



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**PROLIFERACIÓN CELULAR Y DESARROLLO DE  
ASIMETRÍAS CEREBRALES EN MEDAKA (*Oryzias latipes*)  
Y PEZ CEBRA (*Danio rerio*)**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO  
JUDITH ARANE TELLO VEGA**

**Profesor Patrocinante**

Dra. Daniela Seelenfreund H.  
Laboratorio de Bioquímica  
Departamento de Bioquímica  
y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas  
y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Director de Memoria**

Dr. Miguel Concha N.  
Grupo de Biología Comparada y  
del Desarrollo  
Programa de Anatomía y Biología  
del Desarrollo  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

**Santiago, Chile**

**2005**

## **FINANCIAMIENTO**

- FONDECYT, Proyecto Regular 1020902
- PCCI BMBF/CONICYT, Proyecto 2003-4-124
- Iniciativa Científica Milenio, Proyecto ICM P01-007-F
- Wellcome Trust International Research Development Award

Este trabajo está dedicado a mis padres,  
Por abrir puertas,  
A Marco por empujarme a través de ellas,  
Y a Luquitas y Martina por existir.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, hermanos y mami, primero que todo por su gran amor y luego por que desde siempre me han apoyado y creído en todas las ideas que se me han cruzado, incluso la idea de ser científica, gracias por entregarme valores y por presentarme a mi bien amado.

También quiero agradecer a Marco mi gran compañero, quien me acompañó durante 7 años, entregándome amor, paciencia y apoyo, él hizo que mi vida tomara un significado especial. Además gracias a su linda familia, quienes han estado a mi lado en todo momento entregándome un cariño infinito, quiero que siempre estén a mi lado.

Importante y esencial desde niña fue la incondicionalidad de la amistad que me han entregado mis grandes amigas de la vida, Mary Mellado y Loreto Marín, un simple gracias no alcanza para manifestarles la gratitud que siento hacia ustedes, las quiero de una forma que no dimensionan.

Quiero dar las gracias a todas las personas que forman parte del Grupo de Biología Comparada y del Desarrollo. Al Dr. Miguel Concha, “El bien querido jefe”, que por sobre todas las cosas siempre me ayudó y me tuvo una infinita paciencia. A mis compañeros de laboratorio: Aldo Villalón, Yoya Lemus, Jorge Fernández, Luisa Pereiro, Alicia Colombo, Ailen Signore, Gérman Reig y Alejandra Catenaccio, porque todos siempre me brindaron una ayuda sincera y desinteresada cuando lo necesite. En especial a Daniela Galleguillos y Néstor Guerrero, por su linda muestra de compañerismo y complicidad; a María Eugenia Cabrejo y Eugenia Díaz, dos grandes y sabias mujeres, que no solo me entregaron consejos y apoyo muy valioso para mi futuro como profesional, sino que además me brindaron su cariño y el privilegio de sentir las como amigas, a Dina Silva, por la amistad, preocupación y ánimo que me inyectó a diario y a Soledad de la Piedra, “la Sol”, mi amiguis, que día a día, a cualquier hora siempre tuvo espacio para mí y que junto con brindarme una gran dosis de optimismo me entrego una amistad verdadera, que espero perdure en el tiempo.

A mis grandes amigas y compañeras de carrera Romina Barría y Jocelyn Brito, por su incondicional amistad, por su comprensión, por su cariño y afecto, gracias a ustedes la vida fue más alegre y esperanzadora, nunca se separen de mí.

Por último, quiero agradecer a todo el grupo de amigos de carrera y de los “viernes felices” por su sincera amistad y compañía: Sabrita Chandía, Heidi Pérez, Anita Delpiano, Paula Rodas, Fernando Sepúlveda, Denisse Bravo, Anilei Hoare, Javier Carter, Carlos Cruz y en especial a mi querido amigo Andrés Silva por su desbordante alegría.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>DEDICATORIA.....</b>	iii
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	iv
<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....</b>	viii
<b>ABREVIATURAS.....</b>	x
<b>RESUMEN.....</b>	xi
<b>SUMMARY.....</b>	xiii
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	1
1.1 Asimetrías en el desarrollo.....	1
1.2 Asimetrías en el sistema nervioso.....	3
1.3 El modelo de pez cebra.....	5
1.4 El modelo de medaka.....	6
1.5 Genes que regulan asimetrías.....	9
1.6 Hipótesis.....	13
1.6.1 Objetivo General.....	13
1.6.1.1 Objetivos Específicos.....	13
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	14
2.1 MATERIALES.....	14
2.1.1 Material biológico.....	14
2.1.2 Genes.....	14
2.1.3 Reactivos para biología molecular.....	15
2.1.4 Reactivos para hibridación <i>in situ</i> .....	16
2.1.5 Reactivos para incorporación de BrdU.....	16
2.1.6 Reactivos para inmunocitoquímica e inmunofluorescencia indirecta.....	16

2.1.7	Soluciones.....	17
2.1.8	Otros.....	18
2.2	MÉTODOS.....	19
2.2.1	Preparación de sonda de RNA para hibridación <i>in situ</i> .....	19
2.2.2	Blanqueamiento de embriones de pez cebra.....	20
2.2.3	Hibridación <i>in situ</i> .....	20
2.2.4	Incorporación de BrdU en núcleos en fase-S.....	21
2.2.5	Preparación de la enzima de eclosión (“ <i>hatching</i> ”).....	22
2.2.6.	Remoción del corión y uso de la enzima de eclosión en medaka.....	23
2.2.7.	Doble inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra GFP y histona H3 fosforilada.....	23
2.2.8.	Análisis estadístico.....	24
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	25
3.1	Obtención y expresión de marcadores específicos de habénula izquierda y derecha en pez cebra.....	25
3.2	Expresión temporo- espacial del marcador <i>cxcr4b</i> en pez cebra y su relación con las asimetrías a nivel de diencéfalo.....	29
3.3	El factor de transcripción <i>pitx2c</i> es expresado en la habénula izquierda de pez cebra y medaka desde períodos tempranos en el que se establecen las asimetrías cerebrales hasta períodos más tardíos de la morfogénesis asimétrica.....	32
3.4	Incorporación de BrdU en pez cebra y medaka.....	37
3.5	Inmunofluorescencia indirecta doble contra GFP y PH3: las diferencias de actividad transcripcional entre habénula izquierda y derecha en medaka...	39
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	45
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	51
<b>6</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Epitálamo de vertebrados.....	4
Figura 2. Línea transgénica de medaka que expresa GFP específicamente en la región habenular.....	7
Figura 3. Vista dorsal del cerebro de pez cebra mostrando las asimetrías del epitálamo.....	8
Figura 4. Isoformas de <i>pitx2</i> son conservadas en la evolución de vertebrados.....	10
Figura 5. Modelo de la vía de regulación Wnt/Dvl/ $\beta$ -Catenina $\rightarrow$ Pitx2 que regula proliferación celular.....	12
Figura 6. Obtención de la ribosonda <i>slit3</i> .....	27
Figura 7. Hibridación <i>in situ</i> de <i>Lim Lh2B</i> en embrión de pez cebra de 24 horas post-fertilización.....	28
Figura 8. Hibridación <i>in situ</i> de <i>cxcr4b</i> en embriones de pez cebra a distintos estadios del desarrollo.....	31
Figura 9. Gráfico que representa el porcentaje de embriones con diferencias entre el tamaño de sus habénulas.....	32
Figura 10. Transcripción <i>in vitro</i> de <i>pitx2c</i> .....	33
Figura 11. Hibridación <i>in situ</i> de <i>pitx2c</i> en embriones de pez cebra a distintos estadios del desarrollo.....	34
Figura 12. Hibridación <i>in situ</i> de <i>pitx2c</i> en embriones de medaka a distintos estadios del desarrollo.....	36
Figura 13. Incorporación de BrdU.....	37



	Página
Figura 14. Embrión de medaka y su corión.....	38
Figura 15. Inmunofluorescencia indirecta doble en embrión de medaka.....	41
Figura 16. Gráficos que representan la distribución de los datos.....	42
Figura 17. Diferencia entre las medias del número de células de las habénulas izquierda y derecha.....	44
Tabla 1. Genes candidatos para marcadores de habénula y tipo de proteína que codifican.....	26
Tabla 2. Análisis estadísticos de los resultados.....	43

## ABREVIATURAS

<b>A/P</b>	: eje anterior-posterior
<b>BSA</b>	: Albúmina de Suero de Bovino
<b>BrdU</b>	: 5-Bromo-2'-Desoxiuridina
<b>DAB</b>	: Diamino Benzidina
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sulfóxido
<b>DNA</b>	: Ácido desoxiribonucleico
<b>dpf</b>	: días post-fertilización
<b>D/V</b>	: eje dorso-ventral
<b>EDTA</b>	: Ácido Etilendiamino Tetra Acético
<b>est</b>	: Estándar
<b>GFP</b>	: Proteína Fluorescente Verde
<b>HIS</b>	: Hibridación <i>in situ</i>
<b>hpf</b>	: horas post-fertilización
<b>HRP</b>	: Peroxidasa de rabano
<b>I/D</b>	: eje izquierdo-derecho
<b>mRNA</b>	: Ácido ribonucleico mensajero
<b>NTP-Mix</b>	: Mezcla de nucleótidos trifosfatados
<b>PBS</b>	: Tampón fosfato salino
<b>PH3</b>	: Histona H3 fosforilada
<b>PLM</b>	: Placa lateral mesodérmica
<b>PK</b>	: Proteinasa K
<b>rpm</b>	: Revoluciones por minuto
<b>SNC</b>	: Sistema nervioso central

## RESUMEN

La presencia de asimetrías neuroanatómicas y funcionales en el cerebro de vertebrados es un rasgo ampliamente conservado que juega un papel importante en el comportamiento animal. El desarrollo diferencial de las mitades izquierda y derecha del cerebro se observa desde estados tempranos de la embriogénesis, lo que sugiere una regulación genética. Se ha descrito que la vía de señalización comandada por el factor de crecimiento TGF $\beta$  Nodal está involucrada en el establecimiento de asimetría de órganos internos en vertebrados. En pez cebra y medaka, los genes efectores de la vía Nodal, como el factor de transcripción *pitx2c*, se expresan en forma asimétrica a la izquierda del cerebro, precediendo el desarrollo de asimetrías neuroanatómicas. En pez cebra estas asimetrías incluyen al núcleo habenular y al complejo pineal. Al respecto, se sabe que el núcleo habenular izquierdo es más grande que el núcleo habenular derecho y que el órgano parapineal se localiza en la izquierda del diencefalo. Estudios preliminares indican que el pez teleosteo medaka presenta un desarrollo de asimetrías neuroanatómicas similares a aquellas del pez cebra. De esta forma pez cebra y medaka son herramientas genéticas que nos permitirán comenzar a descifrar los mecanismos del desarrollo que participan en el establecimiento de las asimetrías neuroanatómicas en vertebrados.

El objetivo de esta tesis fue determinar si las asimetrías neuroanatómicas de pez cebra y medaka se correlacionan con diferencias en la tasa de proliferación celular entre las habénulas izquierda y derecha, y si estas diferencias podrían estar controladas por el factor de transcripción *pitx2c*. Para el primer objetivo se realizaron experimentos de inmunofluorescencia indirecta contra histona H3 fosforilada. Para el segundo objetivo, se midió la expresión de *pitx2c* mediante hibridaciones *in situ* sucesivas. Al respecto, en medaka, el ensayo contra histona H3 fosforilada muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa en el número de células en proliferación entre ambas habénulas, a modo que el núcleo izquierdo presenta mayor número de éstas. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de una asimetría izquierda/derecha en la tasa de proliferación celular, que es mayor para la mitad izquierda de la habénula.

En pez cebra no fue posible realizar este ensayo, debido a que no se logró encontrar un marcador habenular que delimitara esta región en el embrión completo. En esta

búsqueda se logró identificar un gen denominado *cxcr4b*, como un marcador de la zona más anterior de la habénula, donde su expresión muestra una clara tendencia a la asimetría.

Por otro lado, se observó que tanto en pez cebra y en medaka, *pitx2c* se expresa unilateralmente en el epítalamo, específicamente en el lado izquierdo, desde estadios muy tempranos del desarrollo hasta estadios tardíos. La expresión más tardía no había sido descrita y está a favor de un posible papel de *pitx2c* en la morfogénesis asimétrica cerebral.

Finalmente, se pudo establecer una correlación espacial y temporal entre la expresión de *pitx2c* y las asimetrías en la proliferación celular en la habénula de medaka, ya que los precursores habenulares izquierdos expresan *pitx2c* en el momento donde se observan las asimetrías en proliferación celular. Estos hallazgos deben ser en el futuro corroborados con experimentos de ganancia y pérdida de función de *pitx2c*.

## SUMMARY

### “CELL PROLIFERATION AND DEVELOPMENT OF BRAIN ASYMMETRY IN MEDAKA AND ZEBRAFISH”

Neuroanatomical and functional asymmetries of the brain are conserved among vertebrates and play important roles in animal behaviour. Differences between the right and left sides of the brain have been described at early developmental stages, suggesting a genetic regulation of asymmetry. The Nodal pathway is one of many signalling pathways involved in the establishment of organ asymmetry in vertebrates. In zebrafish and medaka, effectors of the Nodal signaling pathway, such as the transcription factor *pitx2c*, are asymmetrically expressed in the left side of the brain, preceding the development of neuroanatomical asymmetries. Genetic studies in zebrafish have reported asymmetries within the epitalamic habenular nuclei and pineal complex. It is known that the left habenular nucleus is larger than the right nucleus, and that the parapineal organ is located on the left side of the diencephalon. Preliminary data indicate that medaka, a teleost similar to zebrafish, shows a similar pattern of neuroanatomical asymmetries in the brain. Therefore, zebrafish and medaka have emerged as genetic tools that will facilitate our understanding of the developmental basis of brain asymmetry.

The aim of this thesis was to investigate whether the development of neuroanatomical asymmetries is associated with a differential rate of cell proliferation between the left and right habenular nuclei in zebrafish and medaka. In this thesis we also investigated whether differences in cell proliferation correlate with asymmetric expression of the transcription factor *pitx2c*.

The first aim was approached using indirect immunofluorescence against phosphorylated histone H3. For the second aim, the pattern of expression of *pitx2* was determined through *in situ* hybridization. The antibody assay against phosphorylated histone H3 in medaka revealed a difference in the number of proliferating cells within the habenulae, the left nucleus showing a larger amount of proliferating cells. These results suggest an asymmetric pattern of cell proliferation, in favor of the left habenular nucleus.

It was not possible to perform the same assay in zebrafish due to the lack of an habenular marker that would allow us to circumscribe this region in the whole embryo. In

this research, we were able to identify *cxcr4b* as a marker of the anterior habenular region, where its expression was clearly asymmetric.

*pitx2c* was expressed unilaterally in the left epitalamic region of zebrafish and medaka, from early to late developmental stages. The late expression of *pitx2c*, which was not described before, supports a possible role of *pitx2c* during asymmetric morphogenesis of the brain.

Finally, a spatial and temporal correlation was established between *pitx2c* expression and asymmetries in cellular proliferation in the habenulae of medaka. Precursors of the left habenular nucleus express *pitx2c* at the same time when asymmetries in cell proliferation are observed. These findings must be investigated further using *pitx2c* gain and loss of function experiments.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Asimetrías en el desarrollo

La organización corporal y disposición de órganos y vísceras en vertebrados se establece durante el desarrollo embrionario por mecanismos que operan a través de los tres ejes axiales: Antero-Posterior, Dorso-Ventral e Izquierda-Derecha (I/D). A lo largo de este último eje encontramos diferencias morfológicas en órganos como el corazón, los pulmones, el hígado, el bazo y el cerebro, las que se conocen como asimetrías I/D, y que ofrecerían un mejoramiento de la función del órgano en cuestión (Hamada y cols., 2002).

Las asimetrías I/D son clasificadas en tres diferentes tipos: el primer caso se presenta cuando existen diferencias morfológicas no heredables entre el lado izquierdo y derecho de un individuo y se conocen como asimetrías fluctuantes o aleatorias. Un ejemplo de éstas lo encontramos en las pinzas de algunos crustáceos, como es el caso del cangrejo, donde se observa que una de sus pinzas está mucho más desarrollada que la otra. En el segundo tipo, llamada antisimetría, se describen diferencias morfológicas heredables entre izquierda y derecha, en donde, la lateralidad (o direccionalidad) de las asimetrías es determinada al azar. Un ejemplo claro al respecto se observa en las neuronas odorantes en la lombriz *C. elegans*. Por último, la asimetría direccional se refiere a diferencias morfológicas heredables entre izquierda y derecha, en la cual, la lateralidad es fija para una población o especie (Boorman y Shimeld, 2002).

En vertebrados, tanto en humanos como en los modelos experimentales, se describen variaciones de origen genético respecto a la disposición normal de los órganos internos o *situs solitus*. Estas comprenden (i) la reversión completa de los órganos internos o *situs inversus*; (ii) la ubicación aleatoria de órganos únicos, conocido como heterotaxia o *situs ambiguos*; y (iii) la duplicación en forma de una imagen especular de los órganos pareados, denominada isomerismo (Ryan y cols., 1998). Las asimetrías I/D se extienden al sistema nervioso central (SNC) y juegan un rol importante en el comportamiento del individuo. El ejemplo más notable de asimetría del SNC correspondería a la especialización anatómica y funcional del hemisferio cerebral izquierdo de humanos en funciones relacionadas con el lenguaje (Shapleske y cols., 1999). Estos fenómenos de asimetría y

lateralización (disociación funcional entre las mitades derecha e izquierda del cerebro) están presentes en todas las especies vertebradas estudiadas. Luego, esta condición ofrecería una ventaja selectiva al permitir un procesamiento más veloz de la información, evitando además la aparición de conflictos entre las mitades izquierda y derecha del cerebro (Vallortigara y cols., 1999).

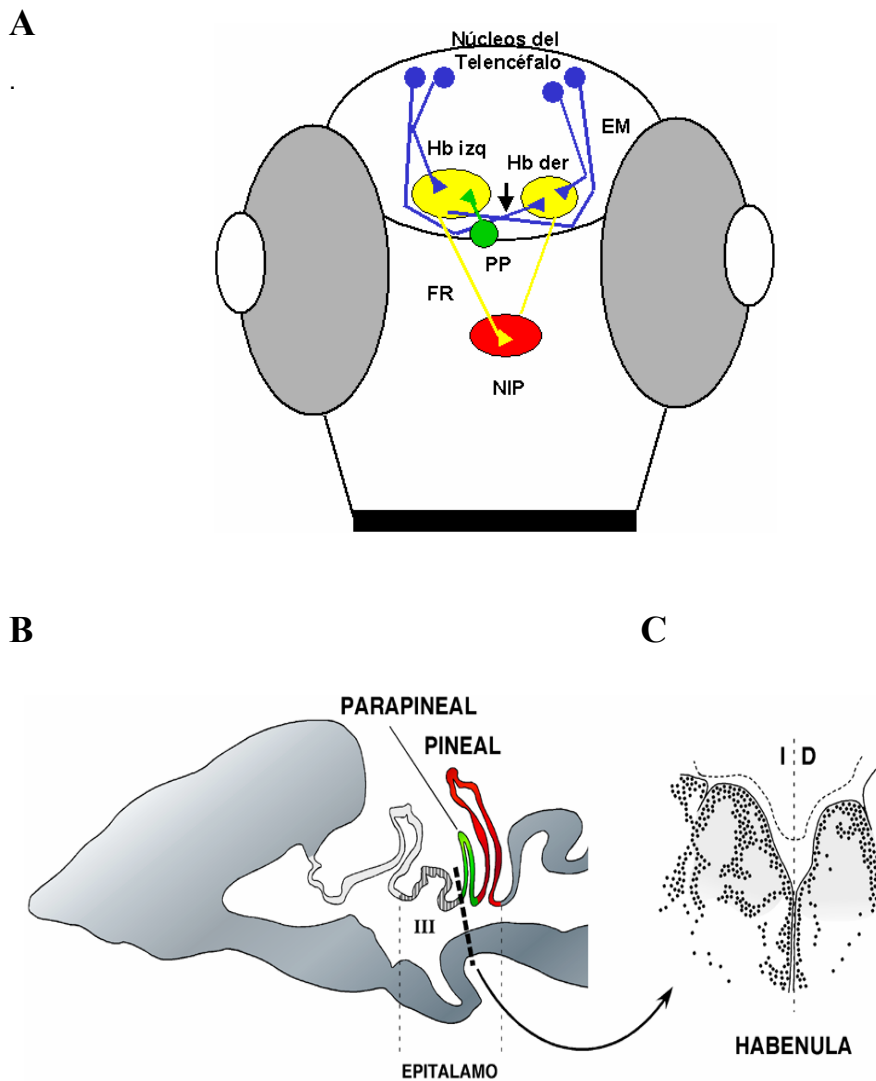
Conceptualmente, el desarrollo del eje I/D puede ser dividido en tres fases: (1) quiebre inicial de la simetría; (2) establecimiento de expresión génica asimétrica; y (3) transferencia de la información posicional I/D a los órganos en desarrollo. Los estudios sugieren que el quiebre inicial de la simetría ocurriría muy temprano en el desarrollo y que estaría comandada por mecanismos diferentes para cada especie de vertebrado. A modo de ejemplo, en rana y pollo se ha descrito la propagación asimétrica direccional de moléculas reguladoras a través de uniones comunicantes modulado por la actividad diferencial de bombas de protones (Levin y Mercola, 1998), mientras que en el ratón, el primer evento de rompimiento de la simetría ocurriría comparativamente más tarde en el desarrollo (estado temprano de placa neural) por la presencia de un flujo asimétrico de determinantes por medio de la actividad rotatoria de los monocilios del nodo (Nonaka y cols., 1998). Estos eventos iniciales, originados en la región organizadora o nodo (el equivalente en pez cebra de esta región corresponde a la vesícula de Kupffer) llevarían a la expresión asimétrica de genes a un lado de la línea media embrionaria, desde donde se propagaría hacia la placa del mesodermo lateral (PML), región donde yacen las células precursoras de los distintos órganos internos. El proceso por el cual se transfieren estos determinantes se ha relacionado con diversas vías genéticas (p.e. Fgf8, Shh, Bmp), las que convergen en un evento común que es la expresión asimétrica y transitoria de la vía de señal comandada por la proteína secretada TGF $\beta$  Nodal en el lado izquierdo de la PML, fenómeno descrito en distintas especies de vertebrados (Harvey, 1998; Capdevila y cols., 2000, Burdine y Shier, 2000; Mercola y Levin, 2001; Wright, 2001). Finalmente determinantes I/D inducidos por la activación asimétrica de la vía Nodal y sus efectores, son transferidos posteriormente desde la PML hacia los primordios de los órganos internos dando comienzo a la morfogénesis asimétrica.



## 1.2 Asimetrías en el sistema nervioso

Actualmente existe mucha información sobre el control genético de las asimetrías de los órganos internos, no obstante, poco es lo que se conoce acerca de cómo y cuando se inducen las asimetrías a nivel cerebral. Las bases genéticas del desarrollo funcional del cerebro en sus ejes A/P y D/V se establecen tempranamente durante la embriogénesis, y se realiza a través de la acción concertada de diversas señales moleculares que en forma gradual proporcionan un potencial diferencial a las células del tejido neural de acuerdo a su ubicación en el embrión (Gamse y Sive, 2000; Jessell y cols., 2000). Aunque se desconocen los mecanismos que establecen el eje I/D del cerebro, el hecho que las asimetrías cerebrales aparezcan tempranamente en el desarrollo embrionario sugiere la acción de factores genéticos. Una prueba de ello sería la inducción de los defectos en la asimetría cerebral al manipular funcionalmente genes que controlan el emplazamiento asimétrico del corazón y las vísceras, sin conocerse aún el detalle de los mecanismos implicados en este fenómeno (por ej. Concha y cols., 2000; Liang y cols., 2000; Long y cols., 2003).

En el SNC de vertebrados existen diversas regiones que presentan diferencias morfológicas entre sus mitades izquierda y derecha. Este fenómeno es particularmente notorio en el epitálamo (Figura 1), una subdivisión del cerebro anterior constituido por dos complejos neuronales: el núcleo habenular y el complejo pineal. La habénula forma parte de un sistema de conducción conservado evolutivamente que comunica a núcleos del telencéfalo basal (a través de la estría medular) con el núcleo interpeduncular del mesencéfalo ventral (por medio del fascículo retroflexo) (Sutherland y cols., 1982). Las asimetrías neuroanatómicas en esta región son ampliamente conservadas en la mayoría de las especies vertebradas y abarcan diferencias de tamaño, organización neuronal, conectividad y expresión de neurotransmisores (Concha y Wilson, 2001).



**Figura 1: Epitálamo de vertebrados.**

(A) Esquema del circuito de conexiones relacionadas a la habénula. Los núcleos habenulares derecho (Hb der) e izquierdo (Hb izq) reciben aferencias del telencéfalo tanto ipsi como contralaterales, lo último a través de la comisura habenular (flecha). La habénula izquierda además recibe aferencias del órgano parapineal (PP). La habénula proyecta a través del fascículo retroflexo (FR) al núcleo interpeduncular (NIP), donde las eferencias derechas e izquierda se segregan en regiones dorsal y ventral del NIP. (B) Esquema de un corte sagital del cerebro adulto de un pez basal, con dorsal hacia arriba y anterior a la izquierda. El complejo pineal está compuesto por los órganos pineal y parapineal. (C) Corte

frontal mostrando la habénula. Asimetrías de tamaño y arreglo neuronal se observan entre las regiones derecha e izquierda de este núcleo. III: tercer ventrículo (Concha y Wilson, 2001).

Estas diferencias estructurales entre las mitades izquierda y derecha del cerebro de vertebrados se han descrito en estados tempranos de desarrollo, sugiriendo esto, y como se dijo anteriormente, una precisa regulación a nivel genético. Como ya se ha demostrado, por lo menos una de las vías genéticas involucradas en el establecimiento de las asimetrías del corazón y las vísceras, la vía de señal comandada por la proteína Nodal, juega un rol central en el control de las asimetrías del SNC. Los genes Nodal son expresados asimétricamente en la PML y en el cerebro anterior, los que a su vez requieren la presencia de cofactores y factores de transcripción específicos para su activación y expresión (Concha y cols., 2000).

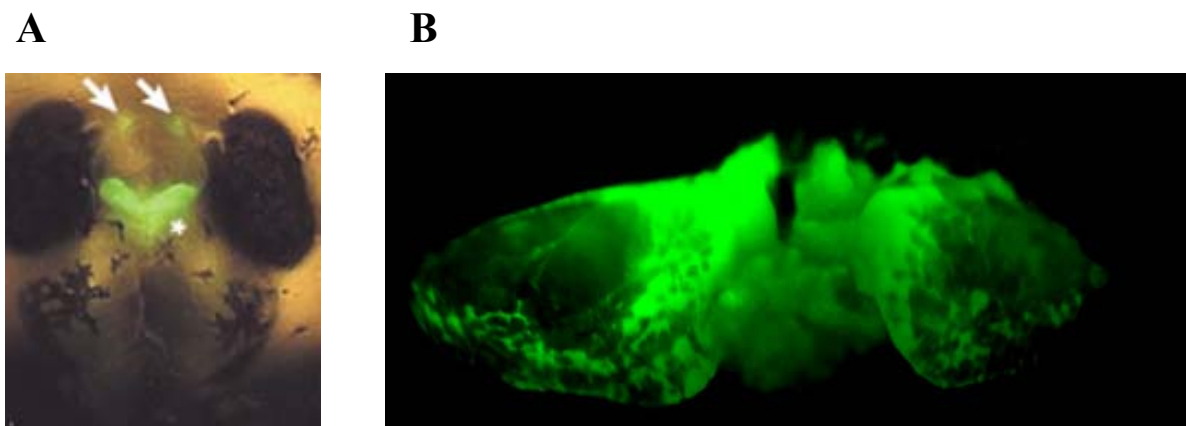
### **1.3 El modelo de pez cebra**

El pez cebra (*Danio rerio*) ha resultado ser un excelente modelo experimental para el estudio del control genético de las asimetrías cerebrales del epítalamo. Este pez teleosteo es una de las principales herramientas genéticas que se ha utilizado en el estudio del desarrollo embrionario de vertebrados, esto, debido principalmente a su alta tasa de fecundidad, a un tiempo de generación corto de tres meses, lo que ha sido útil para la mutagénesis y transgénesis, la presencia de fertilización externa facilitando la manipulación de los huevos fecundados, la gran cantidad de huevos que se obtienen por cruce y finalmente, una de las características que lo hace más interesante, la transparencia óptica de sus huevos y embriones, lo que ha permitido la visualización directa de proteínas marcadas con fluorescencia (como GFP) a través del desarrollo y la determinación del destino celular (Concha y Wilson, 2001; Concha y cols., 2000; Pichler y cols., 2003; Fishman, 2001). En este modelo se observó que previo al desarrollo de las asimetrías estructurales existe una asimetría en la expresión temprana de genes que participan en la vía de señales iniciadas por Nodal sólo en la mitad izquierda del epítalamo (Concha y cols., 2000; Liang y cols., 2000). No obstante, al variar la expresión de estos genes se observaron fenómenos de distribución al azar de la lateralidad de la asimetría, indicando que la vía Nodal no es

necesaria para el desarrollo de las asimetrías estructurales *per se*, pero sí es esencial para definir la dirección (o lateralidad) de estas asimetrías (Concha y cols., 2000). Estudios recientes en el pez cebra han comenzado a abordar los mecanismos genéticos que controlan el desarrollo de las asimetrías neuroanatómicas del epitálamo. El evento inicial de rompimiento de la simetría a nivel del SNC estaría mediado por interacciones de tipo “competitivas” (por moléculas aún no conocidas) entre las mitades derecha e izquierda del cerebro. Experimentos de mapeo fenotípico y ablación celular indican que un lado del epitálamo inhibiría la habilidad del lado contralateral para desarrollar características izquierdas, presentándose una especie de competencia entre ambas mitades (Concha y cols., 2003). En condiciones de ausencia o expresión bilateral de la vía Nodal, las dos mitades del epitálamo tendrían el mismo potencial y el resultado de esta interacción inhibitoria resultaría en una asimetría con lateralidad aleatoria (50% de los casos a la izquierda y 50% de los casos a la derecha). En el embriones silvestres, la activación asimétrica de Nodal en el epitálamo izquierdo ofrecería una ventaja que haría la competencia desigual desde el inicio, lo que resultaría en una asimetría dirigida consistentemente hacia el mismo lado (izquierdo) del cerebro (Concha y cols., 2003).

#### **1.4 El modelo de *medaka***

Más recientemente, Medaka (*Oryzias latipes*), un pez teleósteo nativo de Asia, que presenta características similares a las del pez cebra (Furutani-Seiki y Wittbrodt, 2004), ha emergido como modelo genético complementario al pez cebra, ya que también presenta fertilización externa y embriones transparentes. Además Medaka es muy robusto y puede tolerar un amplio rango de salinidades y temperaturas, es muy fácil de criar y altamente resistente comparado con el común de los peces (Ishikawa, 1997; Wittbrodt y cols., 2002). Aún más importante, durante el desarrollo se observan asimetrías neuroanatómicas similares a aquellas del pez cebra que se muestran en la figura 2 (estudios preliminares aún no publicados).

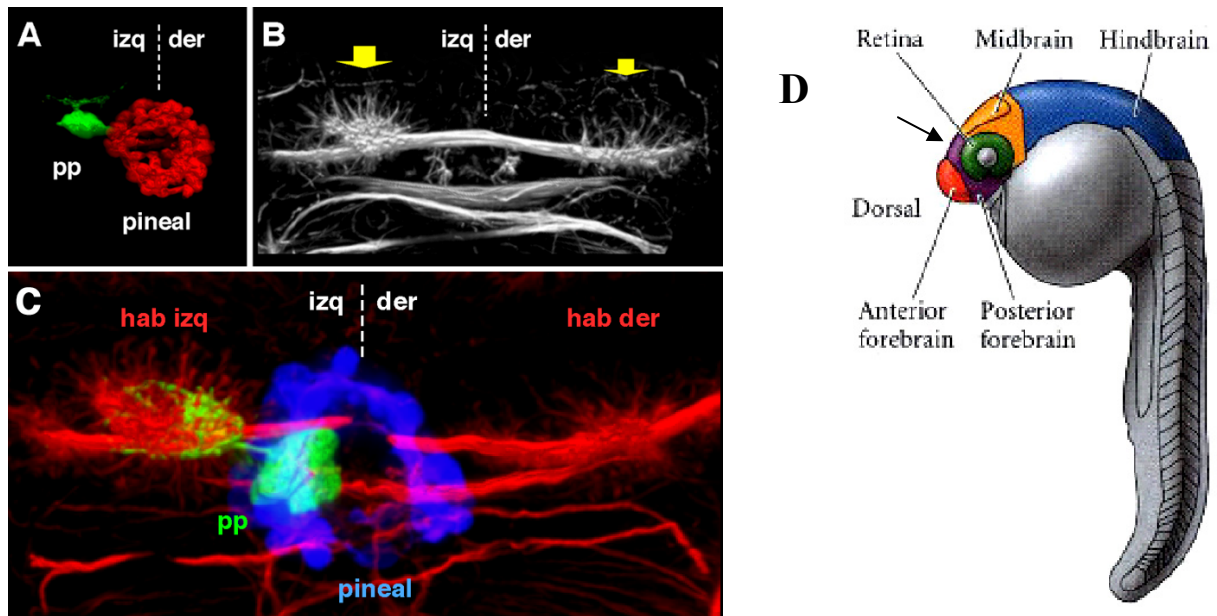


**Figura 2. Línea transgénica de medaka que expresa GFP específicamente en la región habenular.**

(A) Vista dorsal de la cabeza de una larva de medaka con la región anterior hacia arriba. En negro se observan los ojos, el asterisco muestra la habénula y las flechas el epitelio nasal (Wittbrodt y cols., 2002). (B) Vista dorsal del complejo habenular (anterior hacia arriba) que corresponde a una proyección plana de una serie 3D de microscopía confocal obtenida de un embrión vivo de medaka de tipo transgénico, en el estadio de eclosión (7 dpf). Se observa claramente que la habénula izquierda es de mayor tamaño que la habénula derecha (Estudios del laboratorio no publicados).

El estudio comparado entre el pez cebra y Medaka puede entregar información esencial para dilucidar los mecanismos moleculares conservados y divergentes de asimetría cerebral. El epitálamo de pez cebra y Medaka lo constituyen la habénula, que está formada por un par de núcleos bilaterales que rodean la pared lateral del tercer ventrículo, y por el complejo pineal, este último formado por un par de evaginaciones situadas a lo largo del techo encefálico: el órgano pineal y el órgano parapineal. El primer evento morfológico de asimetría corresponde a la migración del órgano parapineal hacia la izquierda, lugar donde desarrolla conectividad profusa dirigida hacia la habénula izquierda. Esta a su vez desarrolla un contenido de neuropila más profuso que aquel observado en la habénula derecha (Figura 3) (Concha y cols., 2003). Así, asimetrías a este nivel se caracterizan por un mayor contenido de neuropila en la habénula izquierda y por un órgano parapineal situado a la

izquierda de la línea media, el que enviaría proyecciones axonales exclusivamente hacia la habénula izquierda (Concha y Wilson, 2001; Concha y cols., 2000).



**Figura 3: Vista dorsal del cerebro de pez cebra mostrando las asimetrías del epítalamo.**

(A) El órgano parapineal (pp, verde) se localiza a la izquierda de la línea media y proyecta axones hacia la izquierda. (B) La habénula izquierda desarrolla un mayor contenido de neuropila (flecha grande) que la habénula derecha (flecha pequeña). (C) Doble marcación del complejo pineal y habenular demostrando que el órgano parapineal (pp) proyecta axones a la región de la habénula izquierda que desarrolla mayor neuropila (Concha y cols., 2000; Concha y cols., 2003). (D) Esquema de una vista lateral de pez cebra, la flecha apunta a la región del cerebro anterior donde se ubica la habénula.

Paralelamente, la habénula izquierda y derecha desarrollan patrones y niveles de expresión asimétrica de diversos genes (Concha y cols., 2003; Gamse y cols., 2003) los que posiblemente cumplen un rol en la diferenciación funcional de grupos celulares específicos. En mamíferos la habénula facilita las interacciones funcionales entre estructuras neuronales del telencéfalo límbico con el mesencéfalo, y se ha propuesto su participación en respuestas

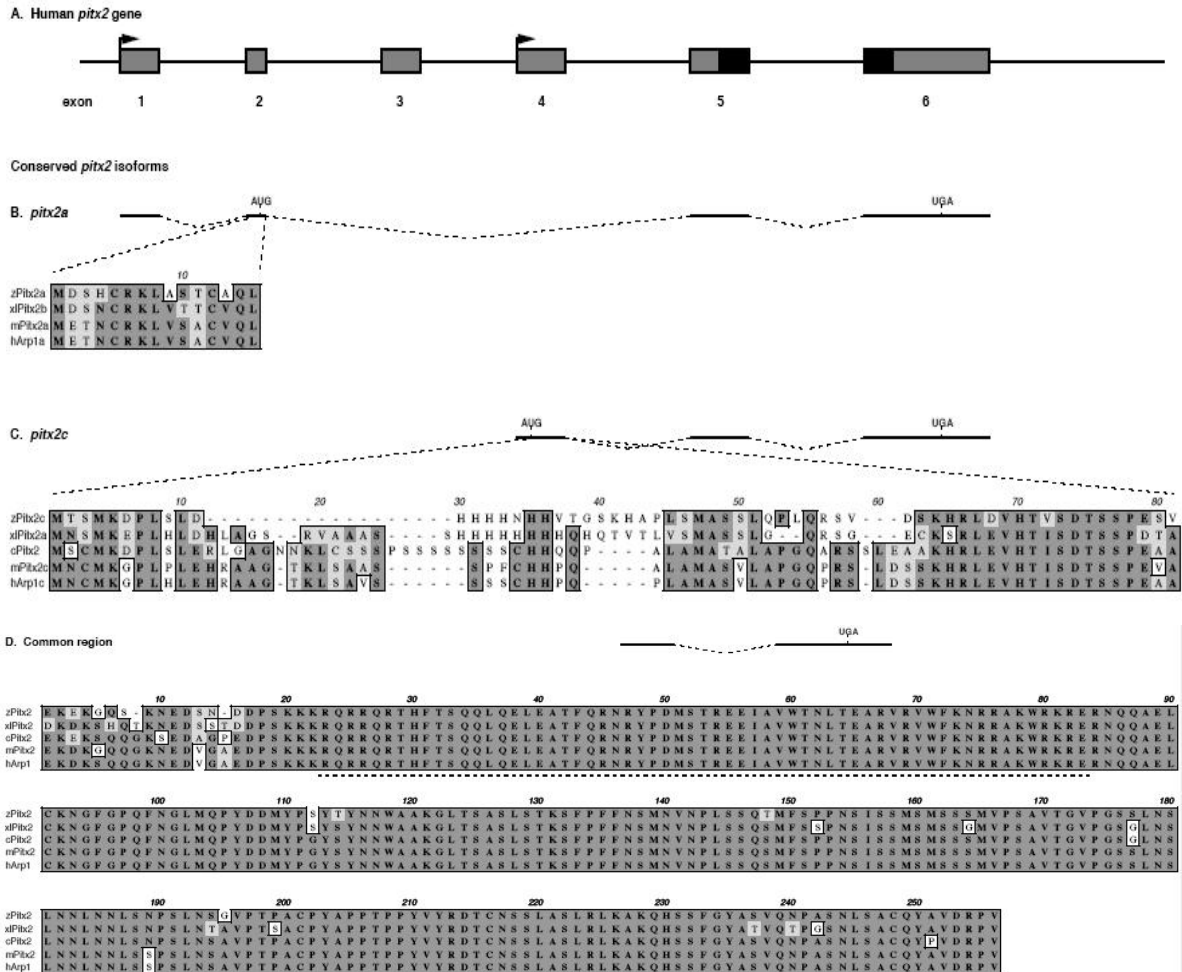
olfatorias, comportamientos reproductivos y de alimentación, en la generación de patrones de sueño, secreción de hormonas (noradrenalina, adrenalina, corticosterona), en las respuestas a estrés, y en aprendizaje por rechazo (Sandik y cols., 1991).

En general la importancia del fenómeno de las asimetrías y su correlato funcional son aún poco conocidos, sin embargo, el alto grado de conservación de este sistema neuronal sugiere que la región epitalámica junto con su circuito de conexiones cumpliría una función importante en la conducta animal, como por ejemplo una acrecentada acción de alimentarse y detección de depredadores (Concha y Wilson, 2001; Concha, 2004).

### **1.5 Genes que regulan asimetrías**

A nivel molecular, la expresión de genes involucrados en el desarrollo de asimetrías en esta región del cerebro puede ser tanto de tipo bilateral como asimétrico. Así, en la vía de señales Nodal, diversos componentes son expresados transitoriamente y en forma asimétrica a la izquierda en la región precursora del epitalamo de pez cebra alrededor de las 20-22 hpf; por ejemplo la molécula ligando de Nodal, *cyclops* (*cyc*), el regulador negativo de Nodal *lefty1* (*lft1*) y el efector de Nodal *pitx2c*. Este último actúa como factor de transcripción y se ubicaría río debajo de la vía de señal Nodal, participando así en la fase tardía que controla la vía de las asimetrías I/D (Concha y cols., 2000; Ryan y cols., 1998; Piedra y cols., 1998).

*pitx2c* es un gen homeobox tipo bicoide, que codifica para una proteína que presenta una lisina en el residuo 50 del homeodominio, residuo que es el mayor determinante en la especificidad de unión al DNA (Gage y cols., 1999). Pitx2 expresa múltiples isoformas de la proteína como resultado de splicing alternativo y el uso de diferentes promotores. Las tres isoformas de Pitx2 (*pitx2a*, *pitx2b* y *pitx2c*) presentan alto grado de homología entre distintas especies (Figura 4), pero no siempre se presentan estas tres isoformas en todas las especies, luego las distintas variantes se van a expresar dependiendo de la especie, pero en general el dominio de expresión de éstas está confinado a los mismos tejidos (Gamse y cols., 2003).



**Figura 4. Isoformas de *pitx2* son conservadas en la evolución de vertebrados.**

(A) El gen *pitx2* humano usa dos promotores (banderas) para generar las isoformas *pitx2a* y *pitx2c* que difieren potencialmente en su región 5' codificante. La estructura genómica en pez cebra es desconocida. Aquí la proteína Pitx2 predicha de la secuencia del cDNA es comparada entre distintas especies de vertebrados; la conservación de secuencia de aminoácidos desde ambas isoformas sugiere una estructura genómica similar a la de humanos. Cuadros negros representan la región que codifican para el homeodominio. (B) Comparación de la región única de Pitx2a de pez cebra (z) con distintas especies, m: ratón, hArp1: homólogo de Pitx2a en humanos, x1: *Xenopus*. (C) Comparación de la región única de Pitx2c de pez cebra (z) con distintas especies, c: pollo. (D) El homeodominio semejante a bicoide y la región C-terminal de Pitx2 de pez cebra comparado con otras especies. La región del homeodominio está subrayada con líneas punteadas. Las zonas en color gris

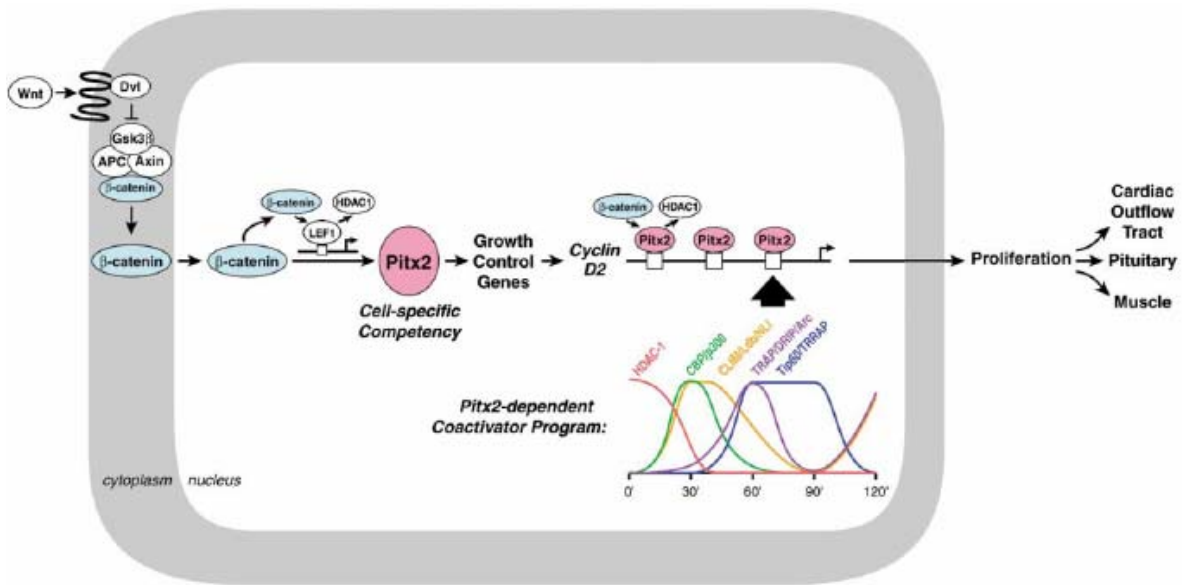


oscuro muestran las regiones de identidad, mientras que las de color gris claro muestran sustituciones conservadas de aminoácidos (Essner y cols., 2000).

*pitx2c* es expresado asimétricamente en la PML izquierda para determinar la aparición de asimetrías I/D en los órganos internos de distintos embriones vertebrados, incluyendo ratón, pollo, rana, pez cebra y medaka. Este gen es homólogo a un gen en humanos conocido como RIEG, cuya mutación produce el Síndrome de Rieger, un desorden autosomal dominante, caracterizado por anomalías en las cavidades oculares anteriores, hipoplasia dental, dimorfismo craneofacial y defectos en el corazón entre otros (Ryan y cols., 1998; Yoshioka y cols., 1998).

Evidencias experimentales nos indican que existe una vía genética en donde Pitx2 estaría mediando la proliferación celular tipo específica durante el desarrollo. Pitx2 es inducido rápidamente por la vía  $Wnt/Dvl/\beta \rightarrow Cat$ . Las proteínas Wnt son altamente conservadas y forman una familia de moléculas de señales morfogénicas de largo alcance dependientes de la concentración, las que regulan interacciones célula-célula durante la embriogénesis. Estas proteínas son liberadas o están presentes en la superficie de células señales que actúan sobre células blanco (Logan y Nusse, 2004).

Pitx2 es inducido por esta vía para una efectiva proliferación celular por activación directa de genes específicos que regulan el crecimiento, actuando de esta forma como un factor de competencia requerido para el reclutamiento en orden temporal (dependiente de factores de crecimiento) de una serie de complejos coactivadores específicos que proveen la inducción necesaria del gen ciclina D2 que participa en el ciclo celular (Figura 5) (Kioussi y cols., 2002).



**Figura 5. Modelo de la vía de regulación Wnt/Dvl/β-Catenina y Pitx2 que regula proliferación celular.**

Pitx2 sirve como un blanco directo dependiente de LEF-1 de la vía Wnt/Dvl/β-Catenina, y se une al promotor de ciclina D2, así como a genes que promueven el crecimiento. Con la estimulación de factores de crecimiento, Pitx2 recluta una serie de complejos coactivadores, que incluyen los factores NLI/Ldb/CLIM y Tip60/TRRAP, los cuales son necesarios para la estimulación de estos promotores. Un nivel de regulación adicional aparece por interacciones entre β-Catenina con Pitx2 (ilustrado en el promotor de ciclina D2), causando disociación de HDAC1 y sirviendo como una estrategia de desrepresión (Kioussi y cols., 2002).

Ya que Pitx2 está involucrado tanto en el desarrollo de asimetrías cerebrales como en proliferación celular, es posible que las asimetrías de tamaño observadas entre las mitades derecha e izquierda del epítalamo, específicamente de la habénula, se deban a un control diferencial de la proliferación celular entre las mitades derecha e izquierda del cerebro mediado por *pitx2c*. Sin embargo, esto no ha sido estudiado en ninguno de los dos modelos teleósteos. El objetivo de este trabajo es analizar qué papel juega la proliferación celular en el desarrollo de las asimetrías del epítalamo, tanto en el pez cebra como en medaka, como una etapa inicial destinada a evaluar una posible función de *pitx2c* en su control genético.

En base a estos antecedentes planteamos la siguiente hipótesis:

## **1.6 Hipótesis**

El desarrollo de asimetrías de tamaño entre la habénula izquierda y derecha de pez cebra (*Danio rerio*) y medaka (*Oryzias latipes*) obedece a diferencias en la tasa de proliferación celular entre ambos núcleos, y estaría relacionado a la actividad asimétrica del factor de transcripción *pitx2c*.

### **1.6.1 Objetivo general**

Estudiar el rol que cumple la proliferación celular en la generación de asimetrías neuroanatómicas de la habénula, y su posible control genético por factores moleculares de expresión asimétrica durante el desarrollo del pez cebra (*Danio rerio*) y medaka (*Oryzias latipes*).

#### **1.6.1.1 Objetivos Específicos**

- 1.- Buscar marcadores específicos de la habénula (ribosonda), lograr su expresión mediante transcripción *in vitro* y analizar su localización mediante hibridación *in situ*.
- 2.- Comparar los niveles de proliferación celular de la habénula izquierda y derecha durante el desarrollo mediante ensayos de incorporación de BrdU e inmunodetección de histonas fosforiladas en el pez cebra y medaka.
- 3.- Establecer el patrón temporal de expresión asimétrica de *pitx2c* en el epítalamo durante el desarrollo de medaka y pez cebra mediante hibridación *in situ* y comparar los patrones observados en ambas especies.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. MATERIALES

#### 2.1.1. Material biológico

Se utilizaron embriones de pez cebra (*Danio rerio*), cepa Wild Type AB, los que fueron obtenidos a través de cruces naturales de peces hembras y machos adultos. De esta misma forma se obtuvieron embriones de medaka (*Oryzias latipes*), específicamente la cepa transgénica DE, caracterizada por expresar la proteína fluorescente verde (GFP) en el complejo habenular (Wittbrodt, 2002), la cual se puede identificar mediante el uso de luz fluorescente.

Los embriones de ambas especies fueron mantenidos en incubadoras a 28°C, en un medio rico en sales, E3 1X, que evita el crecimiento de hongos. La edad de los embriones de pez cebra se expresa en “horas post-fertilización” (hpf) (Westerfield, 1995), mientras que la de embriones de *medaka* se expresa en “estadios”, que van desde el 0 hasta el 44. Los peces adultos se mantuvieron en acuarios a una condición controlada de temperatura (26-28°C), circulación de agua y aire. Diariamente se alimentan tres veces y se monitorean sus condiciones de pH y temperatura.

#### 2.1.2. Genes:

- Los cDNAs de *cpd2*, *cxcr4b*, *fgf8*, *fspondin*, *lim LH 2A*, *lim LH 2B*, *pitx2* (pez cebra), *robo 3*, *sdf1a*, *slit3* y *zic5* fueron donados gentilmente por el laboratorio del Dr. Stephen Wilson, University College London, Gran Bretaña.
- El cDNA de *pitx2* de medaka fue gentilmente cedido por el laboratorio de la Dra. Paola Bovolenta, Instituto Cajal, Madrid, España.

### 2.1.3. Reactivos para Biología Molecular

- Enzimas de Restricción: XbaI, EcoRV, y sus respectivos tampones, Gibco (Paisley, Escocia, Gran Bretaña); EcoRI, SacII, Sall, y tampones, New England Biolabs (Hertz, MA, EEUU); XhoI y tampón, Promega (Madison, WI, EEUU)
- *E. coli* DH5- $\alpha$  competentes, Invitrogen (Paisley, Scotland, Gran Bretaña)
- Acetato de Amonio 5M, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Acetato de sodio 3M pH 6, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Acetona, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Acido Bórico, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Agarosa tipo II, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Agua nanopura estéril (stock del laboratorio)
- Ampicilina, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Azul de bromofenol, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Bromuro de etidio, Bio-Rad (Hércules, CA, EEUU)
- Tampón de transcripción 5X, Promega(Madison, WI, EEUU)
- Dig RNA labeling mix 10X, Enzo
- Ditioneitol (DTT) 0,1 M, Promega (Madison, WI, EEUU)
- DNAsa I (libre de RNAsa), Promega (Madison, WI, EEUU)
- EDTA 0,5 M, pH 8, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Estándar de peso molecular de DNA 1 Kb, Promega (Madison, WI, EEUU)
- Etanol, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Fenol/ Cloroformo básico/ Alcohol isoamílico 25:24:1, Invitrogen (Paisley, Scotland, Gran Bretaña)
- Ficoll, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Formamida desionizada, Winkler ( Santiago, Chile)
- Isopropanol, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Medio LB, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- NTP Mix 10X, Invitrogen (Paisley, Scotland, Gran Bretaña)
- RNA Polimerasa T3 (20U/ $\mu$ l), T7 (17U/ $\mu$ l) y SP6 (15U/ $\mu$ l), Promega
- RNAsin ( inhibidor de RNAsa), Promega (Madison, WI, EEUU)

- Trizma Base, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Tween-20, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)

#### 2.1.4. Reactivos para Hibridación *in situ*

- Anticuerpo Anti-Digoxigenina-AP, Boehringer Ingelheim Roche (Basilea, Suiza)
- Blocking Reagent, Boehringer Ingelheim Roche (Basilea, Suiza)
- Formamida, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Metanol, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Proteínasa K, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- RNA de tórula tipo II-c de levadura, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Sustrato BMPurple AP, Roche (Basilea, Suiza)

#### 2.1.5. Reactivos para Incorporación de BrdU

- Anticuerpo primario monoclonal Anti-BrdU, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón conjugado a HRP, Transduction Laboratories (Greenland, NH, EEUU)
- BrdU, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Diaminobenzidina, stock del laboratorio
- HCl 2N, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Peróxido de Hidrógeno 30%, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Pronasa, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Tetraborato di-sódico decahidratado 0,1 M, Merck (Darmstadt, Alemania)

#### 2.1.6. Reactivos para Inmunocitoquímica e Inmunofluorescencia Indirecta

- Anticuerpo primario monoclonal: Anti-GFP, Chemicon (Temecula, CA, EEUU)
- Anticuerpo primario policlonal: Anti-PH3 (donado por el Dr. Steve Wilson)
- Anticuerpos secundarios: Anti-IgG de ratón conjugado a HRP, Transduction Laboratories (Greenland, NH, EEUU)), Anti-IgG de conejo conjugado a Biotina-Rodamina

- Anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos de la familia Alexa: Anti-ratón Alexa 488, Anti-conejo Alexa 633, Anti-conejo Alexa-Tritc, Alexa 568-Estreptavidina, Molecular Probes (Paisley, Scotland, Gran Bretaña)
- Albúmina de suero de bovino (BSA), Sigma (St. Louis, MO, EEUU)

#### 2.1.7. Soluciones

- 1- fenil-2- tiourea (PTU), Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- BCL (Tris 0,1 M pH 9,5; Tween-20 0,1%; NaCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 0,5 M)
- MAB ( ácido maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M pH 7.5)
- MABT (MAB 1X + Tween-20 0,1 %)
- PBS 10X, Winkler (Santiago, Chile)
- PBST (PBS 1X + Tween-20 0,1%)
- Solución de bloqueo para hibridación *in situ* (MAB+ blocking Reagent 2%)
- Solución de bloqueo para incorporación de BrdU (PBST, 1%DMSO, 10% suero de cabra, 2 mg/ml BSA)
- Solución de bloqueo para inmunocitoquímica o IB (1% DMSO, 10% suero de cabra, 0,5% tritón, PBS)
- Solución de hibridación *in situ* o Hyb: Hyb(-) (formamida 50%; SCC 5X; Tween-20 0,1%); Hyb (+) ( formamida 50%; heparina 50 µg/ml; Tween-20 0,1%, RNA tórula de levadura 5 mg/ml, agua nanopura estéril, ácido cítrico 1M pH6, SCC 5X)
- Solución Danieau 1X (NaCl 1,74 mM, KCl 21 mM, MgSO<sub>4</sub> 12 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 18 mM, HEPES 150 mM, 1% Penicilina/Estreptomicina 100U/ml, pH 7,6 )
- Solución E3 1X (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0,33 mM, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0,33 mM, Azul de Metileno 10%)
- Solución fijadora (Paraformaldehido 4% en PBS)
- SSC 20X (175,3 g de NaCl; 88,2 g de citrato de sodio, pH 7, para un volumen final de 1 lt.)

#### 2.1.8. Otros

- Sistema comercial de extracción de agarosa, Qiagen (Valencia, CA, EEUU)
- Sistema comercial de extracción de DNA plasmidial, Qiagen (Valencia, CA, EEUU)
- Microcolumnas ProbeQuant TM G-50, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU)



## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. Preparación de sonda de RNA para hibridación *in situ*

La preparación de las sondas: *fgf8*, *fspondin*, *lim LH 2A*, *lim LH 2B*, *pitx2* (pez cebra), *pitx2* (medaka), *robo 3*, *sdf1a*, *slit3* y *zic5*, comenzó con la obtención cuantitativa del cDNA de estas (las sondas *cpd2* y *cxcr4b* ya estaban preparadas). Inicialmente se suspendieron discos de papel que contenían inmersos estos cDNA (facilitados por el Dr. Stephen Wilson) en agua nanopura estéril y transcurrido una hora se procedió a transformar células competentes DH5- $\alpha$  con estos cDNAs. Esta transformación se realizó por un procedimiento estándar en el cual las células fueron sometidas a un shock térmico e incubadas en un medio rico en nutrientes (SOC) con agitación a 37°C. Luego se sembraron 200  $\mu$ l de la mezcla de transformación en agar LB/Ampicilina (50  $\mu$ g/ml) y se incubaron a 37°C toda la noche. Las colonias transformadas y con probable presencia del inserto fueron las que se cultivaron en medio líquido. A partir de cultivos de las células seleccionadas se aisló el DNA plasmidial mediante el uso de un sistema comercial de extracción de DNA plasmidial Qiagen. Este protocolo es utilizado para purificar más de 20  $\mu$ g de plásmidos de alto número de copia de cultivos de *E. coli* en medio LB. Una vez obtenida la cantidad de DNA deseada se procedió a la linearización del plásmido que contiene el cDNA para obtener el RNA antisentido. Se verificó la presencia del DNA digerido mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El producto de esta digestión fue purificado mediante una extracción con fenol-cloroformo eliminando así los contaminantes. A continuación se realizó la transcripción *in vitro* de la sonda de RNA marcada con digoxigenina a partir de 0,5-1,0  $\mu$ g/ $\mu$ l de DNA linearizado, 4  $\mu$ l de tampón de transcripción 5X, 2  $\mu$ l de DTT 0,1 M, 2  $\mu$ l de NTP- mix 10X, 0,5  $\mu$ l de inhibidor de RNAsa y 1  $\mu$ l de RNA polimerasa T3, T7 o SP6 según el cDNA. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas, o en algunos casos toda la noche. Se analizó 1  $\mu$ l de la mezcla de transcripción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar presencia de RNA y determinar si detener la reacción. Luego se agregó 1  $\mu$ l de DNAsa (libre de RNAsa) y se incubó 15 minutos para degradar el DNA remanente que no fue transcrito y remover así el templado. A continuación se detuvo la transcripción agregando 1  $\mu$ l de EDTA 0,5 M y se purificó el RNA filtrando la mezcla por micro columnas y centrifugando a 13000 rpm en microcentrífuga a 4°C durante 2 minutos. Algunas sondas

requirieron además un paso adicional, la precipitación del RNA con 1 volumen de acetato de amonio 5M y 3 volúmenes de etanol absoluto a -80°C durante 30 minutos. Se recuperó el RNA centrifugando a máxima velocidad durante 20 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante, el precipitado se lavó con etanol 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. La sonda recién sintetizada se analizó en un gel de agarosa al 1% para constatar la presencia del RNA purificado. Finalmente se resuspendió en formamida.

### 2.2.2. Blanqueamiento de embriones de pez cebra

Con el objeto de eliminar los pigmentos se realizó el blanqueo de embriones que tienen más de 24 hpf. Para esto se incubó los embriones que tenían desde 1 dpf hasta el momento de su uso en medio PTU a 28°C, los que luego fueron fijados para su posterior uso.

### 2.2.3. Hibridación *in situ*

Los embriones de pez cebra y *medaka* se fijaron en el estadio apropiado en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS a 4°C durante toda la noche. En el caso de *medaka* la incubación se realizó con agitación. A continuación se eliminó mecánicamente el corion usando forceps de disección. Luego fueron deshidratados en metanol en una serie (cada 5 minutos) desde 25% metanol/ 75% PBS hasta 100% metanol, y luego se incubaron por lo menos 2 horas a -20°C (los embriones se pueden almacenar en esta etapa a -20°C hasta 6 meses). A continuación fueron sometidos a rehidratación durante 5 minutos en 75% metanol/ 25% PBS, 5 minutos en 50% metanol/ 50%PBS, 5 minutos en 25% metanol/ 75% PBS y dos veces durante 5 minutos con PBS-T. Para incrementar la permeabilidad de la membrana y la accesibilidad de la sonda, y la digestión de proteínas asociadas al mRNA se realizó el tratamiento con Proteinasa K. Los embriones de pez cebra de estadios desde 16 somitos hasta 6 dpf y embriones de *medaka* desde estadio 1 a estadios mayores de 30 se trataron con 1 µg/ml de Proteinasa K (PK) en PBS-T, dependiendo el tiempo de tratamiento con PK del estadio del desarrollo del embrión. Después se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS-T para eliminar la PK. Para volver a fijar los tejidos de los embriones y prevenir que se destruyeran, éstos se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en PFA al 4% en PBS, luego se enjuagaron tres veces en PBS-T y se lavaron tres veces más

durante 5 minutos en PBS-T. A continuación los embriones se prehibridaron con solución Hyb (-) a 65°C durante 5 minutos y luego de hacer un recambio de la solución se incubó durante al menos 2 horas. En la siguiente etapa se diluyó la ribosonda en Hyb (+), se desnaturó durante 10 minutos a 65°C y se incubó con los embriones durante toda la noche a 65°C. Todos los pasos anteriores se realizaron en condiciones libres de RNAsas. Posteriormente la sonda fue removida (para ser re-usada) y se procedió al lavado de los embriones post hibridación. Para esto todas las soluciones se precalentaron a 65°C, así estos embriones fueron incubados 5 minutos en Hyb(-), 5 minutos en 25% Hyb(-)/ 75% 2X SSC, 10 minutos en 2X SSC y finalmente tres veces durante 30 minutos en 0,2X SSC. Todas estas incubaciones se llevaron a cabo a 65°C. Con el objetivo de bloquear los sitios inespecíficos se incubaron los embriones en MAB-T durante 5 minutos dos veces y durante 2-3 horas en solución de bloqueo (MAB+ blocking Reagent 2%) a temperatura ambiente. Posterior al bloqueo se diluyó el anticuerpo anti-digoxigenina (1/5000) y se incubó con los embriones a 4°C durante toda la noche. Se recuperó el anticuerpo, se efectuó el lavado de los embriones seis a ocho veces durante 15 minutos con MAB-T y luego se equilibraron en tampón BCL tres veces durante 5 minutos. A continuación se realizó la tinción de los embriones con el sustrato de la fosfatasa alcalina BMPurple en oscuridad y durante el tiempo necesario para que aparezca la tonalidad púrpura esperada en la zona de expresión del mRNA. Finalmente se eliminó el exceso de tinción lavando tres veces durante 5 minutos en PBS-T, para luego refijar los embriones en PFA al 4% en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente y lavar dos veces en PBS por 5 minutos. Por último, se embebieron los embriones durante 5 minutos en glicerol 30% en PBS, 5 minutos en glicerol 50% en PBS, 5 minutos en glicerol 70% en PBS y se almacenaron en glicerol 70% en PBS fresco a 4°C (Jowett y cols., 1994).

#### 2.2.4. Incorporación de BrdU en núcleos en fase-S

Los embriones de pez cebra se descorionaron manualmente y los embriones de *medaka* se descorionaron enzimáticamente en distintos estadios del desarrollo. Se trató los embriones con una solución de BrdU 10 mM/ DMSO 10% a temperatura ambiente durante 45 minutos para pez cebra y 1 hora para medaka, se lavó tres veces con medio E3 1X y se incubó en placas de Petri durante 45 minutos a 28°C. Luego se fijaron en PFA 4% en PBS toda la

noche a 4°C. Luego se fijaron, rehidrataron y digirieron con PK como lo describe el punto 2.2.3. Para volver a fijar los tejidos de los embriones, éstos se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en PFA al 4% en PBS, luego se lavaron cinco veces durante 5 minutos en PBS-T a temperatura ambiente. A continuación se incubó con HCl 2N durante 1 hora a 37°C para exponer el DNA al BrdU, se neutralizó con tetraborato di-sódico decahidratado 0,1 M durante 10 minutos y se lavó cinco veces durante 10 minutos con PBS-T. Se bloqueó los sitios inespecíficos durante 2 horas con solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo anti-BrdU diluido 1:50 en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se recuperó el anticuerpo, se lavó los embriones cinco veces durante 5 minutos con PBS-T y se volvió a tratar con la solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se incubó los embriones con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:200 en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. A continuación se realizaron tres lavados de 2 minutos con PBS-T. Finalmente, para revelar la tinción se preincubaron los embriones con solución de detección DAB en PBS durante 20 minutos, posterior a esto se agregó 1 µl de peróxido de hidrógeno al 1% y se monitoreó la reacción hasta que se observó en las células la tonalidad café. Por último se detuvo la reacción transfiriendo los embriones a PBS, para luego refijar los embriones en PFA al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y lavar dos veces en PBS durante 5 minutos. Por último, se embebieron los embriones durante 5 minutos en glicerol 30% en PBS, 5 minutos en glicerol 50% en PBS, 5 minutos en glicerol 70% en PBS y se almacenaron en glicerol 70% en PBS fresco a 4°C.

### 2.2.5 Preparación de la enzima de eclosión (“*hatching*”)

Con el fin de obtener la enzima de eclosión se cultivaron los embriones de medaka (entre 100 y 200) en solución E3 1X a 28°C y se colectaron justo antes de eclosionar (aproximadamente 7 dpf, cuando la glándula de la enzima es claramente visible de color verde). Luego de ser lavados con agua destilada cinco veces y removida ésta, se les sometió a un shock frío mediante un ciclo alternado con nitrógeno líquido y baños a 37°C. Posteriormente estos embriones fueron homogeneizados con un pistilo para luego centrifugar el homogeneizado a máxima velocidad durante 1 minuto, transferir el sobrenadante a un tubo limpio en hielo y repetir el proceso nuevamente. Para extraer la

enzima en forma exhaustiva, el sedimento final (resultante del macerado de embriones) se resuspendió en 500 ml de PBS y se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad. Finalmente se juntaron todos los sobrenadantes que fueron nuevamente centrifugados a 13000 rpm durante 10 minutos, y se transfirió la fase líquida a un tubo nuevo. La enzima está lista para su uso o se puede guardar a -80°C.

#### 2.2.6. Remoción del corion y uso de la enzima de eclosión en medaka

Los embriones de medaka se trataron durante 2 horas con PK 20 mg/ml o Pronasa 0,1% en agua destilada a temperatura ambiente y con agitación constante, luego se lavaron con agua destilada y removida ésta se incubaron los embriones con HE a 28°C. Dependiendo del lote de la enzima, la eclosión demora entre 9 y 20 horas. Posteriormente se transfirieron los embriones a una placa de Petri cubierta con agarosa al 1% (superficie no adherente) que contenía solución de Danieü. Finalmente se removió la capa externa del corion (ya que la capa interna desapareció) con forceps esterilizados. Los embriones descorionados se incubaron a 28°C en medio Danieü 1X.

#### 2.2.7. Doble Inmunofluorescencia Indirecta con anticuerpos específicos contra GFP e histona H3 fosforilada

Después de recolectar embriones medaka en los estadios deseados y de seleccionar los embriones transgénicos para GFP de habénula mediante fluorescencia, éstos se fijaron en PFA al 4% en PBS durante toda la noche a 4°C y con agitación. Luego fueron descorionados manualmente bajo lupa usando forceps. Posteriormente se lavaron los embriones tres veces durante 15 minutos en PBS, en agua destilada durante 5 minutos, en acetona (pre-enfriada a -20°C) durante 7 minutos, en agua destilada durante 5 minutos y en PBS por 1 minuto. Para estadios tempranos (0-24) solamente se lavaron los embriones tres veces durante 15 minutos en PBS+0,5% tritón y no fue necesario el tratamiento con acetona. A continuación se bloquearon los sitios inespecíficos con solución IB durante 1 hora y luego se reemplazó esta solución por la mezcla de los anticuerpos primarios anti-GFP de ratón y anti-PH3 de conejo, ambos diluidos 1:1000 en IB y se incubó durante toda la noche a 4°C. Luego se removieron los anticuerpos y se lavaron los embriones cuatro

veces durante 30 minutos con agitación constante, se volvió a bloquear con IB durante 1 hora y se incubaron con la mezcla de anticuerpos secundarios anti-ratón Alexa 488 y anti-conejo (Ig) conjugado a biotina diluidos 1:200 en IB durante toda la noche. Posteriormente se realizaron cuatro lavados de 30 minutos cada uno de la mezcla de los anticuerpos secundarios descartándolos y se incubó con el fluoróforo Alexa 568- estreptavidina diluida 1:100 en PBS, manteniendo los embriones en oscuridad. Éstos se montaron en glicerol 100% (luego de transferirlos por una serie de glicerol/PBS) y se analizaron bajo luz fluorescente con dos filtros distintos. Finalmente se obtuvieron series ópticas de estos embriones a distintas profundidades del complejo habenular, las que fueron procesadas con Openlab (Improvision) y luego analizadas usando rutinas de computación especialmente diseñadas para el programa NIH Image.

#### 2.2.8. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics versión 4.0 (Manugistics Incorporated, 2001), utilizando la prueba t no paramétrica. Para esto se trabajó con la media de dos muestras emparejadas. Para confirmar los resultados adicionalmente se ensayó también con la mediana y con una prueba de rangos que se utiliza si la distribución no es normal. En todos los casos los resultados fueron coincidentes.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Obtención y expresión de marcadores específicos de habénula izquierda y derecha en pez cebra.

El protocolo de incorporación de BrdU y de inmunodetección de histona H3 fosforilada utilizados en este trabajo se realizan en el embrión completo, resultando así marcadas todas las células que están en proliferación activa. Dicho de otra forma, todos los núcleos que están sufriendo alteraciones, ya sea a nivel de mitosis o de modificación de la cromatina, respectivamente. De esta forma, para establecer si existe asimetría izquierda-derecha en la tasa de proliferación celular en la región de la habénula, debemos inicialmente identificar anatómicamente en el embrión dicha región del cerebro por medio de marcadores.

Al respecto, medaka ofrece una gran ventaja, puesto que existe una línea de peces transgénicos que demarca la región habenular por medio de la proteína fluorescente verde (GFP). En pez cebra, no obstante, no ocurre lo mismo, y en consecuencia se buscaron marcadores genéticos que pudieran definir la región habenular durante el período del desarrollo a analizar. Se reconocieron alrededor de 10 genes que se expresarían en la región de interés (genes de expresión bilateral), los que incluyeron a *cpd2*, *cxcr4b*, *fgf8*, *fspondin*, *lim LH 2A*, *lim LH 2B*, *robo 3*, *sdf1a*, *slit3* y *zic 5* (Tabla 1).

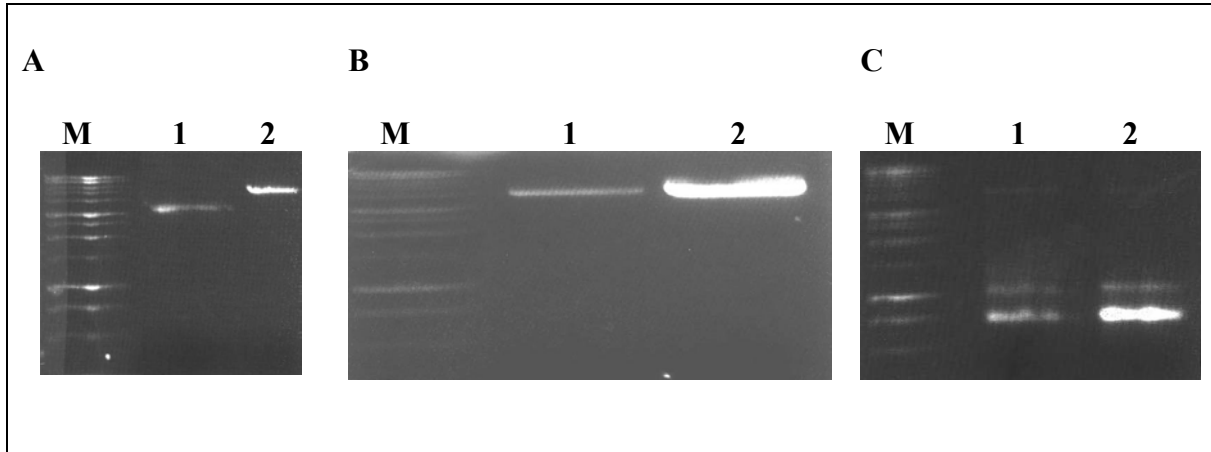
Para observar la presencia de estos transcritos y así definir la ubicación de la habénula en el embrión de pez cebra, se prepararon sondas de mRNA antisentido para cada uno de estos marcadores marcada con digoxigenina con el fin de realizar HIS en embriones *in toto*. El primer paso fue obtener el cDNA de estos marcadores (donados por el Dr. Stephen Wilson, UCL). Las etapas de la obtención de la ribosonda incluyeron la transformación de células competentes con estos cDNA, el cultivo de las células transformadas eficientemente, la purificación del DNA plasmidial que lleva el inserto, la linearización del plásmido, la purificación de contaminantes y finalmente la transcripción *in vitro*. (Descrito en 2.2.1).

**Tabla 1. Genes candidatos para marcadores de habénula y tipo de proteína que codifican.**

Genes Marcadores	Tipo de proteína	Referencia
<i>Cpd2</i>	Proteína 2 asociada al desarrollo postnatal del cerebelo	Gamse y cols., 2003
<i>cxcr4b</i>	Receptor de quimioquinas	Chong y cols., 2001
<i>Fgf8</i>	Factor de crecimiento fibroblástico	
<i>Fspondin</i>	Proteína de adhesión a matrix	Higashijima y cols., 1997
<i>lim LH 2A</i>	Proteína con homeodominio de la clase lim	
<i>lim LH 2B</i>	Proteína con homeodominio de la clase lim	
<i>robo3</i>	Receptor transmembrana involucrado en guía axonal	Challa y cols., 2001
<i>sdf1a</i>	Ligando extracelular de <i>cxcr4b</i>	
<i>slit3</i>	Ligando extracelular de <i>robo</i>	Challa y cols., 2001
<i>Zic5</i>	Proteína del tipo dedos de zinc	Toyama y cols., 2004

La figura 6 muestra el resultado del análisis mediante electroforesis en geles de agarosa correspondientes a un ejemplo de obtención de una de estas sondas, e incluye todos los pasos mencionados anteriormente. En este caso se trata de *slit3*, caracterizado por ser un ligando extracelular de la familia de receptores *robo* (*robo 3*, que también fue analizado) y que participa en diversos procesos del desarrollo de vertebrados. Estudios preliminares de otros autores (Challa y cols., 2001) lo presentaron como candidato de expresión habenular. El mismo procedimiento se realizó con los otros genes restantes (no mostrado).



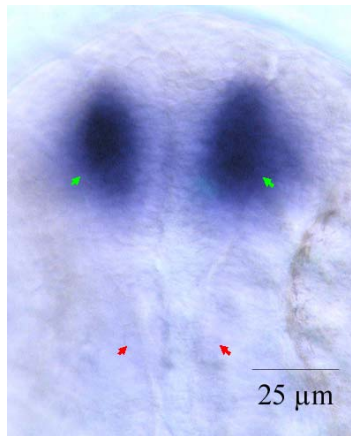


**Figura 6. Obtención de la ribosonda de *slit3*.**

(A) Digestión de *slit3*, 1: plásmido sin digerir, 2: plásmido linearizado con Xho I. (B) Purificación con fenol-cloroformo 1: *slit3* linearizado con Xho I, 2: *slit3* purificado mediante el proceso descrito en 2.2.1. (C) Transcripción *in vitro*, 1: *slit3* transcrito, 2: *slit3* purificado posterior a la transcripción. A, B, C Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M= Marcador de peso molecular de 1 Kb.

El segundo paso fue determinar el espacio temporal en que se analizaría la expresión de estos marcadores habenulares putativos. Como se mencionó anteriormente (ver 1), la vía de señales comandada por la proteína Nodal controlaría los mecanismos genéticos involucrados en el control de la lateralidad de las asimetrías cerebrales en pez cebra. Así, la primera manifestación de asimetría molecular en la región precursora del epitálamo ocurre entre las 20-22 hpf, con la expresión asimétrica transitoria de genes de la vía de señal Nodal, luego los primeros indicios de morfogénesis asimétrica aparecen a las 28-30 hpf (Bisgrove y cols., 2000; Concha y cols., 2000; Liang y cols., 2000). Además, experimentos de ablación celular a las 22-24 hpf nos indican que la región precursora de la habénula izquierda jugaría un papel central en la determinación I/D inicial durante este período discreto de desarrollo (Concha y cols., 2003). Posteriormente, las asimetrías morfológicas del epitálamo son detectadas claramente en el órgano parapineal a las 48 horas del desarrollo. Por lo tanto, considerando estos antecedentes, decidimos centrar nuestro análisis de la región habenular entre las 24-48 hpf.

Una vez obtenidas las ribosondas deseadas y establecida la ventana de tiempo en la que se trabajaría, se procedió a determinar la ubicación de estos marcadores en el embrión de pez cebra mediante HIS, para así conocer si realmente se expresaban en la región habenular. De todos los marcadores analizados ninguno mostró un patrón de expresión esperado, ya sea porque no se expresaba en la ventana temporal analizada o porque no demarcaba claramente la habénula. En el caso de *fspondin*, *lim LH 2A* y *lim LH 2B*, no se obtuvo la expresión deseada a nivel espacial; en cambio, en el caso de *cpd2*, *slit3* y *robo 3* la expresión temporal no fue la deseada, por ejemplo la marca de *cpd2* aparecía en la región habenular pero sólo a partir de los 2 dpf (no mostrado). Por otro lado, nunca se logró una HIS óptima para *fgf8*, *sdf1a* y *zic 5*, debido a posibles problemas en la construcción de las sondas. Por último se determinó que *cxcr4b* se expresa en ambas habénulas en el período analizado, pero restringida a la zona más anterior y medial, y no al territorio completo que abarcan estos núcleos. La figura 7 muestra un ejemplo de HIS para el gen *Lim Lh2B*. Como observamos su expresión es bilateral, pero es restringida a una zona del cerebro que no comprende las habénulas, particularmente al telencéfalo.



**Figura 7. HIS de *Lh2B* en embrión de pez cebra de 24 hpf.**

Vista dorsal con región anterior hacia arriba. Las flechas verdes indican el telencéfalo izquierdo y derecho y las flechas rojas indican la región presuntiva donde debieran ubicarse ambas habénulas. Aumento 20X.

De acuerdo a estos resultados, se concluyó que no es posible utilizar estos marcadores en forma específica para delimitar las habénulas derecha e izquierda en pez cebra.

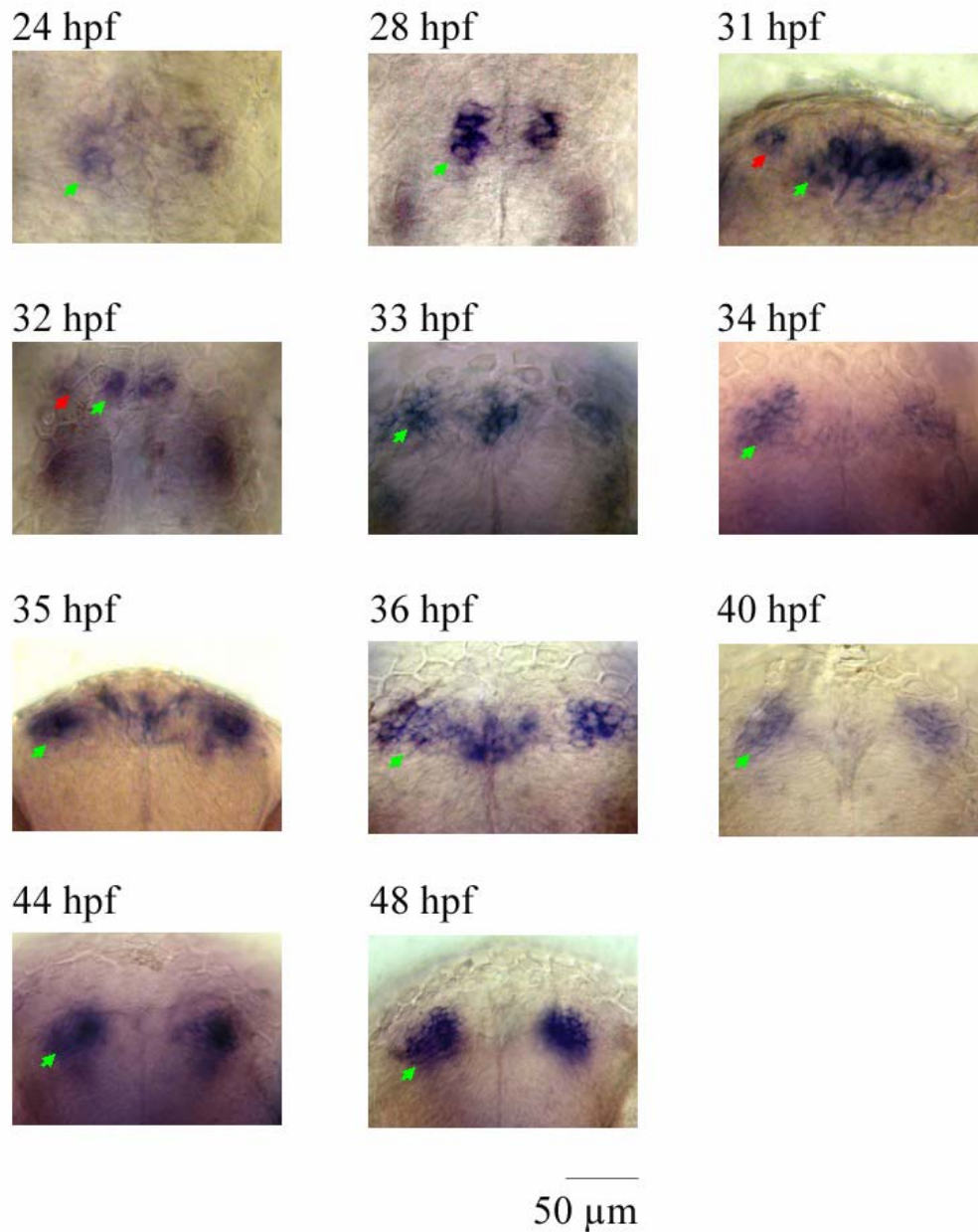
### **3.2 Expresión témporo-espacial del marcador *cxcr4b* en pez cebra y su relación con las asimetrías a nivel de diencéfalo.**

Estudios preliminares de nuestro laboratorio indican que ciertos genes pertenecientes a la familia de los receptores de quimioquinas, como es el caso de *cxcr4*, se expresan en la habénula, pero su función en el desarrollo de las asimetrías es aún desconocido. En pez cebra existen dos genes parálogos de estos receptores, *cxcr4a* y *cxcr4b*, los cuales muestran una alta homología con los CXCR4 de mamíferos (Chong y cols., 2001).

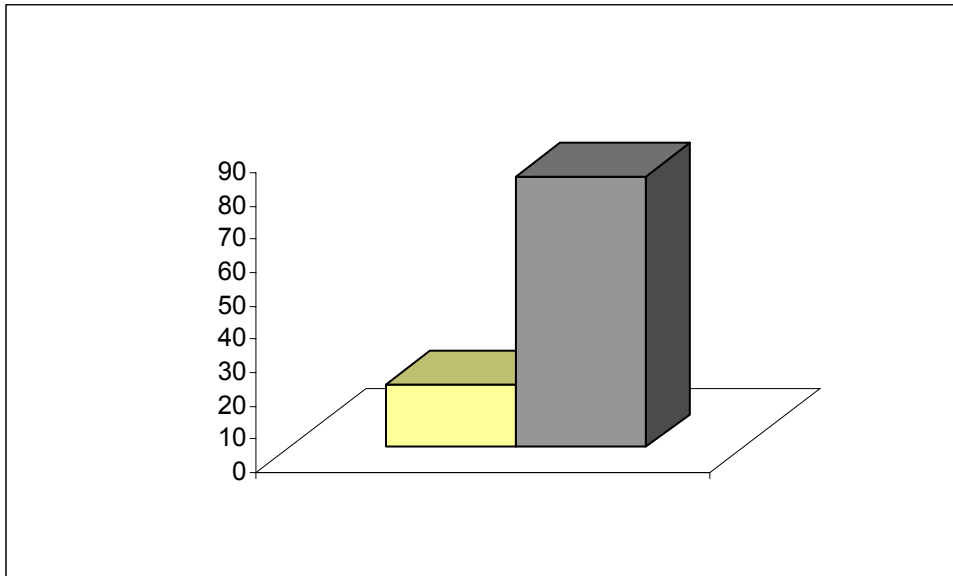
El patrón de expresión de *cxcr4b* se analizó mediante HIS (Fig. 8). En el se observó la presencia de este marcador en la zona más anterior y medial de ambas habénulas. A las 24 hpf se comienza a observar la expresión de *cxcr4b* en el complejo pineal, especialmente en neuronas ventrales que corresponderían a neuronas de proyección (resultado no mostrado). Este patrón de expresión se conserva también a las 28 hpf, en donde, aparece una pequeña diferencia entre los lados derecho e izquierdo, este último casi doblando en territorio al lado derecho. Esta tendencia se reiteró en un 83,3% de los casos analizados (n = 6). Luego se determinó que a las 31 hpf comienza un claro fenómeno de asimetría, correspondiente a la aparición del órgano parapineal hacia el lado izquierdo del embrión. Estadios intermedios entre 28 y 31 hpf también fueron analizados, pero éstos no dieron cuenta de un cambio significativo respecto a lo estudiado (resultados no mostrados). Continuando en el desarrollo observamos que a las 32 hpf existe ya una tendencia definida a la asimetría dada por la aparición definitiva del órgano parapineal, ubicado en cercanías de la habénula izquierda. El 66,7% de los embriones analizados presentó esta tendencia (n = 6). Alrededor de las 35-40 hpf se observa claramente la expresión de *cxcr4b* en la región anterior y medial de ambas habénulas. Es interesante resaltar que existe una diferencia en la extensión del dominio de expresión habenular entre los lados izquierdo y derecho. Al respecto la figura 9 nos muestra un gráfico que nos indica que existe un mayor porcentaje

de embriones que a las 40 hpf presenta un dominio de expresión de *cxcr4b* más grande en la habénula izquierda que en la derecha.

Resulta importante destacar que a las 40 hpf existe una transición complejo pineal-habénula, ya que aquí es donde desaparece definitivamente la expresión de la pineal y se observa nítidamente la expresión del territorio habenular. Finalmente desde las 40 hpf hasta por lo menos a las 48 hpf la expresión de *cxcr4b* a nivel de la región más anterior de ambas habénulas se mantiene, con un aumento de la expresión proporcional al estadio del desarrollo del embrión.



**Figura 8. HIS de *cxcr4b* en embriones de pez cebra a distintos estadios del desarrollo.** Vista dorsal con región anterior hacia arriba; el recuadro inferior de cada figura corresponde a una vista lateral con la región anterior hacia la izquierda de la página. Las flechas verdes indican la habénula izquierda y las flechas rojas indican la marca del órgano parapineal. Aumento 40X.



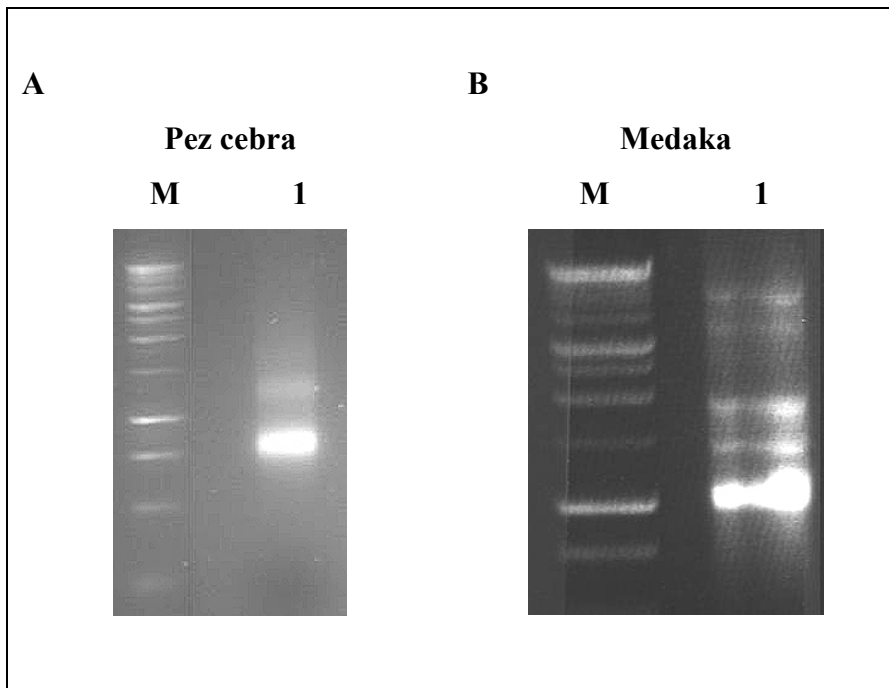
**Figura 9. Gráfico que muestra el porcentaje de embriones con diferencias en la extensión del dominio de expresión de *cxcr4b* en ambas habénulas.**

Embriones analizados a las 40 hpf. Con n= 90. Izquierda (I), Derecha (D).

La presencia de diferencias en la extensión del dominio de expresión de *cxcr4b* fueron fácilmente reconocibles por inspección visual bajo microscopía.

### **3.3 El factor de transcripción *pitx2c* es expresado en la habénula izquierda de pez cebra y medaka desde períodos tempranos en el que se establecen las asimetrías cerebrales, hasta períodos más tardíos de la morfogénesis asimétrica.**

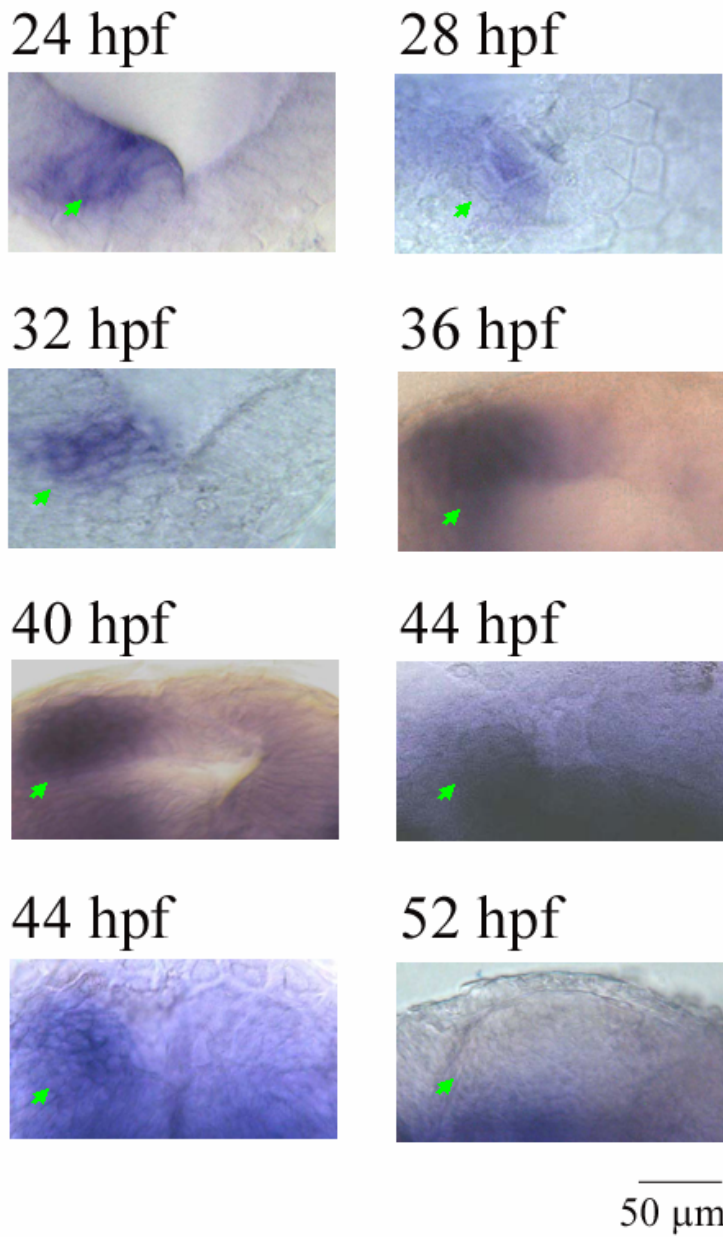
Inicialmente, y al igual que en casos anteriores se procedió a la construcción de las ribosondas de *pitx2c* para pez cebra y medaka, para lo cual se muestra la transcripción *in vitro*, es decir, el proceso final de esta etapa en la figura 10. A partir de estas sondas se realizó HIS en ambos modelos de peces.



**Figura 10. Transcripción *in vitro* de *pitx2*.**

(A) mRNA de *pitx2c* de pez cebra. (B) mRNA de *pitx2c* de medaka. A y B electroforesis en gel de agarosa al 1%, carril 1 en ambos casos corresponde al transcrito. M = marcador de peso molecular.

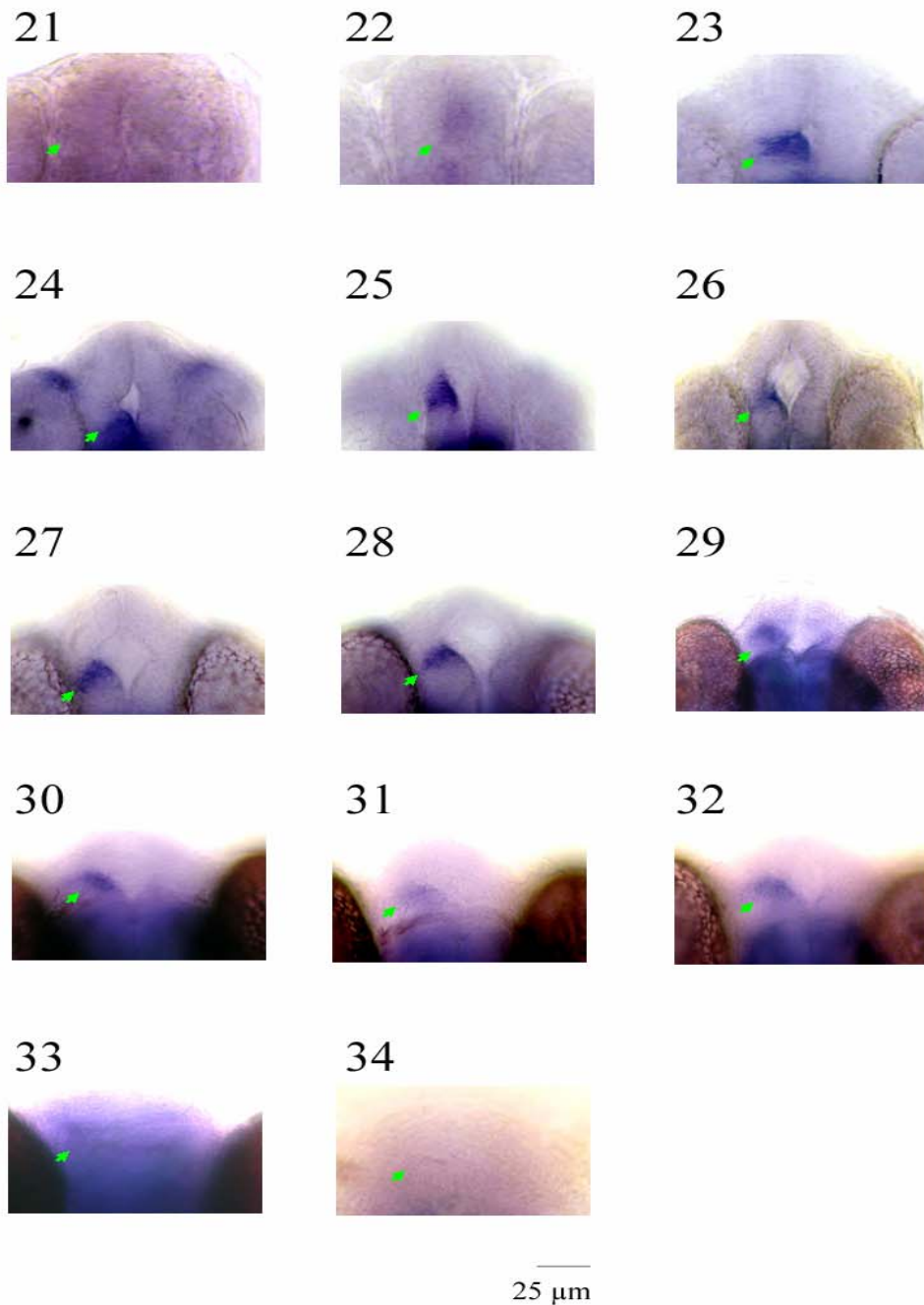
Estudios previos en pez cebra indicaban que la expresión de *pitx2* comienza a los 18 somitos y continúa por lo menos hasta las 22 hpf (Concha y cols., 2000). En nuestros experimentos de HIS abarcamos una ventana de desarrollo que comprende desde las 24 hpf hasta las 40 hpf, con el fin de determinar si *pitx2c* podría estar actuando durante etapas tardías de la morfogénesis asimétrica habenular. Los resultados del patrón de expresión se muestran en la figura 11. En ella se observa que *pitx2c* se expresa unilateralmente en la región habenular izquierda durante toda la ventana temporal analizada. Por ello se realizó HIS en estadios posteriores, estableciéndose que la expresión de *pitx2c* permanece hasta las 48 hpf.



**Figura 11. HIS de *pitx2c* en embriones de pez cebra a distintos estadios del desarrollo.** Vista dorsal del embrión con la región anterior hacia arriba. El recuadro inferior de cada figura corresponde a una vista lateral con la región anterior hacia la izquierda de la página. Las flechas verdes indican la habénula izquierda. Las etapas de desarrollo de pez cebra se indican como horas post-fertilización (24 a 52 horas). Aumento 40X.



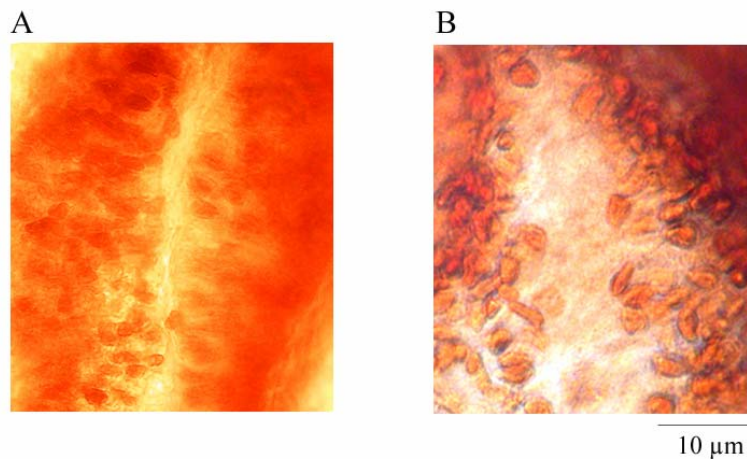
En medaka, estudios preliminares de nuestro laboratorio sugieren que la expresión de *pitx2c* comenzaría alrededor de los estadios 21-22 y que se extendería hasta los estadios 33-34. Por ello, determinamos el patrón de expresión de *pitx2c* entre estos estadios. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 12. Aquí se observa, al igual que en pez cebra, que la expresión de *pitx2c* está restringida a la región habenular izquierda, y que se extiende desde el estadio 22 (1 día 14 hrs.) hasta el 33 (4 días 10 hrs.), no observándose en el estadio 34.



**Figura 12. HIS de *pitx2c* en embriones de medaka a distintos estadios del desarrollo.** Vista dorsal con la región anterior hacia arriba. Las flechas verdes indican la habénula izquierda. Los números indican los estadios del desarrollo de medaka entre 1 día 10 hpf (estadio 21) hasta 5 días 1 hpf (estadio 34). Aumento 20X.

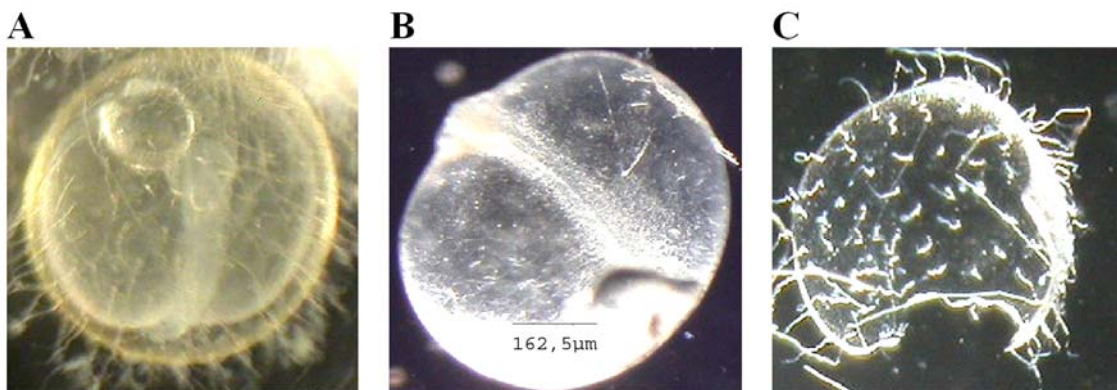
### 3.4 Incorporación de BrdU en pez cebra y medaka.

Se estandarizó el protocolo de incorporación de BrdU, ó 5-Bromo-2'-Desoxiuridina, en pez cebra. Para ello se utilizó un protocolo adaptado del Dr. Craig Miller del Instituto de Neurociencia de la Universidad de Oregón. El pez cebra, en este caso particular, presenta la cualidad de poseer un corion bastante blando, lo cual se detecta claramente frente a la manipulación mecánica, lo que permite que el embrión sea desprovisto de esta bicapa proteica fácilmente y así realizar operaciones en que se requiere de un embrión vivo y libre para el contacto con el agente a utilizar, en este caso BrdU. La figura 13 muestra una región del cerebro de un embrión de pez cebra que ha incorporado exitosamente BrdU. En un experimento de incorporación típico se puede observar que existe tinción a nivel de los núcleos en el embrión completo y no se logra distinguir la región que comprende ambas habénulas. Al respecto, se intentó identificar un marcador para esta zona (ver 3.1) y así mediante una posterior HIS para los embriones tratados con BrdU lograr identificar la región de interés. Este punto presentó un gran obstáculo, puesto que no se logró identificar este posible marcador y por lo tanto no se pudo determinar si existe una diferencia en la tasa de proliferación entre ambas habénulas.



**Figura 13. Incorporación de BrdU. A** Embrión de pez cebra. **B** Embrión de medaka. En ambos casos la vista es dorsal con anterior hacia arriba. Las flechas muestran núcleos que han sufrido incorporación de BrdU. Aumento 40X.

En medaka se determinó que el período del desarrollo en el cual se trabajaría correspondería al mismo espacio de tiempo en que se expresó *pitx2* (estadios 22-33), tratando de establecer una relación entre la expresión de este factor de transcripción y la proliferación celular, y en consecuencia con la generación de asimetrías cerebrales. Por lo tanto, también se estandarizó el protocolo de incorporación de BrdU, pero inicialmente el proceso fue distinto. Medaka presenta un corion bastante duro (13-15,3  $\mu\text{m}$  de grosor respecto a 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  en pez cebra) lo que por un lado presenta una gran ventaja al hacer muy resistentes a estos embriones, pero por otro lado dificulta mucho el trabajo con ellos si se quiere el embrión vivo y libre de su corion. Para remover el corion, se preparó un extracto de enzima de eclosión a partir de los mismos embriones de medaka (descrito en 2.2.5). Luego se intentó remover el corion con el uso de esta enzima (descrito en 2.2.6) (figura 14). El resultado de esto no fue óptimo, y sólo se logró remover el corion en embriones tardíos (a partir del estadio 28), los que tienen un corion más delgado respecto a embriones más tempranos. Se realizaron los ensayos de incorporación de BrdU en aquellos estadios de medaka en los cuales se pudo remover el corion.



**Figura 14. Embrión de medaka y su corion.**

(A) Embrión de medaka vivo de estadio 28 envuelto por una bicapa proteica, se observa la presencia de muchas vellosidades, las que darán origen a cráteres al ser tratado con enzima de eclosión y por los cuales se puede acceder a romper el corión. (B) Embrión vivo que se presenta en A pero que ha sido desprovisto del corion. (C) Corion que ha sido retirado mecánicamente del embrión con el uso de fórceps de relojero. Aumento 11,25 X.

Como se mencionó anteriormente (3.1), en el laboratorio se dispone de una línea transgénica de medaka que expresa GFP en ambas habénulas durante el desarrollo. Por ello, una vez que el embrión fue sometido al tratamiento con BrdU éste se analizó bajo luz fluorescente para determinar los niveles de proliferación en la región de interés. En este punto surgió un problema importante y fue que específicamente la región de las habénulas no emitía fluorescencia, determinando posteriormente que ésta se perdía luego del tratamiento con BrdU. Al respecto se intentó un nuevo procedimiento, el que consistió en hacer una inmunofluorescencia indirecta dirigida a las habénulas, posterior a la incorporación de BrdU y así detectar la zona de interés con un anticuerpo anti-GFP. El problema de esta segunda estrategia fue que los embriones que lograron incorporar el BrdU eran de un estadio de desarrollo avanzado, en donde su permeabilidad frente a distintos agentes es muy baja (diferente a un embrión temprano) lo que no permitió que ingresara el anticuerpo, pese a que se efectuaron varias alternativas de permeabilización. Finalmente, al igual que en pez cebra, en medaka se presentó la misma dificultad de la delimitación del complejo habenular y en consecuencia, no fue posible establecer si existe o no asimetrías de proliferación celular entre ambas habénulas con este experimento.

### **3.5 Inmunofluorescencia Indirecta doble contra GFP y PH3 revela diferencias de proliferación celular entre habénula izquierda y derecha en medaka.**

Actualmente se conoce que la fosforilación en el residuo serina 10 de histona H3 es crucial para la condensación del cromosoma y la progresión del ciclo celular durante la mitosis en células eucariontes. Al respecto, ha sido útil el desarrollo de anticuerpos específicos para la serina 10 de la histona H3 fosforilada (modificación covalente de la histona requerida para ejercer su actividad a nivel de la cromatina). El uso de este anticuerpo ha revelado que durante la mitosis la fosforilación de esta histona se origina en la heterocromatina pericéntrica y se extiende a través del genoma durante la transición de la fase G2-M (Nowak y Corces, 2004). De este modo, y conociendo la relación existente entre la histona

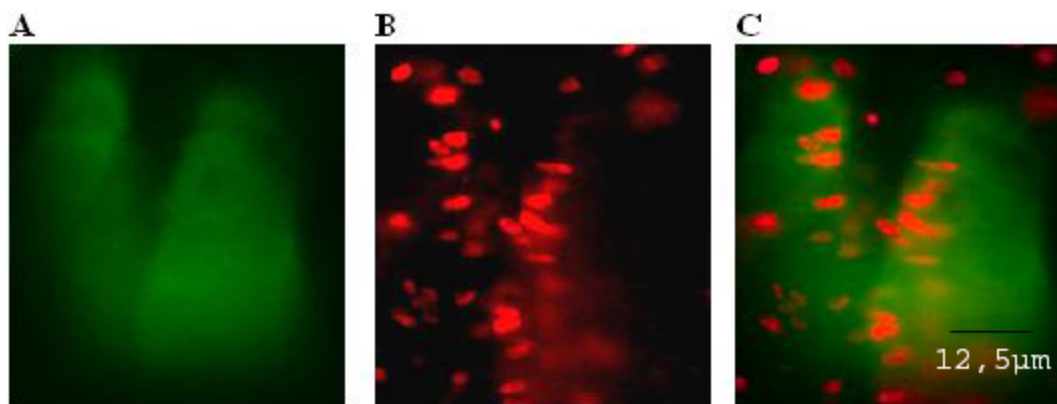
H3 fosforilada, la modificación de la cromatina y la actividad transcripcional, se podría determinar la proliferación a nivel de las células de la habénula.

Nuestra hipótesis de trabajo es que existe una diferencia a nivel de proliferación celular entre las habénulas izquierda y derecha, la que finalmente se traduciría en una diferencia de tamaño entre las habénulas izquierda y derecha. En este contexto se realizó una inmunofluorescencia indirecta dirigida contra epítopes de la histona H3 fosforilada, la serina 10.

Decidimos no realizar la inmunodetección de H3 fosforilada en pez cebra, dado que no establecimos un marcador específico habenular en esa especie. Sin embargo, en medaka y como se explicó anteriormente, existe la línea transgénica DE-EGFP, donde la expresión de GFP está restringida a la habénula. De esta forma, procedimos a verificar si nuestra hipótesis era correcta en esta especie.

Con el mismo razonamiento que para la incorporación de BrdU, se intentó estudiar los estadios comprendidos entre el estado 22 y el 33, no obstante desde el estadio 26 en adelante sucede el fenómeno de muy baja permeabilidad ya nombrado anteriormente (ver 3.4). Por lo tanto, concentramos nuestra atención a dos estadios, 22 y 26. El estadio 22 (9 somitos) corresponde al estado del desarrollo embrionario posterior a la formación del cerebro, el que se establece en el estadio 21 (4 horas de diferencia con el 22). Es decir, a este nivel ya se puede comenzar a observar claramente el fenómeno de las asimetrías cerebrales. Por otro lado, según nuestra hipótesis existe una correlación entre el fenómeno de proliferación con la expresión de *pitx2c*, la cual comienza en este estado. Por último, es a partir de este momento del desarrollo de medaka donde se logra observar en forma nítida la propiedad de emitir fluorescencia a nivel de la habénula. El estadio 26 (22 somitos) presenta 16 horas de diferencia con el estado 22.

Para nuestro análisis realizamos una doble inmunofluorescencia indirecta, tanto contra histona H3 fosforilada como contra GFP de expresión habenular (figura 15). Esta última detección era necesaria, puesto que la expresión de GFP se ve interferida después del tratamiento con el protocolo de inmunohistoquímica, igual a lo que se observó con los embriones tratados con BrdU, en los cuales la propiedad fluorescente de los embriones disminuía o desaparecía.

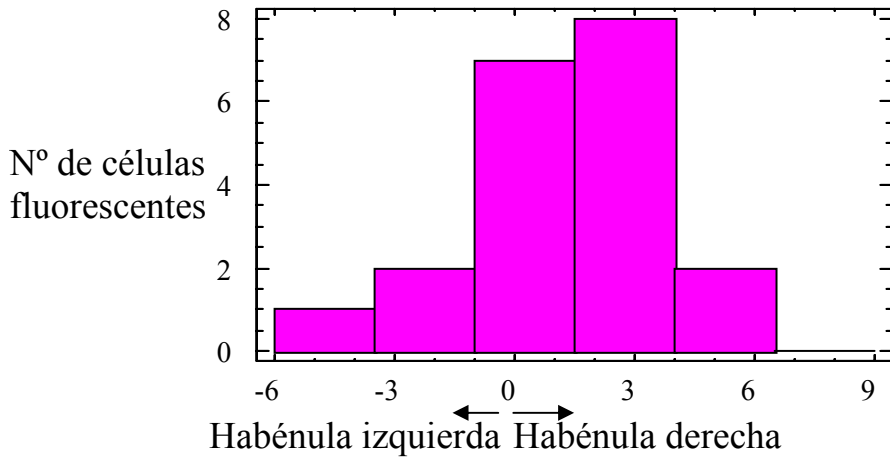


**Figura 15. Inmunofluorescencia indirecta doble en embrión de medaka.**

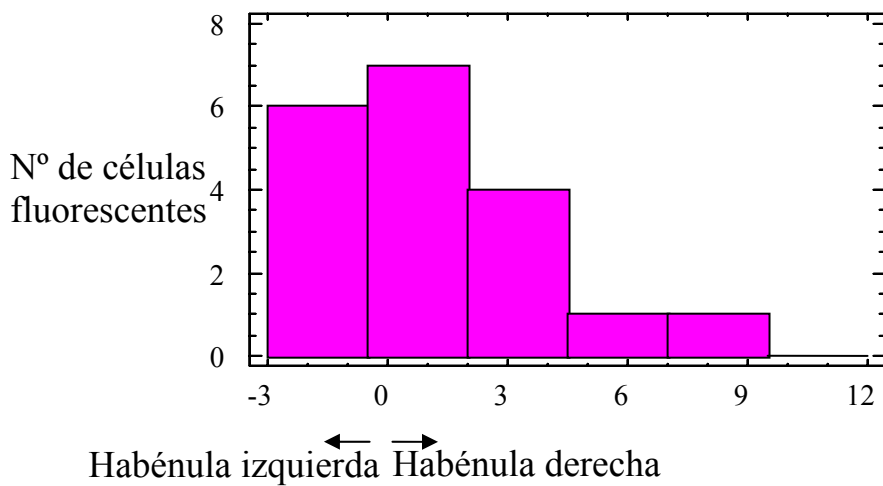
(A) Inmunofluorescencia indirecta contra GFP de expresión en la habénula, utilizando un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488. (B) Inmunofluorescencia indirecta contra histona H3 fosforilada en Serina 10, utilizando un anticuerpo secundario conjugado a biotina, y un sistema de amplificación de Rhodamina-Streptavidina. (C) Combinación de A y B. Vista dorsal con región anterior hacia arriba. Aumento 40X.

Una vez finalizada la inmunofluorescencia, se tomaron fotos digitales de fluorescencia de los distintos embriones, se procedió a contar el número de células positivas para histona H3 fosforilada en la región habenular izquierda y derecha, y se realizó el análisis estadístico de los datos. El resultado de este análisis muestra que los valores obtenidos se comportan siguiendo una distribución normal, en ambos estadios analizados (figura 16). La tabla 2 muestra los valores obtenidos del tratamiento estadístico, los que posteriormente se reflejan en la figura 17. Se observa que tras la evaluación del número promedio de células positivas para histona H3 fosforilada, para cada estadio del desarrollo analizado (22 y 26), existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos para cada mitad habenular. Estos datos evidencian que la habénula izquierda presenta un mayor número de células en proliferación marcadas con el anticuerpo anti-histona H3 fosforilada, respecto de la habénula derecha. Este hallazgo es consistente con la expresión concomitante de *pitx2* exclusivamente en la habénula izquierda, y con el mayor tamaño habenular izquierdo desarrollado con posterioridad en esta región del cerebro.

Histograma para estadio 22 Izq y Der



Histograma para estadio 26 Izq y Der



**Figura 16. Gráficos que representan la dispersión de los datos.** En ambos casos se observa que la distribución es normal y homogénea. El eje de la ordenada representa la frecuencia de repetición de los datos y el eje de la abcisa muestra el valor de la variable, en donde cada barra representa un valor de ésta. Para ambos casos analizados los valores de sesgo y curtosis (este último analiza el grado de concentración que presentan los valores alrededor de la zona central de la distribución) están dentro de los valores predeterminados que consideran una distribución normal.

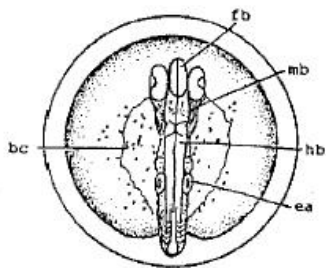
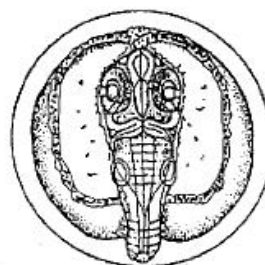
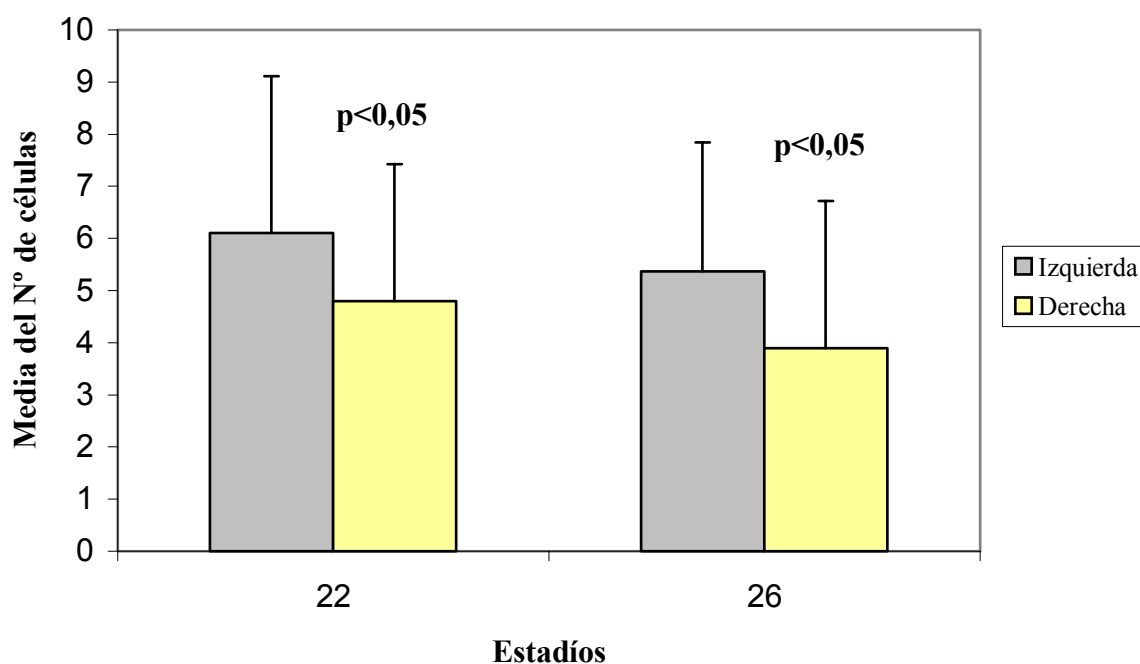


**Tabla 2. Análisis estadísticos de los resultados.**

	Estadio 22		Estadio 26	
n	20		19	
Media	I =6,10	D =4,80	I =5,37	D =3,89
Mediana	I =6,00	D =5,00	I =5,50	D =4,50
Desviación estándar	I =3,00	D =2,63	I =2,48	D =2,83
Prueba t usando la media, valor de p	<b>0,026</b>		0,032	
Prueba de medianas, valor de p	0,015		0,169* (único caso en donde $p > 0,05$ )	
Prueba de rangos, valor de p	0,019		<b>0,046</b>	

Los valores de p en negrita son los escogidos posteriores a un análisis más exhaustivo.

I= izquierda, D= derecha

**A****B****C**

**Figura 17. Esquema y gráfico de los estadios de medaka analizados.**

(A) medaka de estadio 22 (fb: cerebro anterior, mb: cerebro medio, hb: cerebro posterior, ea: vesícula ótica, bc: cavidad del cuerpo). (B) medaka de estadio 26. (C) Diferencia entre las medias del número de células en mitosis de las habénulas izquierda y derecha. Cada barra representa el promedio del número de células contadas positivas para anti-histona H3 fosforilada en cada mitad de la habénula. El estadio 22 presenta un  $n = 20$  con un valor de  $p = 0,026$ , mientras el estadio 26 tiene un  $n = 19$  con un valor de  $p = 0,046$ .

#### 4. DISCUSIÓN

La mayoría de los animales, con excepción de linajes que sufrieron divergencia temprana, presentan simetría bilateral, en donde los ejes que forman el cuerpo (A-P y D-V) están claramente organizados con los lados izquierdo y derecho alrededor de la línea media. Sin embargo, la mayoría de los individuos, sino todos, muestran algún grado de desviación de esta simetría bilateral, fenómeno que ocurre principalmente en la organogénesis. Por lo tanto, cabe preguntarse indiscutiblemente cuáles son los mecanismos celulares que conducen a la morfogénesis asimétrica. Uno de los órganos que presenta una evidente asimetría en su desarrollo es el cerebro. En humanos existe asimetría cerebral en regiones de la corteza a nivel de la fisura de Silvio, las que se correlacionan con diferencias funcionales cognitivas relacionadas al lenguaje entre los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo. En vertebrados no humanos también se ha descrito este fenómeno, por ejemplo en pez cebra existe una clara asimetría a nivel del epítalamo, formado por los complejos habenular y pineal, donde la habénula izquierda se extiende por un territorio más amplio respecto a la derecha y donde el órgano parapineal envía proyecciones exclusivas hacia el núcleo habenular izquierdo.

Uno de los objetivos de esta tesis fue determinar si las diferencias de tamaño entre los núcleos epitalámicos habenulares derecho e izquierdo se podrían deber a una diferencia en la tasa de proliferación de células que conforman la región habenular izquierda *versus* derecha. Para tal efecto, se decidió utilizar agentes que dieran cuenta de la actividad proliferativa de las células. Así, se determinó medir la incorporación de BrdU, reactivo que se incorpora en las células en fase S del ciclo celular, puesto que es un análogo de la timina. Por otro lado, se usó un anticuerpo específico contra la histona H3 fosforilada, que en forma indirecta detecta condensación de la cromatina y por lo tanto actividad mitótica. Se probaron ambas aproximaciones con el objetivo de evidenciar por caminos distintos nuestra hipótesis.

Estos ensayos de proliferación se realizaron en el embrión completo, por lo tanto todos los tejidos del organismo (que obviamente están proliferando, ya que se trabajó con estados tempranos del desarrollo donde las estructuras aún no están todas formadas)

responden a estos tratamientos. Al respecto, fue crucial poder identificar de alguna forma e inequívocamente la región de interés.

En el caso del pez cebra, a partir de datos preliminares de nuestro laboratorio y de colaboradores se estimaron algunos posibles marcadores de la región habenular (*cpd2*, *cxcr4b*, *fgf8*, *fspondin*, *lim LH 2A*, *lim LH 2B*, *robo 3*, *sdf1a*, *slit3* y *zic 5*). Se procedió a determinar el patrón de expresión de estos marcadores y analizar si coincidían con lo esperado; el resultado de esto fue que con ningún marcador era posible identificar clara e inequívocamente la región habenular completa en los estadios de nuestro interés. Por ejemplo, en el caso del factor de transcripción *Lim Lh2B*, conocido por ser un marcador de una región dorsal en ratón, la expresión estaba confinada al telencéfalo (figura 7), no obstante en algunos casos se observó tinción a nivel del diencéfalo, pero ésta era tan tenue que fue imposible distinguir si correspondía a una exposición prolongada del embrión al agente revelador (saturación) o si era la verdadera expresión esperada. En resumen, no se logró establecer si existe un marcador específico en pez cebra para la habénula entre las 24 y 40 hpf. Sin embargo, se sabe que existen marcadores habenulares más tardíos, como *cpd2* (proteína 2 asociada al desarrollo postnatal del cerebelo) que se expresa en estado larvario alrededor del cuarto dpf (Gamse y cols., 2003).

Al respecto, un resultado, que si bien es cierto no colaboró en el finalización exitosa del primer objetivo de este trabajo, pero no por eso menos relevante, es la aparición de *cxcr4b* como un posible candidato en el establecimiento de las asimetrías cerebrales. *Cxcr4* es un receptor de quimioquina acoplado a proteína G, que presenta dos variantes, *cxcr4a* y *cxcr4b*. *Cxcr4* es reconocido por ser requerido en células germinales para su quimiotaxis guiándolas hacia su tejido blanco, dirigiendo su migración (Knaut y cols., 2003). Esta función resulta interesante al analizar los resultados obtenidos (figura 8); estos nos dicen que *cxcr4b* se expresa en la zona del diencéfalo, donde a las 28 hpf ya presenta una clara diferencia en su expresión en ambos lados del cerebro, siendo prácticamente en todos los casos el izquierdo mayor que el derecho, por lo cual desde este estadio en adelante existe una notoria tendencia a la asimetría. Otro fenómeno de asimetría es la aparición de la glándula parapineal a las 31 hpf y como está descrito hacia el lado izquierdo del cerebro. Finalmente se pudo establecer que a partir de las 40 hpf ya existe una clara formación de la habénula, y como en casos anteriores nuevamente existe una diferencia de tamaño entre la extensión del dominio de expresión de *cxcr4b* entre la habénula izquierda y derecha, siendo

en el 81,1% de los casos analizados la izquierda mayor que la derecha (figura 9). Aún no es claro cual es la función de *cxcr4b* en el desarrollo de las asimetrías habenulares. Sin embargo, ya que *cxcr4b* tiene un papel claro en la migración de grupos celulares, es posible que su expresión habenular cumpla alguna función en el desarrollo del patrón de conectividad habenular hacia el núcleo interpeduncular (NIP) del cerebro medio ventral. En este núcleo, las proyecciones eferentes provenientes de la habénula izquierda y derecha presentan una segregación en sus regiones dorsal y ventral (Aizawa y cols. 2005).

Dentro del mismo contexto de la búsqueda de un marcador habenular y contrastando al pez cebra, en medaka se dispone de una línea transgénica (la línea DE::EGFP) que expresa la proteína fluorescente verde bajo el control de un promotor específico para la habénula. Esta característica particular y junto con saber que medaka presenta asimetrías cerebrales similares al pez cebra, condujeron en esta tesis al estudio comparativo de ambas especies de teleósteos.

Una similitud importante para nuestro estudio entre estos dos peces, es la expresión del factor de transcripción *pitx2c*. Este último cumple una función importante en el desarrollo de las asimetrías cerebrales, ya que es un efector de la vía de señalización Nodal, que como se ha descrito, es la principal vía genética involucrada en los mecanismos moleculares de establecimiento de asimetrías en el eje izquierda derecha. Un ejemplo de evidencia del papel de *pitx2c* a nivel de asimetrías, es el estudio realizado con diversos mutantes de esta vía (Concha y cols., 2000). En ellos, la línea media (región que separa espacialmente la mitad derecha de la izquierda) está parcial o completamente ausente y muestran una expresión de *pitx2c* bilateral, junto a un defecto en la lateralidad de las asimetrías cerebrales. Dentro de este contexto, se realizó un estudio en ambas especies de peces para establecer el patrón témporo-espacial de expresión de este factor de transcripción. Los resultados (figuras 11 y 12) describen que su expresión es unilateral y en la mitad izquierda del diencefalo. En pez cebra, estudios publicados (Concha y cols., 2000) muestran que la expresión de *pitx2c* comienza a las 18 hpf y se extiende hasta las 22 hpf. En este trabajo encontramos que la expresión de este marcador se extiende más allá de las 22hpf hasta las 48 hpf. En medaka la expresión de *pitx2c* comenzó en el estadio 22 (34 hpf) y se extendió hasta el estadio 33 (4,17 dpf), desapareciendo en el estadio 34. A esta altura y en ambos modelos ya se han formado las estructuras principales del organismo, es decir, en pez cebra se ha completado la morfogénesis rápida de los sistemas de órganos primarios y

en medaka ya han aparecido los órganos más importantes, como por ejemplo el hígado, y aquellos que no se han desarrollado por completo, ya se presentan en forma rudimentaria, como es el caso del corazón que no se ha desarrollado en su totalidad, pero que ya está latiendo. Estos hechos demuestran de alguna forma que *pitx2c* no sólo actuaría en niveles tempranos del desarrollo, sino que además tendría un rol específico en estados del desarrollo más avanzados, asignándole a este una importante función durante la morfogénesis asimétrica.

Por otro lado, se ha descrito que Pitx2 participa en la vía de señales Wnt, ejerciendo un rol a nivel de proliferación celular. La familia de proteínas de señales Wnt participa en múltiples eventos del desarrollo durante la embriogénesis, induciendo varias respuestas celulares, desde la proliferación celular a la determinación de destino celular y diferenciación terminal (Logan y Nusse, 2004). Estudios recientes han determinado que existe un grupo de órganos donde las señales Wnt proveen una regulación crítica, y estos expresan Pitx2, que como se ha descrito ejerce distintos roles en el desarrollo. En este contexto, Pitx2 actuaría como un factor de competencia en combinación con ciertas vías de señales para mediar el control de la proliferación celular de tipo específica. La vía Wnt/Dvl/ $\beta$ -Catenina $\rightarrow$ Pitx2 opera en tejidos específicos para controlar la proliferación por regulación de la expresión de genes críticos que controlan el ciclo celular en G1. Esta relación entre Pitx2 y proliferación, de alguna forma establecía una unión entre los antecedentes inicialmente descritos, es decir, la asimetría en el tamaño de las habénulas y la participación de Pitx2 en la vía Nodal que regula estas asimetrías (Kioussi y cols., 2002). De acuerdo a esto, y como ya se mencionó anteriormente, se determinó realizar ensayos de proliferación y de expresión de *pitx2* en ambos modelos.

El primero de los ensayos de proliferación consistió en hacer experimentos de incorporación de BrdU, el que no arrojó resultados, debido a que ambos modelos presentaron limitantes: por un lado, en pez cebra no se logró encontrar un marcador que identificara la región de estudio y por lo tanto ésta no se pudo delimitar en el embrión completo; por otro lado en medaka, en estadios tempranos del desarrollo, la dureza del corion que lo envuelve no permitió el acceso al embrión vivo, mientras que en estadios más avanzados, en los cuales se pudo remover el corion del embrión, la permeabilidad de este último no permitió que ingresara el anticuerpo utilizado en el proceso.

El segundo ensayo realizado presentó también algunas limitantes, similares a las anteriores. En el caso de pez cebra no fue posible realizar el estudio debido al ya conocido inconveniente ya discutido de la ausencia de un marcador para habénula. En medaka, sin embargo, se logró obtener resultados al respecto, por lo menos en estados tempranos del desarrollo, puesto que en estados más avanzados sucede lo indicado anteriormente, es decir, el anticuerpo usado en el experimento no puede penetrar al embrión debido a la mala permeabilidad de este. Los resultados que se obtuvieron en medaka en este ensayo (figura 17) nos indican que existe una diferencia significativa entre el número de células en proliferación que presentan cada habénula, a modo que el lado izquierdo presenta mayor número de éstas respecto al derecho, estableciendo que por lo menos en medaka la habénula izquierda presenta una mayor tasa de proliferación que la habénula derecha.

Para comprobar si esta actividad proliferativa de las células esta regulada de alguna forma por *pitx2c* se deberá realizar una serie de experimentos, entre ellos será fundamental realizar estudios de ganancia y pérdida de función de *pitx2c*. Para los estudios de ganancia se puede realizar una sobreinyección de mRNA sentido de *pitx2c* en embriones silvestres, mientras que para los estudios de pérdida de función, el ideal es el uso de oligonucleótidos antisentidos del tipo morfolino contra *pitx2c*. En ambos casos se debería observar un efecto de la función de *pitx2* sobre la tasa de proliferación celular en la habénula, utilizando el ensayo con el anticuerpo contra histona H3 fosforilada.

Actualmente, en nuestro laboratorio se está generando un anticuerpo contra *pitx2* y en consecuencia, se podrán realizar estudios de inmunocitoquímica. El análisis mediante anticuerpos es de gran importancia, puesto que permite ir un paso más allá en la investigación, ya que a este nivel no se determina qué sucede con el transcrito, sino qué sucede con la proteína misma.

Por otro lado, en medaka ha aparecido un marcador bilateral para habénula (estudios no publicados del laboratorio en conjunto con el Dr. Joachim Wittbrodt) llamado *brn3a*, el que se sabe se expresa a partir del estadio 32 en adelante. Aún no se han realizado estudios en embriones más tempranos, pero si éste se expresara más tempranamente (estadios menores de 32) sería posible realizar experimentos de incorporación de BrdU, acoplados a HIS para así reconocer la región de interés.

Por último, hemos tratado de aportar en algunos aspectos a la comprensión del proceso de generación de las asimetrías cerebrales en pez cebra y medaka, utilizando estrategias que corresponden a ciencia básica para en algún momento llegar a niveles más aplicados del conocimiento. El objetivo de nuestro laboratorio es finalmente seguir una aproximación que se inicia con el conocimiento de la genética (vías y genes participantes en la generación de asimetrías), continuando con la morfología (citoarquitectura, tipos celulares, conectividad), fisiología (neurotransmisión, actividad neuronal) y llegando finalmente a conocer el comportamiento animal (localización de funciones neuronales y dominancia hemi-cerebral izquierda derecha), el que a través de la evolución se une nuevamente con la genética generando un circuito en la filogenia animal.



## 5. CONCLUSIONES

- Hasta el momento no logramos identificar un gen que sea un buen marcador molecular bilateral de la región completa de la habénula en pez cebra entre las 24 y 40 hpf.
- El pez teleosteo medaka es un modelo útil para trabajar en el desarrollo de asimetrías cerebrales.
- El receptor de quimioquina *cxcr4b* es un marcador bilateral de la región más anterior de la habénula de pez cebra. Su expresión se extiende por lo menos desde las 24 hpf hasta las 48 hpf, y presenta una clara tendencia a expresarse en forma asimétrica en el cerebro de pez cebra.
- La expresión del factor de transcripción *pitx2* en los modelos estudiados es unilateral en el diencéfalo. En pez cebra comienza a las 18 hpf y finaliza a las 48 hpf, mientras que en medaka su expresión se inicia en el estadio 22 y se extiende hasta el 33, para desaparecer en el estadio 34. En ambos casos la expresión de *pitx2* comienza entonces en estados tempranos del desarrollo y termina cuando ya ha comenzado la morfogénesis asimétrica del sistema nervioso central.
- El número de células en proliferación presentes en la habénula izquierda y derecha de medaka muestra diferencias significativas en los grupos analizados, en donde la mitad izquierda presenta un mayor número que la mitad derecha.
- El patrón de expresión de *pitx2* en la habénula izquierda de medaka es coincidente temporal y espacialmente con el desarrollo de una mayor tasa de proliferación celular en comparación con la habénula derecha, lo que sugiere un posible papel de *pitx2* en la generación de asimetrías de proliferación dentro del epitalamo.

## 6. Referencias

**Aizawa H**, Bianco IH, Hamaoka T, Miyashita T, Uemura O, Concha ML, Russel C, Wilson SW, Okamoto H. (2005). Laterotopic representation of left-right information onto the dorso-ventral axis of a zebrafish midbrain target nucleus. *Current Biology*, 15: 238-242.

**Bisgrove B**, Essner J, Yost H. (2000). Multiple pathways in the midline regulate concordant brain, heart and gut left-right asymmetry. *Development*, 127: 3567-3579.

**Boorman C**, Shimeld S. (2002). The evolution of the left-right asymmetry in chordates. *BioEssays*, 24: 1004-1011.

**Burdine R**, Schier A. (2000). Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation. *Genes Dev*, 14: 763-776.

**Capdevila J**, Vogan K, Tabin C, Izpisua J. (2000). Mechanisms of left-right determination in vertebrates. *Cell*, 101: 9-21.

**Challa A**, Beattie C, Seeger M. (2001). Identification and characterization of *roundabout* orthologs in zebrafish. *Mech Dev*, 101: 249-253.

**Chong S**, Emelyanov A, Gong Z, Korzh V. (2001). Expression pattern of two zebrafish genes, *cxcr4a* and *cxcr4b*. *Mech Dev*, 109: 347-354.

**Concha M**, Burdine R, Russel C, Schier A, Wilson S. (2000). A Nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron*, 28: 399-409.

**Concha M**, Wilson S. (2001). Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J. Anat*, 199: 63-84.

**Concha M**, Russell C, Regan J, Tawk M, Sidi S, Gilmour D, Kapsimali M, Sumoy L, Goldstone K, Amaya E, Kimelman D, Nicolson T, Grunder S, Gomperts M, Clarke J, Wilson S. (2003). Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality. *Neuron*, 39: 423-438.

**Concha M**. (2004). The dorsal diencephalic conduction system of zebrafish as a model of vertebrate brain lateralisation. *NeuroReport*, 15: 1843-1845.

**Essner J**, Branford W, Zhang J, Yost J. (2000). Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by *pitx2* isoforms. *Development*, 127: 1081-1093.

**Fishman M.** (2001). Zebrafish- the canonical vertebrate. *Science*, 294: 1290-1291.

**Furutani-Seiki M**, Wittbrodt J. (2004). Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech Dev*, 121: 629-637.

**Gage P**, Suh H, Camper S. (1999). The bicoid- related *Pitx* gene family in development. *Mamm Genome*, 10: 197-200.

**Gamse J**, Sive H. (2000) Vertebrate anteroposterior patterning: the *Xenopus* neurectoderm as a paradigm. *Bioessays*, 22: 976-86.

**Gamse J**, Thisse C, Thisse B, Raymond P, Halpern M. (2003). The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon. *Development*, 130: 1059-1068.

**Hamada H**, Meno Ch, Watanabe D, Saijoh Y. (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nature*, 3: 103-113.

**Harvey R** .(1998). Links in the left/right axial pathway. *Cell*, 95: 273-276.

**Higashijima S**, Nose A, Eguchi G, Hotta Y, Okamoto H. (1997). Mindin/f-spondin family: novel ECM proteins expressed in the zebrafish embryonic axis. *Dev Biol*, 192: 211-227.

**Ishikawa Y.** (1997). Embryonic development of the medaka brain. *The Fish Biology Journal MEDAKA*, 9: 17-31.

**Jessell T.** (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Neurosci*, 1: 20-29.

**Jowett T**, Lettice L. (1994). Whole mount *in situ* hybridization on zebrafish embryos using a mixture digoxigenin labelled probes. *Trends Gen*, 10:73-74.

**Jowett T.** (2001). Double *in situ* hybridization techniques in zebrafish. *Methods*, 23:345-358.

**Kioussi C**, Briata P, Hee S, Rose D, Hamblet N, Herman T, Ohgi K, Lin Ch, Gleiberman A, Wang J, Brault V, Ruiz-Lozano P, Nguyen H, Kemler R, Glass C, Wynshaw-Boris A, Rosenfeld M. (2002). Identification of a Wnt/Dvl/B-Catenin→ Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell*, 111: 673-685.

**Knaut H**, Werz C, Geisler R, The Tübingen Screen Consortium, Nüsslein-Volhard C. (2002). A zebrafish homologue of chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature*, 421: 279–282.

**Levin M**, Mercola M. (1998). Gap junctions are involved in the early generation of left–right asymmetry. *Dev Biol*, 203: 90–105.

**Levin M**, Mercola M. (1999). Gap junction-mediated transfer of left–right nodal evolve? The lack of involvement of Pitx in asymmetry in patterning signals in the early chick blastoderm is upstream of Shh asymmetry in the node. *Development*, 126: 4703–4714.

**Liang J**, Etheridge A, Hantsoo L, Rubinstein A, Nowak J, Izpisua J, Halpern M. (2000). Asymmetric nodal signaling in the zebrafish diencephalon positions the pineal organ. *Development*, 127: 5101-5112.

**Logan C**, Nusse R. (2004). The wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20: 781-810.

**Long S**, Ahmad N, Rebagliati M. (2003) The zebrafish *nodal*-related gene *southpaw* is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. *Development*, 130: 2303-2316.

**Mercola M**, Levin M. (2001) Left–right asymmetry determination in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17: 779–805.

**Nonaka S**, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M, Hirokawa N. (1998). Randomization of left–right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*, 95: 829–837.

**Nowak S**, Corces V. (2004). Phosphorylation of histone H3 a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet*, 20: 214-220

**Pichler F**, Laurenson S, Williams L, Dodd A, Copp, Love D. (2003). Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. *Nature Biotechnology*, 21:879-883.

**Piedra M**, Icardo J, Albajar M, Rodriguez-Rey J, Ros M. (1998). *Pitx2* participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell*, 94: 319-324.

**Ryan A**, Blumberg B, Rodriguez C, Yonei-Tamura S, Tamura K, Tsukui T, De la Peña J, Sabbagh W, Greenwald J, Choe S, Norris D, Robertson E, Evans R, Rosenfeld M, Izpisua J. (1998). *Pitx2* determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature*, 394: 545-551.

**Sandyk R**. (1991). Relevance of the habenular complex to neuropsychiatry: a review and hypothesis. *Int J Neurosci*, 61: 189-219.

**Shapleske J**, Rossell S, Woodruff P, David A. (1999). The planum temporale: a systematic, quantitative review of its structural, functional and clinical significance. *Brain Res Rev*, 29: 26-49.

**Sutherland R.** (1982). The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci Biobehav Rev*, 6: 1-13.

**Toyama M**, Gómez D, Mana M, Dawid I. (2004). Sequence relationships and expression pattern of zebrafish *zic2* and *zic5* genes. *Gene Expr Patterns*, 4:345-350.

**Vallortigara G**, Rogers L, Bisazza A. (1999). Possible evolutionary origins of cognitive brain lateralisation. *Brain Res Rev*, 30: 164-175.

**Westerfield M**. (1995). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) University of Oregon Press, 3<sup>rd</sup> edition.

**Wittbrodt J**, Shima A, Schartl M. (2002). Medaka- A model organism from the far east. *Nature*, 3: 53-64.

**Wittbrodt J**, Loosli F, Schartl M, Driever W, Shima A, Westerfield M. (2002). EMBO practical course on molecular and genetic tools for the analysis of medaka and zebrafish development.

**Wright C**. (2001). Mechanisms of Left-Right Asymmetry: What's Right and What's Left?. *Dev Cell*, 1: 179-186.

**Yoshioka H**, Meno Ch, Koshiba K, Sugihara M, Itoh H, Ishimaru Y, Inoue T, Ohuchi H, Semina E, Murray J, Hamada H, Noji S. (1998). *Pitx2*, a bicoid- type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell*, 94: 299-305.