

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**FUNCION DE N-CADHERINA EN EL PROCESO DE
INTERCALACION RADIAL DURANTE LA EPIBOLIA DE
PEZ CEBRA**

VALERIA CAROLINA LARENAS HERNANDEZ

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN BIOMEDICINA CELULAR Y
MOLECULAR.**

**Director de Tesis
Prof. Dr. Miguel Concha Nordemann.**

2014

RESUMEN

El primer movimiento morfogenético observado durante el desarrollo temprano del pez cebra es la epibolia. Durante este movimiento las blastómeras profundas emitirían protrusiones de manera polarizada hacia las capas más superficiales del blastodermo, interdigitándose entre células adyacentes. Este comportamiento es denominado intercalación radial, evidencia de este mecanismo proviene de estadios tardíos (80 % epibolia) sin embargo con evidencia proveniente de tinciones vitales se ha propuesto su existencia y se ha sugerido como un proceso con el cual se inicia la expansión del blastodermo. Durante estadios tempranos se han descrito moléculas de adhesión que estarían mediando este proceso. E-Cadherina participaría en el proceso de epibolia, sin embargo, el papel de N-Cadherina aún no es claro. Embriones de pez cebra mutantes para *n-cadherina* no presentan alteraciones aparentes durante la epibolia pero sí en estadios posteriores. Dicho mutante presenta alteraciones en la adhesión de células neuroepiteliales provocando problemas en el cierre del tubo neural. Embriones morfantes de *n-cadherina* demostraron el rol de esta molécula a nivel celular donde se observa una alteración de la polaridad, persistencia y número de protrusiones de células neuroepiteliales, lo que impide el correcto cierre del tubo neural, esto se traduce en defectos durante la intercalación medio lateral, fenómeno presente durante el cierre del tubo neural.

Este trabajo describe un posible rol de N-Cadherina en la orientación del movimiento de intercalación radial, además de su participación en la regulación de la dinámica de las blastómeras profundas en etapas tempranas del desarrollo de pez cebra.

ABSTRACT

Epiboly is the first movement observed during the zebrafish development. During this process, deep cells exhibit polarize protrusions toward the superficial blastoderm layer, migrating through adjacent cells. This particular behavior has been called radial intercalation, the mechanism's strongest evidence comes from late developmental stages (around 80% epiboly), nevertheless there are studies from vital staining that propose their existence and suggest it could be the first hallmark of development during the initial blastoderm expansion.

In early stages of development it has been described that adhesion molecules mediate this process. E-Cadherin could be involved in epiboly, nevertheless N-Cadherin role is still unclear. *n-cadherin* mutant zebrafish embryo doesn't exhibits apparent phenotype during epiboly, but they do in later stages. Those mutants show adhesion problems in neuroepithelial cells which induce problems during neural tube closure. *n-cadherin* morphants embryos exhibit problems with polarity, persistence and protrusion, demonstrating the molecule role at cellular level (neuroepithelial cells). These problems cause medio-lateral intercalation defects causing an aberrant neural tube closure.

This thesis describes the that could have N-Cadherin in radial intercalation movement. Also, N-Cadherin could be related in the deep cell dynamics regulation in early stages of zebrafish development.

1. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo embrionario se han descrito una serie de eventos que involucran una constante reorganización de los distintos tipos celulares mediante movimientos celulares individuales y colectivos (Kimmel C., 1995). Estos se encuentran comandados por señales intracelulares así como señales extracelulares.

El estudio del desarrollo embrionario se ha apoyado en modelos que presentan notorias ventajas para la experimentación, entre ellos destacan *Xenopus laevis*, *Danio rerio* y *Mus musculus*. Las ventajas de estos modelos se centran en su fácil manipulación, mantención y disponibilidad de información genética.

1.1 Pez Cebra como modelo del desarrollo embrionario temprano

Danio rerio, es un pez teleósteo e importante modelo para la investigación de mecanismos celulares y moleculares que dirigen el desarrollo de tejidos en sus etapas tempranas. Esto se debe a la excepcional combinación de desarrollo exoútero, transparencia de sus embriones, rápido desarrollo, numerosa descendencia, fácil manipulación y disponibilidad de información genética.

1.2 Etapas del desarrollo temprano del pez cebra

El proceso de morfogénesis temprana se encuentra definido por las siguientes etapas consecutivas: clivaje, blástula y gastrulación.

Clivaje ($3/4$ - $2 1/4$ horas post fertilización, hpf): Etapa que se caracteriza por sucesivas divisiones celulares de manera sincrónicas cada 15 minutos. La segmentación del embrión es de tipo meroblástica o incompleta, donde las divisiones solo afectan al blastodermo y no al vitelo.

Blástula ($2 1/4$ - $5 1/4$ hpf): Esta etapa se define por la presencia de una "estereoblastula" la cual contiene un pequeño espacio extracelular irregular dentro del

blastodermo. En la blástula del pez cebra se pueden observar 3 tipos celulares distintos (Figura 1):

- **Células de la capa envolvente (EVL, del inglés enveloping layer):** Epitelio plano mono estratificado, cuya función principal es protectora. Se ubica en la parte mas superficial del blastodermo. Este tipo celular dará origen a la peridermis y se considera material extra embrionario ya que es liberado durante el desarrollo tardío.
- **Blastómeras profundas (BP):** Se ubica bajo la EVL, este tipo celular dará origen al embrión propiamente tal.
- **Capa sincicial del vitelo (YSL, del inglés yolk syncitial layer):** Corresponde a un sincicio de núcleos formado a partir de la fusión de BP marginales y la subyacente liberación de sus núcleos al vitelo (Trinkaus, 1993). Posteriormente, estos núcleos experimentan sucesivas rondas de duplicación (dentro del vitelo) formando una capa que se encuentra en estrecho contacto con las células de la EVL ubicadas en el borde del blastodermo (Figura 1). Al igual que ocurre con las células de la EVL, los núcleos de la capa sincicial YSL del vitelo son eliminados en etapas tardías, considerándose un componente extra-embionario.

Gastrulación, esta etapa del desarrollo, se caracteriza por un conjunto de movimientos morfogénéticos que subyacen la formación de las capas germinales del embrión. Estos cambios globales en la forma en la que se organizan dichas capas responden a un grupo de 4 movimientos morfogénéticos, cada uno de ellos modifica de manera distinta la forma del embrión (Solnica-Krezel L., 2006).

- **Epibolia**, permite la expansión del tejido usualmente asociado con el adelgazamiento del blastodermo.
- **Internalización del endomesodermo**, Corresponde al movimiento de células tanto del endodermo como del mesodermo los cuales se desplazan bajo el ectodermo.

- **Convergencia**, movimiento de células en dirección a la línea media el cual permite reducir la superficie que abarcan los tejidos.
- **Extensión**, movimiento que permite la elongación de los tejidos en dirección rostro caudal.

En esta tesis nos centraremos en la etapa de la epibolia. La epibolia, ha sido definida como el adelgazamiento y expansión del blastodermo sobre el vitelo hasta cubrirlo completamente. Se inicia durante el periodo de blástula tardía y sigue su desarrollo durante la gastrulación. La forma del blastodermo varía durante la epibolia, disminuyendo considerablemente el número de capas de células que lo componen. Se ha propuesto que esta disminución es mediada por un mecanismo denominado intercalación radial, el cual sería el motor de la epibolia en las etapas tempranas del desarrollo.

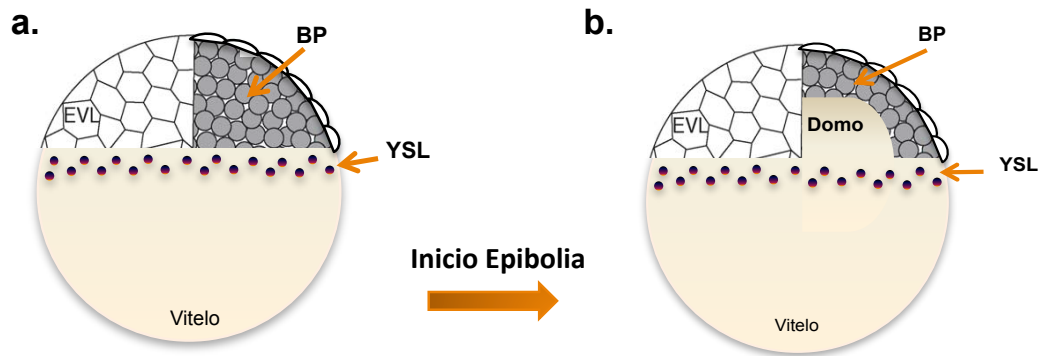


Figura 1: Estadios del desarrollo del embrión de pez cebra. El embrión de pez cebra consta de un saco vitelino y el blastodermo, este último se compone de 3 tipos celulares: EVL, una monocapa de células epiteliales ubicadas en la zona más externa del embrión, que dará origen a la peridermis del embrión; BP, macizo celular ubicado dentro del blastodermo que dará origen al embrión propiamente tal; YSL, generado a partir del colapso de las BP cercanas al vitelo liberando sus núcleos dentro de éste **a.** Estadio de esfera (4 hpf), estadio previo al inicio de la epibolia, la figura muestra un corte de la capa superficial, EVL, para visualizar las BP que se encuentran dentro del blastodermo **b.** Domo (4,3 hpf), estadio en el cual se forma la estructura de domo. Entre ambos estadios se reporta por primera vez el mecanismo de intercalación radial el cual ha sido propuesto como el motor del inicio de la epibolia (Solnica-Krezel, 2006 modificado).

1.3. Epibolia de blastómeras profundas

1.3.1. Intercalación radial

El mecanismo de intercalación celular radial fue inicialmente descrito durante la gastrulación de *Xenopus laevis* por Ray Keller en 1980. Durante este proceso las BP experimentan un cambio morfológico definido, adquiriendo una forma alargada y emitiendo macro y micro protrusiones que facilitan los movimientos bidireccionales en el eje radial del embrión. Este re-arreglo celular permite la disminución del número de capas de blastómeras profundas y la expansión del tejido en el eje planar (Keller, 1980) (figura 2a).

La primera evidencia de la presencia de movimientos de intercalación radial en el pez cebra proviene de reportes de Warga & Kimmel (1990) y Wilson (1995), quienes utilizando aproximaciones similares basadas en el uso marcadores de linaje celular sugirieron la existencia de rearrreglos celulares en etapas tempranas del desarrollo los cuales darían cuenta de la existencia de intercalación radial, el cual sería un movimiento restringido a las BP (figura 3). Warga, tomando ventaja de los patrones de división celular durante las etapas de clivaje, realizó el siguiente experimento, se inyectó una célula con rodamina-dextran en el estadio de 32 células, en el siguiente clivaje (estadio de 64 células) se inyectó la célula mas superficial con fluoresceína-dextran (color verde), obteniendo poblaciones celulares de 2 colores distintos según su ubicación, una superficial amarilla (por la combinación de rodamina con fluoresceína) y rojo (profundo). Esta aproximación resultó conveniente para seguir la descendencia de estas células, analizando la dinámica y posibles re-arreglos celulares de las BP a través del tiempo (figura 3). aportando la primera evidencia de un movimiento exclusivo de las BP en el eje radial durante la epibolia temprana (Warga R., 1990) .

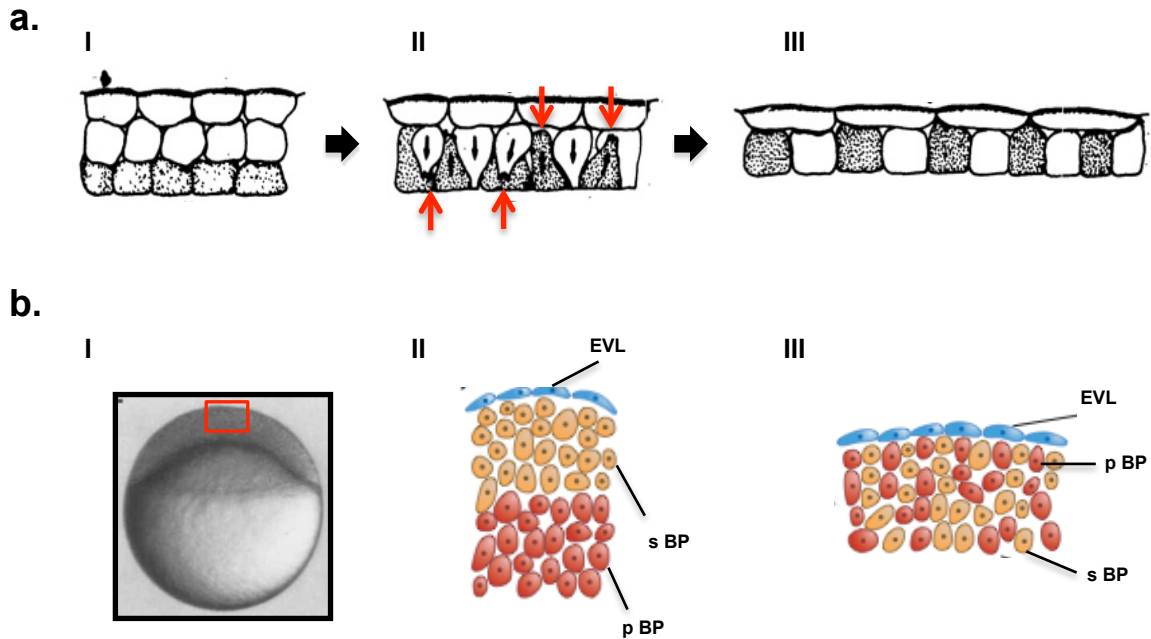


Figura 2: Mecanismo de intercalación radial. **a. *Xenopus laevis*,** esquema de interdigitación radial el cual es un mecanismo de dispersión, las células correspondientes a las blastómeras profundas emiten protrusiones de membrana lo largo del radio del embrión intercalando entre sí, permitiendo la disminución del número de capas **I**. Gástrula de *Xenopus laevis*, desde la capa mas externa los tipos celulares son: EVL, BP de capa intermedia y BP de capas profundas. **II.** Se produce la emisión de protrusiones de ambas capas de BP de manera bidireccional intercalando entre las células vecinas. **III.** Cese de emisión de protrusiones. Las células se ubican en su nueva posición y el tejido se expande. Flechas rojas indican la presencia de protrusiones (Keller R., 1980, modificado). **b. Pez cebra, I.** Fotografía en campo claro de un embrión en estadio 30% epibolia, el rectángulo rojo corresponde a la zona que será analizada en II y III. **II.** Esquema del blastodermo previo al inicio de la epibolia. Las células presentes corresponden a EVL, BP de capas superficiales (s BP), BP de capas profundas (p BP). **III.** Durante el inicio de la epibolia, las s BP y las p BP se dispersan por medio de RI, disminuyendo el número de capas del blastodermo. La RI es un movimiento característico del inicio de la epibolia (Montero J.A., 2004. Modificado).

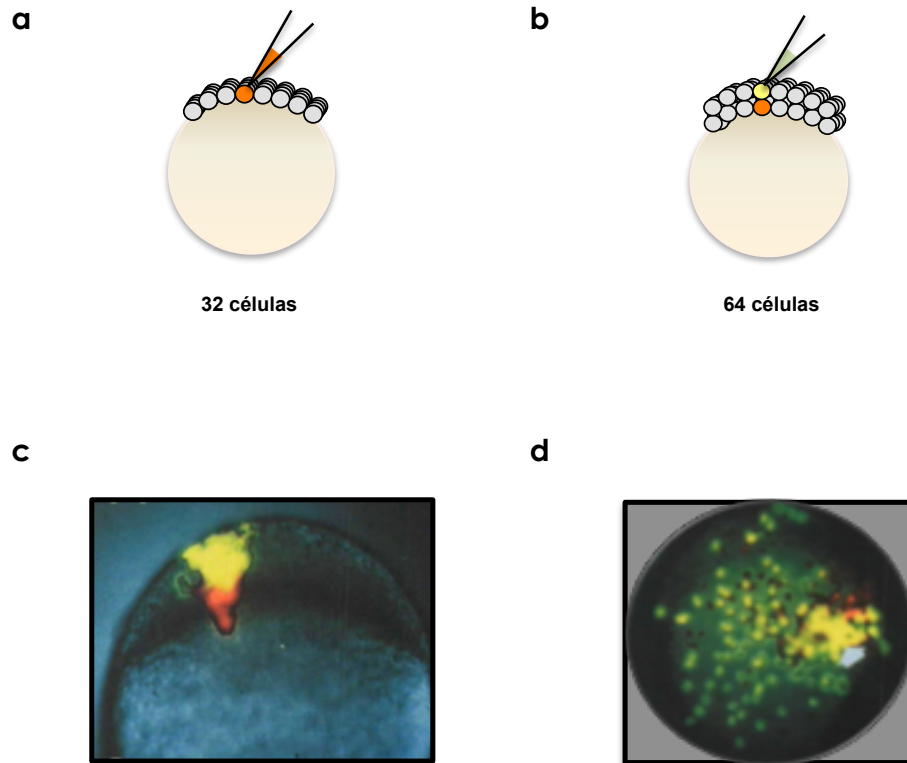


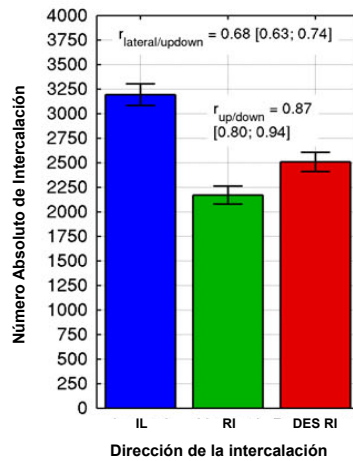
Figura 3: Cambios morfológicos en el embrión afectan los movimientos celulares de las BP. Se inyectan colorantes vitales en embriones de pez cebra para realizar un seguimiento de las BP. **a.** Estadio de 32 células se inyecta rodamina dextran, la cual es posible identificar debido a su marca fluorescente roja. **b.** Durante el estadio de 64 células se identifican las células hijas. Luego se inyectó la BP superficial con fluoresceína dextran, su descendencia se identifica por su marca fluorescente amarilla (rodamina + fluoresceína). **c.** Embrión inyectado, vista lateral, estadio de blástula donde media es posible observar señal fluorescente roja, correspondiente a descendencia de BP de capa profunda, mientras que células la marca fluorescente amarilla (rodamina + fluoresceína) corresponden a descendencia BP de capas superficiales. **d.** Visión desde animal. Es posible observar que las células de capas superficiales y profundas se mezclan entre sí (sin mezclarse en la capa de las EVL). Es posible visualizar en capas superficiales células fluorescentes rojas las cuales provienen de capas profundas se mezclan con otras células en el plano. Estos resultados demuestran que las BP se dispersan a lo largo del eje radial durante la epibolia temprana sin llegar a mezclarse con EVL por lo que se describen como movimientos exclusivos de las BP (Warga & Kimmel, 1990. Modificado).

La existencia de eventos de Intercalación radial fue posteriormente descrita en estadios más tardíos, 80% de epibolia, donde las BP migran en dirección a capas más superficiales (Kane D., 2005). Por lo tanto, aunque estos eventos serían característicos de las etapas iniciales de la epibolia, ellos continuarían presentes en etapas más tardías, por lo cual se ha sugerido que este mecanismo sería el motor de dispersión del tejido sobre el vitelo (figura 2) (Keller R., 1980).

Evidencia reciente demuestra que el comportamiento de las BP sería más dinámico de lo esperado. Utilizando herramientas que permiten el seguimiento de la trayectoria y direccionalidad de las BP a través del tiempo, se confirmó la presencia en condiciones silvestres de movimientos de intercalación radial (IR), así como movimientos de intercalación lateral (IL) y des-intercalación radial (DES IR). Estos dos últimos movimientos fueron reportados a partir del estadio de esfera y fueron propuestos como movimientos adicionales a la IR los cuales facilitarían la dispersión del blastodermo durante la epibolia (figura 4) (Bensch R., 2013).

Moléculas que han sido descritas como importantes para el proceso de intercalación radial son las cadherinas, quienes además de mediar la adhesión entre las células se encuentran involucradas en el proceso de migración del blastodermo.

a



b

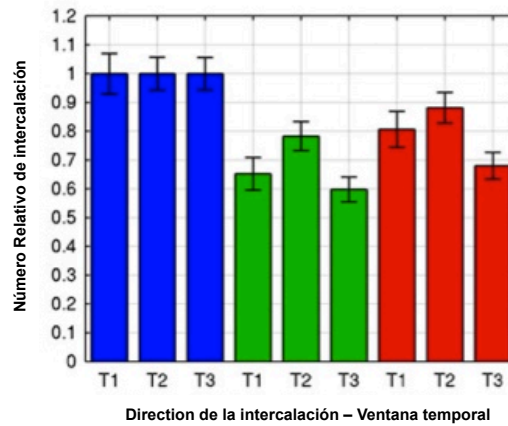


Figura 4: Intercalación radial no direccional domina el comportamiento de las BP durante la epibolia. La caracterización de este tipo de movimiento fue realizada a partir seguimientos de célula única, demostrando su existencia y evidenciando 2 tipos de movimientos adicionales: intercalación lateral (IL) y des intercalación radial (DES RI) **a.** Cuantificación de los movimientos de intercalación en condiciones silvestres . **b.** Presencia de los movimientos de intercalación en distintas ventanas del desarrollo **T1** (Doming) **T2** (epibolia temprana), **T3** (30-50% epibolia) en condiciones silvestres, n= 6 embriones. (Bensch, 2013. Modificado).

1.3.2. Cadherinas e intercalación radial.

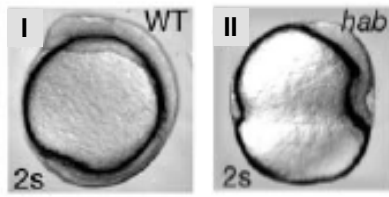
Las cadherinas son proteínas transmembrana de paso único. Su extremo amino terminal está orientado hacia la cara extracelular y posee sitios de unión a calcio, mientras que el extremo carboxilo terminal se encuentra orientado hacia la cara intracelular, y posee sitios de unión para cateninas (α , β) (Tepass 2000) y p120, estos dos últimos son posibles reguladores de su función. Existen diversas familias de cadherinas, entre ellas se encuentran las cadherinas clásicas, N-Cadherina debe su nombre que fue inicialmente descrita en tejido neural, mientras que E-Cadherina fue inicialmente descrita en tejido epitelial. Ambas proteínas se expresan desde el estadio de una célula y tienen un rol fundamental en el desarrollo embrionario temprano de pez cebra (Lele, 2002; Kane and Warga, 2005). La señalización intracelular de cadherinas se encuentra mediada por cateninas. β catenina se une de manera directa a la región distal del dominio intracelular, mientras α catenina se une a β catenina y es quien media la unión de las cadherinas con el citoesqueleto de actina, confiriéndole propiedades de preservación de la estructura. p120 se une al dominio jxtamembrana y es clave en la regulación de fenotipos mótils o de adhesividad (Derike L., 2004).

Desde un punto de vista funcional, la participación de cadherinas durante el desarrollo temprano ha sido demostrada a través de la generación y análisis de peces cebra mutantes y morfantes (con pérdida de la función haciendo uso de un morfolino antisentido) para E o N-Cadherina.

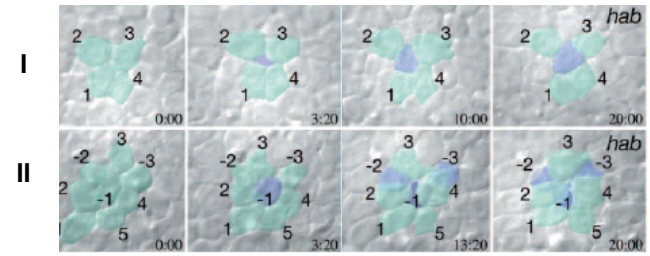
Mutantes de *e-cadherina* (*hab*^{-/-}): presenta fenotipo a partir de 70-80% de epibolia, el cual corresponde a un retraso en la epibolia de las BP, no así en las células de la EVL ni la YSL las cuales completan su epibolia de manera normal (figura 5a). A nivel celular, esto se traduce como una incapacidad de las BP para realizar una eficiente intercalación radial, donde las células se intercalan hacia capas más superficiales pero no logran establecerse en esta nueva posición, y se desplazan hacia capas más profundas (figura 5b). Se ha propuesto que este defecto sería la causa del retraso presente en la epibolia de las BP (Kane & Warga, 2005).

Mutante y morfantes de *n-cadherina*: El mutante de *n-cadherina* (*parachute*, *pac*^{-/-}) presenta fenotipo posterior al inicio de la neurulación, durante el cierre de tubo neural, donde las células se desplazan hacia la línea media (Lele, 2002). En embriones tipo silvestre, células de capas profundas de la capa neural migran y emiten protrusiones polarizadas en dirección a la línea media estableciendo puntos de contacto y uniones en la zona apical. En forma paralela ellas se intercalan desde las capas más profundas a las más superficiales disminuyendo el grosor del epitelio neural. Los mutantes *parachute*, presentan defectos en la morfología en interacción célula-célula (figura 5c) (Lele, 2002). Por otro lado, embriones morfantes de *n-cadherina*, muestran defectos en el cierre del tubo neural, el cual adquiere forma de “T”, donde la zona ventral del tubo no presenta problemas en el cierre, mientras que en la zona dorsal las células son incapaces de converger hacia la línea media (figura 5d) (Hong, 2006). El análisis del comportamiento de las células neuroepiteliales durante el cierre del tubo neural, muestra que la pérdida funcional *n-cadherina* altera la persistencia de las protrusiones emitidas por estas células, lo que afecta la eficiencia de la intercalación radial. El fenotipo se explica porque las células se orientan y emiten protrusiones en dirección a la línea media, sin embargo, no son capaces de mantener dichas protrusiones a través del tiempo las cuales colapsan y por consecuencia la célula se retrae. En resumen, la evidencia proveniente del mutante y morfante de *n-cadherina* demostraron que esta proteína es necesaria para brindar persistencia en las protrusiones celulares, lo cual esencial para un correcto proceso de intercalación radial que media el cierre del tubo neural.

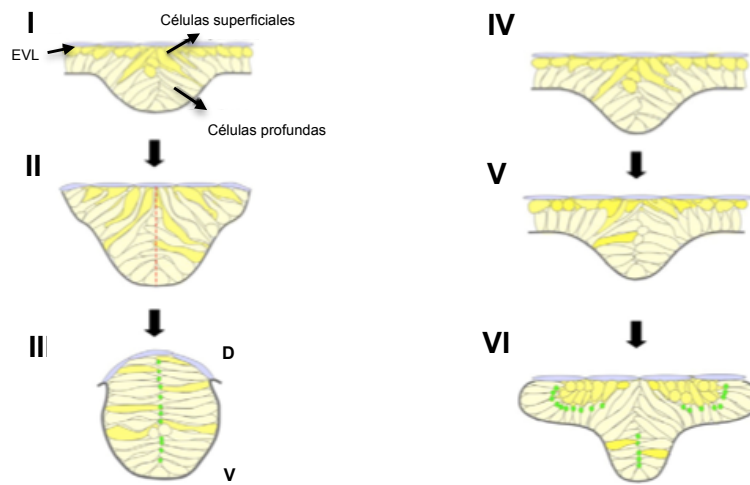
a



b



c



d

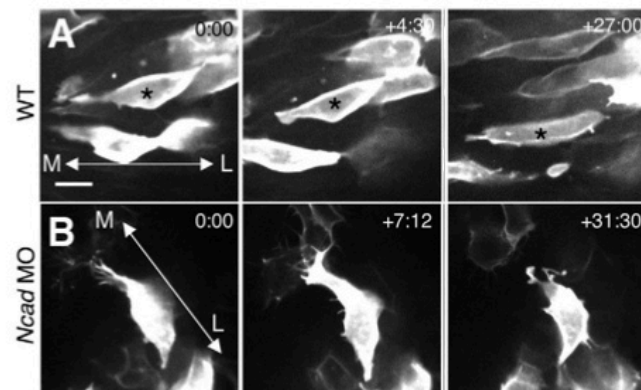


Figura 5: Cadherinas clásicas durante el desarrollo embrionario de pez cebra.

Mutante de E-cadherina (*hab*^{-/-}) (a, b). **a. I.** Imagen campo claro de pez cebra tipo silvestre, estadio de 2 somitos. **II.** Imagen campo claro de fenotipo mutante *hab*^{-/-}, presenta un retraso de la epibolia de las BP. **b.** Secuencia temporal de movimientos de IR y DES IR en mutante *hab*^{-/-}, imágenes capturadas en distintos tiempos, en la esquina inferior derecha indica el tiempo en minutos. **I.** Secuencia del movimiento de IR, entre las células presentes en el plano (color verde) emerge una BP (color azul) para posicionarse en una capa más superficial. **II.** Secuencia de movimientos de DES IR, las células en plano son células de color verde, las células azules (con números negativos) son aquellas desaparecen del plano migrando a capas más profundas (Kane D., 2005). **c.** Modelo de neurulación (**I, II, III**) condiciones silvestres (**IV, V, VI**) mutante de *n-cadherina*. **I.** En la placa neural es posible visualizar células superficiales (color amarillo), células profundas (color crema) y EVL. **II.** Iniciado el cierre del tubo neural, las células se elongan y convergen hacia la línea media, simultáneamente ocurre IR. Las células profundas gradualmente se insertan entre las superficiales extendiendo sus protrusiones mientras cambian su orientación. **III.** Fin de la neurulación, las células convergen en la línea media cerrando el tubo. **IV.** Placa neural, células superficiales en color amarillo, células profundas en color crema y EVL. **V.** Iniciado el cierre del tubo neural, las células laterales no realizan IR. Este fenotipo se debe a incapacidad de las células de sostener una actividad protrusiva estable pese a orientarse hacia la línea media. **VI.** Fenotipo aberrante del cierre del tubo neural, las células superficiales y profundas son incapaces de realizar RI impidiendo su migración hacia la línea media. Puntos verdes corresponden a sitios de unión en la línea media (Hong E., 2006). **d.** La actividad protrusiva de las células superficiales en morfante de *n-cadherina* es inestable. (A,B) Vista dorsal, imágenes de secuencias temporales (30 min), entre los estadios de 3 a 4-5 somitos. **A.** Condición silvestre, las células superficiales a través del tiempo emiten protrusiones las células se elongan mientras se orientan hacia la línea media. **B.** Morfante de *n-cadherina*, las células superficiales emiten protrusiones mientras la célula se elonga, luego colapsan retrayendo la célula (Hong E., 2006). Ejes M (medial) L (lateral).

1.3.3. N-Cadherina e Inhibición por contacto

El proceso de inhibición por contacto (IC), fue descrito por primera vez por Abercrombie en 1954, y surge a partir de la visualización de cultivos celulares de fibroblastos. Abercrombie observó el comportamiento migratorio de fibroblastos donde al colisionar dos células con trayectorias opuestas, al entrar éstas en contacto, se produce la inhibición de la locomoción de ambas células y el colapso de las protrusiones de membrana en la zona de contacto. Posteriormente, las células comienzan a emitir nuevas protrusiones lejos de la zona de contacto, estableciendo un nuevo frente de avance y migrando en direcciones opuestas (Abercrombie M., 1954). Recientemente se identificó a N-Cadherina como una molécula responsable de este tipo de comportamiento en la migración colectiva de las crestas neurales. Al entrar en contacto dos células, se establece una unión mediada por N-Cadherina, esto inhibirá la emisión de protrusiones en el sitio de contacto mientras que la porción de membrana libre se convierte en un potencial sitio de formación y retracción de protrusiones (Theveneau et al., 2010). En este contexto la direccionalidad de las protrusiones del colectivo de células sería conferida a aquellas zonas de la membrana celular que se encuentren libres, las que podrían responder en forma eficiente a señales quimioattractantes, como Sdf1 (figura 6) (Theveneau et al., 2010).

La señalización intracelular de N-Cadherina se inicia en su cara citoplasmática donde une a la proteína p120-catenina. En condiciones silvestres p120, se encuentra unida a Rho A quien la mantiene inhibida. Una vez que p120 es activada (fosforilada) se une a N-Cadherina, liberando a Rho A (GTPasa pequeña) quien se activa e inhibe la emisión de protrusiones en ese frente. La proteína antagónica es Rac1 (GTPasa pequeña) la cual ha sido descrita como característica del frente de avance de la célula, señalizando para la emisión de protrusiones (figura 6).

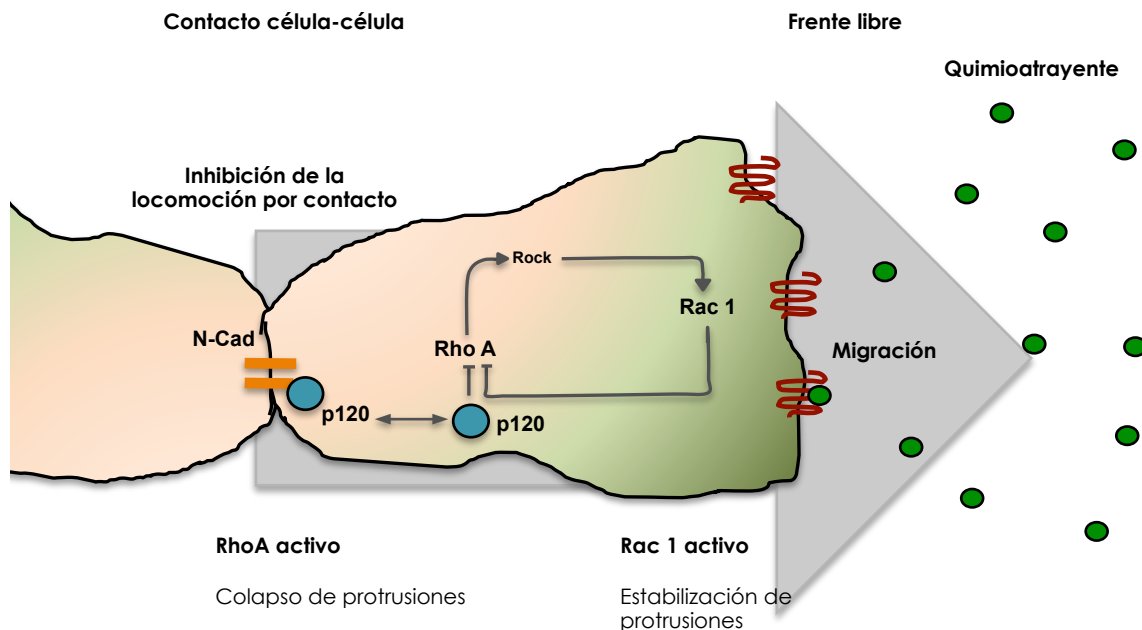


Figura 6: Inhibición de locomoción por contacto (ILC). Este fenómeno ocurre durante una locomoción colectiva hacia una molécula quimioatrayente. Las células se encuentran polarizadas debido a los contactos que establece con las células vecinas, la inhibición por contacto se establece entre dos células cuya unión se encuentra mediada por N-Cadherina. El comportamiento de este fenómeno corresponde al cese de la emisión de protrusiones en la zona de contacto, cambiando la polaridad de la célula y emitiendo protrusiones en dirección opuesta para migrar en esa dirección. Las células que poseen un borde libre emiten protrusiones, esto ocurre en respuesta a la señalización intracelular mediada por N-Cadherina. Las señales mediadas por N-Cadherina son la polarización de RhoA quien se encuentra en la parte posterior de la célula y Rac1 que se encuentra en el frente de avance mediando la emisión de protrusiones permitiendo la migración celular en esa dirección. Adicionalmente, existe la presencia de moléculas quimioatrayentes, las cuales impulsaran la migración en dicha dirección. La señalización intracelular integra las señales provenientes de la inhibición por contacto (uniones mediadas por N-Cadherina) y señales de quimiotaxis.

Los antecedentes previamente expuestos demuestran la importancia tanto de E como N-cadherina en procesos del desarrollo temprano del embrión de pez cebra. E-cadherina juega un papel fundamental en la dinámica de los movimientos de intercalación radial durante la epibolia, pero aparentemente no en la direccionalidad de este proceso (Song, 2013). El papel que juega N-Cadherina en la intercalación radial no está claro, aunque potencialmente podría participar en este proceso ya que se sabe que confiere persistencia a las proyecciones celulares durante la neurulación y es una molécula esencial en el proceso de inhibición por contacto. En este contexto, es posible que N-Cadherina juegue un papel en conferir direccionalidad a las células del blastodermo durante la intercalación radial, hipótesis que será abordada durante el desarrollo de esta tesis. Para ello se estudiará el proceso de intercalación radial en el estadio de esfera donde el blastodermo se presenta como una estructura con un alto número de BP (figura 7).

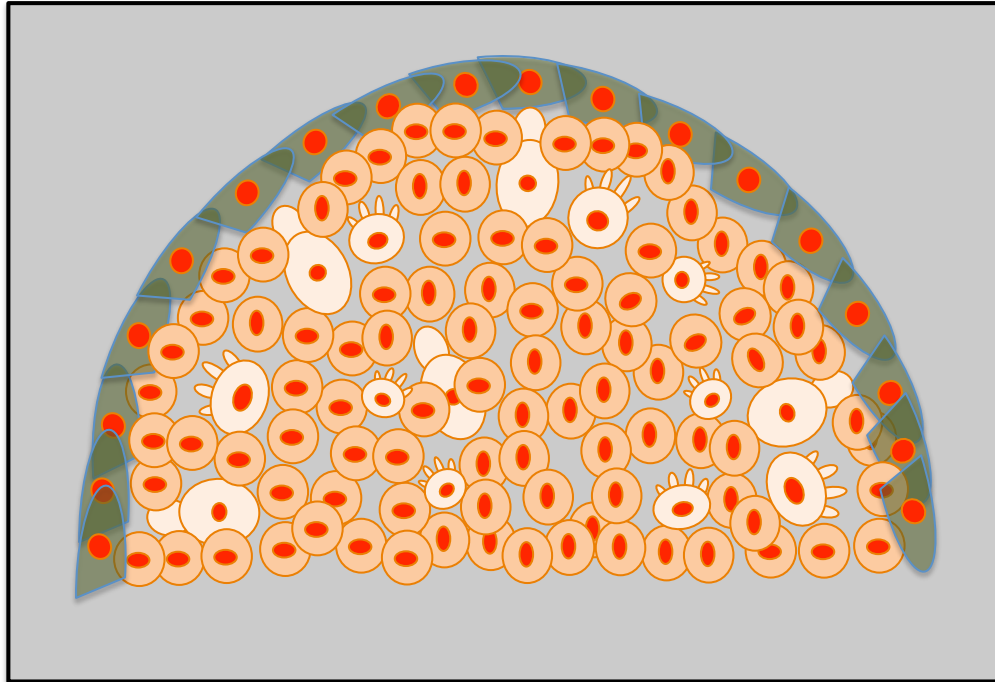


Figura 7: Posible rol de N-cadherina durante la epibolia de pez cebra. El rol que N-Cadherina cumpliría sería el de direccionar el movimiento de intercalación radial de las BP hacia capas mas superficiales dentro del blastodermo durante estadios tempranos (esfera y domo) brindando una mayor persistencia a las protrusiones celulares en esa dirección.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPOTESIS

N-cadherina es necesaria para otorgar direccionalidad y persistencia de las protrusiones de membrana de las BP en regiones superficiales, participando de esta manera en el proceso de intercalación radial durante la epibolia del pez cebra.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Analizar y caracterizar el papel que juega de N-Cadherina en la direccionalidad de las protrusiones de membrana y el movimiento de blastómeras profundas durante el proceso de intercalación radial durante la epibolia de pez cebra.

2.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1. Analizar el comportamiento morfológico y dinámico de las blastómeras profundas durante la intercalación radial en embriones silvestres de pez cebra.

2.2.2. Evaluar la funcionalidad de N-Cadherina durante la intercalación radial en la epibolia del pez cebra.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención y mantenimiento de peces.

Se utilizaron pez cebra adultos los cuales fueron obtenidos desde el bioterio de peces del laboratorio, los cuales son mantenidos en condiciones de acuario, con ciclos de 14 h luz/10h oscuridad y temperatura 28°C. Los acuarios utilizan agua preparada por osmosis reversa (agua de acuario) a la cual se añadió: 385g de microsalt (Brustmann), 385g de Mineral Salt (Sera) y 11 gotas de hierro líquido Ferrogan Sluid (Hobby), a partir de una dilución stock en agua destilada de 1:4 v/v. Esto genera una conductividad de 150µS y se ajustó a pH 7 agregando bicarbonato de sodio. La dieta a la cual son sometidos los peces se encuentra basada en alimento vivos (nauplios de *Artemia salina*) y pellet (marca Sera). Con el fin de obtener embriones, se realizan cruza de peces, los cuales han sido entrenados logrando cruza eficientes, siendo posible recolectar hasta 80 huevos por pareja. La cruza se prepara la tarde previa, los peces son ubicados en cajas de cruza la cual presenta una división que permite mantener durante toda la noche los peces separados, la mañana siguiente se retira dicha rejilla permitiendo la cruza. Al desovar la hembra, los huevos son colectados dentro de la misma caja, ya que presenta una rejilla en el fondo que impide el acceso de los adultos a los huevos depositados en el fondo de la caja asegurando que no sean devorados. Posteriormente los huevos se recolectan y mantienen en medio E3 1X dentro una estufa a 26°C hasta su utilización. E3 (60X): 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂ 2H₂O, 0,33 mM MgSO₄ 7H₂O (ajustar a pH 7,2).

Los experimentos se realizaron utilizando una línea de transgénicos pez cebra Ras Tg(β-actin:HRAS-EGFP) cuya señal se encuentra dirigida a la membrana celular (Cooper M., 2005), la clasificación del estadio de los embriones fue establecida utilizando la tabla de desarrollo descrita por Kimmel C. (Kimmel and Schilling, 1995).

3.2. Inmunofluorescencia indirecta

Materiales

Anticuerpos primarios

Anticuerpo anti E-cadherina, dilución 1/50 μ l obtenidos mediante la empresa Strategic Diagnostics Inc. (SDIX, EEUU). Su diseño fue basado en la secuencia peptídica de *e-cadherina* de peces anuales, sin embargo, dado que presenta un alto porcentaje de homología con la secuencia de *e-cadherina* en pez cebra, ha sido utilizado obteniendo una alta eficiencia en la especificidad de señal.

Anti N-cadherina, dilución 1/200 μ l Ab cam (ab12221).

Anti N-cadherina, dilución 1/200 μ l donado por el Dr. C.P. Heisenberg).

Anticuerpos secundarios

Anti conejo Alexa 488, Molecular Probes (A11070), dilución 1/200.

Anti conejo Alexa 568, Molecular Probes, (A11011)

Anti ratón Alexa 647, Invitrogen (A21235), dilución 1/200.

Método

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Los embriones son fijados en PFA 4% en PBS (pH 7,4) durante toda la noche a 4°C, posteriormente fueron decorionados mecánicamente y sometidos a 4 lavados por 10 min cada uno en PBST (PBS y 0.2 % Tritón) a temperatura ambiente. Luego fueron incubados en una solución de bloqueo (PBST, 1%DMSO y 10% suero de cabra) durante 2 horas a temperatura ambiente, al mismo tiempo es preparado el anticuerpo secundario usando una dilución de 1:50 en solución de bloqueo. Finalizado el tiempo de bloqueo los embriones fueron incubados con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Al termino de la incubación, el anticuerpo primario es recuperado y los embriones lavados 4 veces durante 15 minutos con PBST a temperatura ambiente. Posteriormente, se realiza un segundo bloqueo durante 2

horas a temperatura ambiente usando la misma solución de bloqueo mencionada, siendo retirada al terminar el periodo de bloqueo, para incubar los embriones en una solución con anticuerpo secundario (dilución 1:200) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 4 lavados de 15 minutos en solución PBST para posteriormente montar los embriones. Las imágenes de Inmunofluorescencia fueron capturadas en un Microscopio Confocal Leica TCS LSI.

3.3. Captura y restauración de las imágenes de microscopía confocal.

Los embriones de Tg(β -actin:HRAS-EGFP) fueron decorionados manualmente en el estadio de oblong, luego montados en una cámara orientando el blastodermo hacia el cubre objeto y embebidos en medio E3 con agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (Sigma) para su posterior captura. Las imágenes fueron capturadas entre los estadios de Esfera (4 h) y Domo (4.3 h). Utilizando una unidad confocal de disco rotatorio PerkinElmer modelo Ultraview asociada a un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200, usando un objetivo 25X W/NA 0,8. Se capturaron pilas de imágenes con un intervalo de 1 μ m en el eje z. La modalidad de captura corresponde a una secuencia temporal donde es captada una pila de imágenes cada 2 minutos durante una ventana temporal de 30 minutos, tiempo del desarrollo en el cual se ha reportado que las BP inician su comportamiento migratorio. Posteriormente se procede a realizar el análisis de las imágenes.

Seguimiento de células

El Tg(β -actin:HRAS-EGFP) presenta una señal verde fluorescente a nivel de la membrana celular, por lo cual para lograr determinar con precisión cambios de posición de las células dentro del blastodermo las imágenes binarias fueron procesadas invirtiendo la intensidad de señal, con el fin de obtener como referencia la señal de los núcleos celulares a través del tiempo.

Para realizar el seguimiento manual de células se utilizó un complemento del programa FIJI, llamado "View 5D". Utilizando este programa se logró establecer la trayectoria en 3D de las BP a través de la secuencia temporal tomando como punto de referencia el comportamiento de los núcleos de estas células. Los datos obtenidos

a partir de este seguimiento celular son analizados haciendo uso del programa MATLAB el cual nos permite extraer los siguientes parámetros:

Desplazamiento (Distancia Neta), corresponde a la distancia que recorre una célula desde el punto de inicio (A) a un punto (B) siendo la trayectoria mas directa.

Trayectoria (Distancia recorrida), corresponde a la distancia que recorre una célula durante toda su desplazamiento desde un punto A hacia un punto B.

Persistencia, representa la relación entre desplazamiento y trayectoria, y da cuenta de cuan direccionado es el movimiento celular. Un valor igual a 1 representa un movimiento totalmente direccionado, lineal, mientras valores menores representan movimientos menos direccionales.

Velocidad promedio, corresponde a un promedio de las velocidades presentadas por una célula durante su trayectoria. (um/min).

El cálculo de los parámetros de movimiento celular fueron analizados en ambas condiciones (silvestre y morfante) considerando todas las células presentes en el campo y cuyo resultado ha sido expresado como el promedio de ellas.

Análisis de comportamiento celular y tipos de movimiento

El análisis del comportamiento celular de las BP se realizó a partir de videos del embrión entre los estadios de esfera (4hpf) y domo (4.3 hpf). De manera manual se realizó la segmentación de células individuales, BP, a través del tiempo registrando tanto el comportamiento celular como la migración de las células.

Cambios morfológicos

Al realizar el análisis determinamos la existencia de variaciones de la morfología de las BP en el volumen, número y tipo de protrusiones. Para determinar la variación del volumen celular realizamos una reconstrucción de las células utilizando un complemento del programa Fiji, 3D Objects Counter, el cual nos permitió realizar una segmentación manual de las mismas y establecer su volumen, esta información fue calculada utilizando 10 células representativas para cada condición. Con el fin de establecer la existencia de una alteración en el número de protrusiones que presentaban las BP se realizó una cuantificación del número de células que presentaban protrusiones, en cada condición, por medio de un análisis visual a través del tiempo. El tipo de protrusiones presentes en este tipo celular fue establecido utilizando los criterios del análisis realizado por Trinkaus, en el cual se establecen 2 tipos de protrusiones para BP, blebs y lobopodios (Trinkaus J.P., 1972).

Movimientos celulares

Durante la migración de las BP logramos establecer la existencia de más de un tipo de movimiento los cuales fueron clasificados como aparición, desaparición, intercalación lateral y desplazamiento lateral. Estos resultados fueron expresados en % con respecto al número total de células analizadas.

Aparición (A), corresponde a los movimientos de intercalación radial (IR), en el cual las células migran en dirección al polo animal (capas mas superficiales).

Desaparición (D), movimiento en el cual las células migran en dirección al polo vegetal (hacia el vitelo).

Intercalación lateral (IL), movimiento en el cual las células migran en dirección perpendicular a polo animal, abriéndose paso entre células vecinas.

Desplazamiento lateral (DL), movimiento en el cual las células migran en dirección perpendicular al polo animal sin pasar entre células vecinas. Este tipo de movimiento

describe el comportamiento de células que migran junto a sus vecinas en la misma dirección.

Confirmando la presencia de dichos movimientos presentes en ambas condiciones se procedió a analizar esta dinámica de movimientos célula a célula. A partir de un análisis visual fue posible establecer que durante la ventana temporal una célula es capaz de realizar más de un tipo de movimiento. Debido a esto se realizó el análisis del número de movimientos que presenta cada célula presente en el blastodermo tanto de la condición silvestre (n=47 células) y morfante (n=35 células). . Para cada movimiento se estableció un como requisitos mínimo de 9 μm recorridos para cada movimiento, con el fin de distinguir un movimiento correspondiente a establecerse en una posición distinta de intentos fallidos de los movimientos. Estos resultados fueron expresados en % con respecto al número total de células analizadas.

3.4. Ensayos de pérdida de función

Se realizaron ensayos de pérdida de función en Tg(β -actin:HRAS-EGFP), mediante la inyección de oligonucleótidos antisentido tipo morfolino contra *N-cadherina*, con el fin de interferir el correcto procesamiento de esta proteína, cuya secuencia es 5'CGGTGAAACCAGGCTGACATGGCAT-3' (Lele, 2002). El morfolino fue resuspendido en agua libre de nucleasas a una concentración de 1mM y almacenados.

Microinyección morfolino en embriones de Pez cebra

La microinyección de embriones fue realizada en el estadio de 1 célula. Para esto, se utilizó el equipo IM-300 Cell Microinjector (Narishige Instrument Inc.) el cual se encuentra acoplado a un tanque con N_2 . El montaje, la visualización y orientación de los embriones durante la microinyección fue realizada utilizando una lupa de baja magnificación (Nikon). El microinyector permite calibrar el tamaño de la gota a inyectar la cual de acuerdo su tamaño corresponde a una concentración determinada de morfolino, en este caso utilizando una dilución cuya concentración a inyectar es de

100 μ M (Lele Z., 2002). Las agujas utilizadas para la microinyección fueron preparadas a partir de capilares de Borosilicato con filamento interno (OD: 1mm, ID: 0.78, largo 15 cm, Sutter Instrument # BF100-78-15). Las agujas fueron generadas a partir de estos capilares utilizando un puller horizontal utilizando los siguientes parámetros HEAT 260 Pull 50 Step 1 Time 40 velocidad 80. Este método genera agujas de punta fina las cuales son adecuadas para inyectar embriones de pez cebra. El control realizado para corroborar el correcto fenotipo del morfante de *n-cadherina* es mantener los embriones a 28°C durante 24 hrs después de ser inyectados para ser revisados.

3.5. RT PCR

Para el ensayo de transcripción reversa se utilizaron 1-2 μ g de ARN total del embrión. Utilizando la enzima transcriptasa reversa *Super Script II RT* (Invitrogen), de acuerdo al protocolo del fabricante, se realizó la reacción de la siguiente manera:

Denaturalización: 5 min a 75°C.

Elongación: 90 min a 42°C

Inactivación de la enzima: 15 min a 70°C

Con el fin de amplificar fragmentos de *e-cadherina* en pez cebra, se diseñaron oligonucleótidos a partir de la secuencia genómica del gen. El alineamiento se realizó utilizando la base de datos disponible en la red ClustalW, (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>). El diseño de los partidores fue manual y confirmado con el software DNASTar, disponible en el laboratorio. Mediante la técnica de PCR se amplificó parte de la secuencia del gen de *e-cadherina* para los estadios de esfera domo y 30% epibolia en condiciones silvestre y morfante. Como control fue amplificada una secuencia del gen de actina.

3.6. Análisis estadísticos

Con el fin de evaluar si existen diferencias significativas entre las poblaciones celulares analizadas (silvestre y morfante de *n-cadherina*), en primer lugar se realizaron pruebas de Normalidad y homogeneidad de varianza. Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk con el fin de evaluar la normalidad de los datos de desplazamiento celular, trayectoria y persistencia del movimiento. Estos parámetros presentan una distribución normal por lo cual se decide aplicar la prueba t de student para evaluar si existen diferencias significativas entre ambas condiciones. El parámetro de velocidad promedio resultó ser no paramétrico, por lo cual utilizamos la prueba de Wilcoxon para evaluar si existe una diferencia significativa entre ambas poblaciones. Para todos los análisis se utilizó el programa Prism 6.

4. RESULTADOS

4.1. Objetivo Específico 1: Analizar el comportamiento morfológico y dinámico de las blastómeras profundas durante la intercalación radial en embriones silvestres de pez cebra.

Esta tesis abarcó el análisis del proceso temprano de la epibolia de pez cebra, particularmente entre los estadios de esfera (4 hpf) y domo (4,3 hpf). De acuerdo a la literatura, es entre estos estadios donde se presenta por primera vez el fenómeno de intercalación radial (Kimmel C., 1995). Con el propósito de visualizar la dinámica de movimiento de las BP se utilizó la línea transgénica Tg(β -actin:HRAS-EGFP). La secuencia de este transgen corresponde a una fusión de la proteína reportera GFP a la secuencia de los últimos 20 aminoácidos de la proteína Ras, que posee una secuencia de destinación a la membrana, ambos bajo el promotor de actina. El uso de este transgénico permite visualizar la membrana celular con GFP desde los primeros clivajes (Cooper M, 2005).

Se capturaron secuencias temporales de embriones en condición silvestre y morfante de *n-cadherina* entre los estadios de esfera y domo. Debido a que el blastodermo contiene un gran número capas de BP, se estableció como criterio el restringir el análisis del comportamiento celular a la primera capa de BP, localizada inmediatamente debajo las EVL. En esta capa se estudió un área del embrión equivalente en ambas condiciones, la que contenía un número de células similar al inicio y al término de la secuencia temporal (figura 8).

4.1.1. Análisis de la dinámica de las BP

Parámetros de movimiento y volumen celular

Con el fin describir el comportamiento grupal de las BP, se determinó el valor de 5 parámetros de comportamiento celular en la condición silvestre. En términos generales, el blastodermo se comportó como un sistema con movimientos celulares mas variado con respecto a la visión clásica de las etapas iniciales de la epibolia, lo

cual involucraba fundamentalmente movimientos de IR. El resultado del análisis de los parámetros, que representan el valor promedio de la población, fue el siguiente:

- **Desplazamiento celular** ($10,17 \pm 5,52 \mu\text{m}$), corresponde a la distancia lineal recorrida por una célula entre 2 puntos.
- **Trayectoria celular** ($27,19 \pm 7,17 \mu\text{m}$), corresponde a la distancia total que recorre una BP entre dos puntos. Como se puede observar, el valor de la trayectoria promedio supera el valor de desplazamiento promedio, lo que indica que las BP muestran poca direccionalidad en su movimiento.
- **Persistencia del movimiento** ($0,38 \pm 0,19$), representa la relación entre desplazamiento y trayectoria, y da cuenta de cuan direccionado es el movimiento celular. Un valor de 1 representa un movimiento en una dirección, mas parecido a un desplazamiento celular mientras valores menores representan movimientos mas parecidos a trayectorias. El valor de este parámetro en la condición silvestre de 0.38 lo cual representa un movimiento de la población de BP poco direccionado.
- **Velocidad de movimiento celular** ($1,027 \pm 0,27 \mu\text{m}/\text{min}$), corresponde a la velocidad promedio en la cual migran las células.
- **Volumen celular** (19292 pixel^3).

a. Parámetros de movimiento celular

Desplazamiento	(μm)	$10,17 \pm 5,52$
Trayectoria	(μm)	$27,19 \pm 7,17$
Persistencia	(μm)	$0,38 \pm 0,19$
Vel promedio	($\mu\text{m}/\text{min}$)	$1,027 \pm 0,27$
Volumen celular *	(pixel ³)	19292

b. Presencia de protrusiones (%)

Células sin protrusiones	75
Blebs	21,3
Lobopodios	4,3

c. Tipos de movimientos (%)

A	32
D	49
DL	43
IL	6,4

d. N° de movimientos (%)

0	13
1	70
2	13
3	4

Tabla I: Parámetros de comportamiento celular en condición silvestre. A partir de seguimientos de célula única se analizó el comportamiento de las BP. **a.** Parámetros de características migratorias de las BP. **b.** Presencia de protrusiones. **c.** Cuantificación de tipos de movimientos. **d.** N° de movimientos distintos mostrados por una célula. n= 47 células. (*Volumen celular, n=10 células). El porcentaje fue calculado tomando como referencia el total de células presentes en el campo visual.

Protrusiones

Un aspecto importante y característico de analizar durante procesos migratorios es la emisión de protrusiones de membrana. Otro modelo de pez teleósteo, *Fundulus heteroclitus*, en estadios equivalentes del desarrollo fue reportada la presencia dos tipos de protrusiones de membrana, blebs y lobopodios presentes mayoritariamente en células en movimiento (Trinkaus J.P., 1973). Los blebs corresponden a protuberancias redondeadas con extremo romo presentes en la superficie celular y que no comprometen gran parte de la morfología celular. Los lobopodios, corresponden a proyecciones elongadas de la membrana celular, que comprometen gran parte de la morfología celular y cuya presencia ha sido descrita solo en contexto 3D, las cuales presentan una gran persistencia en el tiempo (Petrie R.J., 2012). En pez cebra, encontramos que el mayor porcentaje de células (75%) carecen de protrusiones, mientras que el 25,6% presentan protrusiones, de las cuales el 21,3% corresponde a blebs y solo el 4,3% corresponden a lobopodios (tabla I). Este porcentaje de células que emiten protrusiones resulta bastante bajo considerando el gran porcentaje de células que se encuentran en movimiento, lo cual sugiere que no todos los movimientos estarían mediados por presencia de protrusiones.

Tipos de movimientos

Al realizar el análisis de los movimientos celulares se buscó identificar en forma dirigida la presencia de los movimientos de IR. Confirmar su presencia resultó importante debido a que gran parte de la bibliografía menciona a la IR como el motor de la epibolia. La evidencia que sustenta esta afirmación proviene del modelo de *Xenopus laevis*, donde ha sido demostrado que este movimiento media la disminución del número de capas (Keller R., 1980). En pez cebra, estudios realizados con tinciones vitales, demostraron que movimientos en dirección radial mediarían la dispersión y adelgazamiento del blastodermo en etapas tempranas de la epibolia (Warga R.M., 1990), aunque solo en etapas tardías de este proceso se ha descrito formalmente la presencia de IR.

A partir de nuestro análisis demostramos la existencia de movimiento de IR desde el estadio de esfera, definido como la aparición de una célula proveniente de capas profundas en un plano de células superficiales a través del tiempo (figura 9 a,b,c). Adicionalmente, observamos la existencia de otros tres movimientos en el eje radial y lateral, los que fueron objeto de análisis, descripción y posterior clasificación, debido a que no habían sido descritos previamente. Logramos establecer la presencia de cuatro movimientos

Aparición (A), comportamiento que hace referencia a que una BP a través del tiempo aparece en un plano más superficial proveniente de capas más profundas.

Desaparición (D), hace referencia a una BP que a través del tiempo desaparece de plano de células superficiales en dirección a un plano mas profundo.

Movimiento lateral (ML), corresponde al movimiento de una BP paralelo al plano superficial (xy), e incluye dos sub tipos:

- Desplazamiento lateral (DL), una BP se desplaza de manera pasiva un determinado número de micras inmerso en un contexto de un movimiento colectivo de BP.
- Intercalación lateral (IL), movimiento donde las BP son capaces de desplazarse en un plano de manera activa, logrando abrirse camino entre células contiguas.

Esta clasificación será adoptada durante el desarrollo de esta tesis para describir los movimientos de las BP presentes en el blastodermo del pez cebra durante la epibolia.

Cuantificación de movimientos

Los resultados de la cuantificación nos indican que el movimiento mas abundante fue de D, le sigue DL, luego A y finalmente IL (tabla I). Como se observa en la tabla I, la suma de los porcentajes de los tipos de movimientos supera el 100%. Esto se debe a que una célula es capaz de realizar más de un tipo de movimiento durante la ventana temporal analizada.

Debido a que una célula es capaz de realizar mas de un tipo de movimiento, se realizó la cuantificación del porcentaje de células que presentan más de un tipo de movimiento. Se observó que un alto porcentaje (70%) de las células presentan solo 1 tipo de movimiento, sin presentar preferencia por un tipo en particular. El porcentaje de células que presentan mas de 2 tipos de movimientos disminuye drásticamente a un 13%. Al individualizar los tipos de movimientos involucrados encontramos que en su totalidad estos corresponden a movimientos de desaparición e intercalación lateral. El porcentaje de células que presentan 3 tipos de movimientos corresponde al 4% siendo este comportamiento el menos habitual.

En conclusión, hemos logramos demostrar la presencia de movimientos de RI entre estos estadios, y a diferencia de lo previamente descrito. Hemos demostrado la existencia de movimientos adicionales del blastodermo mediando la epibolia.

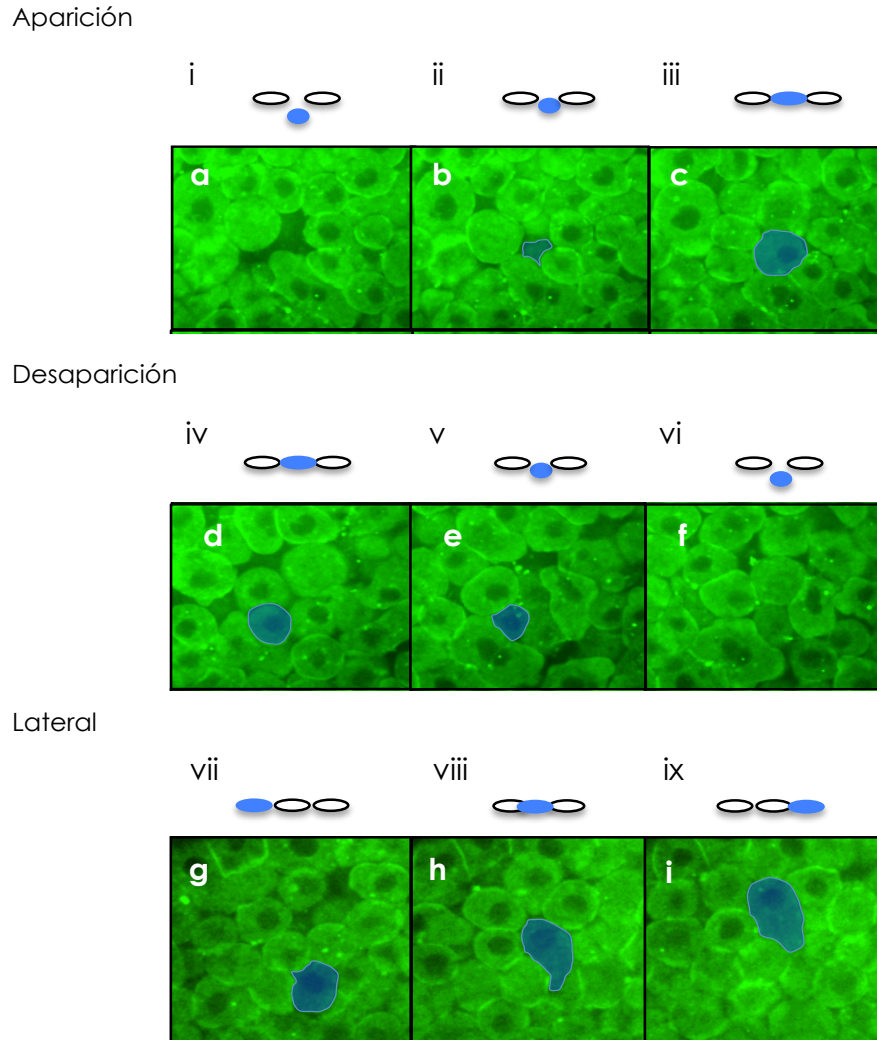


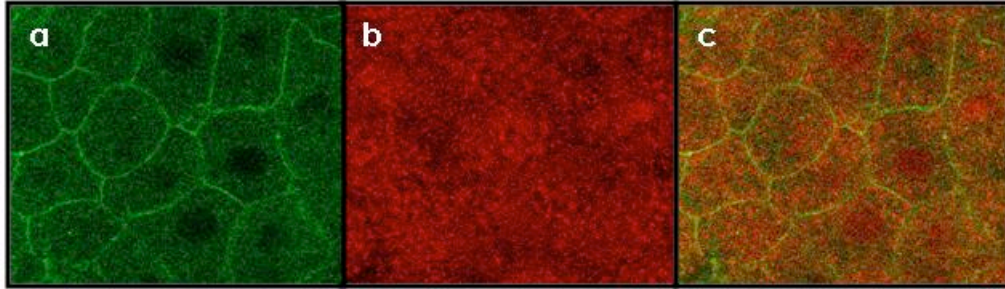
Figura 9: Caracterización de movimientos celulares presentes en el blastodermo de pez cebra. Durante la secuencias temporales es posible observar movimientos de aparición (**a,b,c** visión animal; **i,ii,iii** visión lateral), los cuales corresponden al desplazamiento de una célula en el eje z, desde una capa profunda hasta establecerse en una capa superficial (color azul); movimientos de desaparición (**d,e,f** visión animal; **iv,v,vi** visión lateral), los cuales corresponden al desplazamiento de una célula en el eje z, desde una capa superficial hacia capas profundas (color azul); movimientos de intercalación lateral (**g,h,i** visión animal; **vii,viii,ix** visión lateral). corresponden al desplazamiento de una célula, en el eje xy, entre células contiguas (color azul). El plano de células observado corresponde a la primera capa de BP bajo las EVL.

4.2. Objetivo Específico 2. Evaluar la funcionalidad de N-Cadherina durante la intercalación radial en la epibolia del pez cebra.

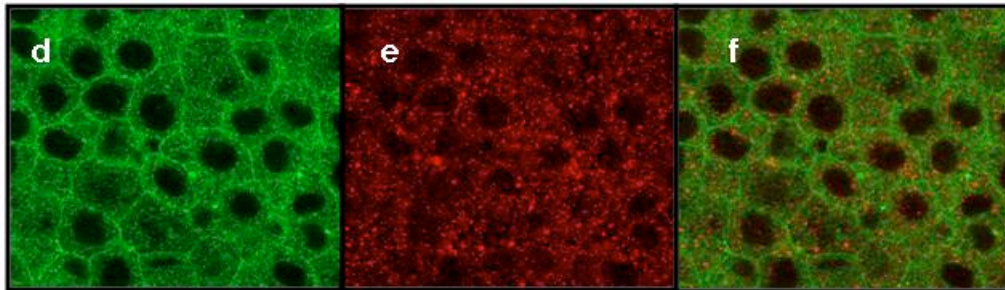
4.2.1. Caracterización de la expresión de N-Cadherina en estadios tempranos del pez cebra en condiciones silvestres.

Como una primera aproximación al papel que cumple N-cadherina en la epibolia, caracterizamos la expresión y localización proteica en las BP. N-cadherina es una molécula de adhesión que a nivel de RNAm presenta una señal débil en EVL y BP superficiales, mientras que en capas mas profundas su señal se vuelve mas intensa (Warga R., 2007). Utilizando inmunofluorescencia indirecta en condiciones silvestres, observamos que N-Cadherina en el estadio de esfera, presenta una señal homogénea intracelular en las BP (figura 10). En el estadio de domo, la señal de N-Cadherina conserva su distribución intracelular pero además se organiza en estructuras granulares que muestran una señal mas intensa de marcación. En el estadio de 30% epibolia, la señal de N-cadherina resulta muy similar al estadio de Domo. En conclusión, el patrón de localización de N-Cadherina muestra una marca intracelular que predomina durante las etapas tempranas del desarrollo, lo que difiere a lo esperado dado que sería una localización en la membrana celular.

Esfera



Domo



30% epibolia

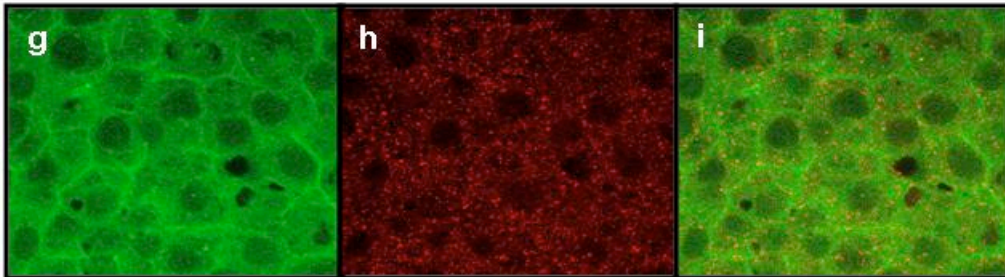


Figura 10: Expresión de N-cadherina en BP durante la epibolia de pez cebra. Utilizando inmunofluorescencia indirecta se analizó la localización de N-cadherina en los estadios de esfera, domo y 30% epibolia. **(a,d,g)** señal GFP, **(b,e,h)** señal N-Cadherina, **(c,f,i)** superposición de ambas imágenes. En el estadio de esfera **(b)** la señal de N-Cadherina es citoplasmática, homogénea mientras que en los estadios de Domo **(e)** y 30% epibolia **(h)** el patrón se modifica, apareciendo estructuras con una señal más intensa y clusterizada, además de una expresión homogénea en el citoplasma. El plano de visualización corresponde a la primera capa de BP bajo las EVL.

4.2.2. Pérdida de función de N-Cadherina por inyección de morfollinos.

Para evaluar la funcionalidad de N-Cadherina, se utilizó como aproximación la generación de embriones morfantes, en los cuales se bloqueó de manera temporal la traducción del RNAm de *n-cadherina* (Lele Z., 2002). Posteriormente, se realizaron videos de esta condición para analizar el comportamiento de las BP.

4.2.2.1. Análisis de la dinámica de las BP

Parámetros de movimiento celular

En base a lo descrito en el objetivo específico 1, se analizó el desplazamiento, trayectoria, persistencia, distancia recorrida en z, velocidad promedio y volumen celular de las BP entre los estadios de esfera y domo (tabla II).

Es posible observar que el blastodermo de embriones morfantes de *n-cadherina* difiere de la condición silvestre, estas diferencias se presentan tanto en aspectos generales como a nivel celular. Nuestros experimentos evidenciaron mayor espacio disponible en el blastodermo, existiendo un aumento en el número y tamaño de los espacios intercelulares. Adicionalmente, fue posible reportar un aumento del tamaño de las BP. Estas observaciones son las primeras evidencias de un posible rol de N-cadherina durante el inicio de la epibolia.

a. Parámetros de movimiento celular

Desplazamiento	(μm)	$15,58 \pm 8,76$
Trayectoria	(μm)	$36,27 \pm 14,89$
Persistencia	(μm)	$0,45 \pm 0,19$
Vel promedio	($\mu\text{m}/\text{min}$)	$1,3 \pm 0,44$
Volumen celular *	(pixel ³)	27275

b. Presencia de protrusiones (%)

Células sin protrusiones	5,9
Blebs	70,6
Lobopodios	23,5

c. Tipos de movimientos (%)

A	12
D	53
DL	39
IL	15

d. N° de movimientos (%)

0	15
1	56
2	24
3	5

Tabla II: Parámetros de comportamiento celular en condición morfante para *n-cadherina*. A partir de seguimientos de célula única se analizó el comportamiento de las BP. **a.** Parámetros de características migratorias de las BP. **b.** Presencia de protrusiones. **c.** Cuantificación de tipos de movimientos. **d.** N° de movimientos distintos mostrados por una célula. n= 35 células. (*Volumen celular, n=10 células). El porcentaje fue calculado de acuerdo al total de células presentes en el campo visual.

Parámetros de movimiento y volumen celular

Con el fin de describir el comportamiento grupal de las BP, se determinó el valor de 5 parámetros de comportamiento celular en la condición morfante de n-cadherina. El resultado del análisis de los parámetros, que representan el valor promedio de la población, fue el siguiente:

- **Desplazamiento celular** ($15,58 \pm 8,76 \mu\text{m}$).
- **Trayectoria celular** ($36,27 \pm 14,89 \mu\text{m}$).
- **Persistencia del movimiento** ($0,45 \pm 0,19$).
- **Velocidad de movimiento celular** ($1,3 \pm 0,44 \mu\text{m}/\text{min}$).
- **Volumen celular:** 27275 pixel³.

Al analizar estos resultados fue posible apreciar que existe un aumento significativo de los parámetros de desplazamiento, trayectoria y velocidad de movimiento celular con respecto a la condición silvestre, dando indicios de una posible condición mas permisiva con respecto a la migración celular dentro del blastodermo, por otro lado, el parámetro de persistencia no presenta una diferencia significativa entre ambas condiciones debido a lo cual es posible inferir que las células presentan un comportamiento migratorio similar en cuanto a su direccionalidad. Adicionalmente se encuentra afectado el volumen celular, lo que pudiera ser explicado por el rol que cumple N-cadherina en la división celular.

Protrusiones

Existe un porcentaje de células que no presenta protrusiones el cual corresponde a un 5,9%, cuyo valor es mucho menor comparado con la condición silvestre. El porcentaje de células que presentan protrusiones en la condición morfante aumenta notoriamente alcanzando un 94,1%, del cual las células que presentan protrusiones tipo blebs corresponden a un 70,6% mientras que las protrusiones tipo lobopodios representan un 23,5% (tabla II).

Tipos de movimientos

Con respecto a los tipos de movimiento hemos logrado establecer que, al igual que lo observado en la condición silvestre, los morfantes de *n-cadherina* presentan los mismos tipos de movimientos presentes en las BP de embriones silvestres (figura 9). Sin embargo la abundancia de estos resulta estar afectada.

Cuantificación de movimientos

En embriones morfantes de *n-cadherina*, los movimientos de aparición corresponden a un 12%, menor a lo observado en la condición silvestre. Los valores de desaparición (53%) y desplazamiento lateral (39%) no evidenciaron diferencias significativas con la condición silvestre mientras la intercalación lateral aumentó al doble. Con respecto a la capacidad de las BP para realizar movimientos, fue posible apreciar que el porcentaje de células que no presentan movimientos corresponde a un 15%, mientras que el 56% de las BP realizan 1 movimiento. Las células que presentan 2 tipos de movimientos corresponden a un 24%, estas BP conservan su preferencia por movimientos de desaparición e intercalación lateral. Las células que presentan 3 tipos de movimientos corresponden a un 5% del total. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en la cuantificación de los movimientos, demostrando que se encuentran afectados dos tipos de movimientos: aparición e intercalación lateral, este último involucrado en presente en células que realizan de 2 tipos de movimientos.

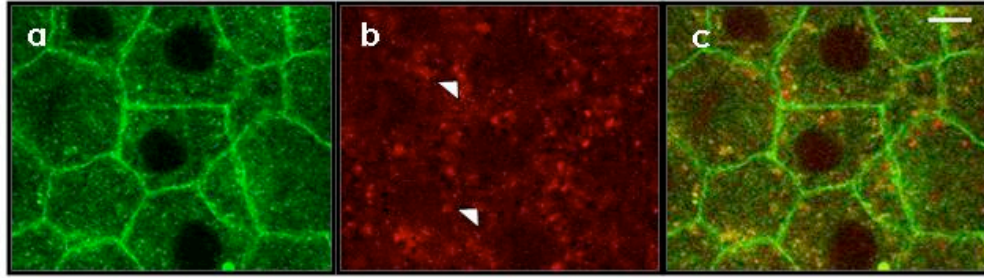
En resumen, estos resultados demuestran que en embriones morfantes de *n-cadherina*, el blastodermo durante las etapas iniciales de la epibolia se comporta como un sistema con movimientos más activos, principalmente afectando el comportamiento de las BP las cuales ven alterada su velocidad de movimiento.

4.2.3. Expresión de E-cadherina en morfantes de *n-cadherina*

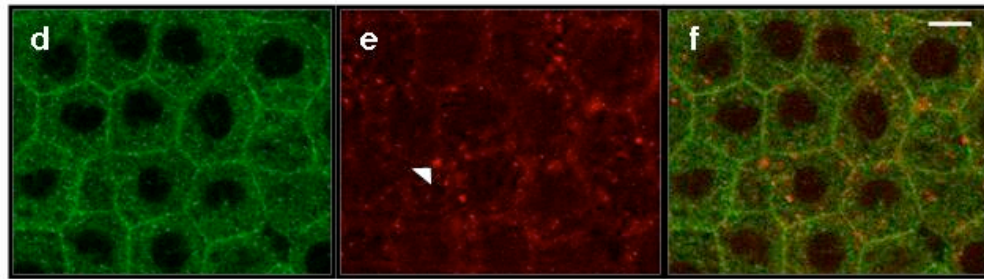
Existe evidencia previa de mecanismos de compensación entre proteínas que cumplen roles similares. Particularmente en el caso de las cadherinas, se describió que en el modelo de ratón mutante de N-Cadherina, el cual presenta aberraciones a nivel cardíaco, SNC y desarrollo del vitelo, E-Cadherina es capaz de sustituir funcionalmente a N-Cadherina durante la morfogénesis cardíaca temprana (Luo Y. 2001). En pez cebra, el mutante de *n-cadherina* (*pac^{-/-}*) sobrevive al menos 24 horas sin desarrollar un fenotipo aparente, lo que sugiere que pudiera operar un mecanismo de compensación similar durante las etapas tempranas del desarrollo. Por esta razón, decidimos evaluar el patrón de expresión de E-cadherina en nuestras condiciones de morfantes de *n-cadherina*.

Utilizando inmunofluorescencia indirecta se estudió la expresión de E-cadherina en tres estadios: esfera, domo y 30% epibolia. En condiciones silvestres, E-Cadherina presenta una señal enriquecida en forma de patrón punteado en la membrana celular de las BP en el estadio de esfera. En el estadio de Domo, la señal de E-Cadherina se enriquece a nivel de la membrana celular logrando distinguir los límites de membrana y sosteniendo una débil señal intracelular. En el estadio de 30% epibolia, la señal de E cadherina pierde su localización a nivel de la membrana celular pudiendo distinguirse una señal tenue intracelular y muy poca señal punteada de mayor intensidad (figura 11).

Esfera



Domo



30% epibolia

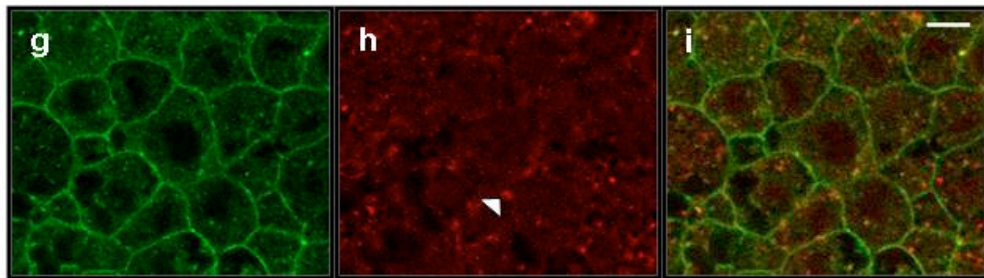


Figura 11: Expresión de E-Cadherina en BP durante la epibolia en condiciones silvestres. Utilizando inmunofluorescencia indirecta se analizó la expresión de E-cadherina en los estadios de Esfera, Domo y 30% epibolia: **(a,d,g)** señal GFP, **(b,e,h)** señal E-Cadherina, **(c,f,i)** Superposición de imágenes. El patrón de expresión de E-Cadherina presenta una débil señal citoplasmática con presencia de patrón punteado (cabeza de flecha blanca) en las cercanías de la membrana celular. En el estadio de Domo la localización de esta proteína resulta evidente en la membrana celular (consistente con reporte de Song S., 2013). En 30% epibolia, desaparece la señal de E-Cadherina de la membrana celular y se mantiene la señal intracelular. El plano de visualización corresponde a la primera capa de células bajo las EVL.

En morfantes de *n-cadherina*, el patrón de expresión de E-Cadherina se altera drásticamente. En el estadio de esfera, el patrón de expresión observado es similar al presentado en embriones silvestres, con una tenue señal intracelular y un patrón punteado con señal mas intensa en las cercanías de la membrana celular. Sin embargo, en el estadio de domo la señal de E-Cadherina se modifica drásticamente presentando una señal mas intensa, homogénea citoplasmática sin poder percibir la localización de la membrana celular. Durante el estadio de 30% epibolia, la señal de E-Cadherina nuevamente se modifica volviendo a presentar señal intracelular y patrón punteado en las cercanías de la membrana celular (figura 12).

Al realizar una comparación entre las condiciones silvestre y morfante es posible visualizar que frente a la disminución de N-Cadherina disponible, estos embriones evidencian una alteración en el patrón de expresión de E-Cadherina de manera transitoria. El patrón de expresión del embrión morfante de *n-cadherina* difiere del patrón presente en la condición silvestre, durante el estadio de esfera el morfante de *n-cadherina* exhibe una señal levemente mas débil que la condición silvestre, sin embargo la localización de la proteína se mantiene. Durante el estadio de domo, el patrón de expresión que presenta N-Cadherina pierde su localización presentando una señal homogénea intracelular. Durante el estadio de 30% epibolia es posible apreciar que existe un aumento en la intensidad de se señal de E-Cadherina, además se observa una recuperación parcial del patrón de expresión exhibido en la condición silvestre (Figura 13).

Este resultado da cuenta de que los niveles de N-Cadherina disponibles en las BP son importantes para mantener los niveles de expresión de E-Cadherina en este tipo celular. Resulta interesante observar que en embriones morfantes durante domo, cuando se reporta por primera vez la presencia del movimiento de intercalación radial, se presentan las alteraciones en la dinámica de las BP incluyendo alteraciones en la abundancia de los movimientos de IR.

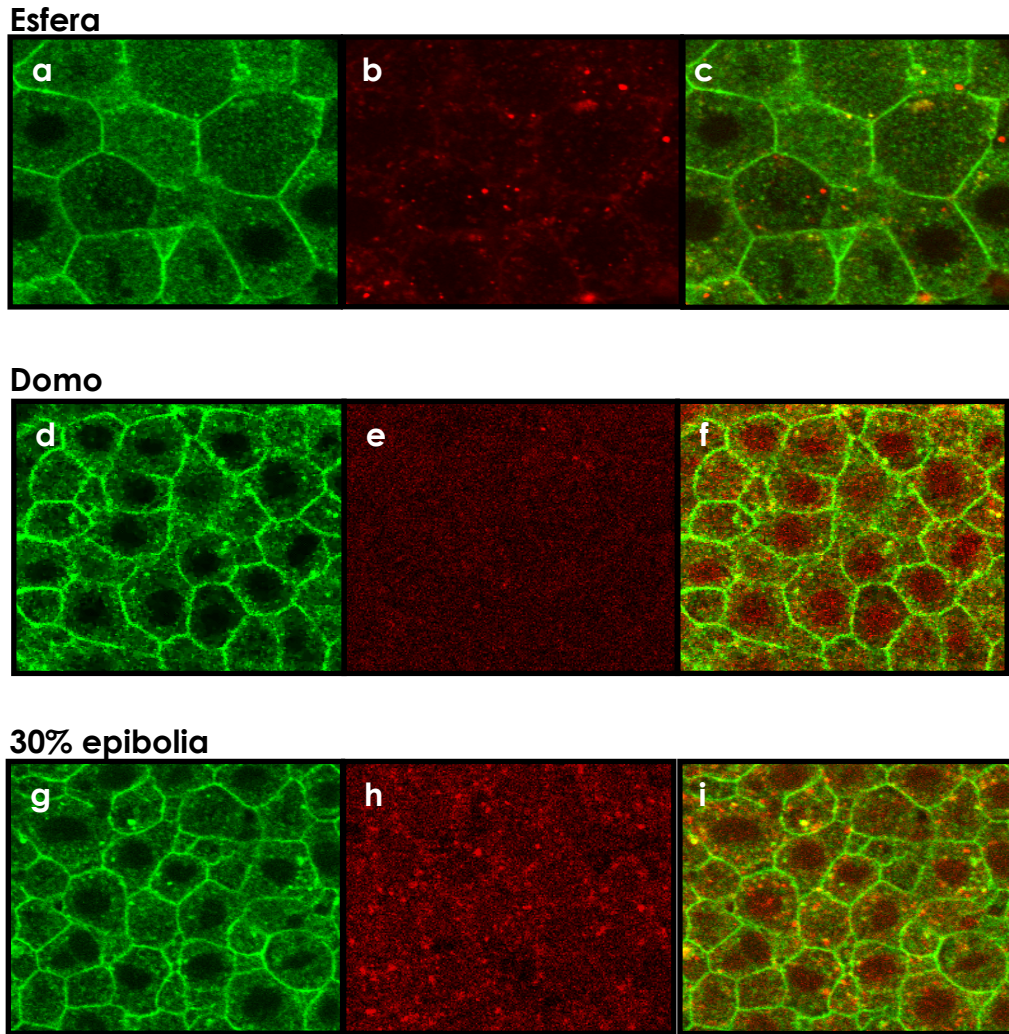


Figura 12: Expresión de E-Cadherina en BP en embriones morfantes de *n-cadherina*. Utilizando inmunofluorescencia indirecta contra E-Cadherina se analizó la dinámica de su expresión en embriones morfantes de *n-cadherina* en los estadios de esfera, domo y 30% epibolia. **(a,d,g)** señal GFP **(b,e,h)** señal E-Cadherina **(c,f,i)** Superposición de ambas imágenes. En esfera, la señal de E-Cadherina es intracelular, con presencia de un patrón punteado cercano a los bordes de membrana. En el estadio de domo, el patrón de expresión se modifica presentando una señal citoplasmática homogénea. En el estadio de 30 % epibolia es posible observar un aumento en la intensidad de señal y la recuperación del patrón de expresión exhibido durante el estadio de esfera. El plano de visualización corresponde a la primera capa de células bajo las EVL.

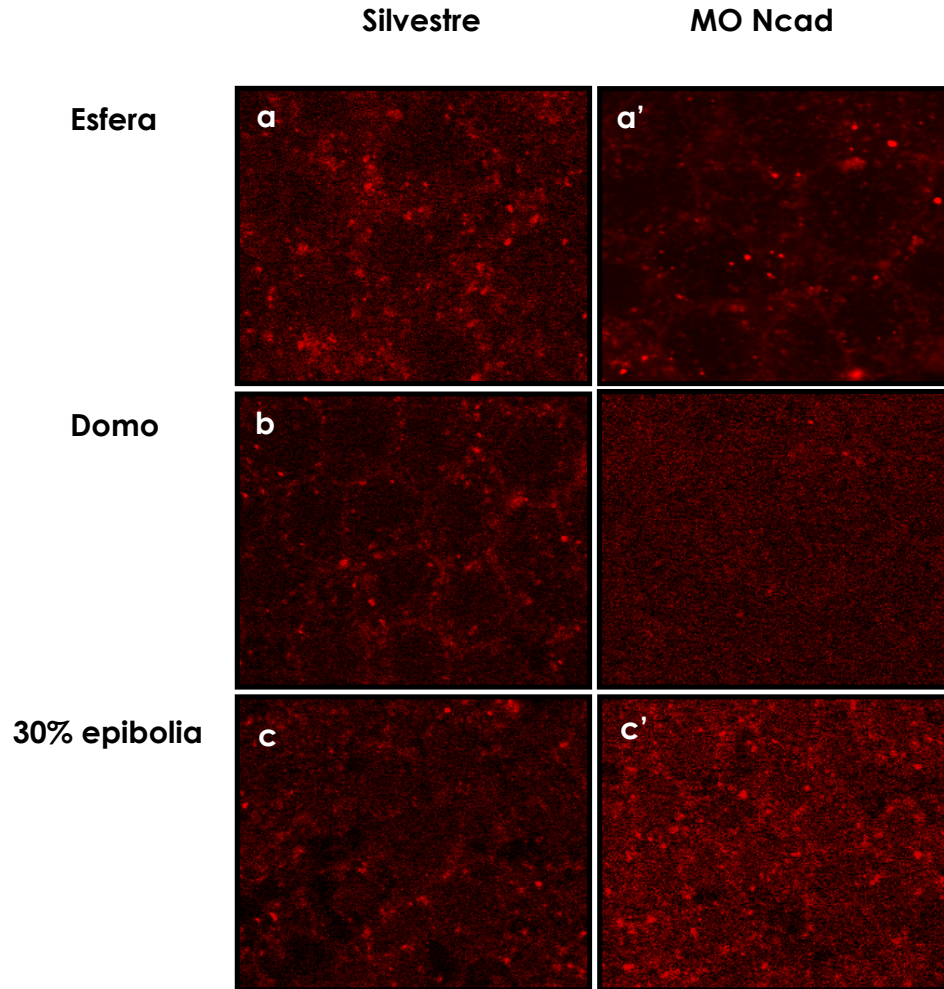


Figura 13: Análisis comparativo de la expresión de E-Cadherina en condiciones silvestre y MO *n-cadherina*. En condiciones Silvestres (**a**, **b**, **c**), el patrón de expresión de E-Cadherina en estadio de esfera presenta una señal intracelular y patrón punteado en las cercanías de la membrana celular. En domo, la señal presenta una localización similar pero pudiendo observar señal a nivel de la membrana celular. En 30%epibolia, la señal de membrana se pierde manteniendo una señal intracelular. En condición MO *n-cadherina* (**a'**, **b'**, **c'**) el patrón de expresión se modifica. En esfera, la señal es similar a la condición silvestre. En domo, la señal se altera perdiendo la localización, presentando una señal intracelular. En 30% epibolia, la señal intracelular se mantiene y re aparece el patrón punteado. El plano de visualización corresponde a la primera capa de células bajo las EVL.

Como una segunda aproximación para analizar el comportamiento de E-cadherina frente a la pérdida de función de N-cadherina, se utilizó RT-PCR para establecer la dinámica de la expresión del RNAm de esta proteína (figura 14). Debido a que formalmente esta aproximación no es cuantitativa se tomaron los resguardos que nos permitieran realizar una comparación entre los estadios de esfera, domo y 30% epibolia. A la izquierda de la figura 14 se encuentra el panel de expresión de *e-cadherina* en distintos estadios, mientras que a la derecha se encuentra la detección de expresión de actina la cual fue utilizada como un control de carga.

Es posible observar que existe una diferencia en la dinámica de expresión de esta proteína entre las condiciones silvestres y morfante de *n-cadherina*. En la condición silvestre, existe una disminución de la señal del mensajero de *e-cadherina* a partir del estadio de domo el cual se sostiene durante el estadio de 30% epibolia. Sin embargo, en la condición morfante, los niveles de expresión de mensajero de *e-cadherina* no se encuentran alterados entre los estadios mencionados (figura 14).

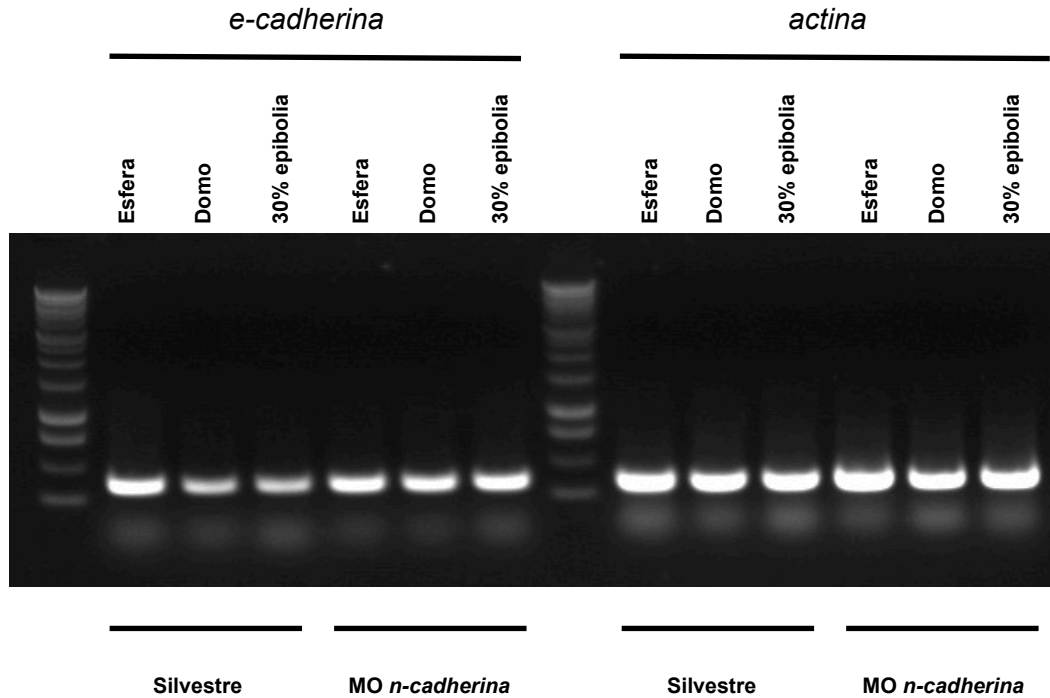


Figura 14: Dinámica de la expresión de *e-cadherina* en condiciones silvestres y morfantes para *n-cadherina*. RT-PCR de *e-cadherina* (carril 1 al 6) y *actina* (carril 7 al 12), los cuales fueron detectados en distintos estadios del desarrollo del pez cebra. Ambos genes fueron detectados en los estadios de esfera, domo y 30% epibolia. *e-cadherina*, en condiciones silvestres presenta un patrón donde su expresión disminuyen en el estadio de domo y se mantiene en 30% de epibolia. En condiciones de MO *n-cadherina*, no se observa una variación de los niveles de expresión. Detección de los niveles de *actina* fueron utilizados como control.

4.3. Análisis comparativo entre condición silvestre y morfantes de *n-cadherina*.

Análisis del comportamiento global del blastodermo

Establecido el comportamiento de las BP en la condición silvestre, considerando su dinámica y morfología celular, corresponde evaluar el posible rol que cumple N-Cadherina entre los estadios de esfera y domo. A partir de un análisis comparativo fue posible establecer la existencia de un fenotipo en embriones morfantes de *n-cadherina* a nivel celular, observaciones del blastodermo a baja magnificación no presenta alteraciones evidentes. La disminución de los niveles de N-Cadherina es capaz de generar alteraciones en la migración y morfología de las BP las cuales se resumen a continuación:

- a. A nivel tisular se observa un mayor número de espacios intercelulares.
- b. A nivel celular las BP presentan:
 - Aumento en la velocidad de movimiento.
 - Aumento de tamaño.
 - Aumento en el número de células que presentan actividad protrusiva
 - Aumento en la estabilidad de lobopodios

Los movimientos descritos son tridimensionales y pueden abarcar todo el blastodermo, nos referiremos a aquellos que somos capaces de visualizar los cuales corresponderán a las 2 capas de BP mas superficiales sin tener certeza de lo que ocurre en capas mas profundas. La evidencia muestra una diferencia en el comportamiento de las BP entre la condición silvestre y morfante, pudiendo observar un aumento en la velocidad de movimiento de las BP en la condición morfante siendo capaces de recorrer una mayor distancia dentro del blastodermo en nuestra ventana temporal. Adicionalmente, al alterar el patrón de expresión de N-Cadherina, es posible observar aumento en los espacios intercelulares y disminución del número de puntos de contacto entre las BP dentro del blastodermo, además es posible observar un aumento del volumen celular.

El incremento en el tamaño de los espacios intercelulares presenta un entorno más permisivo para la migración de las BP, esto sugiere que una baja disponibilidad de espacio presentes en la condición silvestre pudiera restringir los movimientos dificultando el desplazamiento de las BP y con ello disminuyendo su velocidad de migración. Otra razón que pudiera explicar el aumento del movimiento es que la disminución de N-Cadherina disponible en embriones morfantes incida en las uniones célula-célula que son mediadas por N-Cadherina. Al disminuir las uniones efectivas mediadas por estas proteínas, las células serían capaces de desplazarse de manera más fluida dentro del blastodermo y con ello existe la posibilidad de que se aumente su velocidad de migración..

Análisis del movimiento de las blastómeras profundas

Los resultados de los parámetros que describen la dinámica de movimiento de las BP a nivel poblacional tales como trayectoria, desplazamiento y velocidad promedio muestran que existen diferencias significativas entre las condiciones silvestre y morfante de *n-cadherina*. Al observar el movimiento de las BP, es posible percibir que estas se mueven en forma más dinámica frente a una disminución de los niveles de N-Cadherina. Nuestro morfante exhibe un aumento en la velocidad de migración de las BP, lo cual pudiera ser indicativo de una pérdida de la adhesión célula-célula mediada por N-Cadherina.

A partir de la secuencia temporal, logramos comprobar la existencia de movimientos de RI (en nuestro contexto definido como aparición de una célula desde capas profundas) así como de otros 3 tipos de movimientos celulares: desaparición, desplazamiento lateral e intercalación lateral, los cuales definirían la dinámica de las BP dentro del blastodermo.

Las BP son células que realizan movimientos de manera independiente a su entorno. Embriones morfantes presentan alteraciones en la abundancia de este tipo de movimiento, células que presentan 1 tipo de movimiento disminuyen a 56%, no presentando preferencia por alguno de ellos, mientras que aquellas que presentan 2 tipos de movimientos aumentan a un 24%, presentando preferencia por los mismos movimientos. Estos resultados sugieren que la disminución de la disponibilidad de

esta proteína vuelve mas permisivo el entorno en el que se desarrolla la migración, brindando a las células mayor libertad de movimiento.

En embriones silvestres y morfantes de *n-cadherina* coexisten en el blastodermo 3 tipos de movimientos celulares con distinta orientación. En embriones morfantes se ve modificada la abundancia de dos tipos de movimientos de aparición e intercalación lateral además en esta condición el blastodermo se presenta como un grupo de células donde existe un aumento del tamaño y número de espacios intercelulares. En este contexto las BP se encuentran inmersas en un entorno que les brinda una mayor posibilidad para realizar movimientos celulares hecho demostrado por la mayor dinámica de movimiento y el aumento en el número de protrusiones. Sin embargo esto no explica porqué se afecta solo una dirección de movimiento, sugiriendo que esta alteración pudiera tratarse de un comportamiento alterado a nivel de célula única. Al comparar entre ambas condiciones el porcentaje de células que no presentan movimientos permanece constante, mientras que el porcentaje de células que presentan 1 solo movimiento disminuye y al mismo tiempo aumenta el número de células que realizan 2 movimientos demostrando que esto afecta a la población celular que se encuentra en movimiento. Al analizar el comportamiento de las células que presentan 2 movimientos es posible notar que se presenta un aumento solo en los movimientos de intercalaciones laterales.

Embriones morfantes de *n-cadherina* presentan una alteración en la abundancia de dos de estos tipos de movimiento, donde las apariciones disminuyen en un 20%, mientras que la intercalación lateral aumenta en un 8,6 %. Actualmente no contamos con evidencia que involucre a N-Cadherina en movimientos con solo 1 orientación, sin embargo estos resultados sugieren que dicha proteína pudiera orientar el movimiento de las BP hacia capas mas superficiales del blastodermo, sin afectar las movimientos en otras orientaciones.

5. DISCUSION

Los movimientos morfogenéticos involucrados en las etapas tempranas del desarrollo han sido de gran interés en el campo de la biología del desarrollo debido a que determinan el plan de desarrollo de un organismo. Durante la gastrulación, los movimientos celulares coordinados reorganizan el blastodermo para dar origen a las capas germinales y el eje embrionario. Un movimiento que en pez cebra se inicia previo a la gastrulación y continúa durante ella es la epibolia, el cual media la expansión y adelgazamiento del blastodermo (Kimmel CH., 1995). Durante la epibolia ocurre la expansión de tres tipos celulares en dirección al polo vegetal: EVL, YSL y BP. La epibolia de las BP se caracteriza por un re-arreglo celular cuyo principal movimiento es conocido como intercalación radial (RI), en el cual las BP migran desde capas profundas en dirección a capas más superficiales dando origen a un adelgazamiento y expansión del blastodermo (Warga R.M., 1990; Wilson E., 1995). Miembros de la super familia de las cadherinas, proteínas de adhesión célula-célula con una función en el desarrollo, juegan un rol central en la epibolia, no sólo en pez cebra sino también en otros organismos como *Xenopus laevis*.

En pez zebra, el análisis de embriones mutantes y morfantes de *n-cadherina* durante estadios posteriores a la epibolia, ha mostrado que N-cadherina participa en el movimiento de intercalación radial y en la persistencia de protrusiones celulares durante la neurulación (Lele Z., 2002; Hong E., 2006). Sin embargo, aún se desconoce si cumple un papel durante la epibolia.

Durante el desarrollo de esta tesis hemos descrito la dinámica del movimiento de las BP en una ventana temporal discreta del desarrollo embrionario buscando establecer el posible rol de N-Cadherina en los movimientos de intercalación radial.

El morfante de *n-cadherina* muestra alteraciones morfológicas y de comportamiento de las BP. Es posible notar en el blastodermo de estos embriones una disminución en el número de células, además de un aumento en la velocidad de migración y el volumen de las mismas. Con respecto a la morfología de las BP, ellas presentan un aumento en el número de protrusiones y una alteración en la abundancia de los tipos de movimientos que exhiben (aparición e intercalación

lateral). El aumento de volumen puede estar relacionado con una disminución en la tasa de división celular. Existe evidencia que demuestra que durante las etapas tempranas del desarrollo (clivaje), las BP presentan una alta tasa de división celular, siendo incapaces de recuperar su tamaño original previo al ingreso a la siguiente ronda división celular. Debido a esto, el blastodermo presenta un gran número de células de tamaño pequeño (Kane D., 1993). Nuestros datos sugieren que la alteración de los niveles de N-Cadherina podría estar disminuyendo la tasa de división celular, lo cual es consistente con el rol previamente atribuido a esta proteína en la regulación del ciclo celular. En células de melanoma, la inhibición de N-Cadherina afecta la proliferación celular, inhibiendo vías de señalización que activan proteínas del tipo ciclinas asociadas a la activación del ciclo celular, mientras exhiben un aumento la expresión de proteínas inhibitoras del ciclo celular, disminuyendo así el número del células (Cioczyk-Wierzbicka D., 2012).

Además, es posible observar un aumento en el número de células que presentan protrusiones en la superficie de membrana lo cual indica que existen más células dispuestas a realizar algún tipo de movimiento, ya que las protrusiones son estructuras típicamente involucradas en procesos de migración celular. Esto pudiera ser explicado debido a que los morfantes de *n-cadherina* perderían adhesión célula-célula lo cual permitiría que las células emitan protrusiones y se encuentren dispuestas a presentar un comportamiento migratorio frente a posibles señales presentes en el blastodermo (Trinkaus J.P., 1973). En pez cebra, las BP durante la epibolia presentan un comportamiento similar al descrito previamente para las células del primordio germinal (PGC), las cuales muestran un comportamiento de migración *in vivo* mediado por blebs, utilizando sus células vecinas como sustrato durante su migración. En este tipo celular en respuesta las células se polarizan en dirección a la fuente de una molécula atrayente (la quimioquina CXCL12) para migrar en esa dirección. En ausencia de CXCL12, la migración de este tipo celular se vuelve azarosa, sustentando la hipótesis de que las quimioquinas actúan como señales de guía durante la migración de estas células (Kardash E., 2009). Este tipo de migración resulta muy interesante debido a su similitud con el movimiento que hemos descrito para las BP en el blastodermo de pez cebra. Nuestros resultados sugieren la

posibilidad de que la migración de las BP, al igual que las células del primordio germinal, ocurriría utilizando como sustrato células vecinas. De hecho, la migración de las BP no sería mediada por interacciones célula-matriz extracelular debido a la ausencia de ésta durante estadios tempranos del desarrollo, la que ha sido reportada sólo a partir del 60% de epibolia (Latimer A., 2010).

Al observar la dinámica de movimiento de las BP en nuestro modelo morfante es posible percibir que presentan un comportamiento más dinámico, lo cual fue ratificado a través de los parámetros de migración celular, tales como: trayectoria, desplazamiento y velocidad de migración, así como un aumento en el porcentaje de células que realizan movimientos. Nuestros resultados sugieren que una disminución en la disponibilidad de N-Cadherina genera un entorno más permisivo para la migración de las BP brindando una mayor libertad de movimiento. Estos resultados sugieren que N-Cadherina pudiera tener un rol restrictivo en el movimiento de este tipo celular.

Durante estadios tempranos del desarrollo de pez cebra, la intercalación radial era el único movimiento descrito para las BP (Kimmel C., 1995). Las primeras evidencias de su existencia y vinculación al proceso de la epibolia provienen de estudios utilizando tinciones vitales (Warga R.M, 1990; Wilson E., 1995). Sólo más tarde se demostró de manera directa su presencia en estadios tardíos de la epibolia (80%) (Kane D., 2005). Estudios recientes demuestran que la intercalación radial se encuentra presente desde el estadio de esfera y co-existe hasta el 50% de epibolia con otros tipos de movimientos recientemente descritos (Bensch, 2013). En esta tesis, hemos logrado corroborar la existencia del movimiento de intercalación radial (definido como aparición de una célula desde capas profundas) así como describir otros 3 tipos de movimientos celulares distintos: desaparición, desplazamiento lateral e intercalación lateral, los cuales definirían la dinámica de las BP dentro del blastodermo. Embriones morfantes de *n-cadherina* presentan una alteración en la abundancia de los movimientos de aparición (intercalación radial) e intercalación lateral. El movimiento de aparición presenta una disminución en su abundancia de un 20%, mientras que la intercalación lateral presenta un aumento de un 8,6 %. Es posible apreciar que la disminución de la abundancia en los movimientos de aparición

podrían ser reemplazados por movimientos de IL. Esto demuestra que existe una pérdida exclusivamente en la direccionalidad de movimiento hacia capas superiores (intercalación radial) siendo este reemplazado por un movimiento lateral. La pérdida de RI podría deberse a la observada alteración en la localización hacia la membrana de E-Cadherina, tras la pérdida de función de N-Cadherina. Existe evidencia que demuestra que las BP y EVL interactúan mediante E-Cadherina, y que esta interacción se ve afectada en embriones mutantes para esta proteína dando origen a defectos en la epibolia de las BP (Shimizu T., 2005).

El análisis del patrón de expresión de N-Cadherina evidenció que la presencia de la señal no se encuentra a nivel de membrana sino que tiene una localización intracelular. Esto nos permite sugerir que al tratarse de células en constante movimiento las adhesiones poseen un alto dinamismo en la localización de esta proteína mediado por un reciclamiento en vesículas, tal como ha sido recientemente demostrado para N-Cadherina durante la migración celular en astrocitos (Peglion F., 2014).

En condición silvestre, hemos establecido que existe una alteración en el patrón de expresión de *e-cadherina*, presentando una disminución en los niveles de mRNA desde el estadio de domo, el cual se sostiene durante 30% de epibolia. Sin embargo, esto no afecta mayormente la localización de la señal a nivel celular sino que solo afecta levemente su abundancia, la cual disminuye. Esto resulta consistente con que domo es la etapa donde se inicia el comportamiento migratorio de este tipo celular. En el embrión morfante de *n-cadherina*, al realizar el análisis de los niveles de mRNA de *e-cadherina* es posible observar una alteración en sus niveles de expresión presentando niveles sostenidos de mensajero, lo cual sugiere que N-Cadherina ejercería un rol en la regulación de la expresión de *e-cadherina*. Con respecto a la expresión proteica, es posible observar una alteración en la localización de la señal de E-Cadherina en el estadio de domo donde la señal pierde su localización tornándose intracelular mientras que en 30% de epibolia retoma el patrón observado en la condición silvestre (con presencia de señal en la membrana).

Nuestros resultados sugieren que N-Cadherina cumple un rol durante las etapas tempranas en el desarrollo, entre esfera y domo, estadios en los cuales se ha

reportado que inicia la migración de las BP. El rol que cumpliría esta proteína, probablemente mediando interacciones célula- célula, sería mas bien el restringir la migración de las BP, lo que es evidenciado por los parámetros que describen la dinámica de migración celular los que frente a la disminución de N-Cadherina disponible aumentan significativamente. Variaciones en los niveles de expresión de N-Cadherina además inducirían, de manera indirecta, alteraciones en los niveles de expresión, además de cambios transitorios en la localización de E-cadherina, lo cual podría incidir en el comportamiento migratorio de las BP especialmente en la aparición de eventos de intercalación radial. Actualmente no contamos con evidencia que involucre a N-Cadherina en movimientos unidireccionales, pese a ello nuestros resultados sugieren que esta proteína pudiera orientar de manera indirecta el movimiento de las BP en dirección a las capas mas superficiales del blastodermo, sin afectar al resto de los movimientos.

5.1. N-Cadherina y su posible rol en el blastodermo de pez cebra.

En el blastodermo del pez cebra, las BP presentan una gran actividad durante las etapas tempranas del desarrollo. Posterior a las etapas de clivaje se inicia su actividad migratoria, la cual les permite realizar una serie de movimientos que median re-arreglos celulares previos a la formación de las capas germinales. Durante estas etapas las BP presentan una morfología redondeada y pequeño volumen, presentando en su superficie estructuras asociadas a comportamientos migratorios en la forma de protrusiones tipo blebs y lobopodios. Las señales que median estos movimientos aún son desconocidas, sin embargo existen agentes motogénicos (por ejemplo, factores de crecimiento) cuya función es estimular la actividad de membrana asociada a la migración celular, los cuales se encuentran presentes de manera homogénea en el blastodermo.

Al analizar los movimientos que realizan estas células resulta interesante notar que solo los movimientos de intercalación radial se encuentran disminuidos, pese a que las BP poseen la capacidad de realizar indistintamente cualquier tipo de movimiento, lo cual sugiere que N-Cadherina pudiera estar involucrada en brindar

una dirección hacia capas superficiales en el movimiento de las BP participando como una molécula involucrada en el movimiento de intercalación radial. El contexto en el cual se encuentran inmersas las BP, corresponde a una etapa del desarrollo donde no han sido descritas señales quimio-atrayentes o quimio-repelentes que pudieran direccionar estos movimientos. Sin embargo, es posible especular acerca de la presencia de alguna señal motogénica, que sería la responsable del movimiento celular, la cual se encuentre homogéneamente expresada dentro del blastodermo e induzca una respuesta de migración celular sin establecer una dirección.

Nuestro modelo morfante de *n-cadherina* nos ha permitido establecer que dicha proteína juega un papel en la dinámica, abundancia de movimientos y morfología de las BP, demostrando su participación durante las etapas tempranas del desarrollo del pez cebra. En esta condición hemos logrado determinar alteraciones en la dinámica de migración de las BP siendo la más evidente un aumento en su velocidad de migración. Al analizar este fenotipo es posible plantear que en este modelo N-Cadherina pudiera cumplir un rol restrictivo del movimiento de las BP. Al analizar el comportamiento migratorio de este tipo celular además de encontrar un aumento en la velocidad de migración, existe un mayor número de células que se muestran predispuestas a migrar en comparación con la condición silvestre.

Existe evidencia de un mecanismo a través del cual N-Cadherina pudiera mediar el comportamiento migratorio, la inhibición por contacto mediada por N-cadherina es un fenómeno que ha sido descrito en células de la cresta neural. Cuando dos células entran en contacto y establecen adhesiones mediadas por N-cadherina se activa una cascada de señalización intracelular que media la presencia o ausencia de protrusiones, (Theveneau E., 2010). Nuestros experimentos sugieren la presencia de este tipo de mecanismo debido al tipo de movimiento que presentan las BP, el cual corresponde a células que migran de manera independiente en distintas direcciones, situación que se asemeja al comportamiento de las crestas neurales en ausencia de un quimio-atrayente.

¿Cómo pudiera N-cadherina brindar direccionalidad en el movimiento de las BP?, ¿Qué provoca que solo los movimientos hacia capas más superficiales se vean

afectados? Debido a que desconocemos la dinámica de este tipo celular en capas mas profundas proponemos un modelo que sugiere este tipo de comportamiento.

5.2. Modelo

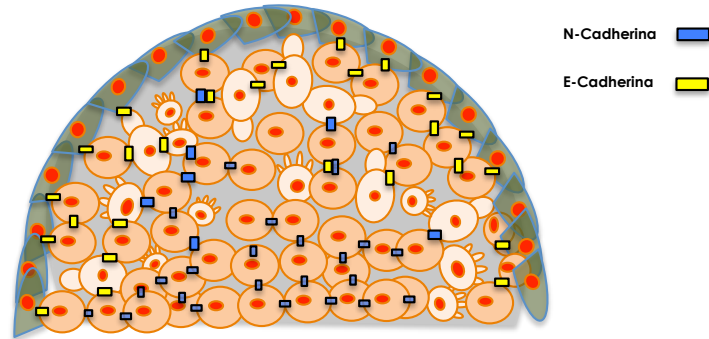
En condición silvestre, las BP migran de manera independiente y en distintas orientaciones. Este tipo de migración se encontraría mediada por señales motogénicas las cuales desencadenan una señalización intracelular que media la aparición de protrusiones (Palamidessi A., 2008). Durante su trayectoria estas células presentan numerosos eventos de inhibición por contacto los cuales permitirían cambiar la orientación de sus movimientos (Theveneau E., 2010). Cada BP presente en el blastodermo es capaz de realizar indistintamente cualquier tipo de movimiento que hemos reportado previamente: Aparición (Intercalación radial), Desaparición e Intercalación lateral. Los tipos de migración que presentan estas células no evidencian un patrón definido con respecto a la forma en la cual se reorganizan las células.

Embriones morfantes de *n-cadherina* presentan una dinámica de migración de las BP alterada con respecto a la condición silvestre. Al analizar la dinámica fue posible establecer que presentan un aumento en la velocidad de migración, fenotipo atribuible a una disminución en la disponibilidad de N-Cadherina lo cual permitiría que las células establezcan menos uniones intercelulares mediadas por esta proteína, brindándole a las células una mayor libertad de movimiento dentro del blastodermo.

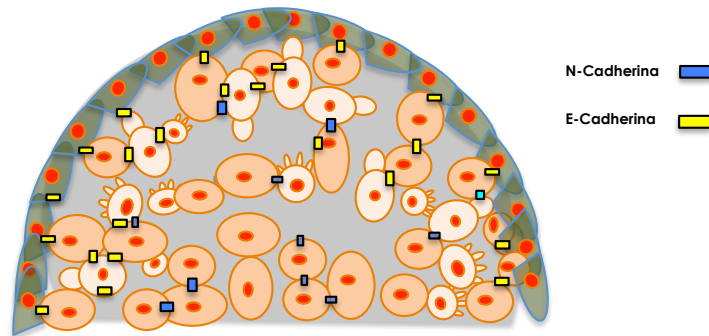
Con respecto al comportamiento de las BP logramos observar que los movimientos son conservados en ambas condiciones (silvestre y morfante), sin embargo se encuentra alterada la dinámica y abundancia de dos de ellos, intercalación radial (disminuye) e Intercalación lateral (aumenta), esto sugiere que el rol de N-Cadherina pudiera ser restrictivo en cuanto al movimiento de las BP. El disminuir los niveles de expresión de N-Cadherina induce alteraciones en E-Cadherina, este incide tanto sus niveles de expresión del RNA mensajero como la localización de la proteína en la membrana celular. Estos resultados son consistentes con el rol propuesto para E-Cadherina en la migración de las BP, la cual permitiría a

estas células interactuar con sus vecinas y especialmente con EVL, y de esta forma realizar movimientos de Intercalación radial (Song S., 2013).

Condición Silvestre



Morfante de *n-cadherina*



↑ Velocidad de migración
↑ N° células que emiten protrusiones

Figura 15: Modelo propuesto de la dinámica de las BP entre los estadios de esfera y domo. a. Condición silvestre. Las BP migran presentando trayectorias independientes mediadas por 4 tipos de movimientos. Las trayectorias se definen por eventos de inhibición por contacto que presente cada célula (mediados por N-Cadherina) mientras que la migración depende del contacto célula-célula que establecen las BP mediados por E-Cadherina. **b. Condición morfante.** El blastodermo presenta un menor número de BP, la dinámica de movimiento se encuentra mediada por proteínas de adhesión. Al disminuir la disponibilidad de N-cadherina existe una pérdida de interacción célula-célula, lo cual permite un movimiento mas libre de las BP. El gradiente dispone de una menor cantidad de esta proteína disminuyendo los eventos de inhibición por contacto y afectando la señal que direcciona las BP a capas mas superficiales, por lo tanto la migración se ve favorecida.

6. CONCLUSION

En esta tesis hemos logrado describir un posible rol de la proteína N-Cadherina en la dinámica de migración de las BP en estadios tempranos del desarrollo en el blastodermo de pez cebra. N-Cadherina resulta importante en la regulación de la dinámica de este tipo celular evidenciando un rol modulador en su velocidad de movimiento y la predisposición de las mismas a migrar.

Adicionalmente logramos establecer la presencia de movimientos de RI de los cuales no existía evidencia previa en estos estadios, pudiendo identificando y caracterizando la existencia de 3 tipos de movimientos adicionales: intercalación lateral, desaparición y desplazamiento lateral, los cuales coexisten con la RI durante esta ventana temporal.

Nuestros resultados sugieren fuertemente que N-cadherina además de regular la dinámica de las BP modularía de manera indirecta a E-Cadherina la cual posee un rol fundamental en la migración de este tipo celular durante la RI.

7. BIBLIOGRAFIA

Bensch R.; Driever, W. “Non directional radial intercalation deminates deep cell behavior during zebrafish epiboly”. *Biology Open* 1-10, 2013.

Cooper M.S.; Kimelman D. “Visualizing Morphogenesis in Transgenic Zebrafish Embryos Using BODIPY TR Methyl Ester Dye as a Vital Counterstain for GFP”. *Developmental Dynamics* **232**: 359–368, 2005.

Hong E.; Brewster R. “N-cadherin is required for the polarized cell behaviors that drive neurulation in the zebrafish”. *Development* **133**: 3895-3905, 2006.

Kane D.; Schilling T. “Mutations in half baked/E-cadherin block cell behaviors that are necessary for teleost epiboly. *Development*”. **132**: 1105-1116, 2005.

Keller R.E. “The cellular basis of epiboly: An SEM study of deep-cell rearrangement during gastrulation in *Xenopus laevis*”. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* **60**: 201-234, 1980.

Kimmel C. “Stages of embrionic development of the zebrafish”. *Developmental Dynamics*. **203**: 253-310, 1995.

Lara D.M.; Bracke M. “N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling”. *The International Journal of Developmental Biology* **48**: 463-476, 2004.

Lele Z.; Laure Bally-Cuif L. “parachute/n-cadherin is required for morphogenesis and maintained integrity of the zebrafish neural tube”. *Development* **129**: 3281-3294, 2002.

Lepage S.; Bruce A. “Zebrafish epiboly: mechaniscs and mechanism”. *The International Journal of Developmental Biology* **54**: 1213-1228, 2010.

Luo Y.; Radice G.L. “Rescuing the N-cadherin knockout by cardiac-specific expression of N- or E-cadherin”. *Development* **128**: 459-469, 2001.

Montero J.A.; Heisenberg C.P. “Gastrulation dynamics: cells move into focus” *TRENDS in Cell Biology* **14**: 620-627, 2004.

Peglion F.; Etienne-Manneville S. “Adherens junction treadmilling during collective migration”. *Nature cell biology* **16**: 639-651, 2014.

Petrie J.R.; Yamada M.K. “At the leading edge of three-dimensional cell migration”. *Journal of Cell Science* **125**: 1–10, 2012.

Shimizu T.; Hibi M. “E-cadherin is required for gastrulation cell movements in zebrafish”. *Mechanisms of Development* **122**: 747-763, 2005.

Solnica-Krezel L. “Gastrulation zebrafish- all just about adhesion?”. *Current Opinion in Genetics & Development* **16**: 433–441, 2006.

Song S. “Pou5f1-Dependent EGF Expression Controls E-Cadherin Endocytosis, Cell Adhesion, and Zebrafish Epiboly Movements”. *Developmental Cell* **24**: 486–501, 2013.

Tay H.G.; Ng Y.W.; Manser E. “A Vertebrate-Specific Chp-PAK-PIX Pathway Maintains E-Cadherin at Adherens Junctions during Zebrafish Epiboly”. *Plos One* **5**: 1-14, 2010.

Theveneau E.; Mayor R. “Integrating chemotaxis and contact-inhibition during collective cell migration”. *Landes Bioscience* **2**: 113-117, 2010.

Trinkaus J.P. “Surface activity and locomotion of *Fundulus* deep cells during blastula and gastrula stages”. *Developmental Biology* **30**: 68-103, 1973.

Warga R.M.; Kane D. “A role for N-cadherin in mesodermal morphogenesis during gastrulation”. *Developmental Biology* **310**: 211-225, 2007.

Warga R.M.; Kimmel C. “Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish”. *Development* **108**: 569-580, 1990.

Wilson E.; Helde K.A. Cell mixing during early epiboly in the zebrafish embryo.
Developmental Genetics **17**: 6-15, 1995.