

TIME-LAPSE IMAGING OF NEURAL DEVELOPMENT: ZEBRAFISH LEAD THE WAY INTO THE FOURTH DIMENSION.

ABSTRACT:

El time-lapse es la mejor forma de observar movimientos celulares dinámicos para el desarrollo neuronal. El time-lapse es importante en este tipo de desarrollo en el que las células deben conectarse entre sí, nos da la opción de ordenar eventos en una secuencia completa y coherente.

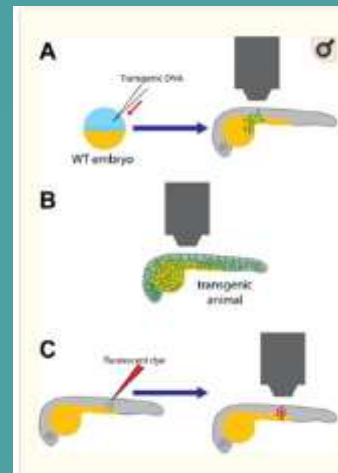
El pez cebra posee muchas ventajas para ser organismo modelo, como son que sus embriones son ópticamente claros y fertilizados, o que al desarrollarse en el agua se puede observar el proceso de desarrollo durante muchas horas sin molestar al embrión.

Tools and methods for time-lapse imaging in zebrafish.

Los embriones de pez cebra en el estudio se anestesian o se paralizan, y por lo general se incluyen en agarosa, estos embriones de pez cebra son tan resistentes que pueden desarrollarse en agarosa durante horas. La microscopía confocal de barrido láser es el método más común para obtener imágenes, el microscopio multifotón es mejor para tejidos más profundos y la microscopía confocal de disco giratorio cuando la velocidad es importante, ya que esta captura eventos dinámicos de msg. Los parámetros que deben considerarse para el experimento son el tiempo que debe durar cada sesión de imágenes, la ampliación utilizada, el método de montaje y la velocidad de la imagen, es importante adecuar estos parámetros a cada población neuronal de estudio.

Labeling specific cells.

- Expresar genes transgénicos somáticos (de forma transitoria). Se usa para etiquetar una sola célula.
- Expresar genes transgénicos germinales (de línea germinal). Utilizado para etiquetar un grupo de células.
- Como alternativa al etiquetado también puede utilizarse un colorante fluorescente por inyección o electroporación, y así obtener imágenes de una célula seleccionada.



Reporters and effectors

A parte de GFP y RFP, que han demostrado ser valiosos para rastrear el destino celular y analizar su morfología, existen más proteínas que pueden utilizarse.

Algunas como Kaede y KikGR son fotoconvertibles con espectros de emisión que pueden cambiar de verde a rojo al exponerse a la luz UV.

Otra como Dronpa es similar a GFP, pero puede cambiar de estado encendido a apagado esto hace posible monitorear los eventos subcelulares dinámicos.

En muchos de los casos el objetivo no es solo visualizar la célula, si no también expresar simultáneamente un gen efector que altera su función.

Gal4/UAS transgenes

El sistema de activación transcripcional de levadura Gal4/UAS ha sido una herramienta muy exitosa para manipular la expresión génica en Drosophila. Con modificaciones, este sistema se ha incorporado en los transgenes del pez cebra. Lo especial de este enfoque binario es que los controladores Gal4 y los reporteros UAS se pueden producir por separado y combinarse en distintas combinaciones, lo que proporciona una gran versatilidad. La fusión de Gal4 con VP16 permite una expresión abundante incluso de potenciadores/promotores débiles. Una fusión de Gal4 con el dominio de unión de ligandos del receptor de ecdysone permite el control temporal mediado por hormonas de la expresión génica. El silenciamiento y la variegación han sido un problema con el sistema Gal4/UAS en el pez cebra, pero la creación de elementos UAS no repetitivos alivia este problema. Se ha utilizado elementos reguladores específicos de los tejidos conocidos para dirigir la expresión de Gal4 y para mejorar las pantallas trampa, creando un conjunto muy versátil de herramientas para obtener imágenes de las células y expresar mal los genes en los tejidos de todo el animal.

What have we learned from watching movies?

Las imágenes de lapso de tiempo proporcionan tres tipos de información sobre los mecanismos del desarrollo neural. Primero, puede revelar un vínculo entre el comportamiento de una célula en un momento y una experiencia previa, sugiriendo una conexión mecanicista entre dos eventos discretos. Por ejemplo, el destino final de las células recién nacidas a veces puede predecirse por la orientación de una división celular, una relación que sólo puede deducirse definitivamente observando la división y rastreando las células hijas a lo largo del tiempo. Segundo, la imagenología time-lapse es la manera más directa de identificar una vía migratoria, y puede ser la única manera de deducir estas rutas si las células migratorias se entremezclan con un grupo heterogéneo de células que exhiben diferentes comportamientos. Tercero, las imágenes de lapso de tiempo pueden revelar comportamientos celulares transitorios que son características de los procesos de desarrollo. Por ejemplo, los axones en desarrollo a menudo proyectan ramas que luego son podadas; si la degeneración es rápida o estocástica, puede ser imposible saber si la poda ocurrió sin imágenes de lapso de tiempo. Identificar secuencias vinculadas de eventos, rutas migratorias y fenómenos transitorios es fundamental para comprender cómo se construye el sistema nervioso.

Into the future

A parte de las contribuciones que ha hecho este experimento ya, hay todavía muchos aspectos del avance neuronal que acaba de empezar a investigarse ahora. Entre ellos están:

- Eventos subcelulares: Se van creando más proteínas con fluorescencia y con ello, la posibilidad de ver y/o seguir más la acción de orgánulos, compartimentos subcelulares y proteínas complejas.
- Avances en la psicología: Los sensores de calcio son un buen indicadores del paso del calcio e indirectamente de los potenciales de acción. Esto sirve para poder, mediante una imagen del circuito del calcio que se haría con GCaMP, descifrar la organización de circuitos neuronales.
- Plasticidad celular en animales maduros: Los comportamientos dinámicos de las células no cesan cuando llegan a la madurez. Las células crecen y cambian a la vez que el animal va cumpliendo años; estas experimentan respuestas reguladas a los daños que va sufriendo la célula a largo del tiempo y establecen nuevas conexiones neuronales a medida que el animal va aprendiendo distintas cosas.