidermis y la dermis, las cuales dan el color a los peces, macrófagos y mastocitos. Entre la epidermis y la dermis hay una membrana basal muy delgada que puede ser observada con las técnicas de tinción de Pas o Azure B (Henrikson y Matoltsy, 1968).

La hipodermis separa a la dermis del músculo subyacente y es considerada como una variante del tejido conjuntivo, especializado en el almacenamiento de lípidos, cuyas células principales son los adipositos que se encuentran en una malla de tejido conjuntivo reticular, en la cual es posible observar capilares sanguíneos (Henrikson y Matoltsy, 1968; Bonilla y cols., 2008).

g. El pez cebra como modelo animal en el estudio de la epidermis

El pez cebra, como ya se mencionó, pertenece a la familia de los peces teleósteos y es uno de los animales modelo ampliamente estudiado por su alta homología con los genes y sistemas corporales humanos. La homología entre la epidermis humana y la epidermis del pez cebra se debe a que en ambas especies, y en otros vertebrados superiores, se expresan algunas proteínas similares como el factor de transcripción p63 (conocido en pez cebra como tp63), la proteína rbp4, isoformas de queratina, proteína de unión al retinol y apolipoproteína Eb, todas relacionadas con el proceso de desarrollo de la epidermis y la dermis (Dodd y cols., 2009; Rakers y cols., 2010; Hong y cols., 2011).

B. Desarrollo de la epidermis

a. Desarrollo de la epidermis en mamíferos

La epidermis establece su función de barrera en los primeros días del desarrollo embrionario (Koster y Roop, 2007). El desarrollo de la epidermis se caracteriza por la estratificación celular y la expresión ordenada de moléculas estructurales, que también sirven de marcadores de diferenciación (Mack, 2005). La epidermis comienza a diferenciarse después de la gastrulación, cuando se forma una capa de células en la superficie del ectodermo, las células progenitoras de la epidermis; estas células expresan queratina 8 y 18 un marcador de células indiferenciadas que reciben señales para comprometerse a un destino epidérmico, proliferar y estratificarse (Koster y Roop, 2007; Candi y cols., 2008; Blanpain y Fuchs, 2009).

Las células progenitoras dan origen a la capa basal de la epidermis y por debajo de ella se establece una población de células mesenquimatosas que transmiten señales que inducen la proliferación, diferenciación y estratificación de la epidermis. Las células de la capa basal hacen alianza con las células mesenquimatosas para producir y organizar por debajo de ellas a la membrana basal que, como ya se mencionó, es rica en matriz extracelular y factores de crecimiento (Blanpain y Fuchs, 2009).

Las células de la capa basal de la epidermis se adhieren a la membrana basal a través de integrinas que se unen a la laminina 5 (Koster y Roop, 2007; Blanpain y Fuchs, 2009), y a sus vecinas a través de uniones adherentes mediadas por E-cadherina. Cuando las células de la capa basal de la epidermis interactúan con el sustrato celular y forman uniones intercelulares con las células vecinas adquieren una polaridad apicobasal. La acción de factores de crecimiento sobre la capa basal promueve el crecimiento y diferenciación terminal de las capas que se originan a partir de ella. La membrana basal no sólo sirve como una plataforma que promueve el crecimiento, sino también la formación del límite entre la epidermis y la dermis (Ray y Lechler, 2011; Kulukian y Fuchs, 2013).

En la epidermis del ratón, el proceso de diferenciación ocurre en un periodo aproximado de 10 días, entre el estadio 8.5 (E 8.5) y el estadio 18.5 (E.18.5). Durante el periodo de diferenciación, la capa basal de la epidermis embrionaria da origen a una segunda capa de células, el peridermo, el cual se desprende antes del nacimiento. Las células de la capa basal se dividen en un plano lateral; estas divisiones se denominan divisiones simétricas, ya que de ellas se obtienen células semejantes que permiten que la epidermis se expanda rápidamente para cubrir al embrión en crecimiento (Koster y Roop, 2007; Candi y cols., 2008; Blanpain y Fuchs, 2009; Kulukian y Fuchs, 2013) (ver Fig. 5).

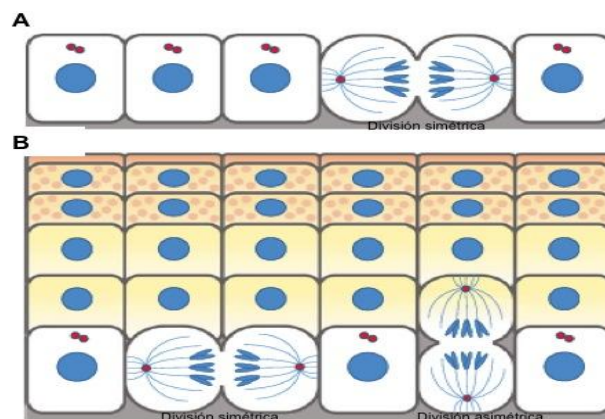


Fig. 5 . Representación de las divisiones que ocurren en la epidermis durante el desarrollo. (A) En la epidermis de ratón en estadios tempranos de desarrollo se llevan a cabo divisiones simétricas que aumentan el número de células que deben cubrir al embrión en crecimiento y (B), para que se lleve a cabo la estratificación algunas células reorientan la dirección de huso mitótico y llevan a cabo divisiones asimétricas (Kulukian y Fuchs, 2013).

En el momento en que la capa basal reduce las divisiones en el plano lateral, se inicia otro proceso de división de la células basales de la epidermis, en el que algunas de las células reorientan la posición del huso mitótico para que tome una posición perpendicular al plano basal a lo largo del eje apicobasal de la célula; este proceso se denomina división asimétrica (Lechler y Fuchs 2005).

La reorientación del huso mitótico se debe a la formación de un complejo proteico constituido por las proteína Par3, Inescutable de ratón (mInsc), proteína rica en leucina-glicina-aspartico (LGN) y NuMA, que se localiza en la parte apical de las células. Durante la división asimétrica se da origen a una célula basal que expresa queratina 14 y una célula suprabasal que expresa queratina 10 (Lecher y Fuchs, 2005; Ray y Lechler, 2011) (ver Fig. 6). Las divisiones asimétricas son importantes durante el desarrollo de la epidermis debido a que son las responsables de la estratificación en la epidermis embrionaria y del proceso de compromiso celular. Durante la división se produce una célula hija que se asocia a la membrana basal con potencial proliferativo y a otra célula hija que no tiene contacto con la membrana basal; ésta tiene una capacidad reducida para dividirse, forma parte de la capa suprabasal de la epidermis embrionaria y comienza el proceso de diferenciación celular (Poulson y Lechler 2010; Ray y Lechler, 2011).

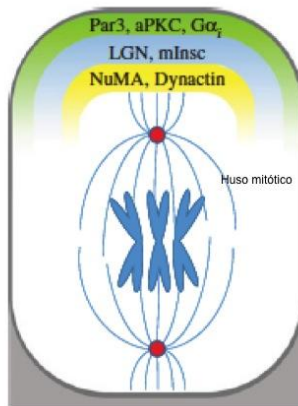


Fig. 6. Localización del complejo proteico que interviene en el proceso de la división asimétrica (Kulukian y Fuchs, 2013).

Las divisiones asimétricas promueven, por lo tanto, la formación de la capa suprabasal que se localiza entre la capa basal de la epidermis y el peridermo. Las células de la capa suprabasal realizan unos cuanto ciclos de divisiones celulares y comienzan su maduración para formar a la capa de células espinosas. Las células de la capa espinosa subsecuentemente darán origen a las células de la capa granulosa y a la capa de células corneas que expresan los marcadores de diferenciación terminal queratinas 1 y 10, locrina y filagrina (Koster y Roop, 2007; Candi y cols., 2008; Blanpain y Fuchs, 2009; Kulukian y Fuchs, 2013).

En el proceso de diferenciación de la epidermis se requiere de la coordinación de diferentes eventos moleculares para generar un epitelio estratificado. Se han propuesto diversas moléculas en el control de la diferenciación y proliferación que incluyen a myc, Norch y NFkB, pero la evidencia existente sugiere que el factor de transcripción p63 tiene un papel clave en la regulación de la proliferación y diferenciación de la epidermis (Truong y Khavari, 2007).

b. Desarrollo de la epidermis en el pez cebra

El embrión de pez cebra en los estadios iniciales está formado por el blastodermo, que se localiza en el polo animal del embrión y es un conjunto de células que se organiza en dos capas celulares: la capa de células envolventes o EVL (por las siglas en inglés “Enveloping Layer”), compuesta por una capa de células planas, las cuales rodean al embrión durante el desarrollo, y la capa de células profundas o DEL (por sus siglas en inglés “Deep Layer”), formada por las células localizadas por debajo de la EVL; estas células da origen a todos los tejidos del embrión (Kimmel y cols., 1995).

A las 4 horas post-fertilización (hpf), las células de la EVL y de la DEL se adelgazan y se mueven para cubrir al vitelo, proceso conocido como epíbole (Slanchev y cols., 2009) (ver Fig. 7). Cuando el vitelo ha sido cubierto en un 50% (5hpf), la gastrulación comienza y Lee y Kimelman (2002) han propuesto que también empieza el proceso de diferenciación de la epidermis en el lado ventral del embrión, donde se ha observado la presencia de mRNA de p63, un factor de transcripción esencial para el desarrollo de la epidermis (Webb y cols., 2008).

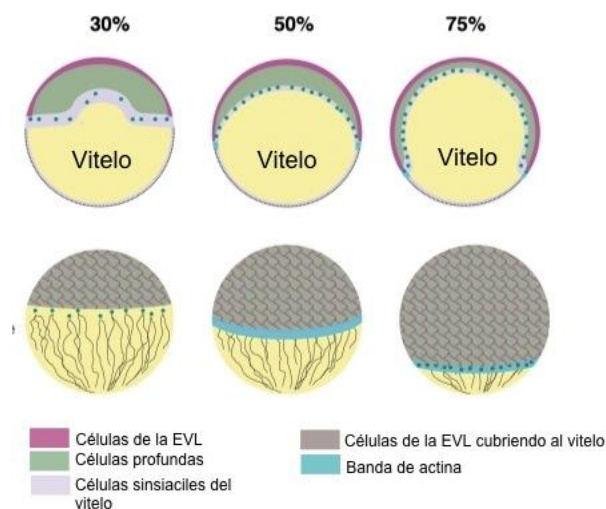


Fig. 7. Representación esquemática de la epíbole. La epíbole es el proceso en donde las células de la EVL y profundas (del blastodermo) cubren al vitelo.

Entre las 6 y 10 hpf, las células de la epidermis migran inicialmente hacia el polo vegetal y después se dirigen a la línea media en la región dorsal. En este punto, la epidermis consiste en una simple capa de células epiteliales que proliferan conforme el embrión crece y que lo envuelven en su totalidad (Villava y cols., 2007).

A las 14 hpf la epidermis inicia el proceso de diferenciación que resulta en dos capas de células: una capa basal epidérmica (BEL), que contacta con una membrana basal, y una capa de células superficiales o externas (EEL) con microsurcos. Los mecanismos que controlan la estratificación o generación de estas dos capas son desconocidos (Villava y cols., 2007). Aunado al proceso de diferenciación, las células de la epidermis inician el establecimiento de una polaridad ápico-basal. La primera indicación conocida de la polaridad celular en la epidermis ocurre a los 3 días post-fertilización (dpf), cuando las células basales depositan filamentos intermedios de queratina en el lado basal de la célula. No se sabe exactamente cuándo las células epidérmicas adquieren por primera vez esta polaridad, y la señal que la induce no ha sido identificada (Webb y cols., 2008).

C. Importancia del factor de transcripción p63 en el desarrollo y mantenimiento de la epidermis

El factor p63 es el miembro evolutivamente más antiguo de la familia de genes de p53. El p63 presenta similitudes en estructura y homología con p53, debido a las cuales se pensó que p63 tenía relación en los procesos cancerosos. La evidencia experimental ha hecho que cambie esta consideración (Vanbokhoven y cols., 2011).

El p63 tiene un centro altamente conservado, el dominio de unión al DNA (DBD), en el extremo carboxilo terminal un dominio de oligomerización que facilita la tetramerización y en el extremo amino terminal se encuentra un dominio de transactivación (TA). El gen de humano de p63 se encuentra localizado en el cromosoma 3q28 y comprende 16 exones. El gen de p63 puede generar 6 isoformas que son el resultado de la combinación del uso de dos promotores diferentes P1 y P2 y tres eventos de splicing en el extremo 3'. Por la región amino terminal p63 presenta 2 isoformas: la isoforma TAp63 que tienen en su región amino terminal un dominio de TA y la isoforma truncada $\Delta p63$ que carece de este dominio. Por la región carboxilo terminal p63 se pueden generar las isoformas α , β y γ . Se ha reportado la presencia de otra isoforma, la ϵ , la cual es resultado de una terminación transcripcional prematura en el exon 10 (Truong y Khavari, 2007; McDade y MacCancel, 2010; Guerrini y cols., 2011; Vanbokhoven y cols., 2011) (ver Fig. 8).

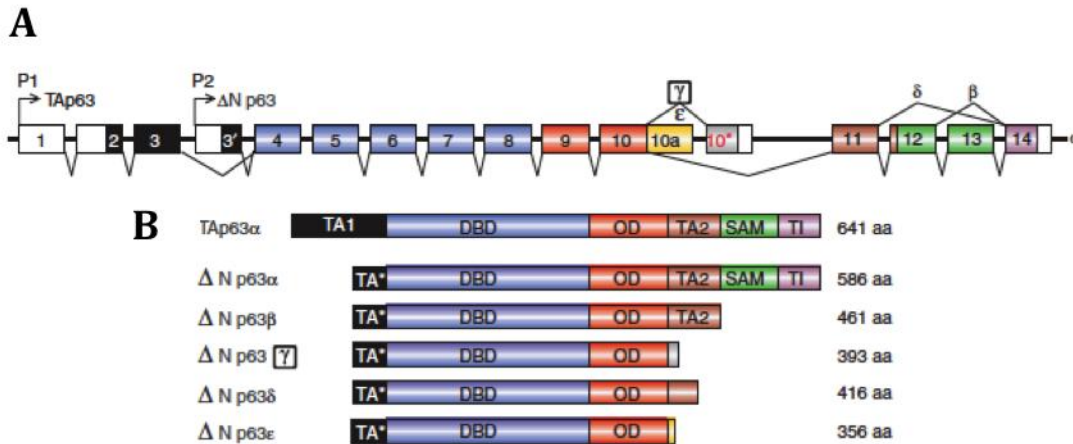


Fig. 8. Gen humano del factor de transcripción p63. **(A)** Representación esquemática de la organización de p63 exon-intron y los eventos de splicing alternativo. El uso de promotores alternativos produce dos isoformas en el extremo aminoterminal, TA (dominio de transactivación) y una isoforma truncada Δ N. Se indica el número de exones. El código de color en los exones corresponde a los dominios funcionales de la proteína. **(B)** Representación esquemática de las variantes de p63 humano. Solo se muestran una isoforma con el dominio TA, TAp63 α y todas las variantes de Δ Np63. aa, aminoácidos; DBD, dominio de unión al DNA; OD, dominio de oligomeización; SAM motivo alfa estéril; TA2, dominio de transactivación; TI dominio de inhibición de la transactivación (Vanbokhoven y cols., 2011).

Las isoformas TAp63 presentan en su dominio amino terminal un alto grado de homología al dominio TA de p53 y pueden unirse a elementos de respuesta de p53 o a otros elementos de respuesta específicos. Las isoformas Δ p63 pueden actuar como inhibidor dominante negativo de la activación transcripcional de los miembros de la familia de p53 y/o competir por los sitios de unión. Además, las isoformas Δ , incluyendo Δ Np63 α , son capaces de inducir a un subgrupo de genes blanco vía un segundo dominio TA presente en el carboxilo terminal (TA2). Las isoformas más largas de p63 incluyen un dominio motivo estéril (SAM) que se relaciona con interacciones proteína-proteína y un dominio de inhibición transcripcional (TID); este dominio puede autoinhibir la actividad transcripcional de TAp63 y Δ Np63 α o inhibir hetercomplejos con otros p63 transactivados o isoformas miembros de la familia (McDade y MacCancel, 2010; Guerrini y cols., 2011).

La complejidad del papel de p63 y sus isoformas en la morfogénesis de la epidermis se observó inicialmente por la generación de dos ratones transgénicos carentes de p63 $^{-/-}$ por diferentes grupos (Yang y cols., 1998; Mills y cols., 1999; Koster y Roop, 2004a;). Estos ratones no poseen epitelios estratificados, carecen de apéndices como glándulas mamarias, folículos pilosos y dientes. Además, no se observó una epidermis reconocible, pero sí una capa de células cubriendo el cuerpo. Estos ratones pueden morir prenatalmente o en la primeras horas después del nacimiento por deshidratación, presentan afectaciones en la piel y anomalías craneofaciales, por lo que se determinó que p63 tiene un papel fundamental en el desarrollo de la epidermis de mamíferos. También se ha observado que

mutaciones en el gen de p63 se asocian a un grupo de síndromes en el humano que desarrollan manifestaciones clínicas tales como malformaciones en las extremidades, displasia ectodérmica y alteraciones faciales (Koster y Roop, 2004; Truong y Khavari, 2007; McDade y MacCancel, 2010).

En cuanto a la diferenciación de la epidermis, se ha propuesto que el factor de transcripción p63, se expresa en las células superficiales del ectodermo para comprometerlas y que éstas se dirijan a un linaje epidérmico, o para mantener a las células troncales de la epidermis (Koster y Roop, 2004; Truong y Khavari, 2007).

A partir de estudios con queratinocitos en cultivo también se propuso que p63 es fundamental para mantener el potencial proliferativo de la epidermis: los queratinocitos que expresaban altas cantidades de p63 poseían una capacidad proliferativa alta. En otro estudio se observó que p63 se expresa en todas las células con capacidad proliferativa en la epidermis de embriones de pez cebra; también se requiere para que las células proliferen (Truong y Khavari, 2007). Además, se determinó que p63 sirve como un marcador de células troncales de la epidermis (Candi y cols., 2008).

En la epidermis madura p63 tiene varios papeles: promueve el mantenimiento de la adhesión celular y la proliferación de las células basales e induce la expresión de genes requeridos para la diferenciación (Candi y cols., 2008), por lo que se propone a p63 como el control molecular maestro para la inducción del programa de diferenciación y estratificación (Koster y Roop, 2004).

El p63 se expresa en el ratón en estadios tempranos de desarrollo (E8.5), antes de la expresión de los primeros marcadores de diferenciación en el tejido epitelial que ha iniciado el programa de estratificación. Aunque mantiene su expresión durante todo el desarrollo embrionario, está restringida a la capa basal mientras la epidermis madura. La isoforma principal de p63 que se presenta en la epidermis es $\Delta p63\alpha$, de forma predominante en la capa basal y su expresión está en bajas concentraciones en las células de las capas superiores debido a que éstas se están diferenciando, por lo que se requiere que p63 sea degradado (Koster y cols., 2007; McDade y MacCancel, 2010).

Las isoformas $\Delta p63$ se expresan en diferentes etapas de desarrollo y diferenciación en comparación con las isoformas de TAp63. La isoforma TAp63 no es detectable en queratinocitos por Western-blott pero con un anticuerpo no comercial se ha identificado su expresión en la capa superior de la epidermis madura (Koster y cols., 2007; McDade y MacCancel, 2010).

La isoforma $\Delta Np63$ puede controlar diferentes redes transcripcionales en los precursores de las células de la epidermis, lo que depende del estado de maduración de las células y de una variedad de estímulos extracelulares. En los queratinocitos en proliferación de la capa basal, $\Delta Np63$ puede controlar la

expresión de queratinas basales (5 y 14), de moléculas requeridas para la formación de la barrera epidérmica como Alox 12 e inhibe la proliferación inducida por genes de arresto celular por competencia con p53 a los mismos elementos de respuesta (Gerrini y cols., 20119).

La $\Delta Np63$ también puede cambiar su actividad transcripcional después de un estímulo de diferenciación: se separa del promotor de los genes de arresto celular, activa a los genes requeridos para la salida del ciclo celular y reorganiza la transcripción de moléculas de adhesión celular que permiten a los queratinocitos separarse de la membrana basal y estratificarse (Guerrini, 2011). En contraste, p63 tiene como blancos transcripcionales algunos componentes de la membrana basal. Ratones knockout de p63 presentan defectos de la membrana basal, lo que resulta en una pérdida de la polaridad celular, esto repercute en el proceso de la estratificación de la epidermis embrionaria, ya que las divisiones asimétricas de la epidermis no se realizan adecuadamente y el proceso de estratificación no se lleva a cabo. (Ray y Lechler, 2011).

D. El pez cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo

El pez cebra es un organismo modelo ideal para estudiar el desarrollo embrionario de los organismos vertebrados, debido a que la embriogénesis ocurre de forma externa y a que los embriones son completamente transparentes. A las 24 hpf se aprecia la segmentación del cerebro, estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitos (ver Fig. 9). A los 5 dpf se han formado los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso y órganos como los ojos, oídos, riñones, el corazón, el hígado y el páncreas. La larva es capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos.

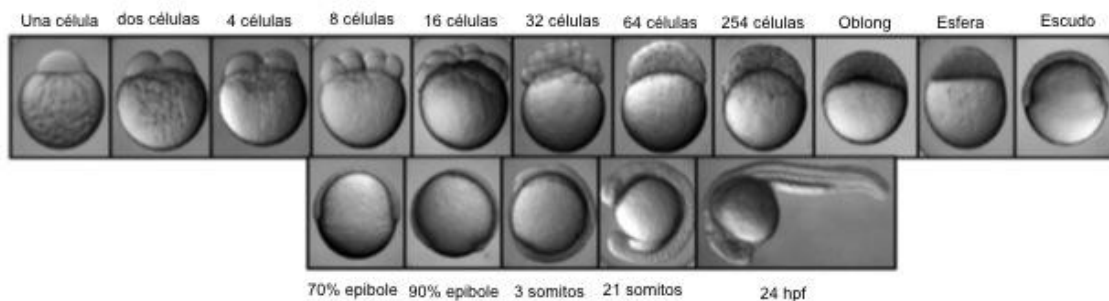


Fig. 9. Un día (24 hpf) de desarrollo del pez cebra. Se observan diferentes estadios de desarrollo, que son parte de la blastulación, la gastrulación y la somitogénesis, hasta llegar al inicio de la formación de órganos. Fotos Ernesto Maldonado.

Cada pareja de peces produce una cantidad abundante de embriones, a los cuales les toma 3 meses convertirse en adultos con capacidad reproductiva, son organismos diploides y su genoma está completamente secuenciado (Howe y cols., 2013). El pez cebra es un buen modelo para estudiar enfermedades que afectan a los humanos como la lipofuscinosis neuronal cerioide (Mahmood y cols., 2013), el Síndrome Allan-Herndon-Dudley de retraso psicomotor (Vatine et al., 2013), los neuroblastomas (Zhu y cols., 2012), el melanoma maligno (Patton y cols., 2005), el cáncer (MacInnes y cols., 2008; Moore y cols., 2006), las enfermedades hematopoyéticas (Amatruda y Zon, 1999), la poliposis intestinal (Haramis y cols., 2006), el riñón poliquístico (Kishimoto y cols., 2008), las infecciones virales (Ludwig y cols., 2011), etcétera. Así mismo, ha probado ser una excelente plataforma para la búsqueda de nuevos fármacos (Clifton y cols., 2010; ver la iniciativa www.fishforpharma.com). En particular, nuestro grupo de investigación propuso a dos mutantes de pez cebra como modelos de enfermedades en humanos: del Albinismo Oculocutáneo (Maldonado y cols., 2006; Navarro y cols., 2008) y de AMRF (Action Myoclonus Renal Failure, Díaz-Téllez, en preparación).

En el pez cebra se han desarrollado metodologías para la localización de fusiones con proteínas fluorescentes “in vivo”, la detección de la expresión de mRNAs, por hibridación “in situ”, la ablación y el trasplante de células, el abatimiento de la expresión de genes específicos empleando morfolinós (RNAs antisentido modificado con un grupo morfolino, Beis y Stainier, 2006) o nucleasas TALEN (“Transcription activator-like effector nuclease”). Recientemente se estableció un nuevo protocolo de mutagénesis en pez cebra llamado CRISPR-Cas el cual consiste en utilizar un sistema que utilizan las bacterias para defenderse de DNA extraño y que induce cortes en DNA de doble cadena por la nucleasa Cas-9 y que puede modificarse para inducir mutaciones en genes específicos en genes del pez cebra (Hwang y cols., 2013).

Una aportación de nuestro grupo fue generar una nueva metodología para estudiar las células de la epidermis durante el desarrollo del pez cebra (Villava y cols., 2007).

Además, permite conocer las bases moleculares de algunos procesos regenerativos, sistemas de defensa contra microorganismos, control molecular de las células troncales en la epidermis y la dermis, lo que refuerza la importancia del pez cebra como modelo.

Justificación

La epidermis de los humanos y los peces comparten características estructurales aunque evolutivamente presenten grandes diferencias. En ambos casos, la epidermis está formada por varias capas de células y separada de la dermis por una membrana basal, pero la epidermis de los peces está adaptada a la vida acuática, cubierta de moco y no está queratinizada (Raker y cols., 2010).

El estudio de la epidermis sirve como un sistema para contestar preguntas básicas sobre su biología, cuyas respuestas son de utilidad para comprender su funcionamiento en el humano; ejemplo de ello son los resultados del estudio in vivo de acuaporinas ancestrales y de uniones intercelulares adherentes (Raker y cols., 2010).

Además, los peces teleosteos tienen un sistema inmune con características que ayudarían a estudiar enfermedades infecciosas que afectan la piel humana. Por otro lado, la epidermis de los peces permite estudiar el origen del sistema de defensa innata antimicrobiana (Raker y cols., 2010).

El pez cebra se utiliza como modelo de estudio debido a que se pueden obtener fenotipos definidos mediante mutaciones diseñadas o espontáneas, lo que representa una alternativa a los ratones transgénicos. Es menos costoso realizar mutagénesis, permite la exploración de nuevas estrategias de investigación y el estudio de una amplia variedad de enfermedades humanas de la piel. En la actualidad, ha aumentado el uso de este organismo para analizar el empleo de drogas y sustancias que afectan el programa de desarrollo de la epidermis (Lieschke y Currie, 2007).

Por otro lado, el pez cebra permite realizar estudios de genómica in vivo de la epidermis para establecer procesos de desarrollo y generación de ella y de apéndices en los vertebrados. Estos estudios pretenden explorar vías de señalización como Hedgehog, BMP y Wnt, que se han conservado desde los inicios hasta la cúspide de la evolución de los vertebrados (Koudijs y cols., 2008).

Los tejidos del pez cebra poseen una gran capacidad regenerativa que incluye aletas, espina dorsal, nervio óptico, corazón y la epidermis (Whitehead 2005). Se tiene información de los genes y procesos que controlan el desarrollo de los diferentes órganos mencionados; Sin embargo, muchos de los eventos que participan en el desarrollo de la piel en este organismo no se han explorado y podrían proporcionar información que coadyuve en el conocimiento de los procesos que ocurren en la epidermis.

Hipótesis

El proceso de estratificación de la epidermis durante el desarrollo de pez cebra se puede llevar a cabo por divisiones asimétricas, en donde el factor de transcripción p63 tiene un papel impotente en este proceso, entonces el proceso es muy parecido en el ratón.

Objetivo general

Determinar como ocurre el proceso de estratificación durante el desarrollo del pez cebra.

Objetivos específicos

Determinar en que etapa del desarrollo embrionario del pez cebra la epidermis presenta su estratificación.

Determinar en que etapa del desarrollo embrionario del pez cebra la epidermis presenta divisiones asimétricas para su estratificación

Determinar si los componentes del complejo proteico LGN-NuMA-mInsc-Par3, participan en las divisiones asimétricas en la estratificación de la epidermis del pez cebra

Determinar la presencia de las proteínas p63, a-catenina durante el proceso de estratificación del pez cebra.

Material y métodos

A. Crianza de larvas

Embriones de pez cebra de la cepa silvestre se obtuvieron de cruas naturales con el fondo genético TAB-14/WIK (Zebrafish International Resource Center). Los peces cebra adultos se mantuvieron en un sistema de recirculación (Aquatic Habitats) de acuerdo con el procedimiento reportado por Maldonado y cols. (2006). Los embriones se mantuvieron a 28.5°C por cinco días; al sexto día se colocaron 30 larvas por vaso de precipitado de vidrio en 200 ml de agua de acuario estéril y se inició un régimen de alimentación hasta el día 12, que constó de 10 ml de *paramecium* 3 veces al día, a partir del día 13 y hasta el día 15, se cambió el régimen de alimentación por la administración tres veces al día de 10 ml de *paramecium* y 8 gotas de Artemia salina (SN Microcyst, Salt Creek) de cultivos de 24 horas; además, cada tercer día las larvas se cambiaban de vaso y se mantuvo constante la población de 30 larvas por vaso a una temperatura de 21-22°C.

A partir del día 16 se colocaron 30 larvas en cilindros de tanques de acuario, los cuales se colocaron en un sistema de recirculación (Nursery3, Aquatic Habitats) a 26°C y el régimen de alimentación constó de 5 ml de Artemia salina de cultivos de 24 horas, adicionado con Tetramin-pro (TetraMIn Pro Tropical Crisps, Tetra) tres veces al día. Las larvas se cambiaban cada tercer día de cilindro manteniendo contante la población de 30 larvas por cilindro.

El día 23 se cambiaron 30 larvas a tanques con rejillas (AHN400, AquaticHabitats) y se conservó el régimen de alimentación hasta el día 28. Todos los procedimientos cumplieron con la aprobación de la oficina de bienestar para animales de laboratorio (OLAW), de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH), aprobación #A5281-01.

B. Medición de larvas

A partir del día 24 y hasta el día 28, se colectaron larvas, las cuales se sacrificaron en una solución de tricaina 0.025% (A5040 Sigma) y, posteriormente, se fijaron toda la noche en paraformadehído al 4% diluido de PBS pH 7.2.

Después de tres lavados con PBS las larvas fijadas se midieron con un sistema Stemi-SV11 colocado en un microcopio estereoscopico (Zeiss), con un ocular de 10x reticulado y una reglilla micrométrica. Las mediciones de la longitud estándar (SL) se realizaron del hocico (el punto más anterior de la cabeza excluyendo la mandíbula) al pedúnculo caudal (la región más posterior del cuerpo donde se insertan los radios de la aleta caudal), de acuerdo con el procedimiento de Parichy y cols. (2009).

Las larvas se agruparon de acuerdo con su tamaño y se colocaron en tubos marcados 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.5, 8.0 y 8.5 mm SL, reflejando el valor más cercano a la medida del tamaño. Se tomaron las medidas de las larvas de cada tubo, se calculó el promedio de longitud y se renombraron los grupos de larvas de acuerdo con éste. Se dividieron en 8 clases de tamaño: 4.2, 4.8, 5.4, 6.0, 6.7, 7.5, 8.0 y 8.6 mm SL.

Se examinó cada grupo para reportar las características de cada tamaño o estadio de desarrollo y se encontró una correlación satisfactoria. Se midió el grosor de la epidermis con el software AxionVision de cortes histológicos de las larvas por grupo de tamaño. Las imágenes se mejoraron mediante el software Adobe PhotoShop, pero todas las imágenes de la misma figura fueron colocadas lado a lado antes de hacer alguna modificación.

C. Procesamiento histológico y tinción de Pas-schiff

Las larvas se post-fijaron toda la noche en una solución de formol-acetato de sodio-glicerina (NaOAc 1.8%, formaldehído 3.6% y glicerina 10%), se lavaron con PBS (pH7.4) y se deshidrataron con alcohol a diferentes concentraciones siguiendo la secuencia alcohol al 60, 70, 80, 96 y 100% durante 20 min en cada concentración. Posteriormente, se aclararon con dos cambios de xilol de 20 min cada uno, se embebieron en parafina líquida y se obtuvieron bloques, los cuales se cortaron con un micrótopo de rotación (RM2145, Leica) a 5 μ m de grosor. Los cortes se colocaron en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (P8920, Sigma).

Para la tinción de Pas-schiff se tomaron cortes de larvas de los diferentes grupos, los cuales se desparafinaron con dos cambios de xilol de cinco min cada uno; se rehidrataron con cambios de dos min cada uno en concentraciones graduales de alcohol al 100, 96, 80, 70 y 60% y se colocaron los cortes en agua y, posteriormente, en una solución de ácido peryodico al 0.5% durante 10 minutos.

A continuación, los cortes se lavaron y se colocaron durante 10 min en la solución de Schiff (Fucsina básica 0.4%, HCl 0.09N y $K_2S_2O_5$ 0.9%), que se une a glicoproteínas que forman parte de las membranas basales, después de lo cual se retiró la solución de Schiff y los cortes se pusieron alrededor de tres a cinco min al agua corriente hasta que tomaron un color magenta. Se tiñeron con la solución de hematoxilina de Gill No. 1 (GHS132-1L, Sigma-aldrich) por dos min, se colocaron en una solución de carbonato de litio, se lavaron y se deshidrataron en alcoholes graduales 60, 70, 80, 96 y 100% en cambios cada dos min. Se aclararon en xilol con dos cambios de dos min cada uno y se montaron con resina Entellan (107960, Merck).

D. Inmunofluorescencia de cortes histológicos de larvas

Los cortes de larvas de los diferentes grupos se desparafinaron e hidrataron para proceder a una recuperación antigénica con una solución amortiguadora de EDTA (1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 8.0) y calentando en horno de microondas por 3:30 minutos. A continuación, se permeabilizaron y bloquearon con PBS-tween-albúmina (Tween0.1%, albúmina 2%) por 30 min, se colocó el anticuerpo primario durante 12 horas a una concentración de 1:200 para detectar α -catenina (monoclonal de ratón, Abcam ab-4915), PCNA (policlonal de conejo, Santacruz, sc-7907), y p63 (monoclonal de ratón, Santacruz, sc-8431) en cualquiera de sus múltiples formas (Δ Np63 y Tap63).

Por múltiples alineamientos para secuencia de proteínas de p63 (MacVector), se determinó y obtuvo el antip63 usado en este trabajo, el cual reconoce a todas las isoformas de p63.

Para finalizar, los cortes se lavaron con PBS y se colocó el anticuerpo secundario Alexa-488 (verde) o Alexa-594 (rojo) Invitrogen; se montaron con Vectashield-DAPI, y se observaron con el microscopio AxioImager usando una cámara MRc AxioCam y el software AxioVisio, 4.8 (Zeiss).

Resultados

Artículo:

Guzman, A., Ramos-Balderas, JL., Carrillo-Rosas, S. and Maldonado, E. (2013) A Stem Cell Proliferation Bursts, Forms New Layers of P63 Expressing Suprabasal Cells, During Zebrafish Postembryonic Epidermal Development. Biol Open. En Prensa.

Aceptado por la revista el 24 de Agosto del 2013

Aceptado por el Posgrado en Ciencias Biológicas el 9 de Septiembre del 2013

A stem cell proliferation burst forms new layers of P63 expressing suprabasal cells during zebrafish postembryonic epidermal development

Aida Guzman, Jose L. Ramos-Balderas, Samantha Carrillo-Rosas and Ernesto Maldonado*

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F., México

*Author for correspondence (emaldona@ifc.unam.mx)

Biology Open 000, 1–8

doi: 10.1242/bio.20136023

Received 2nd July 2013

Accepted 22nd August 2013

Summary

Organ growth during development is a highly regulated process with both temporal and spatial constraints. Epidermal stratification is essential for skin growth and development. Although the zebrafish has been well studied, it is not known when and how epidermal stratification occurs. This is because beyond the first five days of development our knowledge is currently limited. We found that epidermal stratification in zebrafish begins when the larvae reach a standard length (SL) of 6 mm at approximately 25 days of age. Over the next four days (from a SL of 6 to 9 mm), epidermis thickness increases almost four-fold. This represents a sudden increase in organ size, since for the previous 20 days of development, the epidermis has been only two layers thick. This pattern is different from that observed in mammals that undergo continuous stratification from E14.5–E18.5. To study how stem cell proliferation gives rise to the new epidermal layers, we used a combination of markers: one for cell proliferation (proliferating cell nuclear-antigen PCNA) and one for epidermal stem cells (P63

transcription factor). We identified, throughout the stratification process, two different waves of cell division. Initially, the most basal epidermal cells divided and generated a subset of suprabasal cells (possibly transient-amplifying cells); within the next several days, the basal cells stopped dividing, and the suprabasal cells began proliferation, giving rise to most of the cell types in the new layers. This part of the process is similar to what has been recently found during epidermal stratification in mammals.

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Key words: Epidermal stem cells, Epidermal stratification, Postembryonic development, Zebrafish

Introduction

In vertebrates, the epidermis is maintained by epithelial stem cells that are capable of self-renewal and differentiation. These properties are established during development and are the result of a complex and precisely coordinated program in which stratification plays an essential role (Koster and Roop, 2007; Lechler and Fuchs, 2005). The zebrafish is a model organism suitable for the study of organ formation, including that of the skin (epidermis, dermis and hypodermis) (Beis and Stainier, 2006; Chang and Hwang, 2011; Rakers et al., 2010; Sire and Akimenko, 2004). Much is known about the development of the zebrafish epidermis during the first five days of embryonic development, in part due to studies of different zebrafish mutants. For example, in the *lgl2* (large giant larvae) mutant, hemidesmosomes are absent, and epidermal cells undergo epithelial-mesenchymal transition; consequently, epidermal cells are detached and lost (Reischauer et al., 2009; Sonawane et al., 2009). Epidermal cell shedding also occurs in *EpCam* (Epithelial cell adhesion molecule) and *Hai1a* (a serine protease inhibitor of Matriptase1a) zebrafish mutants (Carney et al., 2007; Slanchev et al., 2009). *Hai1a* mutants also exhibit epidermal cell

hyperproliferation (Carney et al., 2007), which has also been observed in the “psoriasis” mutant (Webb et al., 2008). Mutations that affect the formation of the basal membrane of the epidermis in zebrafish (*lama3*, *itga3*, *fras1*, *frem1-2*, *hmcn1*) produce a characteristic fin blistering phenotype and have been proposed as models for Fraser syndrome in humans (Carney et al., 2010; Feitosa et al., 2012). The development of certain structures that are ultimately located in the zebrafish epidermis but that originate elsewhere (such as peripheral sensory axons and neuromasts) has been studied (Hernández et al., 2007; O’Brien et al., 2012). Genetic tools for the study of epidermal development, such as the cytokeratin II promoter which drives epidermal expression (Wang et al., 2006) and a conditional cell ablation system that can be used to eliminate epidermal cells at any given time point (Chen et al., 2011), have also been designed.

During zebrafish development, the surface ectoderm is induced to an epidermal cell fate just a few hours after fertilization. By 24 hours post-fertilization (hpf), the epidermis (approximately 4 μm thick) is organized into two cell layers: an external enveloping layer and a basal layer (Le Guellec et al., 2004). For the next two to three weeks, the external layer protects the larvae

from the environment while the fish grows. The basal layer produces large amounts of collagen to form the basal membrane and the primary dermal stroma, but the epidermis remains only two cell layers thick. It is not known when or how epidermal stratification takes place in zebrafish. Certain aspects of epidermal stratification were described in a very detailed electron microscopy study addressing zebrafish dermis development. The authors of this study reported that a third epidermal layer appeared by 15 days post-fertilization (dpf) and that four epidermal layers were visible by 26 dpf (Le Guellec et al., 2004). However, breeding conditions (population density, food quality, temperature) significantly affect growth rates (Parichy et al., 2009), and the developmental rate can therefore vary greatly from one laboratory to another. Thus, we believe that further analysis is required to understand how zebrafish epidermal stratification occurs and how it compares to the same process in other organisms.

In this work, we aim to identify the developmental stage at which epidermal stratification takes place in zebrafish. Taking advantage of a now well-established post-embryonic developmental staging series (Parichy et al., 2009), we describe when and how several critical cellular events in epidermal stratification take place.

Results

Epidermal thickening during postembryonic zebrafish development from a SL of 4.8 to 8.6 mm

In preparation for this work, we analyzed the epidermis in histological sections from larvae at 10, 15, 20, 25 and 30 dpf (data not shown); epidermal changes were only observed after 25 dpf. For this reason, we chose to study the epidermis during a window surrounding this period of time. Our first aim was to look for epidermal thickening during postembryonic zebrafish development; with that in mind, we collected and studied larvae between 24 and 28 dpf. Because, during postembryonic stages, size is a better indicator of developmental progress than age (Parichy et al., 2009), we measured the antero-posterior (SL) length from the snout to the caudal peduncle and grouped the collected larvae into eight different size classes with mean SL values of 4.2, 4.8, 5.4, 6.0, 6.7, 7.5, 8.0 and 8.6 mm (see Materials and Methods). We observed that zebrafish larvae double in SL from days 24 to 28 of development, as reflected by the different size class distributions found on each day (Fig. 1A). While the larvae with a SL of 4.2 to 5.4 mm represent 84% of the population at 24 dpf, only 38% of the population falls into these classes at 28 dpf. Larvae with a SL greater than 7.5 mm could only be found on days 27 and 28. We wanted to determine how this size increase was related to epidermal growth. Therefore, we measured epidermal thickness in larvae with a SL of 4.8 to 8.6 mm. We found that, during these days of development, the epidermis grew at a constant rate, increasing its thickness fourfold (Fig. 1B,C). The same pattern was observed in the dorsal trunk region (Fig. 1B) and in the head area (Fig. 1C) where the epidermis appeared to thicken at the same rate.

Epidermal stratification starts when larvae attain a SL of 5.4 and 6 mm

For the analysis of zebrafish epidermal stratification, histological sections were prepared from larvae with a SL of 4.8 to 8.6 mm. These sections were stained using the periodic acid–Schiff (PAS) method, which labels the basal membrane that separates the epidermal and dermal layers. Observations of both the head and dorsal trunk regions indicated that the thickening of the epidermis

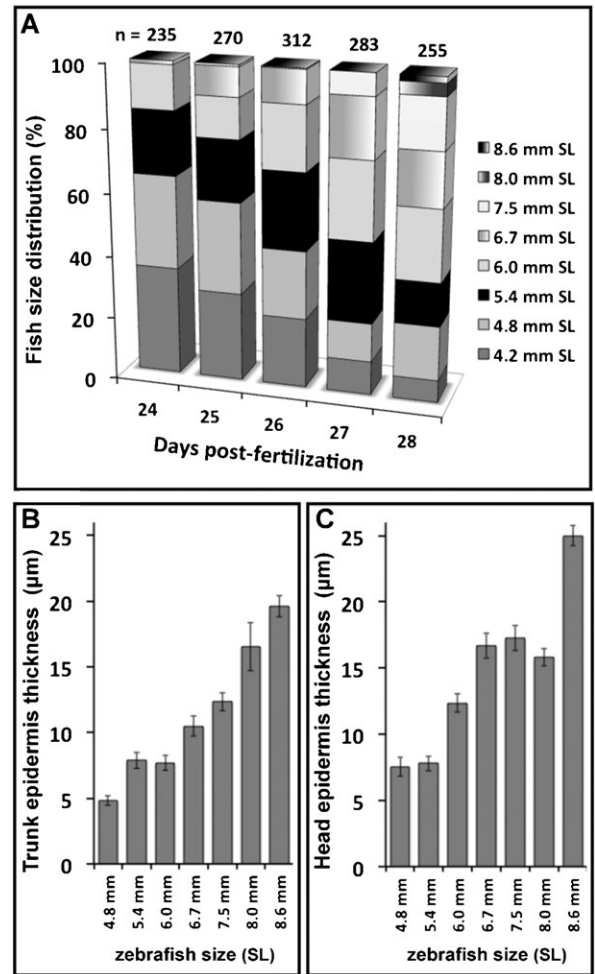


Fig. 1. Distribution of zebrafish larvae size and epidermis thickness from 24 to 28 dpf. (A) Larvae were collected each day from 24 to 28 dpf, fixed and measured from the snout to the caudal peduncle (SL: Standard Length), then grouped into eight different classes according to their size (see Materials and Methods): SL of 4.2, 4.8, 5.4, 6.0, 6.7, 7.5, 8.0 and 8.6 mm. The size class distribution changes rapidly during this window, with SL above 7.5 mm appearing only at 27 and 28 dpf. (B) Epidermal thickening in the dorsal trunk region. (C) Epidermal thickening in the head area. (B and C) We measured the epidermal thicknesses in histological sections taken from fish with a SL of 4.8 mm to 8.6 mm and found a nearly fourfold increase in epidermal dimensions. Epidermal thickness was measured in fourteen larvae from each size class, and the mean values were used to build class histograms. Error bars represent the standard error of the mean.

observed during this developmental window results from an increase in the number of cell layers (Fig. 2). In the head area, the epidermis began to thicken when larvae reached a SL of 6 mm, while, in the dorsal trunk, thickening was observed at a SL of 6.7 mm (Fig. 2E–H, Fig. 1B,C). Mucous cells were also labeled with the PAS stain. We noted that, as the epidermis grew, the mucous cells also became considerably larger (Fig. 2). By the 8.6-mm-SL developmental stage, the epidermis was four to six cell layers thick (Fig. 2M,N). When comparing the postembryonic larval epidermis (Fig. 2A–N) with the adult epidermis (Fig. 2O,P), it is obvious that the epidermis in the head reaches its maximum thickness (which, in adults, measures on average 20 µm) during the postembryonic development stages studied here (SL of 4.8–8.6 mm). In contrast, the dorsal trunk epidermis (which is close to

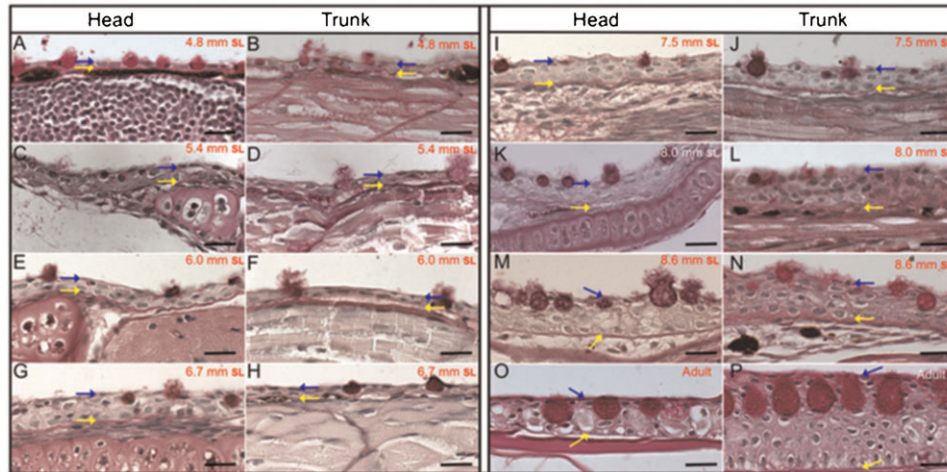


Fig. 2. Histological longitudinal sections and periodic acid-Schiff staining of juvenile fish with a SL of 4.8 mm to 8.6 mm and from adult zebrafish.

(A, C, E, G, I, K, M and O) Sections from the head region. (B, D, F, H, J, L, N and P) Sections from the dorsal trunk area. (A, B), (C, D), (E, F), (G, H), (I, J), (K, L) and (M, N) are from fish with a SL of 4.8 mm, 5.4 mm, 6 mm, 6.7 mm, 7.5 mm, 8 mm and 8.6 mm, respectively. (O, P) Sections of the head and dorsal trunk from adult fish. Blue arrows label the topmost limit of the epidermis and yellow arrows label the basal membrane, which is specifically labeled by PAS. (C–F) Epidermal stratification and thickening was initiated when larvae attained a SL of 5.4 and 6 mm. (G–N) When larvae reached a SL of 6.7–8.6 mm, stratification notably thickened the epidermis. During this time, the mucous cells undergo a considerable increase in size, which might give the impression that these images were not taken at the same magnification; however, all images shown here were obtained with a 63 \times oil objective (Zeiss). The large spaces visible between the skin and other tissues may be artifactual. Bars are 20 μ m in length.

25 μ m thick in larvae with a SL of by 8.6 mm) remains far from its maximum thickness of 40–60 μ m (Fig. 2P). The epidermis in the ventral abdomen of adult fish is very thin, with an average thickness of 10 μ m (data not shown).

Cell proliferation during epidermal stratification

To determine whether stratification is a consequence of cell proliferation, we carried out immunostaining in histological sections from larvae during the postembryonic development period. Anti-PCNA was used to label the nuclei of cells that are on the point of entering cell division. At the same time, we used an anti- α -catenin antibody to label the cell membranes of epidermal cells; α -catenin is specifically enriched at the zone of contact with the basal membrane of the epidermis. As expected, we observed a high degree of proliferation in the epidermis in larvae with a SL between 4.8 mm and 8.6 mm in both the dorsal trunk area (Fig. 3A–U) and in the head region (Fig. 4A–U). While some proliferation was observed in the dermis area, we were able to distinguish epidermal from dermal proliferation (as an example, see Fig. 3D–F) using the α -catenin labeling. Immediately prior to (SL of 4.8 mm) and at the initial stratification developmental stages (SL of 5.4–6 mm), most of the proliferating cells appeared to be in contact with the epidermal basal membrane (Fig. 3A–I, Fig. 4A–I); however, as stratification progressed, the PCNA-positive cells became more broadly distributed in the recently formed suprabasal layers (Fig. 3J–U, Fig. 4J–U). In the adult epidermis, PCNA labeling was less abundant (Fig. 3V–X, Fig. 4V–X). We observed that in larvae with a SL of 4.8–5.4 mm, the nuclei of the proliferating epidermal cells were flat and elongated; however, subsequently (at a SL of 6–8.6 mm SL), the nuclei in the proliferating cells were more rounded.

Most cells proliferating during epidermal stratification express P63 protein

Prior to the initiation of stratification, only two epidermal cell layers are present (the basal and external layers), and these layers

have different morphological and functional characteristics (Le Guellec et al., 2004). Only basal cells express P63 (a P53 homolog), which is required to maintain the regenerative capacity of the epithelial stem cells (Fuchs, 2009; Hsu and Fuchs, 2012; Koster et al., 2004; Yang and McKeon, 2000). To determine whether the basal cells are actively proliferating during epidermal stratification, we combined the anti-PCNA and anti-P63 antibodies (Fig. 5); both PCNA and P63 are expressed in the cell nuclei. We found that, in larvae with a SL of 4.2 mm, PCNA-expressing cells also expressed P63 (Fig. 5A–D; supplementary material Fig. S1A,C). We believe these are basal cells, as the only epidermal cells that express P63 are located within the basal cell layer (Bakkers et al., 2002; Koster et al., 2004; Lee and Kimelman, 2002). Later, when larvae reached a SL of 6 mm, a reduction in the number of basal cells expressing PCNA was observed, even though P63 expression was maintained (Fig. 5E–L; supplementary material Fig. S1B,C).

At this point, we observed the appearance of a suprabasal or intermediate layer of PCNA- and P63-expressing cells that had rounded nuclei, in contrast to the flat nuclei characteristic of basal cells (Fig. 5E–H). Stratification appeared to occur rapidly when larvae reached a SL of 7.5 mm, by this developmental stage, a notable increase in the number of suprabasal P63-expressing cells was observed (Fig. 5I–L) in the intermediate epidermal layers. PCNA expression had completely disappeared from the more basal layers, which remained positive for P63 expression. From this stage on, most P63-expressing cells had rounded nuclei (basal and intermediate). In adult fish (head and dorsal trunk epidermis), we only observed PCNA labeling in P63-positive suprabasal cells in the head (Fig. 6A–D) as in the trunk area (Fig. 6E–H). It is worth mentioning that PCNA was never observed within the topmost layer of external cells.

Discussion

We combined histological and immunofluorescence analyses to determine the developmental stage at which epidermal

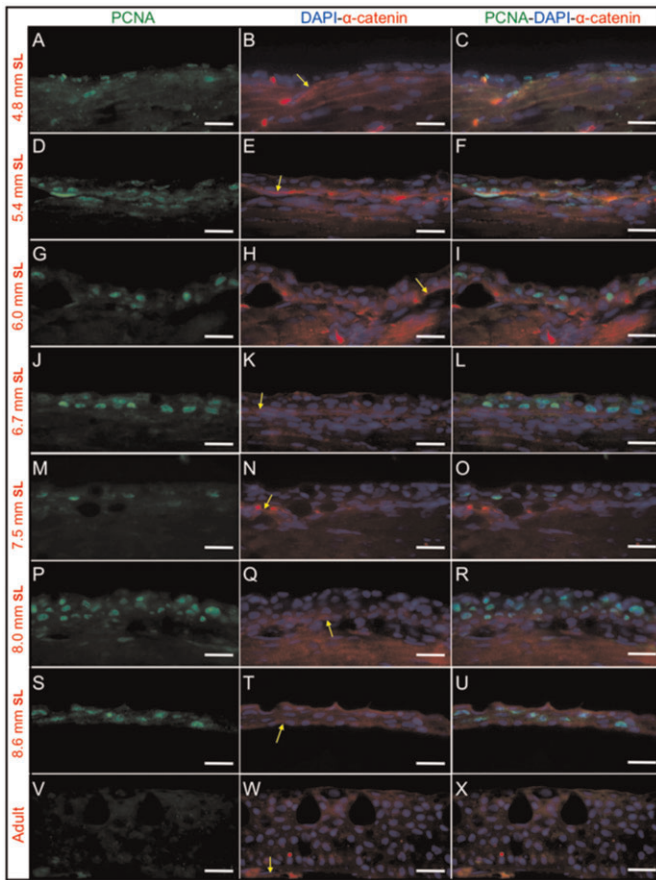


Fig. 3. PCNA and α -catenin immunofluorescence staining reveals cell proliferation during epidermal stratification in the dorsal trunk area. Anti-PCNA labels proliferating cells, while anti- α -catenin labels both the epidermis and dermis but is concentrated in the basal membrane, which allows the discrimination of these two regions. (A–C), (D–F), (G–I), (J–L), (M–O), (P–R) and (S–U) show immunofluorescence staining from longitudinal sections of larvae with a SL of 4.8 mm, 5.4 mm, 6 mm, 6.7 mm, 7.5 mm, 8 mm and 8.6 mm SL, respectively. PCNA labeling is observed specifically in basal layer cells from SL 4.8–5.4 mm larvae (A–F), but later is observed in suprabasal layers (compare C, L and R). (V–X) are immunostained longitudinal sections from adult fish; no PCNA staining can be observed in this representative region. In some samples (like S–U) the epidermis get separated from the dermis but this is artifactual. Yellow arrows mark the epidermal basal membrane where α -catenin labeling concentrates. Bar length is 20 μ m.

stratification occurs in zebrafish; we found that this event occurs during postembryonic development, between 24 to 28 dpf. Because fish developmental growth rates strongly depend on breeding conditions (e.g., temperature, density, food quality) and therefore could vary among research facilities, we chose to use a more precise staging system proposed by other authors (Parichy et al., 2009; Sire et al., 1997) using larvae length as an index of development instead of dpf. Epidermal stratification begins when the SL of the larvae is between 5.4 and 6 mm, and the average rate of thickening is approximately 4.7 μ m for every 1-mm increase in SL; subsequently, the epidermis grows to an approximate thickness of 20 μ m in the adult head area and of 40–60 μ m in the adult dorsal trunk region. Considering that there are only two epidermal layers of cells (4–5 μ m thick) for approximately 25 days, the nearly fourfold thickening that occurs in the epidermis within five days represents a sudden and rapid increase in organ size. Other regions of the zebrafish skin are also

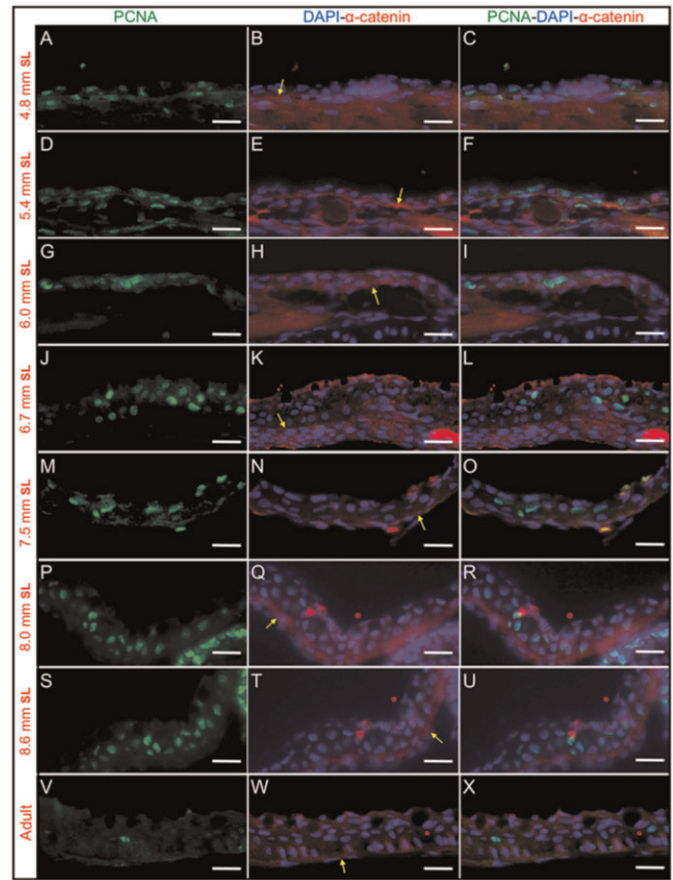


Fig. 4. PCNA and α -catenin immunostaining to show cell proliferation during epidermal stratification in the head area. Anti-PCNA labels cells in proliferation and anti- α -catenin labels the basal membrane that separates the epidermis and dermis regions. (A–C), (D–F), (G–I), (J–L), (M–O), (P–R) and (S–U) show immunostained longitudinal sections of larvae with a SL of 4.8 mm, 5.4 mm, 6 mm, 6.7 mm, 7.5 mm, 8 mm and 8.6 mm, respectively. (V–X) show immunostained longitudinal sections in adult fish. (A, D, G, J, M, P, S and V) PCNA immunostaining. (B, E, H, K, N, Q, T and W) Anti- α -catenin immunofluorescence merged with DAPI staining to label the nuclei. (C, F, I, L, O, R, U and X) Merged images of PCNA, α -catenin and DAPI staining. In some samples (like M–O) the epidermis get separated from the dermis, however this is artifactual. Yellow arrows mark the epidermal membrane where α -catenin labeling is abundant. Bar length is 20 μ m.

thickening at this time; it has been reported that the deepest dermis layer, known as the “stratum compactum”, grows from a width of 2 μ m in larvae with a SL of 7.5 mm to a width of 5 μ m in larvae with a SL of 9 mm (Sire et al., 1997). It is worth mentioning that epidermal stratification precedes scale formation, which has been described to take place when larvae attain a SL between 8 to 10 mm (Parichy et al., 2009; Sire and Akimenko, 2004; Sire et al., 1997).

Interestingly, the approximately 25-day gap between epidermal specification (formation of the first two layers of cells) and stratification (formation of all other epidermal layers) does not occur in mammals. For example, epidermal specification begins at E8.5 in mice, and stratification takes place immediately thereafter, culminating with several layers of differentiated epidermal cells at E18.5 (Koster and Roop, 2007). This heterochronic change may be the consequence of adaptation while preparing (during development) the epidermis for the

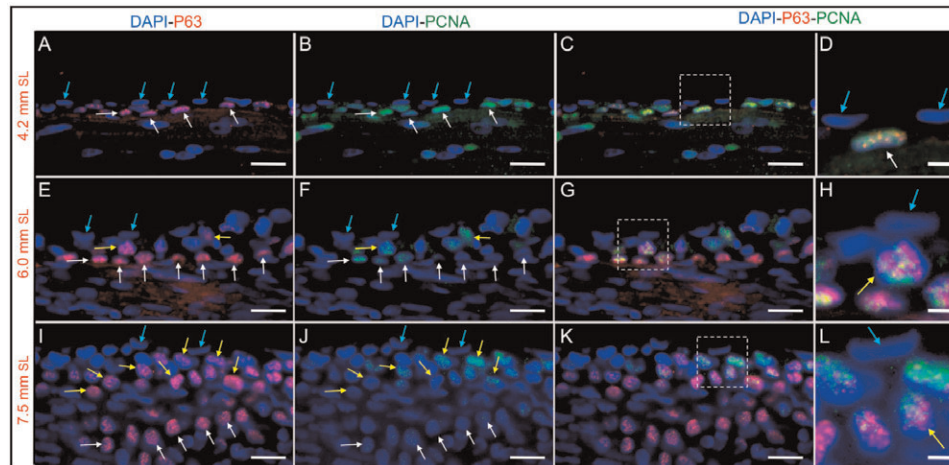


Fig. 5. Zebrafish epidermal stratification as a consequence of the proliferation of P63-expressing cells. (A–D) Longitudinal sections from larvae with a SL of 4.8 mm. (E–H) Longitudinal sections of larvae with a SL of 6 mm. (I–L) Longitudinal sections of larvae with a SL of 7.5 mm. (A, E and I) P63 and DAPI labeling. (E, F and J) PCNA and DAPI immunofluorescence. (C, G and K) Merged P63, PCNA and DAPI staining; the colocalization of P63 and DAPI appears magenta, and the colocalization of P63 and PCNA appears yellow. (D, H and L) Higher magnification images of the regions marked by squares in (C, G and H), respectively. Prior to the initiation of stratification (SL of 4.8 mm), basal cells (P63 positive) express the proliferation marker PCNA; later, for a SL of 6 mm, new suprabasal cells appear, also exhibiting P63 and PCNA co-labeling. For a SL of 7.5 mm SL, suprabasal cells (P63 positive) are abundant, and only suprabasal cells show PCNA labeling. Blue arrows label cells from the external epidermal layer, yellow arrows mark suprabasal cells at intermediate layers that are positive for PCNA and P63 expression, white arrows label P63 positive cells from the basal layer. Bars are 20 μm in length, except in (D, H and L), where they measure 5 μm in length.

different environments in which these organisms live. It would be interesting to identify the molecular mechanisms that regulate this “stratification delay”. For example, in mammals, a certain balance between PP63 (the phosphorylated form of P63) and P63 (non-phosphorylated form) is required to initiate epidermal stratification (Koster et al., 2004); it may be that the appropriate balance between these two isoforms is not achieved until the fish grows to a certain size (5.4–6 mm SL). PP63 phosphorylation is also associated with certain events in stratification (Suzuki and Senoo, 2012). It would be very useful to produce specific zebrafish PP63 antibodies for use in future studies.

We observed a change in the PCNA labeling pattern during epidermal stratification. When the larvae had reached a SL of 4.8–5.4 mm, PCNA-labeled cells were present only among the cells in contact with the basal membrane (labeled with the α -catenin antibody); however, when the larvae had grown to a SL

of 6–8.6 mm, these cells were widespread in the recently formed epidermal layers. To identify which epidermal cells proliferate during stratification, we specifically labeled the zebrafish basal layer with an antibody that marks P63 expression. P63 is a P53 homolog that is regulated by BMP and is essential for the development of the epidermal ectoderm. P63 has been used as a marker for epidermal stem cells; in mammals, epidermal stratification is associated with the proliferation of stem cells (Hsu and Fuchs, 2012; Koster et al., 2007; Koster et al., 2004; Lander et al., 2012). Our observations show an interesting dynamic between epidermal P63 expression and cell proliferation during the stratification process in zebrafish (Fig. 7).

First, during the initial steps of stratification (SL of 5.4–6 mm) when there are only two layers of cells (basal and external), PCNA and P63 co-labeling is restricted to basal cells. This has also been observed during the first days of development, though

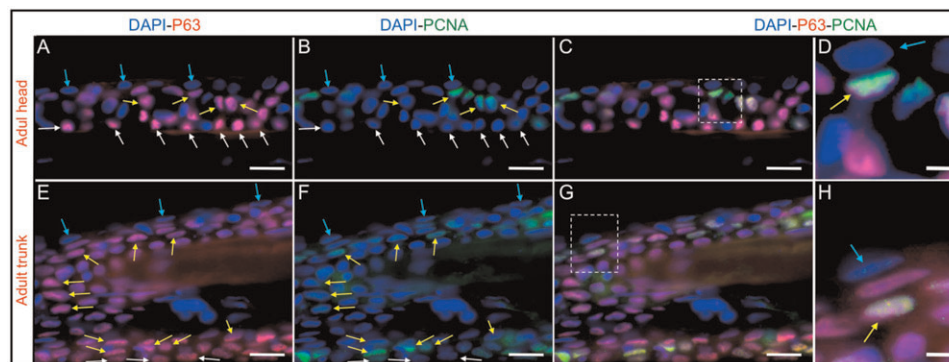


Fig. 6. PCNA and P63 immunofluorescence in the adult zebrafish epidermis. (A–D) Head region. (E–H) Dorsal trunk area, in a region that contains only scales. (A and E) DAPI and P63 labeling. (B and F) DAPI and PCNA immunofluorescence. (C and G) Merged P63, PCNA and DAPI immunostainings. (D and H) Higher magnification images of the regions marked by squares in (C and G), respectively. Suprabasal P63-positive cells persist in adulthood and remain actively proliferating. Blue arrows mark cells from the external epidermal layer, yellow arrows label suprabasal cells at intermediate layers that are positive for PCNA and P63 expression, white arrows mark P63 positive cells from the basal layer. Bars are 20 μm in length, except in (D, H and L) where they measure 5 μm in length.

PCNA expression is less abundant (Hornig et al., 2009). In zebrafish, P63 is expressed beginning at 5 hpf and is required for dorsoventral patterning and the formation of the epidermis and limbs during early development. During the earliest stages of development, P63 is distributed throughout the cytoplasm; however, by 20 hpf, it is localized in the cell nuclei (Bakkers et al., 2002; Lee and Kimelman, 2002). *In vitro* studies have shown that P63 induces proliferation and prevents premature differentiation in mammalian basal keratinocytes, giving rise to stratification (King et al., 2006) (Fig. 7).

Second, starting at the 6-mm-SL stage, suprabasal cells expressing PCNA and P63 appear, accompanied by a reduction in the number of basal cells showing PCNA labeling. The same phenomenon has been observed in mice between E13.5 and E14.5 (Koster and Roop, 2007); in this case, stem cells coexist within the basal layer with a set of their daughter cells known as transit-amplifying cells that later move suprabasally to initiate terminal differentiation (Koster et al., 2007; Suzuki and Senoo, 2012). This may mean that not all specific zebrafish epidermal cell types are generated by the basal stem cells but that there is a relay in which suprabasal progenitors or transit-amplifying cells participate. One example of transit-amplifying cells are the “intermediate neural progenitors”, which have a more restricted proliferative potential than stem cells, but can still produce an enormous amount and diversity of neural cells during development (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Viktorin et al., 2013). It was recently reported that P63 is phosphorylated in suprabasal cells but not in basal cells (Suzuki and Senoo, 2012); it may be possible to use a phospho-specific antibody to monitor the dynamics of epidermal transit-amplifying cell formation during zebrafish development (Fig. 7).

Third, multiple layers of cells, form the zebrafish epidermis in the larvae with a SL of 7.5 mm. The suprabasal or transit-amplifying P63-expressing cells are abundant at this stage, but only some of these cells are proliferating (PCNA positive). At this point, basal cells no longer express PCNA, and their nuclei are now rounded. This pattern of expression is similar to the pattern

observed in the adult fish epidermis, though PCNA expression is less abundant in the adult. P63-expressing cells in both the basal and suprabasal layers have also been recently found in the adult human epidermis (Suzuki and Senoo, 2012) (Fig. 7).

In this work we provide the structural framework for future molecular mechanistic studies in zebrafish epidermal stratification. In mammals, epidermal stratification is associated with a change in spindle orientation (Muroyama and Lechler, 2012) it will particularly interesting to look now for asymmetric cell divisions and the associated molecular regulatory gene network, during zebrafish epidermal development.

Materials and Methods

Fish husbandry

Wild-type zebrafish (*Danio rerio*) embryos were obtained from natural crosses of fish with the TAB-14/WIK genetic background. The TAB-14 strain was kindly donated to us by Professor Nancy Hopkins from MIT, while the WIK strain was obtained from the Zebrafish International Resource Center (ZIRC). Adult zebrafish were maintained in a recirculation system (Aquatic Habitats) with a constant pH, temperature and dark-light cycle (Trevarrow, 2004). The food consisted of harvested nauplii larvae mixed with macerated Tetraamin Pro (Tetra). Zebrafish embryos obtained by natural crosses were placed in Petri dishes (60 embryos per plate) and maintained at 28.5°C for 5 days. At 6 dpf, the larvae were moved to 200-ml glass beakers at a density of 30 larvae per beaker in 100 ml of fish water (250 mg/L Instant Ocean, 4 mg/L NaHCO₃, pH 7); the larvae were fed three times a day with 10 ml of paramecia (100–150 cells per ml). Water was changed every other day. At 13 dpf, three drops of brine shrimp were added to each meal, the temperature was maintained at 21–22°C. Sixteen dpf; larvae were transferred to mesh-bottom cylinders (height, 7.5 cm; diameter, 8.2 cm) fitted in 3-L tanks that were placed in a recirculating system (Nursery 3; Aquatic Habitats) at 26°C and maintained at a density of 30 individuals per cylinder. In these cylinders, the feed was concentrated within a smaller volume, allowing for appropriate fish growth. At this time, the diet was changed to 5 ml of brine shrimp mixed with macerated Tetraamin-Pro (Tetra), fed three times per day. Twenty-three dpf; the larvae were transferred to 1-L tanks (with a 750 micron baby baffle) at a density of 30 larvae per tank and fed the same diet. All procedures performed with animals were approved by the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) of the United States National Institutes of Health (NIH), approval #A5281-01.

Larval fish measurements

Zebrafish larvae were collected each day from 24 to 28 dpf, euthanized in ice-cold 0.025% tricaine (3-aminobenzoic acid methyl ester from Sigma) and fixed in 4%

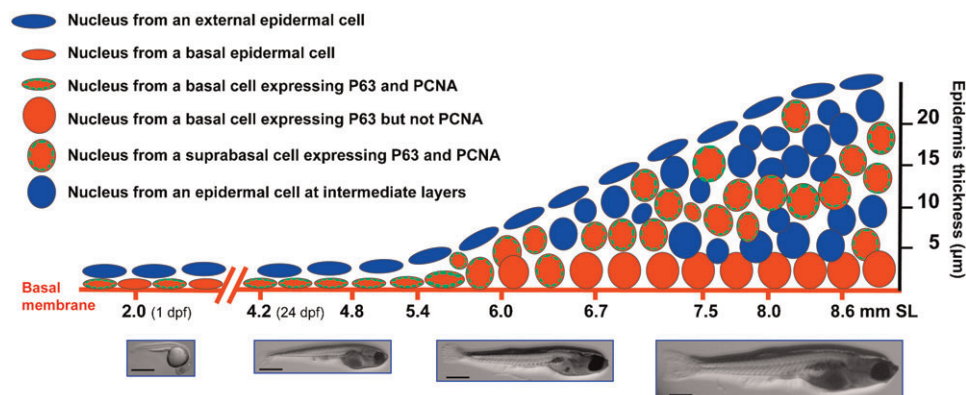


Fig. 7. Model for epidermal stratification during postembryonic development in zebrafish. This diagram shows the labeling in the nuclei from epidermal cells, through different postembryonic developmental stages, as was observed in this work. By 1 dpf the embryo has an approximate size of 2 mm in length, the epidermis is formed by two cell layers, the external layer and the basal layer. The basal layer is known to express the P63 transcription factor (a known marker for epidermal stem cells). Just before epidermal stratification initiates (SL 4.2–4.8 mm) there are high levels of proliferation in the basal layer. When the fish reach a size of SL 5.4–6 mm, epidermal stratifications begins. At this point the nuclei of basal cells became rounded and these cells reduce proliferation. A new layer of suprabasal cells appears which also express P63 and shows an active cell proliferation. At stages of SL 8.0–8.6 the epidermis is 5–8 layers thick (depending of the body region) and suprabasal cells are still proliferative while basal cells have completely stop proliferation. It is possible that suprabasal cells are “transient-amplifying cells”. Bars are 1 mm in length.

paraformaldehyde at pH 7.4 for 12 h. After fixation, the medium was replaced with PBS (pH 7.4), and measurements were performed in a Stemi-SV11 stereomicroscope (Zeiss) equipped with a 10× eyepiece reticle and previously calibrated using a stage micrometer. Standard Length (SL) measurements were made from the snout (most anterior point of the head excluding the lower jaw) to the caudal peduncle (most posterior region of the body where caudal fins rays insert), as described by Parichy et al. (Parichy et al., 2009). To group the fish according to their size, each larva was placed in one of eight tubes (labeled 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.5, 8.0 and 8.5 mm SL) reflecting the value closest to its measured size. Then, using the actual measurements for the larvae in each tube, we calculated the mean value and re-named each group according to the mean. Thus, eight size classes were created: 4.2, 4.8, 5.4, 6.0, 6.7, 7.5, 8.0 and 8.6 mm SL. We believe these classes better reflect the sizes of the zebrafish during growth. We examined each size class for reported traits and characteristics of each size or developmental stage and found a satisfactory correlation between our results and those reported elsewhere (Parichy et al., 2009). Measurements of the epidermal thickness were made with the AxioVision software (Zeiss) from histological preparations digitalized in a pre-calibrated AxioImager microscope. All images were taken with the same exposure time for all larvae. Some images were enhanced using Adobe Photoshop, but all images in the same figure were placed side by side in the same layer prior to any enhancements or modifications to avoid biased comparisons.

Histological sectioning and periodic acid-Schiff staining

After measurements were taken, the larvae were post-fixed in NaOAc-formaldehyde-glycerine (1.8% NaOAc, 3.6% formaldehyde and 10% glycerine) for 12 h, washed with PBS (pH 7.4), gradually dehydrated with ethanol (60, 70, 80, 96 and 100%) for 20 min each and cleared with xylene (JT Baker) twice for 20 min each. At this point, samples were embedded in melted paraffin wax (Leica), and 5- μ m sections were prepared in a rotatory microtome (Leica RM2145). To label the basal membrane for our analysis of the epidermis, we used periodic acid-Schiff (PAS) staining, which is specific for glycoproteins. Briefly, sections were incubated in 0.5% periodic acid for 10 min, in Schiff solution (0.4% Basic Fuchsin, 0.09 N HCl and 0.9% K₂S₂O₈) for another 10 min, washed in water and post-stained with Gill no. 1 hematoxylin (Sigma).

Immunofluorescence and antibodies

Histological sections were deparaffinized, rehydrated and treated for antigen recovery. Blocking and permeabilization were performed simultaneously (0.1% Tween and 2% albumin) and the sections were incubated first with the indicated primary antibody at 4°C for 12 h then with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies for 2 h (Invitrogen). The anti- γ -catenin antibody (ab-49105) was obtained from Abcam, while the anti-PCNA (sc-7907) and anti-P63 (sc-8431 clone H-137) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Multiple isoforms of P63 exist in zebrafish (as in other organisms); the major isoforms are known as Δ NP63 and TAP63. According to the company that provides the antibody, this was prepared against the Human Δ NP63 isoform (residues 15–151), however it is not known if the same antibody also binds to the TAP63 or any other isoform. A similar antibody (clone 4A4, that is no longer produced) was used in one study (Lee and Kimelman, 2002), the authors observed that morpholino based inhibition of Δ NP63 eliminated the reactivity of the 4A4 antibody, therefore it is possible that the predominant isoform expressed in the zebrafish skin is Δ NP63. For that reason, along the text, we used the term P63 when referring to the binding of the sc-8431 antibody in epidermal cells. Fluorescence images were obtained with an AxioImager microscope using an MRc AxioCam camera and AxioVision 4.8 software (Zeiss).

Statistical analysis

All experiments were performed at least three times. Data are given as the mean \pm SD. $P > 0.05$ was considered significant.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Rebeca M. López-Rivas for assistance in zebrafish husbandry and breeding, Dr Fernando García-Hernández for the support provided by the Imaging facility from our Institute, and as well to Gerardo Coello-Coutiño, Ana María Escalante-Gonzalbo, Juan Manuel Barbosa-Castillo, Ivette Rosas-Arciniega and Francisco Pérez-Eugenio from the Informatics and Computing facility from our research institute.

Funding

Funding for this work was provided by Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica UNAM [IN208512] and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [166046], which also provided a fellowship [210995] to A.G. This

article is part of the requirements for A.G. to obtain her PhD degree from the “Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM”.

Author Contributions

A.G. and E.M. conceived and designed the experiments. A.G. and J.L.R.-B. performed the experiments. A.G., S.C.-R. and E.M. analyzed the data, prepared the figures and wrote the paper.

Competing Interests

The authors have no competing interests to declare.

References

- Bakkars, J., Hild, M., Kramer, C., Furutani-Seiki, M. and Hammerschmidt, M. (2002). Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev. Cell* **2**, 617-627.
- Beis, D. and Stainier, D. Y. (2006). *In vivo* cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol.* **16**, 105-112.
- Carney, T. J., von der Hardt, S., Sonntag, C., Amsterdam, A., Topczewski, J., Hopkins, N. and Hammerschmidt, M. (2007). Inactivation of serine protease Matrilysin 1 by its inhibitor Hail 1 is required for epithelial integrity of the zebrafish epidermis. *Development* **134**, 3461-3471.
- Carney, T. J., Feitosa, N. M., Sonntag, C., Slanchev, K., Kluger, J., Kiyozumi, D., Gebauer, J. M., Coffin Talbot, J., Kimmel, C. B., Sekiguchi, K. et al. (2010). Genetic analysis of fin development in zebrafish identifies furin and hemicentin1 as potential novel fraser syndrome disease genes. *PLoS Genet.* **6**, e1000907.
- Chang, W. J. and Hwang, P. P. (2011). Development of zebrafish epidermis. *Birth Defects Res. C Embryo Today* **93**, 205-214.
- Chen, C. F., Chu, C. Y., Chen, T. H., Lee, S. J., Shen, C. N. and Hsiao, C. D. (2011). Establishment of a transgenic zebrafish line for superficial skin ablation and functional validation of apoptosis modulators *in vivo*. *PLoS ONE* **6**, e20654.
- Feitosa, N. M., Zhang, J., Carney, T. J., Metzger, M., Korzh, V., Bloch, W. and Hammerschmidt, M. (2012). Hemicentin 2 and Fibulin 1 are required for epidermal-dermal junction formation and fin mesenchymal cell migration during zebrafish development. *Dev. Biol.* **369**, 235-248.
- Fuchs, E. (2009). The tortoise and the hair: slow-cycling cells in the stem cell race. *Cell* **137**, 811-819.
- Hernández, P. P., Olivari, F. A., Sarrazin, A. F., Sandoval, P. C. and Allende, M. L. (2007). Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker *sox2* and proliferation-dependent and-independent mechanisms of hair cell renewal. *Dev. Neurobiol.* **67**, 637-654.
- Horng, J. L., Lin, L. Y. and Hwang, P. P. (2009). Functional regulation of H⁺-ATPase-rich cells in zebrafish embryos acclimated to an acidic environment. *Am. J. Physiol.* **296**, C682-C692.
- Hsu, Y. C. and Fuchs, E. (2012). A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 103-114.
- King, K. E., Ponnampuram, R. M., Gerdes, M. J., Tokino, T., Yamashita, T., Baker, C. C. and Weinberg, W. C. (2006). Unique domain functions of p63 isoforms that differentially regulate distinct aspects of epidermal homeostasis. *Carcinogenesis* **27**, 53-63.
- Koster, M. I. and Roop, D. R. (2007). Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 93-113.
- Koster, M. I., Kim, S., Mills, A. A., DeMayo, F. J. and Roop, D. R. (2004). p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.* **18**, 126-131.
- Koster, M. I., Dai, D. and Roop, D. R. (2007). Conflicting roles for p63 in skin development and carcinogenesis. *Cell Cycle* **6**, 269-273.
- Kriegstein, A. and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **32**, 149-184.
- Lander, A. D., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham, M., Calof, A. L., Trumpp, A. and Oskarsson, T. (2012). What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biol.* **10**, 19.
- Le Guellec, D., Morvan-Dubois, G. and Sire, J. Y. (2004). Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 217-231.
- Lechler, T. and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* **437**, 275-280.
- Lee, H. and Kimelman, D. (2002). A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish. *Dev. Cell* **2**, 607-616.
- Muroyama, A. and Lechler, T. (2012). Polarity and stratification of the epidermis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 890-896.
- O'Brien, G. S., Rieger, S., Wang, F., Smolen, G. A., Gonzalez, R. E., Buchanan, J. and Sagasti, A. (2012). Coordinate development of skin cells and cutaneous sensory axons in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* **520**, 816-831.
- Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N. and Engeszer, R. E. (2009). Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev. Dyn.* **238**, 2975-3015.
- Rakers, S., Gebert, M., Uppalapati, S., Meyer, W., Maderson, P., Sell, A. F., Kruse, C. and Paus, R. (2010). ‘Fish matters’: the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Exp. Dermatol.* **19**, 313-324.

- Reischauer, S., Levesque, M. P., Nüsslein-Volhard, C. and Sonawane, M.** (2009). Lgl2 executes its function as a tumor suppressor by regulating ErbB signaling in the zebrafish epidermis. *PLoS Genet.* **5**, e1000720.
- Sire, J. Y. and Akimenko, M. A.** (2004). Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 233-247.
- Sire, J. Y., Allizard, F., Babiar, O., Bourguignon, J. and Quilhac, A.** (1997). Scale development in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Anat.* **190**, 545-561.
- Slanchev, K., Carney, T. J., Stemmler, M. P., Koschorz, B., Amsterdam, A., Schwarz, H. and Hammerschmidt, M.** (2009). The epithelial cell adhesion molecule EpCAM is required for epithelial morphogenesis and integrity during zebrafish epiboly and skin development. *PLoS Genet.* **5**, e1000563.
- Sonawane, M., Martin-Maischein, H., Schwarz, H. and Nüsslein-Volhard, C.** (2009). Lgl2 and E-cadherin act antagonistically to regulate hemidesmosome formation during epidermal development in zebrafish. *Development* **136**, 1231-1240.
- Suzuki, D. and Senoo, M.** (2012). Increased p63 phosphorylation marks early transition of epidermal stem cells to progenitors. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2461-2464.
- Trevarrow, B.** (2004). Zebrafish facilities for small and large laboratories. *Methods Cell Biol.* **77**, 565-591.
- Viktorin, G., Riebli, N. and Reichert, H.** (2013). A multipotent transit-amplifying neuroblast lineage in the central brain gives rise to optic lobe glial cells in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **379**, 182-194.
- Wang, Y. H., Chen, Y. H., Lu, J. H., Lin, Y. J., Chang, M. Y. and Tsai, H. J.** (2006). Epidermis-restricted expression of zebrafish cytokeratin II is controlled by a -141/+85 minimal promoter, and cassette -141/-111 is essential for driving the tissue specificity. *Differentiation* **74**, 186-194.
- Webb, A. E., Driever, W. and Kimelman, D.** (2008). Psoriasis regulates epidermal development in zebrafish. *Dev. Dyn.* **237**, 1153-1164.
- Yang, A. and McKeon, F.** (2000). P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 199-207.

Supplementary Material

Aida Guzman et al. doi: 10.1242/bio.20136023

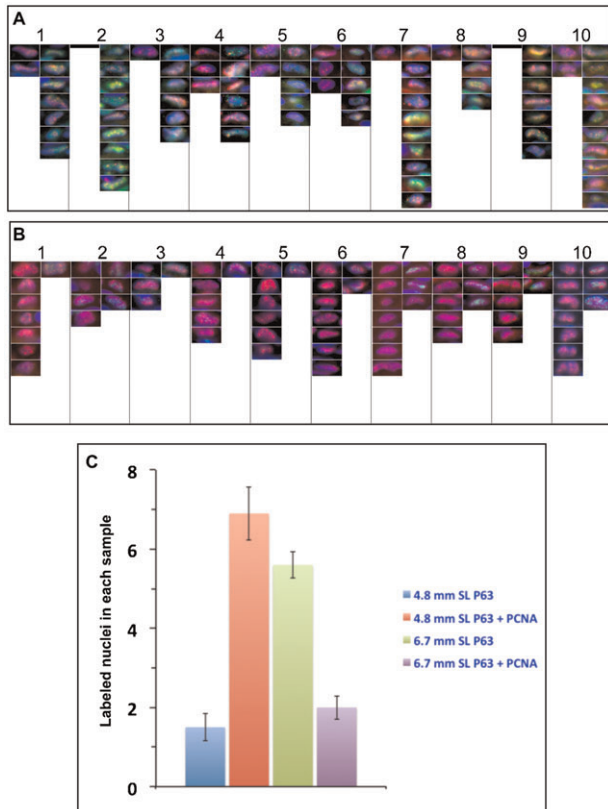


Fig. S1. Quantification of the PCNA changes in expression from basal cells during epidermis stratification. (A) For ten samples of the 4.2 mm SL epidermis co-immunostained for P63 and for PCNA, nuclei that only express P63 are shown in the columns to the left and the ones with both P63 and PCNA expression, in the columns to the right. (B) Also, in ten samples of 6.7 mm SL epidermis co-immunostained for P63 and for PCNA, the nuclei that are only positive for P63 are shown in the left columns, while those positive for both P63 and PCNA in the right columns. The 4.2 mm SL basal cells nuclei are more flat in shape than those from the 6.7 mm SL. PCNA expression in 6.7 mm SL epidermal basal cells was not only less frequent but also less intense. (C) Histogram showing that PCNA labeling in the nuclei from epidermal basal cells decrease from larvae fish 4.2 mm SL to 6.7 mm SL larvae. Error bars represent the standard error of the mean.

Resumen artículo

Durante el desarrollo, el crecimiento de los órganos del cuerpo está altamente regulado por procesos inicialmente sujetos a restricciones espaciales y temporales. La estratificación de la epidermis es un proceso esencial para el crecimiento y desarrollo de la piel. Aunque el pez cebra es un modelo animal ampliamente conocido, no se sabe cuándo y cómo se lleva a cabo la estratificación de la epidermis, pues sólo hay descripciones limitadas de los eventos de desarrollo que, hasta el momento, no van más allá de los 5 días post-fecundación, lo cual es importante porque ayudaría a esclarecer la biología de la epidermis. A partir de observaciones de cortes histológicos encontramos que la estratificación de la epidermis en el pez cebra inicia aproximadamente a los 25 días de edad, cuando la larva tiene 6mm-SL (longitud estándar) de tamaño. Durante los siguientes 4 días (de 6 a 8 mm SL), el grosor de la epidermis casi se cuadruplica, lo que representa un rápido incremento en el tamaño del órgano, sobre todo porque antes del día 20, sólo dos capas de células cubrían el cuerpo de la larva del pez en crecimiento. Este patrón es diferente del observado en los mamíferos, en los que se aprecia una continua estratificación (de E.14.5-E18.5), inmediatamente después de la especificación del ectodermo a epidermis. Para estudiar cómo la estratificación de la epidermis y su crecimiento se lleva a cabo como un proceso coordinado a través del ciclo celular en el pez cebra, marcamos a las células en proliferación (PCNA marcaje) a lo largo del proceso de estratificación y encontramos dos diferentes olas de división celular. Inicialmente, las células basales se dividen y generan un subconjunto de células parabasales (posiblemente células de transición-proliferación), las cuales continúan proliferando para dar lugar, en los siguientes días, a varios tipos celulares en las nuevas capas celulares, momento en que las células basales dejan de dividirse. Esta parte del proceso es similar al que se ha descrito durante la estratificación de la epidermis en mamíferos, contestar preguntas básicas sobre su biología y son procesos que se han conservado desde los inicios hasta la cúspide de la evolución de los vertebrados.

Discusión

La epidermis del pez cebra adulto se caracteriza por ser un epitelio estratificado con alrededor de 10 capas celulares, que se subdividen en tres capas generales: basal, media y superficial (Bonilla y cols., 2008). En embriones de pez cebra, la epidermis comienza a diferenciarse a las 24hpf (Le Guellec y cols., 2004), está formada por dos capas celulares: la capa la capa basal de la epidermis y la capa externa de la epidermis (Villava y cols., 2007), y tiene alrededor e 4 μ m de grosor. En larvas de 15dpf, la epidermis se engruesa, esta formada por tres capas celulares y se pueden evidenciar células mucosas entre las células epiteliales (Le Guellec y cols., 2004).

Nosotros realizamos un estudio histológico en embriones y larvas de pez cebra en diferentes estadios de desarrollo para esclarecer cuando ocurre en le proceso de estatificación de la epidermis y que moléculas se encuentran relacionadas con este proceso. Para establecer las características morfológicas de la epidermis en los diferentes estadios de desarrollo se tomaron cortes histológicos, a los cuales se les aplicaron la técnicas de hematoxilina y eosina, y de Pas-schiff, esta última es una herramienta para evidenciar la membrana basal, estás técnicas nos permitieron observar las capas celulares que formaban a la epidermis en los diferentes estadios. Se observó que antes de que comience la estratificación, la epidermis en larvas está formada por dos capas celulares de alrededor de 4 μ m de grosor (Le Gullec y cols., 2004; Hong y cols., 2011), y este arreglo de la epidermis está presente por alrededor de 25 días aproximadamente. Después se determino que la estratificación de la epidermis ocurre durante el desarrollo larval, entre los 24 a 28 dpf, durante este periodo de tiempo la epidermis cuadruplica su grosor, lo que indica que la epidermis crece súbita y rápidamente. Además, se observo que la población de larvas analizada por estadio de desarrollo presentaba variabilidad en tamaño y no coincidía con el proceso de estratificación.

Las larvas del pez cebra presentan una gran variabilidad en su desarrollo, esto se debe a que crecen como individuos libres y los factores ambientales, genéticos y las interacciones entre individuos ayudan a

incrementar la variabilidad durante el desarrollo, por lo que se sugiere que el parámetro de días post fertilización no es un criterio adecuado para describir el desarrollo larval, para esto se propone que se utilice el parámetro denominado longitud estándar (SL), que se define como la longitud del pez que va de la nariz al pedúnculo caudal (Sire y cols., 1997; Parichy y cols., 2009). Con base en lo anterior, nosotros observamos que la estratificación de la epidermis inicia cuando las larvas presentan una SL entre 5.4 y 6 mm. Además, cuando la SL de las larvas aumenta 1 mm, el grosor de la epidermis aumenta en promedio 4.7 μm , lo que explica el crecimiento súbito de la epidermis. Es importante mencionar que la epidermis debe estratificarse antes de la formación de las escamas, lo cual debe ocurrir cuando las larvas tienen una SL de 8 mm (Sire y cols., 1997).

La epidermis del pez cebra desde su especificación y por un periodo de alrededor de 25 días esta formada por solo dos capas de células, nosotros estamos reportamos que cuando el pez alcanza una longitud de alrededor de 6 mm, ocurre la estratificación de la epidermis. Esto no ocurre en el ratón, ya que, la especificación de la epidermis en ratón comienza en E 8.5 y la estratificación ocurre inmediatamente después, culminando con una epidermis que posee diversas capas de células diferenciadas en E 18.5 (Koster y Roop, 2007). Esta diferencia pudiera estar relacionada la adaptación al medio que presentan los vertebrados terrestres en comparación con los peces (Henrikson y Matoltsy, 1968).

Se debe recordar que, durante el periodo de diferenciación y estratificación de la epidermis en el ratón se llevan a cabo divisiones simétricas que ayudan a que la epidermis cubra al embrión en crecimiento e inmediatamente después se llevan a cabo divisiones asimétricas, que son las responsables de la estratificación de la epidermis (Lechler y Fuchs, 2005), este tipo de divisiones no se pudieron observar en el momento que detectamos que la epidermis del pez cebra comenzaba a estratificarse, esto se pudo deber a que no contamos con los marcadores específicos para detectar a alguno de los elementos involucrados en el proceso de división asimétrica o la metodología empleada no era la adecuada para este fin.

El conocimiento acerca la estratificación de la epidermis se ha obtenido a partir de estudios de la piel madura, donde la epidermis continuamente se está renovando a partir de la capa basal. Las células basales se dividen y se diferencian cuando migran hacia las capas superiores y su progenie se localiza en la superficie de la epidermis. La epidermis embrionaria se establece por la formación de la capa basal embrionaria y de la membrana basal, esta última provee a la capa basal de la epidermis con proteínas de matriz extracelular y factores de crecimiento (Zang y Duan, 2013).

El factor de transcripción p63 se considera el regulador maestro en el proceso de estratificación y mantiene el potencial proliferativo de las células progenitoras de la epidermis (Ray y Lechler, 2011). p63 esta presente en una gran gama de organismos. La expresión de p63 en ratón puede ser detectada en estadios tempranos de desarrollo. Es posible que ciertas señales mesenquimales ayuden a promover la expresión de p63 en el ectodermo. De las dos isoformas de p63, TAp63 es la isoforma que se expresa muy tempranamente en la morfogénesis de la epidermis, pero también se ha reportado que $\Delta Np63$ se expresa mas que TAp63 (Liu y cols., 2013). En el genoma del pez cebra, la isoforma TA no se ha localizado, mientras que la isoforma $\Delta Np63$ si esta presente. Estudios sobre la carencia de la expresión de p63 pez cebra mostraron la presencia de fallas en el desarrollo normal de la epidermis y los organismo presentan malformaciones de los apéndices y otras estructuras que requieren de las interacciones epitelio mesenquima durante el desarrollo (Guerrini y cols., 2011). La falta de desarrollo de la epidermis puede ser debido a la incapacidad de las células de la epidermis para mantener el potencial proliferativo de las célula basales. (Lee y Kimelman, 2002).

Nosotros cuando observamos la epidermis de larvas de pez cebra utilizando inmunofluorescencia para detectar el marcador de proliferación celular PCNA, detectamos un patrón de marcaje de PCNA durante la estratificación de la epidermis. Cuando las larvas alcanzaron una SL de 4.8-5.4 mm, las células marcadas con PCNA solo estaban presentes en contacto con la membrana basal, sin embargo las larvas que tienen una SL de 6-8.6 mm, las células marcadas con PCNA se encontraban distribuidas en las nuevas capas de la epidermis. Para identificar qué células de la epidermis proliferan durante la estratificación, se marco específicamente la capa basal con un anticuerpo contra p63. p63 ha sido usado como un marcador de células troncales epidérmicas, en mamíferos, la estratificación de la epidermis esta

asociada con la proliferación de células troncales (Koster y cols., 2004; Koster y cols., 2007; Suzuki y Senoo, 2012.). Nuestras observaciones indican una dinámica interesante entre la expresión de p63 y la proliferación celular durante el proceso de estratificación en el pez cebra.

La dinámica detectada indica que en los primeros pasos de estratificación donde la larva tiene una SL de 5.4 a 6mm, sólo hay dos capas celulares (basal y externa), PCNA y p63 colocalizan en las células basales. Esto también se ha observado durante los primeros días de desarrollo, sin embargo la expresión de PCNA es menos abundante. En pez cebra, $\Delta Np63$ se expresa a inicios del 5dpf, es requerido para el establecimiento del patrón dorsoventral y la formación de la epidermis y apéndices. Estudios in vitro han demostrado que p63 induce proliferación celular y previene la diferenciación prematura de los queratinocitos basales en mamíferos. Dando lugar a un aumento en la estratificación (King y cols. 2006).

Cuando la larva posee una SL de 6mm, la células suprabasales expresan PCNA y p63, acompañada por una reducción en el número de células basales que muestran marcaje con PCNA. El mismo fenómeno ha sido observado en ratón entre los E13.5 y E14.5 (Koster y cols., 2007); en este caso, las células troncales coexisten dentro de la capa basal con un grupo de sus células hijas conocidas como células de amplificación transitoria, que después se mueven suprabasalmente al iniciarse su diferenciación terminal (Suzuki y Senoo, 2012; Koster y cols., 2007). Esto puede significar que no todas las células epidérmicas en el pez cebra son generadas por células madre basales pero que hay un relevo en que los progenitores suprabasales o células de amplificación transitoria participan. Un ejemplo de células de amplificación transitoria son las "progenitores neurales intermedios", que tiene un potencial proliferativo más restrictivo que las células troncales, pero puede aún producir una enorme cantidad y diversidad de células neurales durante el desarrollo (Kriegstein y Alvarez-Bulla, 2009). Se ha reportado recientemente que p63 es fosforilado en las células suprabasales pero no en las células basales (Suzuki y Senoo, 2012) sería interesante observar la dinámica epidérmica de la formación de las células de amplificación transitoria en la epidermis del pez cebra si se utilizara un anticuerpo para monitorearla.

Cuando las larvas tienen una SL de 7.5 mm posee varias capas de células, la capa suprabasal o de células de amplificación transitoria expresan p63 y son abundantes en este estadio, pero únicamente en algunos caso proliferan (PCNA positivas). En este punto, las células basales no expresan PCNA, y sus núcleos son ahora redondeados. Este patrón de expresión es similar a el patrón observado en la epidermis del pez adulto, aunque la expresión de PCNA es menos abundante en el adulto. La expresión de p63 en células en ambas capa basal y suprabasal han sido también recientemente encontrado en la epidermis de humanos adulto (Suzuki y Senoo, 2012).

Conclusiones

La epidermis del pez cebra comienza a estratificarse en el estadio larvario alrededor de los días 6 mm de SL.

El proceso de estratificación se realiza en dos momentos diferentes, en el estadio embrionario donde se forman dos capas de células y en estadio larval donde se forman más de dos capas celulares.

Los marcadores p63 y PCNA ayudan para detectar el momento en que se presenta la proliferación celular en el proceso de estratificación de la epidermis.

Perspectivas

Con este trabajo se evidencio cuando se estratifica la epidermis del pez cebra, lo que se requiere es ver si el proceso de estratificación se lleva a cabo por divisiones celulares del tipo asimétrico. Esto podría ser observado mediante la generación de peces transgénicos para algunos de los componentes del complejo proteicos que lleva a cabo las divisiones asimétricas.

Existen sustancias como nocodazole, taxol y colchicina que arrestan a las células en cultivo en la metafase de la división celular, por lo que se podría colocar a larvas de peces en estas sustancias y así poder arrestar a las células basales de la epidermis, para así poder observar si hay divisiones asimétricas.

Sería interesante la revisión de las diferentes isoformas de p63 que esta presente en el momento de la estratificación ya que se uso un anticuerpo para marcar el componente común entre las diferentes

isoformas de p63, por lo que sería interesante buscar de manera más específica que isoformas de p63 se están expresando en el proceso de estratificación de la epidermis del pez cebra.

Sería interesante hacer transplantes de células de la capa profunda de embriones que expresen la proteína verde fluorescente a embriones que no la tiene y observar el desarrollo de estas células en larvas en vivo en los días que se lleva a cabo la estratificación de la epidermis.

Literatura citada

1. Bakkers J., Hild M., Kramer C., Furutani-Seiki M., Hammerschmidt M., Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm, *Dev Cell* 2 (2002) 617-627.
2. Baroni A., E. Buommino, V. De Gregorio, E. Rucco, V. Rucco, R. Wolf. Structure and function of the epidermis related to barrier properties, *Clinics in Derm.* (2012) 30, 257-262.
3. Blanpain C., Fuchs E. Epidermal Stem Cells of the Skin. (2006). *Annu Rev. Cell Biol.* Vol. 22: 339-373
4. Blanpain C., Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. (2009) *Mol. Cell Biol.* Vol. 10.
5. Braun K. M., Powse D.M. Distinct Epidermal Stem Cell Compartments are Maintained by Independent Niche Microenvironments. (2006). *Stem Cell Rev.* Vol. 2 221-232.
6. Breitzkreutz D., Mirancea N., Nischt R. 2009. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem Cell Biol* 132:1–10.
7. Candi E., Cipollone R., Di Val Cervo R., Gonfloni S., Melino G., Knight R. 2008. p63 in epithelial development. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 3126 – 3133
8. Chang W.J., Hwang P.P, Development of zebrafish epidermis, *Birth Defects Res C Embryo Today* 93 (2011) 205-214.
9. Dodd M. E., Hatzold J., Mathias J. R., Walters K. B., Bennin D. A. Rhodes J., Kanki J. O., Look A. T., Hammerschmidt M., Huttenlocher A. 2009. The ENTH domain protein Clint1 is required for epidermal homeostasis in zebrafish. *Development* 136, 2591-2600
10. Guerrini L., Costanzo A., Merlo G. R. A. 2011. Symphony of Regulations Centered on p63 to Control Development of Ectoderm-Derived Structures.. *J Biom. Biot.*
11. Henrikson R. C., Matoltsy G., The Fine Structure of Teleost Epidermis 1 I. Introduction and Filament-Containing Cells, *J. ULTRASTRUCTURE RESEARCH* 21, 194--212 (1968).
12. Hong Y. J., Choi Y. W., Myung K. B., Choi H Y. 2011. The Immunohistochemical Patterns of Calcification-related Molecules in the Epidermis and Dermis of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Ann Dermatol* Vol. 23, No. 3.

13. Horng J.L., Lin L.Y., Hwang P.P, Functional regulation of H⁺-ATPase-rich cells in zebrafish embryos acclimated to an acidic environment, *Am J Physiol Cell Physiol* 296 (2009) C682-692.
14. Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullman B., Schilling T. F. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev. Dyn* 203:2553-10
15. King K.E., Ponnampertuma R.M., Gerdes M.J., Tokino T., Yamashita T., Baker C.C., Weinberg W.C., Unique domain functions of p63 isotypes that differentially regulate distinct aspects of epidermal homeostasis, *Carcinogenesis* 27 (2006) 53-63.
16. Kisurina-Evgenieva O., Mack G., Du,Q., Macara I, Khodjakov A., Compton D. A, Multiple mechanisms regulate NuMA dynamics at spindle poles. *J Cell Sci.* (2004) 117:6391-400.
17. Koster M. I., Roop D. R., The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *J Derm Sci* (2004a) 34, 3—9
18. Koster M.I., Dai D., Roop D.R., Conflicting roles for p63 in skin development and carcinogenesis, *Cell Cycle* 6 (2007) 269-273.
19. Koster M.I., Kim S., Mills A.A., DeMayo F.J., Roop D.R., p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program, *Genes Dev* 18 (2004) 126-131.
20. Koster M.I., Roop D.R., Mechanisms regulating epithelial stratification, *Annu Rev Cell Dev Biol* 23 (2007) 93-113.
21. Koudijs M J, den Broeder M J, Groot E, van Eeden F J. Genetic analysis of the two zebrafish patched identifies novel roles for the hedgehog signaling pathway. *BMC Dev Biol* 2008; 8: 15
22. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A., The glial nature of embryonic and adult neural stem cells, *Annu Rev Neurosci* 32 (2009) 149-184.
23. Kulukian A, Fuchs E. 2013. Spindle orientation and epidermal morphogenesis. *Phil Trans R Soc B* 368: 20130016.
24. Le Guellec D., Morvan-Dubois G., Sire, J.Y. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*), *Int J Dev Biol* 48 (2004) 217-231.
25. Lechler T., Fuchs A. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* (2005). 437: 275-280
26. Lee H, Kimelman D., A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish, *Dev Cell* 2 (2002) 607-616.
27. Lee H., Kimelman D., A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish. *Dev Cell.* (2002)2:607-616.
28. Lieschke G J, Currie P D. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*: 8: 353–367.
29. Liu S., Zhang H., Duan E. 2013. Epidermal Development in Mammals: Key Regulators, Signals from Beneath, and Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 10869-10895

30. Maldonado E., Hernandez F., Lozano C., Castro M.E., Navarro R.E, The zebrafish mutant vps18 as a model for vesicle-traffic related hypopigmentation diseases, *Pigment Cell Res* 19 (2006) 315-326.
31. McDade S. S., MacCAnce1 D. J. The role of p63 in epidermal morphogenesis and neoplasia. (2010). *Gene Expression in Development and Disease*Biochem. Soc. Trans. 38, 223–228.
32. Medawar A., Virolle T., Rostagno P., Forest-Divonne S., Gambaro K., Rouleau M., Aberdam D. Δ Np63 Is Essential for Epidermal Commitment of Embryonic Stem Cells. (2008). *Plos ONE* vol. 3
33. Parichy D.M., Elizondo M.R, MMills.G., Gordon T.N., Engeszer R.E., Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish, *Dev Dyn* 238 (2009) 2975-3015.
34. Poulson N., Lechler T. 2010. Robust control of mitotic spindle orientation in the developing epidermis. *J. Cell Biol.* Vol. 191 No. 5 915–922
35. Raker S., Gebert M. , Uppalapati S, Meyer W, Maderson P, Sell A. F., Kruse C., Paus R.. ‘Fish matters’: the relevance of fish skin biology to investigative dermatology, *Exp Dermatol.* 2010 Apr;19(4):313-24.
36. Ray S., Lechler T. 2011. Regulation of asymmetric cell division in the epidermis. *Cell Div.* 6:12.
37. Schlicwa M.1975. Cytoarchitecture of Surface Layer Cells of the Teleost Epidermis. *JOURNAL OF ULTRASTRUCTURE RESEARCH* 52, 377-386.
38. Sire J.Y., Allizard F., Babiar O., Bourguignon J., Quilhac A., Scale development in zebrafish (*Danio rerio*), *J Anat* 190 (Pt 4) (1997) 545-561.
39. Slanchev K., Carney T.J., Stemmler M.P., Koschorz B., Amsterdam A., Schwarz H., Hammerschmidt M., The epithelial cell adhesion molecule EpCAM is required for epithelial morphogenesis and integrity during zebrafish epiboly and skin development, *PLoS Genet* 5 (2009) e1000563.
40. Suzuki D., Senoo M., Increased p63 phosphorylation marks early transition of epidermal stem cells to progenitors, *J Invest Dermatol* 132 (2012) 2461-2464.
41. Tribulo C., Barrionuevo M. G., Aüero T., Sánchez S. S., Calcaterra N. B. Aybar M. J. Δ Np63 Is Regulated by BMP4 Signaling and Is Required for Early Epidermal Development in *Xenopus*. *Developmental Dynamics* 241:257–269, 2012.
42. Truong A. B., Khavari P. A. Control of Keratinocyte Proliferation and Differentiation by p63. (2007). *Cell Cycle* 6:3, 295-299.
43. Vanbokhoven H., Melino G Candi E., Declereq. p63, a Story of Mice and Men. *J. Inv. Derm.* 2011. Vol. 131.
44. Villalva C E., Arellano-Torres A, Navarro R. E., Maldonado ., Freeze crack technique to study epidermal development in zebrafish using differential interference contrast microscopy and fluodescent markers. *BioTechniques*, (2007) 43: 313-319.
45. Webb A. E, Driver W, Kimelman D., *psoriasis* Regulates epidermal development in zebrafish. *Dev. Dyn.* (2008) 237: 1153-1164.

46. Yurchenco P. 2011. Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*;3:a004911.
47. Whitehead G G, Makino S, Lien C L, Keating M T. fgf20 is essential for initiating Zebrafish fin regeneration. *Science* 2005; 310: 1957–1960.