

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**EFECTO DE LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE DAAM1
EN LA ORGANIZACIÓN ASIMÉTRICA DE LOS SUB-
TERRITORIOS HABENULARES, EN EL PEZ CEBRA.**

**TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO
MÉDICO CON MENCIÓN EN MORFOFISIOPATOLOGÍA Y
CITODIAGNÓSTICO.**

AUTOR: Camila Morales Fénero

TUTOR: Alicia Colombo Flores

2011

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no fue sólo producto de mi trabajo, sino que del de varias personas que me ayudaron y apoyaron en este proceso. En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Alicia Colombo por recibirme en su laboratorio y enseñarme con tanta paciencia y dedicación. También quisiera agradecer a Karina y Álvaro por su ayuda y entrega de herramientas para poder realizar este trabajo. Además agradezco al personal, tesistas y técnicos del Bioterio de Peces y de los Laboratorios LEO y SCIAN, por recibirme e incluirme dentro de esta gran familia.

Por otro lado, para mí fue muy importante el apoyo de mi familia que soportaron conmigo los momentos de mayor trabajo y me dieron ánimo y fuerza. También quiero agradecer a mis amigos, Catalina y Cristian, que recorrieron junto a mi este mismo periodo y a ti, que a pesar de la distancia, siempre estuviste conmigo.

Índice

Ítem	Página
I. Resumen.....	4
II. Introducción.....	5
III. Objetivos.....	19
IV. Hipótesis.....	19
V. Materiales y Métodos.....	20
VI. Resultados.....	26
VII. Discusión.....	35
VIII. Bibliografía.....	42

I. Resumen

Las asimetrías neuroanatómicas son una característica conservada y fundamental para la funcionalidad del cerebro en los organismos vertebrados. En el pez cebra las asimetrías cerebrales son observadas en el circuito parapineal-habénula-interpeduncular (PP-Hab-NIP) y comprenden: (i) ubicación y conectividad asimétrica del órgano parapineal, (ii) mayor contenido de neuropila en el sub-núcleo habenuar izquierdo y expresión asimétrica de diversos genes y (iii) conectividades habenuares diferencialmente segregadas hacia el NIP. Estudios recientes evidencian expresión asimétrica del gen *Daam1*, un componente de la vía de señalización Wnt/PCP, dentro de este circuito. Este gen ha sido implicado en el desarrollo axonal en mosca, a través de su interacción con el citoesqueleto. La ausencia de este gen en pez cebra, induce alteraciones en la morfogénesis de las proyecciones de neuronas habenuares y reversión de las asimetrías en la neuropila. Esta tesis tiene como objetivo principal, establecer los cambios en la morfo-topología de los sub-territorios habenuares, delimitados por la expresión de genes marcadores de neuropila y marcadores de neuronas, en condiciones de pérdida de función de *Daam1*. Para esto, se utilizaron técnicas de hibridación *in situ* e inmunofluorescencia, combinado con análisis morfo-topológico de proyecciones 3D de los sub-territorios habenuares. Los resultados mostraron que la pérdida de función de *Daam1* tiene un rol dual en la morfogénesis asimétrica habenuar en pez cebra, de tal manera que afecta tanto la lateralidad de los territorios de expresión de genes marcadores neuronales (***dex***) y de neuropila (***lov*** y ***daam1***); así como también, induce cambios en las proyecciones neuronales representadas por el menor contenido y largo de la neuropila habenuar.

II. Introducción

II.a. Asimetrías en vertebrados

Las especies vertebradas se caracterizan por ser a simple vista entidades simétricas en su plan corporal. Sin embargo, internamente presentan diversas diferencias morfológicas entre los lados izquierdo y derecho. Esto es lo que se conoce como asimetría izquierda-derecha (I-D), la que se observa en órganos internos tales como corazón y vísceras, así como en el cerebro. En éste último las asimetrías estructurales neuroanatómicas, es decir, las diferencias morfológicas entre los lados derecho e izquierdo, y su lateralidad (hacia qué lado está dirigida la asimetría), permitirían un mejoramiento en el procesamiento de la información y tendrían un rol central en tareas relacionadas con la supervivencia de las especies, como la alimentación, la detección de depredadores y la memoria (Güntürkün *et al.* 2000, Rogers 2000, Pascual *et al.* 2004, Vallortigara & Rogers 2005, Rogers *et al.* 2008). En humanos se presenta un claro ejemplo de asimetría cerebral en varias funciones cognitivas, entre las que se incluyen el habla y la comprensión del lenguaje (Hutsler & Galuske 2003, Sun & Walsh 2006). Además, diversas neuropatologías como la Esquizofrenia (Li *et al.* 2007), el Autismo (Escalante-Mead *et al.* 2003) y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Toth *et al.* 2004), parecen estar asociadas a una anormalidad en las asimetrías cerebrales.

El establecimiento de las asimetrías I-D en el organismo, ocurre en 3 diferentes etapas durante desarrollo (Figura 1): (i) Rompimiento inicial de la simetría embrionaria, lo que lleva a la expresión de genes en algunos grupos celulares, a un sólo lado de la

II.b. Circuito PP-Hab-NIP en pez cebra como modelo de estudio de la morfogénesis de circuitos neuronales

El sistema PP-Hab-NIP en el pez cebra es un circuito asimétrico que es parte del sistema de conducción diencefálico dorsal (DDC) (Figura 2). Está conformado por (i) la Habénula (Hab) y el Complejo Pineal, que está compuesto por el Órgano Pineal y Parapineal (PP); (ii) dos tractos fibrosos que llevan las proyecciones de la habénula al mesencéfalo ventral, el Fascículo Retroflexo y (iii) una estructura mesencefálica ventral, el Núcleo Interpeduncular (NIP). La habénula, un núcleo bilateral, muestra asimetrías en cuanto a citoarquitectura y expresión de genes entre los lados derecho e izquierdo, e inerva al NIP, de manera laterotópica, de tal manera que los eferentes izquierdo y derecho están segregados diferencialmente en el eje dorso-ventral (D-V), así la habénula izquierda proyecta axones que en su mayoría van hacia el NIP dorsal (dNIP), y una pequeña porción va a NIP ventral (vNIP), mientras que la habénula derecha proyecta solamente al NIP ventral. Por su parte, el órgano parapineal es un núcleo fotoreceptivo que está localizado al lado izquierdo y que sus axones proyectan asimétricamente hacia la habénula izquierda (Concha 2004, Bianco & Wilson 2009, Concha *et al.* 2009).

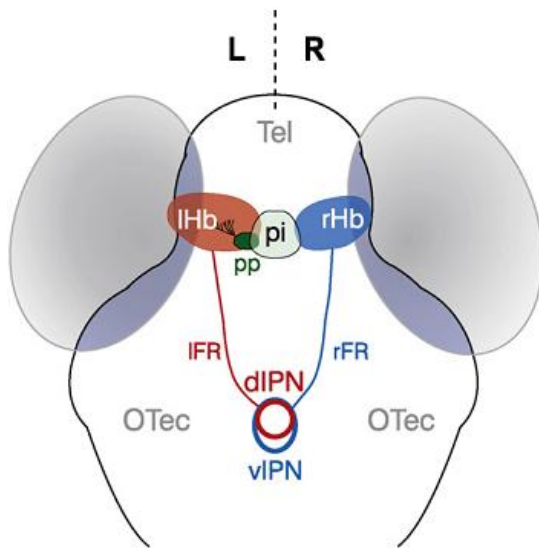


Figura 2: Conectividad asimétrica en el circuito PP-Hab-NIP. Esquema de una vista dorsal del sistema PP-Hab-NIP en cerebro de una larva de pez cebra de 4dpf. Ambos subnúcleos habenules envían proyecciones axonales mediante el fascículo retroflexo (FR) al NIP. El núcleo habenules izquierdo (IHb, rojo) inerva a través del fascículo retroflexo izquierdo (iFR), principalmente el NIP dorsal (dIPN), mientras que derecho (rHb, azul) mediante el fascículo retroflexo derecho (rFR), llega al NIP ventral (vIPN). La habénula y el complejo pineal, que se divide en pineal (pi) y parapineal (pp), conforman el epitalamo. El órgano parapineal (verde) está a la izquierda y conecta sólo con la habénula izquierda (Concha *et al.* 2009).

Son varias las ventajas que ofrece el modelo de pez cebra para el estudio de la morfogénesis de este circuito neuronal. Por una parte, este modelo ha sido ampliamente establecido como un sistema genético que permite identificar e investigar la función de diversos genes; la transparencia de los embriones, permite realizar estudios de imagenología; el desarrollo exo-uterino del pez, le otorga fácil manipulación. Además, la factibilidad de contar con líneas transgénicas GFP que marcan este circuito, permiten visualizar la morfogénesis de esta red neuronal *in vivo*. También, existe la posibilidad de realizar manipulación genética en este modelo, que combinado con el análisis morfo-topológico en 3D de la morfogénesis neuronal a través de microscopía Spinning disc, transforman al pez cebra en un excelente modelo para el estudio de la morfogénesis asimétrica de este circuito neuronal (revisado en Concha *et al.* 2004, Concha 2009).

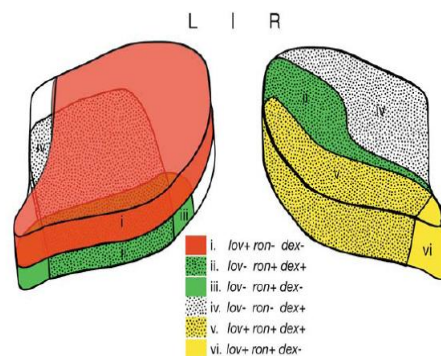
II.c. Asimetrías de conectividad, citoarquitectura y expresión génica de la habénula de pez cebra.

La migración del órgano parapineal y su conectividad diferencial con la habénula izquierda, genera diferencias morfogenéticas entre la habénula izquierda y derecha (Concha *et al.* 2003, Gamse *et al.* 2003). La habénula izquierda es aproximadamente un 20% más grande que la derecha (Halpern *et al.* 2003, Bianco & Wilson 2009), al igual que la neuropila, más prominente en la habénula izquierda (Concha *et al.* 2000 y 2003, Gamse *et al.* 2003 y 2005, Aizawa *et al.* 2005). La conectividad hacia el núcleo interpeduncular se ha estudiado mediante trazadores lipofílicos en estadios larvarios, y muestran que las eferencias de la habénula izquierda hacia el NIP son mayoritariamente en la región dorsal de este núcleo y un pequeño porcentaje en la región ventral. A diferencia de la habénula derecha, que inerva casi completamente el vNIP. Mientras que en el adulto, la habénula lateral izquierda inerva el dNIP, y es el núcleo medial de la habénula derecha el que proyecta hacia el vNIP (Aizawa *et al.* 2005, Bianco & Wilson 2009).

La expresión génica entre ambas habénulas también es diferencial. Se han encontrado tres genes de la familia *potassium channel tetramerization domain (KCTD)* (dominio de tetramerización de canal de potasio), cuya expresión asimétrica en la habénula depende de la presencia del órgano parapineal, sin embargo se desconoce su función en el desarrollo del núcleo habenular (Gamse *et al.* 2003 y 2005). Experimentos de ablación del órgano PP generan un patrón de expresión tipo “derecha” (isomérica derecha) y aumento de los territorios de *ron* y *dex* en la habénula izquierda (Gamse *et al.* 2003). El análisis del patrón de expresión de estos genes, denominados ***leftover***

(*lov*), *right on* (*ron*) y *dexter* (*dex*) ha permitido definir 6 sub-territorios habenules en pez cebra (Figura 3). La habénula izquierda presenta un predominio de expresión de *lov*, que genera una sub-división en el eje dorso-ventral, a diferencia de la habénula derecha, donde la regionalización se manifiesta en el eje antero-posterior (A/P) (Gamse *et al.* 2003 y 2005).

Figura 3. Esquema de los territorios habenules en pez cebra. Se observan los sub-núcleos habenules izquierdo y derecho en una larva de 4 dpf, donde el territorio de expresión de *lov* (rojo), es el más prominente en la habénula izquierda. En verde se observa la expresión de *ron* y en gris el territorio de *dex*. La sobreposición de territorios se observa en verde punteado (*ron+dex*), en amarillo punteado (*lov+ron+dex*) o en amarillo (*lov+ron*) (Modificado de Gamse *et al.* 2005).



En estadios adultos, la habénula presenta núcleos mediales y laterales discretos, con expresión génica (ambos núcleos laterales expresan *lov*, y los mediales *brn3a*) y conectividad diferencial hacia el NIP. La habénula izquierda muestra un sub-núcleo lateral predominante donde se expresa *lov* y desde donde surge la mayor conectividad hacia el NIP dorsal, mientras que la habénula derecha, muestra un sub-núcleo medial más extenso que el lateral que se conecta con el NIP ventral e intermedio (Aizawa *et al.* 2005, Bianco & Wilson 2009).

II.d. Morfogénesis del circuito PP-Hab-NIP en pez cebra.

El desarrollo del sistema PP-Hab-NIP se establece a través de un programa de módulos secuenciales de desarrollo (Concha *et al.* 2009). Las asimetrías epitalámicas y la lateralidad de estas asimetrías, están mediadas por la acción coordinada de Fgf (Fibroblast Growth Factor) y la vía de señalización Nodal. Los Fgfs controlan el evento inicial del rompimiento de la simetría en el diencéfalo dorsal, mediante el establecimiento de un sistema bi-estable competitivo que induce la migración del órgano parapineal ya sea hacia el lado izquierdo o derecho del cerebro (Figura 4A) (Concha *et al.* 2003; Regan *et al.* 2009). Por otra parte, Nodal otorga direccionalidad a esta tendencia, determinando el establecimiento consistente de lateralidad izquierda en las asimetrías morfológicas del circuito, a través de la expresión asimétrica de sus componentes en diencéfalo dorsal (Figura 4B) (Concha *et al.* 2000). La activación asimétrica de Nodal en la PLM esta regulada por la vía de señalización Wnt/Axina1/ β -Catenina (Carl *et al.* 2007). Subsecuentemente, un programa secuencial de morfogénesis asimétrica permite el desarrollo de asimetrías estructurales del epitalamo. La migración del órgano parapineal, es el primer evento morfológico asimétrico y ocurre alrededor de las 28 hpf (horas post-fertilización) (Figura 4C) (Concha *et al.* 2003). Posteriormente, el órgano parapineal emite proyecciones axonales sólo hacia la habénula izquierda y regula en forma coordinada e interdependiente una parte del desarrollo de las asimetrías habenulares (Figura 4D) (Concha *et al.* 2003, Gamse *et al.* 2003), proceso que en parte está influenciado por componentes de Wnt canónico (Carl *et al.* 2007). Esto induce la morfogénesis de las asimetrías habenulares, caracterizadas por territorios diferenciales de expresión de genes (***leftover***, ***right on***, ***dexter*** y ***brn3a***)

(Concha *et al.* 2003; Gamse *et al.* 2003 y 2005; Aizawa *et al.* 2005), mayor contenido de neuropila en la habénula izquierda (Concha *et al.* 2000) y por neurogénesis diferencial entre los sub-territorios izquierdo y derecho (Roussigné *et al.* 2009 y Aizawa *et al.* 2007). Finalmente, las asimetrías habenulares son transmitidas al cerebro medio ventral, a través de proyecciones de la habénula izquierda al NIP dorsal y de la derecha al NIP ventral (Figura 4E) (Kuan *et al.* 2007, Aizawa *et al.* 2005, Gamse *et al.* 2005).

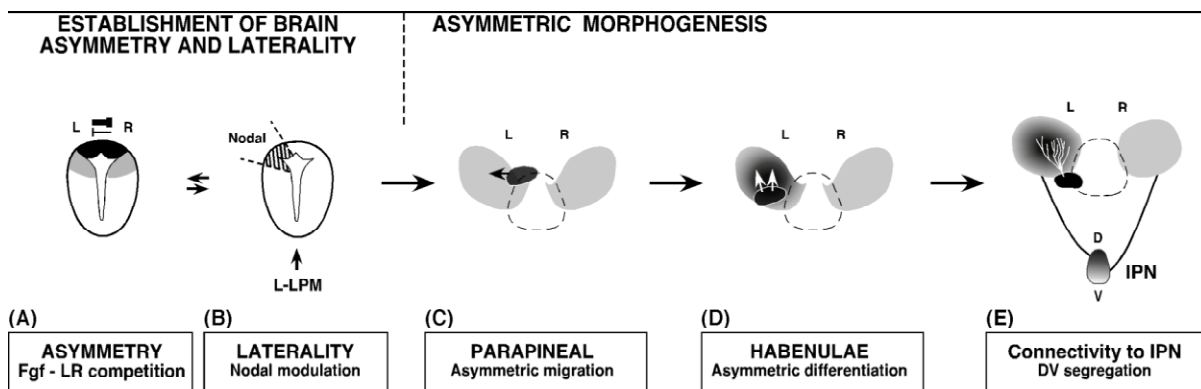


Figura 4: Esquema de la morfogénesis del circuito PP-Hab-NIP en pez cebra. (A) Modulo de asimetría. (B) Modulo de lateralidad. (C-E) Etapas del programa de morfogénesis asimétrica. L-LPM (placa del mesodermo lateral) (Modificado de Concha 2004). Para detalles, referirse al texto.

El desarrollo asimétrico del circuito PP-Hab-NIP es controlado por vías genéticas independientes, por lo que el establecimiento de las asimetrías es autónomo de la regulación de la lateralidad (Concha *et al.* 2000). Sin embargo, a pesar del creciente conocimiento de los mecanismos genéticos que controlan el desarrollo de las asimetrías morfológicas de este circuito, muy poco se entiende acerca de los procesos celulares y moleculares que controlan la morfogénesis asimétrica del mismo.

II.e. Daam1

La proteína *Daam1* (*Dishevelled-associated activator of morphogenesis*) es un miembro de la familia de proteínas forminas, pertenece a la sub-familia DRFs (*Diaphanous-related formins*) y es conservada en diferentes especies (Liu *et al.* 2008). Las proteínas de la sub-familia de las DRFs se caracterizan por presentar diferentes dominios: FH1 (formin homology 1), rico en prolina, que une complejos de profilina-actina; FH2 (formin homology 2), que estabiliza dímeros de actina, a través de la nucleación de nuevos filamentos de actina. Además, presentan un sitio de interacción con GTPasas pequeñas Rho activadas, denominado GB y dominios regulatorios: DAD (diaphanous-autoregulatory domains) y DID (diaphanous-inhibitory domains). La interacción de DAD-DID induce un estado de autoinhibición en estas proteínas (Figura 5A), que es liberado mediante la unión de Rho-GTP al GBD o de Dishevelled (Dvl) a este complejo (Figura 5B) (Habas *et al.* 2001, Wallar & Alberts 2003, Faix & Grosse 2006).

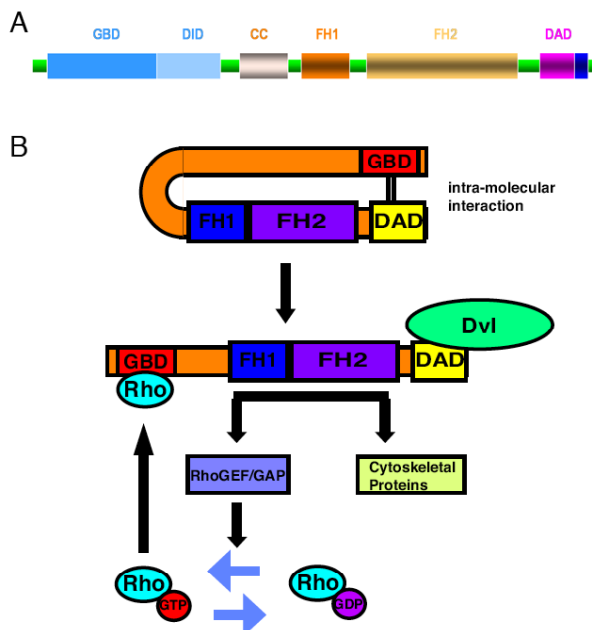


Figura 5: Estructura y mecanismo de activación de *Daam1*. (A) Representación esquemática de *Daam1*. Se muestran los dominios GBD (*GTPases binding domain*), DID (*Diaphanous autoregulatory domain*), CC (*predicted Coiled-coil*), FH1 (*Proline-rich formin homology 1 domain*), FH2 (*Formin homology 2 domain*), DAD (*auto-inhibitory domain*). (B) Modelo de activación de *Daam1* por la vía Wnt no canónica. En el citoplasma *Daam1* se encuentra en su forma auto-inhibida, por la unión de los dominios DAD-DID. La unión de Rho activado en el dominio GBD o de Dvl en el dominio DAD interrumpe la interacción DAD-DID, lo que conduce a la activación de *Daam1* (Modificado de Liu *et al.* 2008).

El nombre de esta molécula surge a partir de su unión con Disheveled (Dvl), participando como componente de la vía Wnt/PCP (Wnt no canónica) (Figura 5B). La función de *Daam1* esta relacionada a movimientos morfogenéticos durante la gastrulación (Habas *et al.* 2001; Khadka *et al.* 2009; Sato *et al.* 2006), morfogénesis cardíaca (Li *et al.* 2011), migración y polaridad celular (Ang *et al.* 2010; Babayeva *et al.* 2010; Ju *et al.* 2010; La Monica *et al.* 2009). Hasta ahora se han identificado 2 clases de proteínas Daam en vertebrados: *Daam1* y *Daam2* (Habas *et al.* 2001, Nayaka *et al.* 2004, Kida *et al.* 2004 y 2007), mientras que en *Drosophila* sólo se ha encontrado una forma: DAAM (Matusek *et al.* 2006).

II.f. Daam1 en el control de la morfogénesis neuronal

En estudios en neuronas y cultivos hipocampales de ratón, se ha observado que *Daam1* participa en el desarrollo de las proyecciones neuronales. Además, se ha comprobado que esta proteína colocaliza en forma parcial con marcadores pre (SV2) y post-sinápticos (PSD95) y se encuentra en algunos cuellos y cabezas de espinas dendríticas (Salomon *et al.* 2008). La infección de cultivos de cortes hipocampales con una construcción viral de PD-EGFP-Daam1-RFP, induce sobre-expresión de *Daam1*, causando cambios en la morfología neuronal que se manifiestan en espinas más largas y gruesas y una mayor densidad de las espinas dendríticas (Salomon *et al.* 2008). Simultáneamente, investigaciones en cultivo primario de neuronas embrionarias y de *embryonic nerve cord* del mutante DAAM^{mat/zig} de *Drosophila*, el cual no expresa el gen DAAM, mostraron una reducción en la densidad de neuritas, filopodios neuronales (Figura 6B) y se evidenciaron además alteraciones en el crecimiento axonal. Un efecto antagónico se observa al inducir la expresión de la forma constitutivamente activa de

DAAM, lo que se refleja en un aumento en la inducción del crecimiento de neuritas y de filopodios (Figura 6C) (Matusek *et al.* 2008).

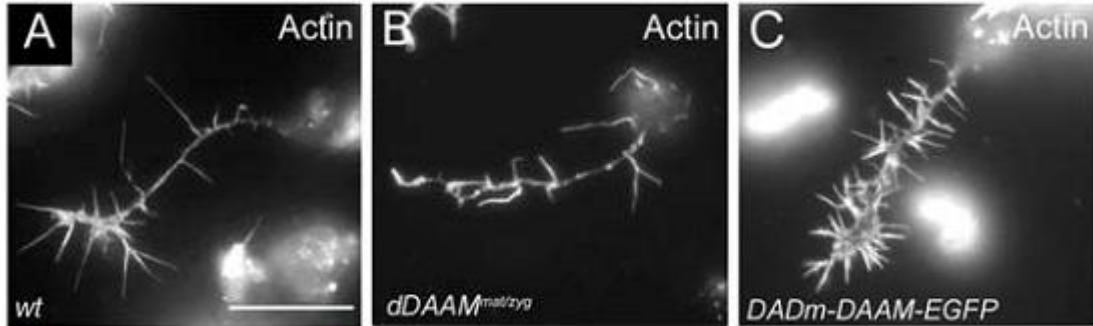


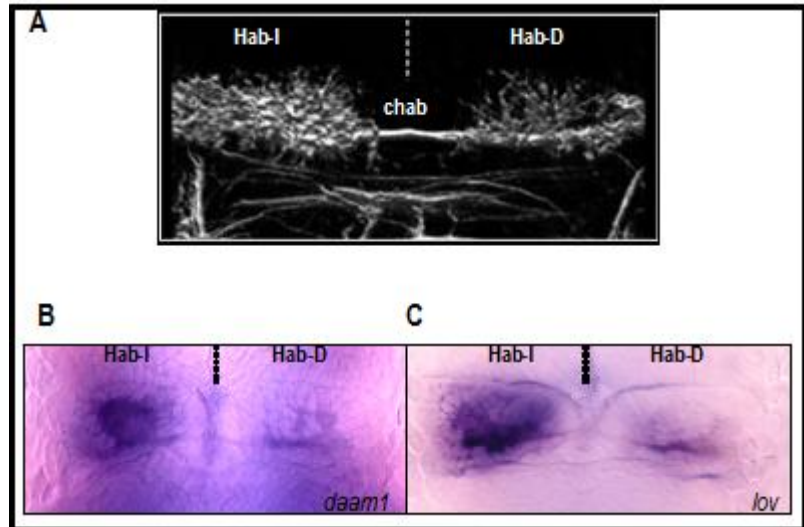
Figura 6: Daam 1 es requerido para la formación de filopodios en neuronas embrionarias de mosca en cultivo. Inmunofluorescencia anti-Factina de cultivos primarios de (A) neuronas embrionarias derivadas de cepas silvestres, (B) mutante $DAAM^{mat/zyg}$ y (C) transgénico $Sca-Gal4;UAS-DADM-Daam::EGFP$. El mutante (B) presenta filopodios reducidos en número y tamaño, mientras que en el transgénico (C) se observan un mayor número de filopodios, respecto a la condición silvestre (A). (Modificado de Matusek *et al.* 2008)

II.g. Rol de *Daam1* en la morfogénesis asimétrica del circuito PP-Hab-NIP

Recientemente, se ha detectado la expresión asimétrica *Daam1* en habénula de pez cebra, durante el desarrollo del circuito PP-Hab-NIP (Colombo 2007, Tesis Doctoral). Experimentos de hibridación *in situ* para el transcrito de *Daam1* han evidenciado expresión asimétrica de este gen en el epítalamo de pez cebra desde estadios larvarios y hasta adulto (Colombo 2007, Tesis Doctoral), a diferencia de lo que ocurre en otras especies vertebradas en las que se ha reportado expresión simétrica (Kida *et al.* 2004, Nakaya *et al.* 2004). Específicamente, *Daam1* se expresa en la habénula izquierda, en la región que coincide con mayor contenido de neuropila habenular (Figura 7) (Colombo, 2007; Tesis Doctoral) y con el dominio de expresión asimétrica del gen *leftover* (Gamse *et al.* 2003). Además, la expresión temporal de *Daam1* en la habénula de pez cebra coincide con el inicio de la morfogénesis neuronal habenular y la formación de la conectividad en el circuito PP-Hab-NIP.

En este sentido, *Daam1* podría desempeñar un papel predominante en el desarrollo del circuito PP-Hab-NIP en pez cebra.

Figura 7: Patrón de expresión asimétrico de *daam1* y *lov* en epítalamo. (A) Imagen confocal de la morfología de la neuropila habenular marcada con el anticuerpo anti-tubulina- α acetilada. Se observa mayor contenido de ésta en la habénula izquierda. (B-C) La expresión asimétrica de *daam1* y del marcador *lov*, coincide con la misma región de mayor contenido de neuropila en el diencefalo dorsal, Hab-I= habénula izquierda, Hab-D= habénula derecha, chab= comisura habenular. (A-C: vista dorsal, 4dpf) (Colombo, 2007; Tesis Doctoral).



Estudios recientes han demostrado que la vía de señalización Wnt no canónica participa en el desarrollo del órgano de lateralidad (VK) del pez cebra, (Oteiza *et al.* 2008) y que la inhibición de componentes de esta vía (Wnt11 y Prickle1a) conduce a la alteración en la formación de la VK en estadios tempranos del desarrollo de pez cebra (6-8 somitos). Consecuentemente, la ausencia de ambos genes induce la randomización de la expresión de componentes de la vía Nodal en la placa del mesodermo lateral (PML) (Oteiza *et al.* 2010). Anteriormente, se mencionó que los genes de la vía Nodal regulan la lateralidad de las asimetrías de vísceras y epítalamo (Concha *et al.* 2000), por lo que cambios en la lateralidad de la expresión temprana de componentes de la vía Nodal conducirán a alteraciones en la lateralidad de las asimetrías de órganos internos y del epítalamo. *Daam1* es un componente de la vía Wnt no canónica, por lo que su ausencia podría afectar la función de esta cascada de

señalización en procesos relacionados a la formación del órgano de lateralidad y/o en la morfogénesis de la notocorda de pez cebra (Kida *et al.* 2007), estructura que forma la línea media embrionaria y también determina la lateralidad de las asimetrías neuroanatómicas del epítalamo (Concha *et al.* 2000). En este sentido, la inyección de oligonucleótidos antisentido morfolininos para *daam1* en estadio de una célula en embriones de pez cebra, conduce a defectos tanto en la formación de la neuropila habenular, como en la reversión de la asimetrías de la misma (Figura 8) (Colombo *et al.* 2008, resultados no publicados),

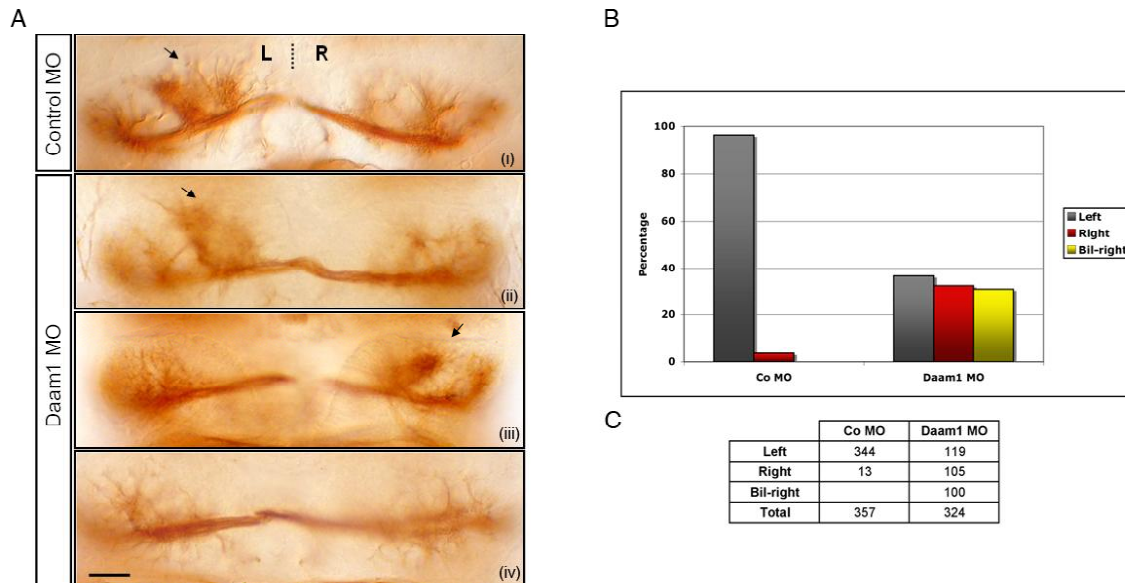


Figura 8: La pérdida de *Daam1* afecta el desarrollo de la neuropila y su distribución asimétrica dentro de la habénula. Vistas dorsales del diencéfalo en larvas de 4dpf. (A) Inmunohistoquímica de la neuropila habenular marcada con el anticuerpo anti-tubulina acetilada. Las flechas marcan la región de mayor contenido de neuropila en la habénula izquierda de embriones inyectados con morfolino control (Control MO, i), la cual se observa revertida o reducida en aquellos embriones inyectados con morfolino de *Daam1* (Daam1 MO, ii-iv). (B) Gráfico que presenta el porcentaje de los 3 fenotipos de neuropila observados: asimétrico izquierdo (left, 37%), asimétrico derecho (right, 32%), y simétrico bilateral derecho (bil-right, 31%). (C) Tabla que muestra la distribución de de los fenotipos observados en la población de embriones inyectados con Control Mo y *Daam1* MO.

Considerando estos hallazgos y teniendo en cuenta que *Daam1* podría tener una función dual (desarrollo de las proyecciones neuronales y lateralidad de las asimetrías estructurales) en el desarrollo del circuito PP-Hab-NIP, se propone que ***Daam1* cumple un rol fundamental en la morfogénesis asimétrica de los sub-territorios habenulares** (hipótesis central). Para desarrollar esta hipótesis, se estudiará la morfología y topología de los sub-territorios habenulares en embriones silvestres y transgénicos para GFP que marquen este circuito, en condiciones de pérdida de función de *Daam1*.

II. Objetivos

Objetivo General: Estudiar la arquitectura de sub-territorios habenulares en ausencia de *Daam1*, durante el desarrollo del circuito PP-Hab-NIP, en pez cebra.

Objetivos Específicos:

- 1.- Analizar cambios en la conformación de los sub-territorios habenulares en condiciones de pérdida de función de *Daam1*, mediante hibridación *in situ* e inmunofluorescencia.
- 2.- Establecer efectos de la falta de expresión de *Daam1*, en la configuración de la neuropila habenular, mediante inmunofluorescencia e hibridación *in situ*.
- 3.- Realizar, mediante reconstrucciones 3D, un análisis morfo-topológico de los sub-territorios habenulares en ausencia de *Daam1*.

III. Hipótesis

Daam1 cumple un rol fundamental en la morfogénesis asimétrica de los sub-territorios habenulares. Por lo que la pérdida de función de éste produce cambios en la lateralidad de los sub-territorios habenulares izquierdo y derecho.

IV. Materiales y Métodos

1.-Líneas de Pez Cebra:

Los embriones fueron obtenidos por desove natural e incubados a 28.5°C en medio embrionario estándar (E3 1x). La etapa del desarrollo fue determinada de acuerdo a la morfología y a la edad (horas post fertilización, hpf) (Kimmel *et al.* 1995). Una vez alcanzado el estadio a estudiar, las larvas fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) 4% o ácido tricloroacético (TCA) 2%, previa sedación en triclaína de acuerdo a protocolo aprobado por la Unidad de Bioética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Las líneas de pez cebra utilizadas fueron: silvestres Tübingen y *Tg (Brn3a-hsp70::GFP)* (Aizawa *et al.* 2005), disponibles en las instalaciones del Bioterio de Peces del Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

2.-Inyección Global de Morfolino de Daam1:

Para la realización de este estudio, los embriones silvestres y transgénicos, fueron seleccionados aleatoriamente en dos grupos e inyectados en la etapa de 1-4 células: un grupo fue inyectado con 15 ng/embrión de oligonucleótido morfolino Control 5'-CGGGTAAGCTAAGTAAAGGTTGCTG-3' (Gene Tools, LLC), el cual no genera efectos en el embrión; otro grupo fue inyectado con la misma cantidad de morfolino (MO) contra Daam1, cuya secuencia es 5'-AGCTATGACCCCCTCTCAAATGGC-3' (Gene Tools, LLC.), descrita por Kida *et al.* 2007. Los embriones, posteriormente fueron seleccionados para la experimentación (Hibridación *in situ* o Inmunofluorescencia), según fenotipos globales de morfología previamente descrita (Kida *et al.* 2007).

3.-Linearización y Transcripción *in vitro* de las sondas antisentido:

La linearización incluye la siguiente mezcla: 5-10 μ g de ADN plasmidial para cada gen testado, 10 μ l de buffer de enzima de restricción 10x y 2 μ l de enzima de restricción en un volumen final de 100 μ l. Luego, se incubó por 4 horas a 37°C; una alícuota de 1 μ L fue corrida en un gel de agarosa 0,8% en TAE 1x para chequear la correcta digestión, de acuerdo al peso molecular de cada inserto. Posteriormente, para purificar el ADN linearizado se agregó a la mezcla de digestión, 100 μ L de Ultrapure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol, 25:24:1 v/v (Invitrogen), mediante vortex se mezcló durante 2 minutos y posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 13.000 rpm. La fase acuosa, que contienen el ADN digerido, fue separada y transferida a un tubo limpio. Se agregó acetato de sodio 6M (1/10 vol.), etanol 100% (2 vol.) y se incubó por 15 minutos a -80°C, luego se centrifugó por 10 minutos a 13.000 rpm, para precipitar el ADN. El pellet fue lavado con etanol 75% y centrifugado a máxima velocidad por 5 minutos. En seguida, el pellet fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 10 μ l de agua nanopura.

La transcripción *in vitro*, para la obtención de sondas antisentido, se realizó mediante el siguiente protocolo: en un volumen final de 20 μ L se agregaron 4 μ L de Buffer de transcripción 5X (Promega), 2 μ L de DTT dithiothreitol 100mM (Promega), 0.5 μ L de RNAsin (Promega), 1 μ L de dNTP-DIG o dNTP-Fluo 10X (DIG-RNA o Fluo-RNA, Labeling Mix, Roche), 1 μ L de DNA linearizado, 9,5 μ L de agua nanopura estéril y 1 μ L de RNA polimerasa SP6/T7 según corresponda. Posterior a la incubación de 4 horas a 37°C, el DNA templado fue removido por adición de 1 μ l (40 unidades) de

DNase I (Roche) e incubado durante 15 minutos a 37°C. La reacción fue detenida agregando 1 µL de EDTA (0.5 M pH 8.0). La sonda de mRNA obtenida fue purificada por una columna ProbeQuant G-50 Micro Columns, según las indicaciones de manufactura (GE Healthcare) y almacenada a -20°C.

4.-Hibridación *in situ* en Embriones Completos:

El análisis de los sub-territorios habenulares a nivel de expresión de mRNA fue realizado mediante ribosondas antisentido para determinar patrones de expresión de marcadores habenulares simétricos: ***brn3a*** (Aizawa *et al.* 2005), y asimétricos: ***leftover*** (Brisgrove *et al.* 1999; Thisse & Thisse 1999), ***dexter*** (Gamse *et al.* 2005; Gamse *et al.* 2003) y ***daam1*** (Colombo, 2007; Tesis Doctoral). La hibridación *in situ* fue realizada en embriones de las líneas silvestres Tübingen, con un N mínimo de 30 embriones para cada condición (con Morfolino Control y Morfolino de Daam1), para cada uno de los genes analizados. El protocolo prosigue a continuación: los embriones se dejaron crecer hasta el estadio requerido (96 hpf), fueron anestesiados con Tricaína y fijados en Paraformaldehído (PFA) al 4% a 4 °C por toda la noche. Al día siguiente se removió el PFA y se realizaron dos lavados rápidos con PBS 1X y tres lavados de 5 minutos con PBT 0,1% (PBS 1X/Tween 0,1%) en agitación. Posteriormente, se deshidrataron en una batería de metanoles de 25%, 50%, 75% y 100%, a temperatura ambiente (TA) por 5 minutos cada uno y fueron almacenados en metanol 100% a -20 °C, por toda la noche. Al siguiente día, los embriones se rehidrataron en una batería descendente de metanoles, a TA por 5 minutos cada uno, y lavados dos veces en PBT 0,1%. Luego, fueron permeabilizados con 10ug/ml de Proteinasa K al 1X (Invitrogen) por 45 min a TA. Posteriormente, fueron re-fijados en PFA 4% por 20 min a TA y lavados en PBT 0,1%.

Para pre-hibridar, los embriones fueron lavados en solución de hibridación Hyb(+) e incubados por al menos 2 hrs. a 67°C en Hyb(+). La sonda fue diluida en Hyb(+) pre-calentada 20 min. Luego, los embriones fueron incubados en la sonda durante toda la noche a 67°C. A continuación se retiró la sonda y se realizaron los siguientes lavados a 67°C, pre-calentando las soluciones a la misma temperatura: 5 min. en Hyb(-), 5 min. en 25% Hyb(-)/75% SCC 2X, 10 min. en SCC 2X, 3x 30 min. en SCC 0,2X. Luego, los embriones se dejaron enfriar a TA y se lavaron con MAB 1X, para en seguida ser bloqueados con Blocking Reagent (Boehringer) 2% en MAB por 2-3 hrs. a TA. Se incubó toda la noche a 4°C con anticuerpo anti-DIG-AP (Roche; 1:500). Posteriormente, se retiró el anticuerpo y se lavó 4x 30 min. en MAB 1X, 30 min. en Tris-HCl 0,1M pH 9,5 y 30 min en buffer BCL, para luego revelar con sustrato BMP (Roche).

5.-Inmunofluorescencia Indirecta en Embriones Completos:

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta se realizaron mediante protocolos establecidos previamente (Concha *et al.* 2000, Invitrogen). Se utilizaron embriones de la línea *Tg(Brn3a-hsp70::GFP)* de 96 hpf, los que fueron fijados en TCA 2% por 3 hrs a TA y permeabilizados con Tripsina (Invitrogen) 0,25% e incubados toda la noche a 4°C en solución de bloqueo IB. A continuación, se incubó por toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios anti-GFP (Chemicon, 1:1000) y anti-Go (MBL; 1:1000) (marca habénula completa y neuropila). Posteriormente, los embriones fueron lavados con PBS 1X/Tritón 0,5% (PBTr 0,5%) 2x 15 min., 2x 30 min., y 1x 1 hr. Luego, se procedió a bloquear los embriones nuevamente en IB por 2-3 hrs. para posteriormente incubar a 4°C por toda la noche con anticuerpos secundarios Alexa anti-mouse 488 y Alexa anti

rabbit 568 (Molecular Probes, 1:200). Finalmente, los embriones fueron lavados por 2x 15 min., 2x 30 min., y 1 hr. con PBTr 0,5%, y se montaron en Low Melting Agarose 1% (Invitrogen) para su observación.

6.-Adquisición, Procesamiento de Imágenes y Análisis Morfo-topológico:

Para las adquirir las imágenes de la técnica de hibridación *in situ*, los embriones fueron disectados mediante forceps Dumont nº5 y montados en glicerol 100% (Sigma) sobre un portaobjeto. Las imágenes fueron obtenidas en un Microscopio Nikon Eclipse 80i con objetivo de 40x, mediante una Cámara Fotográfica Nikon Digital Sight DS-Fi1 vinculada al software NIS-Elements F3.0, sin zoom fotográfico. Posteriormente fueron procesadas a nivel de contraste y brillo en el software Adobe Photoshop CS3.

Para obtener las imágenes de inmunofluorescencia, los embriones fueron observados en Microscopio UltraView RS de disco giratorio (PerkinElmer) usando objetivo C-Apocromático 40x/1.2W y posteriormente un Microscopio Invertido Olympus IX 81 usando un objetivo UPLSAPO 40x. Las imágenes fueron procesadas con los softwares ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), Volocity (Improvision) y Adobe Photoshop CS3 (Adobe). Para la construcción de proyecciones tridimensionales, stacks de 0.5µm de imágenes fueron traspasados a máscaras de dibujo, a través del software ScnImage. Posteriormente, para la generación de un modelo tridimensional y la cuantificación de parámetros morfo-topológicos de los sub-territorios habenuares se empleó el software SCIAN-Soft desarrollado por SCIAN-Lab (Scientific Image Analysis, www.scian.cl), basado en IDL (Interactive Data Processing Language, Lenguaje de Procesamiento de Datos Interactivo) (ITT, Boulder, CO).

7.- Análisis de Datos y Estadística

Para el análisis de resultados se realizó la medición de la expresión diferencial de genes en la habénula del pez cebra, es decir, para cada gen en las dos condiciones (Control y Morfante), se contabilizó el número de embriones según el tipo de expresión presentada, definiéndose una escala categórica para expresión de tipo izquierda (mayor territorio de expresión del gen habénula izquierda), derecha (mayor territorio de expresión del gen habénula derecha) y bilateral izquierda o derecha (territorios con expresión equivalente en ambas habénulas). En el caso de la neuropila, se definió el sub-dominio de mayor contenido de neuropila (izquierdo), revertido (derecho) y bilateral o isomérico derecho (sub-dominio derecho con menor contenido de neuropila en ambas habénulas). Se determinó un N mínimo entre 30-50 embriones para cada condición, para las hibridaciones *in situ* y de 5-7 larvas para la inmunofluorescencia. Los datos obtenidos no fueron sometidos a un test estadístico, ya que con un N superior a 30, las tendencias son claras, recomendaciones recibidas por la Asesoría Estadística, Fabiola Werlinger (Escuela Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile). Por su parte, los resultados obtenidos a partir de las inmunofluorescencias y análisis morfo-topológicos, no fue posible someterlos a análisis estadístico por falta de tiempo y/o un N muy reducido.

VI. Resultados

VI.a. La ausencia de *Daam1* induce cambios en la lateralidad y asimetría de la expresión de genes marcadores de neuropila en la habénula de pez cebra

Como se planteó en la introducción, *Daam1* estaría cumpliendo un papel dual en la morfogénesis asimétrica de los sub-territorios habenulares, por una parte participaría en el establecimiento de la lateralidad de las asimetrías estructurales de la habénula del pez cebra y por otra parte estaría afectando el desarrollo de ciertas estructuras asimétricas habenulares, como la neuropila. Para corroborar este supuesto se realizó un análisis de la expresión diferencial de genes asimétricos en la habénula, a través de hibridación *in situ* de sondas de ARN mensajero. Se estudió la expresión de los genes *lov* y *daam1*, que son principalmente marcadores de la neuropila habenular (proyecciones de las neuronas habenulares, fundamentalmente constituida por dendritas y axones aferentes de la estría medularis), teniendo ambos genes un territorio de mayor expresión en la habénula izquierda (Figura 9A, a y b) por sobre el 90% en la población silvestre (Figura 9B y C; n= 193 y 103, respectivamente), y que coincide con el mayor contenido de la neuropila habenular izquierda. En ausencia de *Daam1* se observan 3 fenotipos característicos para *lov* y *daam1*: (i) izquierdo (Figura 9A, a' y b'), (ii) derecho o revertido (Figura 9A, a'' y b'') y (iii) bilateral o isomérico derecho (Figura 9A, a''' y b'''), que presentan una distribución en la población de alrededor del 30% para cada fenotipo (Figura 9B-C). Esta distribución coincide con los fenotipos obtenidos para

la neuropila habenular en los embriones que carecen de *Daam1*, donde observamos reversión y menor contenido de neuropila para todos los fenotipos de los embriones morfantes (ver Figura 8, Introducción).

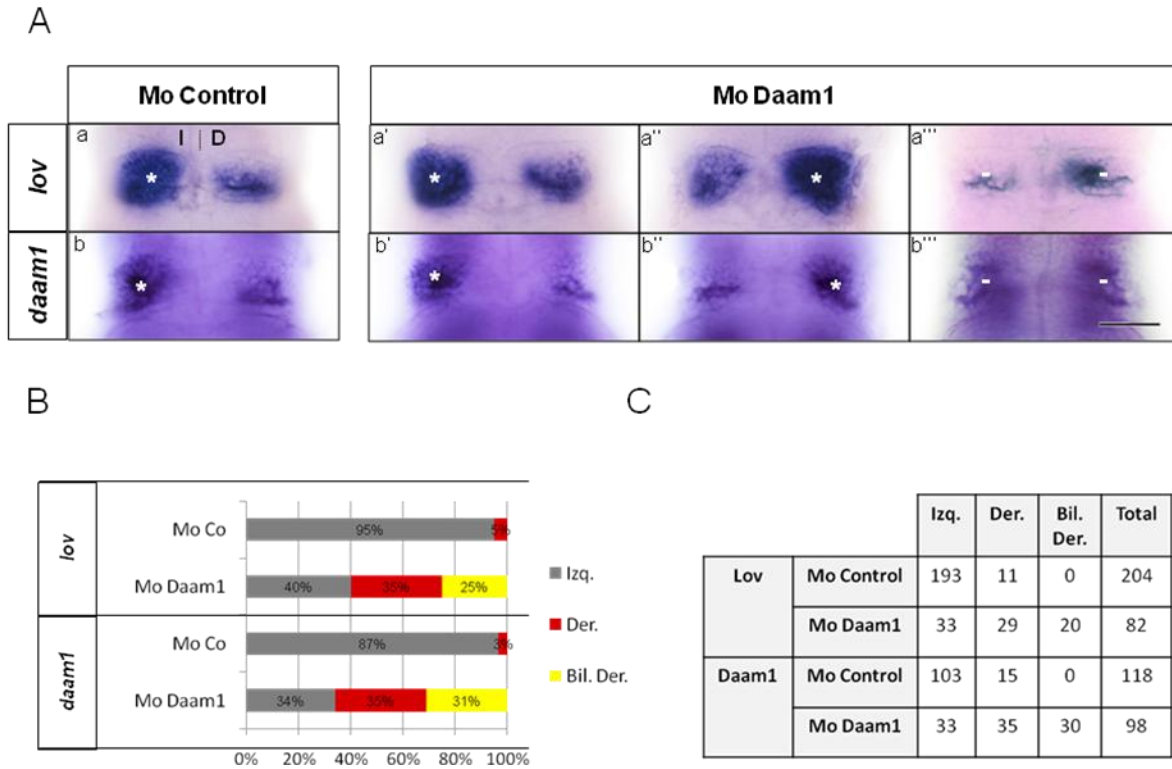


Figura 9: La pérdida de *Daam1* afecta la lateralidad y asimetría de genes marcadores de neuropila en la habénula. (A) Vistas dorsales de larvas silvestres de 4dpf. Hibridación *in situ* de *leftover* (*lov*; a-a''') y *daam1* (b-b''') en embriones inyectados con Mo Control y Mo de *daam1*. Los asteriscos blancos indican el territorio de mayor expresión, el cual se encuentra revertido en los morfantes o isomérico derecho (territorio indicado con guiones blancos). Barra= 50 μ m. (B) Gráfico que muestra los porcentajes de los fenotipos observados (Izq: izquierdo, Der: derecho y Bil. Der: bilateral derecho). (C) Tabla de distribución de fenotipos observados en la población de embriones de Mo Control y Mo de *daam1*.

VI.b. *Daam1* no afecta los territorios de expresión de genes marcadores de neuronas habenulares en pez cebra.

Para determinar si la pérdida de *Daam1* induce cambios en la especificación de sub-territorios neuronales en la habénula, se utilizaron genes que marcan diferencialmente territorios habenulares. El primero ***dexter (dex)***, es un gen de expresión predominante en la habénula derecha (Figura 10A, a), tendencia que en la población silvestre supera el 90% (Figura 10B y C; n= 120). Mientras que ***brn3a***, cuya expresión es bilateral simétrica en ambas habénulas (Figura 10A, b), tiene un 100% de la población silvestre con este patrón de expresión a nivel de transcrito (Figura 10B y C; n=150). En condiciones de ausencia de *Daam1*, ocurre un cambio en la distribución habenular de ***dex***, un 31% (Figura 10B y C; n= 45) de los embriones presentan reversión de la expresión de este gen y se observa un porcentaje reducido con isomerismo (Figura 10B). En el caso de ***brn3a***, no ocurren cambios en el patrón de expresión al comparar los controles y morfantes de *Daam1*.

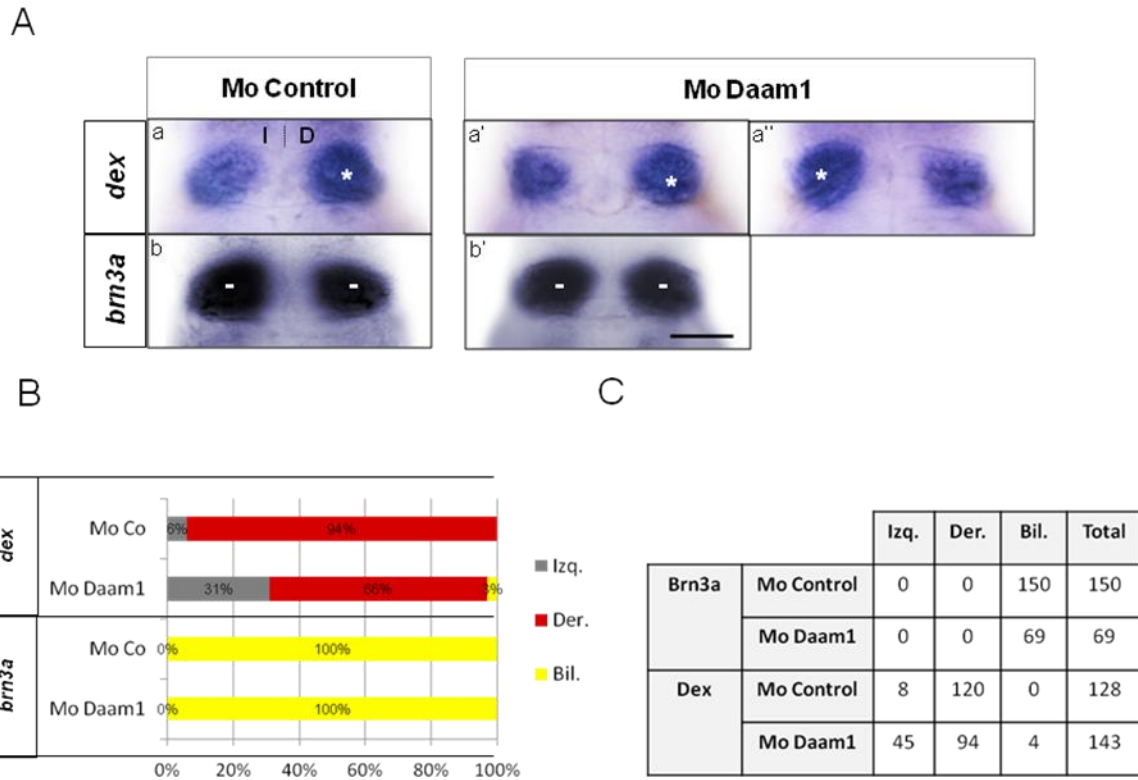


Figura 10: La especificación de sub-territorios neuronales habenules no es afectada en ausencia de *Daam1*.

(A) Vistas dorsales de larvas silvestres de 4dpf. Hibridación *in situ* de *brn3a* y *dexter (dex)*, en embriones inyectados con Mo Control y Mo de *Daam1*. En los morfantes de *dex* se observa reversión del territorio de mayor expresión, indicado con asteriscos blancos (a'-a''). El territorio bilateral simétrico de *brn3a*, indicado en guiones blancos, se mantiene en el morfante (b'-b''). Barra= 50 μ m. (B) Gráfico que muestra los porcentajes de los fenotipos observados (Izq: izquierdo, Der: derecho y Bil: bilateral). (C) Tabla de distribución de fenotipos observados en la población de embriones de Mo Control y Mo de *daam1*.

VI.c. *Daam1* altera la morfogénesis de las proyecciones neuronales habenulares, pero no la especificación neuronal.

Además del análisis de transcritos de genes asimétricos y simétricos, se realizó el estudio de la expresión de marcadores de neuropila habenular y de sub-territorios habenulares a nivel proteico. Para esto, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en embriones transgénicos *Tg(brn3a-hsp70::GFP)*, que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) bajo la conducción del promotor de *brn3a*, por lo que GFP es expresado en las mismas regiones que la proteína *Brn3a*. Este transgénico, marca el tracto Hab-IPN, por lo que es muy útil para estudiar la morfogénesis del mismo. Además, para demarcar la habénula completa se utilizó el anticuerpo anti-Go α (*GTP Binding Protein Go α Subunit*), que delimita membranas neuronales y neuropila. El territorio proteico de *Brn3a* abarca una mayor zona de expresión en la habénula derecha en comparación con la izquierda, a diferencia de la expresión del transcrito (Figura 11A, a). En embriones carentes de *Daam1* se observa tanto el fenotipo derecho como el revertido (Figura 11A. b, b'' y c, c''), sin que se evidencie alteración de la especificación neuronal, de la misma manera que se muestra para la expresión del transcrito de este gen. Sin embargo, podemos observar, mediante la tinción de Go, reversión (Figura 11A. c') y menor contenido de neuropila habenular, con una morfotopología neuronal habenular aparentemente normal en los embriones morfantes de *Daam1* (Figura 11A. b' y c').

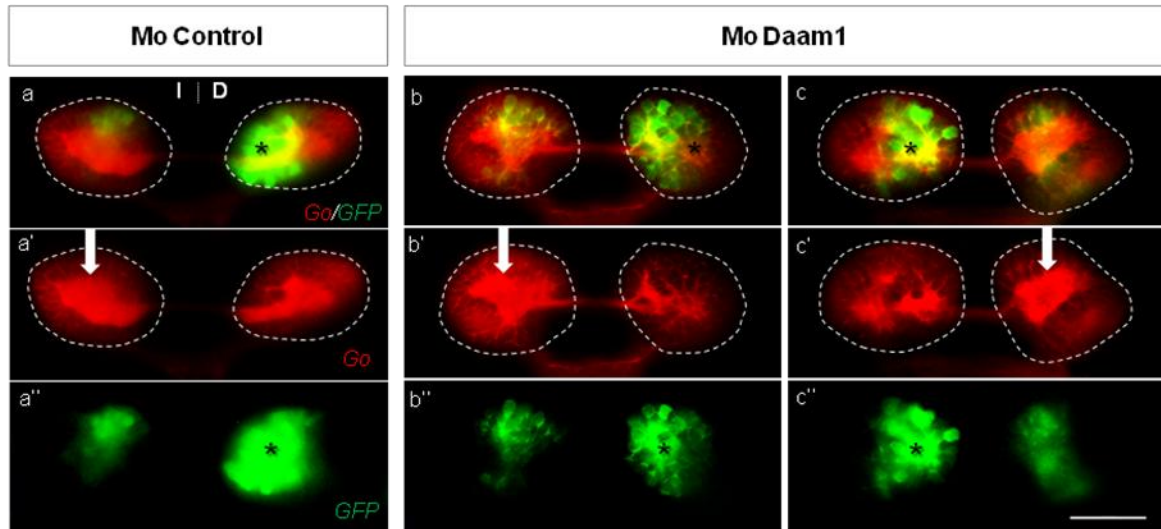


Figura 11: La ausencia de *Daam1* afecta el desarrollo de la neuropila habenular, sin alterar la especificación neuronal. Inmunofluorescencia de Go (rojo) y GFP (verde), este último delimitando el sub-territorio de *Brn3a* en la habénula. Vistas dorsales de larvas *Tg(brn3a-hsp70::GFP)* de 4dpf. (a-a'') Control, (b-b'') Morfante Derecho y (c-c'') Morfante Izquierdo). El borde habenular dado por Go está demarcado por una línea punteada blanca. Los asteriscos negros indican el territorio de *Brn3a* de mayor expresión. Las flechas blancas indican el mayor contenido de neuropila. Barra= 50 μ m.

La distribución de fenotipos presentada en la Tabla 1 muestra la cantidad de embriones controles y morfantes, de fenotipo derecho y revertido, para los subdominios *Brn3a* que se corresponden con los distintos fenotipos de neuropila. Se observa que existe concordancia entre la reversión de ambos territorios habenulares. Para verificar estos resultados, es necesario aumentar el número de larvas analizadas.

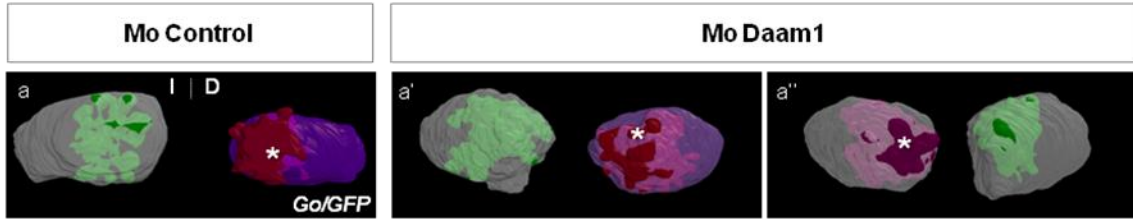
	Mo Control (N=7)			Mo Daam1 (N=9)		
	Sub-territorio Neuropila (Go)					
Sub-territorio Brn3a (GFP)	Izquierdo	Derecho	Bilateral Derecho	Izquierdo	Derecho	Bilateral Derecho
Derecho	7	-	-	4	-	-
Izquierdo	-	-	-	-	3	2

Tabla 1: Existe concordancia en los cambios de lateralidad de los sub-territorios y el dominio de neuropila habenules. Tabla de distribución de sub-territorios de *Brn3a* y neuropila de acuerdo a lateralidad. Los embriones controles (N=7) presentaron en su totalidad un sub-territorio de *Brn3a* más prominente en la derecha y mayor contenido de neuropila en la izquierda (sub-territorio de G0). En los morfantes (N=9) se observaron tres fenotipos: sub-territorio Brn3a derecho/neuropila izquierda (total=4), sub-territorio Brn3a izquierdo/neuropila derecha (total=3) y sub-territorio Brn3a izquierdo /Neuropila bilateral derecha (total=2).

Con el objeto de obtener resultados cuantificables, de manera de comparar los volúmenes entre los sub-territorios habenules en relación al contexto habenules completo, se realizó reconstrucción 3D de stacks para los sub-territorios de Brn3a (GFP) y Go (neuropila), tanto para la condición control como morfante. Para esto se seleccionó un ejemplar control, con fenotipo de mayor contenido de neuropila izquierdo y sub-territorio derecho de *Brn3a* más prominente (Figura 12A.a, representa el 90% de la población control), un morfante derecho para el sub-territorio derecho de *Brn3a* e izquierdo para neuropila (Figura 12A.a') un morfante revertido, con mayor contenido de neuropila en la derecha y un sub-territorio de *Brn3a* izquierdo de mayor expresión (Figura 12A.a''). La medición de los volúmenes para cada condición, se muestra en la Figura 12B. Para la habénula derecha obtuvimos un volumen similar en los 3 casos

(cercano a los $100.000\mu\text{m}^3$), mientras que para la izquierda, el control presento un mayor volumen ($150.354\mu\text{m}^3$), respecto a las morfantes. En el caso de los sub-territorios de *Brn3a*, el control ($31.940,8\mu\text{m}^3$) y morfante derecho ($31.423,9\mu\text{m}^3$) presentan volúmenes casi iguales, sin embargo en el morfante izquierdo (revertido) el volumen ($51.380,7\mu\text{m}^3$) es bastante mayor, escapándose a los dos anteriores. Para el sub-dominio izquierdo de *Brn3a* encontramos valores disímiles para los volúmenes, entre las diferentes condiciones. Es importante señalar que normalmente, existe variabilidad en los tamaños de la habénula total izquierda y derecha, y entre los sub-territorios de *Brn3a* entre diferentes individuos. Sin embargo, un mayor número de análisis volumétricos son necesarios para determinar si existe un cambio en los volúmenes habenulares en ausencia de *Daam1*.

A



B

	Volumen en μm^3		
	Control	Morfante Derecho	Morfante Izquierdo
Sub-territorio <i>Brn3a</i> Derecho	31940,8	31423,9	34619,4
Sub-territorio <i>Brn3a</i> Izquierdo	18145	24434,2	51402,2
Habénula Derecha	109160	99029,8	110024
Habénula Izquierda	150354	114675	110124

Figura 12: La ausencia de Daam1 produce reversión de territorios manteniendo el volumen habenular. (A) Imagen del plano frontal de reconstrucciones 3D de habénulas de un embrión control (a), un embrión morfante de territorio normal (a') y un embrión de territorio revertido (a''), a partir de la inmunofluorescencia de Go y GFP, este último delimitando el sub-territorio de *Brn3a* en la habénula. Los colores indican menor a mayor volumen, en un gradiente en el siguiente orden: verdes, azules, rojos, blancos. (B) Tabla de volúmenes (μm^3) en datos crudos de los territorios y habénula, derecho e izquierdo, de embriones controles (N=1) y morfantes (N=2).

VII. Discusión

Como objetivo principal, en esta tesis se buscaba comprender el rol de *Daam1* en la morfogénesis asimétrica de los sub-territorios habenulares. Específicamente se pretendía analizar los cambios en la lateralidad de los sub-territorios habenulares izquierdo y derecho, producido por su falta de función.

VII.a. *Daam1* afecta la lateralidad y configuración asimétrica de la habénula en pez cebra

Daam1 es expresado asimétricamente en el epitálamo a nivel de ARN mensajero, desde estados larvarios hasta adulto en pez cebra (Colombo 2007, Tesis Doctoral). Particularmente, se expresa en la habénula izquierda, en la misma región que presenta mayor contenido de neuropila y que es expresado *lov* (Colombo 2007, Tesis Doctoral y Figura 9A). Además, el patrón de expresión espacio-temporal de *Daam1* tanto a nivel de transcrito como de proteína coincide con la morfogénesis neuronal habenular y con el desarrollo de conectividades del sistema PP-Hab-NIP (comunicación personal, Colombo A.), por lo que podría estar influenciando la morfogénesis asimétrica de la habénula. Nuestros resultados, demuestran que tanto *lov* como *daam1* a nivel de ARN mensajero, en ausencia de *Daam1* presentan cambios en la distribución y contenido de su expresión. Por un lado, se observó que *lov* y *daam1* presentaban una distribución de alrededor de 30% de reversión e isomerismo derecho, respectivamente. Similar a la observado en Colombo *et al.* 2008 en la neuropila habenular, cuya configuración asimétrica y desarrollo están afectados (resultados no publicados y Figura 8). De la misma forma, para la proteína SV2 (sinaptic vesicle 2), que marca vesículas pre-

sinápticas y cuya distribución coincide con el dominio de neuropila habenular, se observó alteración en su expresión en condiciones de falta de expresión de *Daam1* (resultados no mostrados), presentando fenotipos similares a los encontrados para ***lov*** y ***daam1*** a nivel de transcrito. Estos resultados nos indicarían que *Daam1* estaría afectado la lateralidad y el desarrollo de proyecciones neuronales. Otros experimentos de pérdida de función global (inyección del MO *Daam1* a nivel de 1 célula) realizados en nuestro laboratorio, también afectan la lateralidad y asimetría de la neuropila habenular, reversión en la ubicación del órgano parapineal, así como de las proyecciones habenulares axonales a través del fascículo retroflexo hacia el NIP (Comunicación personal, Colombo A.). Mientras que, ensayos de pérdida de función de *Daam1* local (electroporación del morfolino de *Daam1* en la habénula previo al desarrollo del circuito), sólo afectan el desarrollo de neuropila y fascículo retroflexo, sin afectar la lateralidad de las asimetrías en la habénula (Comunicación personal, Colombo A.).

VII.b. La especificación de neuronas habenulares no es alterada por la pérdida de *Daam1*

Para determinar si *Daam1* podría estar influenciando la neurogénesis habenular, utilizamos marcadores de especificación de sub-territorios habenulares (***brn3a*** y ***dex***), los que son expresados predominantemente en somas neuronales (Figura 10A). La pérdida de función de *Daam1*, indujo reversión en la expresión de ***dex*** (31%), por lo que sólo estaría afectando la lateralidad de la expresión asimétrica de este gen. Mientras que para ***brn3a*** no se observan cambios en la topología, así como tampoco en los niveles de expresión. A nivel proteico observamos que la ausencia de *Daam1*, también

generó cambios en la lateralidad de los sub-territorios izquierdo y derecho de *Brn3a* (Figura 11A. b" y c"), lo que confirma el papel de este gen en el establecimiento de la lateralidad de los sub-territorios habenulares. De la misma forma, resultados de nuestro laboratorio han demostrado que para el *Tg(ET16::GFP)*, que posee el sub-territorio izquierdo más prominente que el derecho, sólo existe una randomización de esta región dentro de la habénula en los morfantes de *Daam1* (Comunicación personal, Colombo A.). Además, al correlacionar los fenotipos del sub-territorio de *Brn3a* y los dominios de neuropila habenulares (Tabla 1), pudimos observar que existe una coordinación en la reversión de este territorio de expresión proteica y el mayor contenido de neuropila, lo que confirman la participación de *Daam1* en la lateralidad de los diferentes sub-territorios habenulares.

Mediante el análisis de reconstrucciones 3D de la expresión de G0, que delimitaba el territorio habenular completo, y de GFP, que delimitaba el territorio de expresión de *Brn3a* intentamos cuantificar posibles cambios en los volúmenes de la habénula y/o los sub-territorios izquierdos y derechos. Estos, resultados, aunque muy preliminares indican que aparentemente no hay cambios volumétricos en la habénula al comparar la condición control y morfante de *Daam1*, sin embargo, sí existe reversión de los territorios (Figura 12). Aunque se observan diferencias considerables en algunos volúmenes, como ya mencionamos, esto puede deberse a las variaciones en los tamaños de la habénula y de los sub-territorios habenulares encontrados en la población de embriones. Tampoco, podemos descartar errores técnicos debido a la inmunofluorescencia (distribución no homogénea del anticuerpo) y a la baja calidad de la imagen confocal (por el cambio en el microscopio Spinning disk Olympus IX 81 con

lámpara HBO, debido al inesperado malfuncionamiento del Microscopio UltraView RS de disco giratorio de PerkinElmer). Además, un mayor número de embriones son necesarios de analizar para obtener un resultado representativo para todas las condiciones estudiadas.

Estos resultados, nos sugieren que *Daam1* no participaría en la neurogénesis de las neuronas habenules, si no que más bien influiría en el desarrollo de las proyecciones neuronales de las mismas, y por lo tanto en la configuración asimétrica de la neuropila habenules. Sin embargo, más experimentos son necesarios para demostrar que *Daam1* no cumple un papel en la neurogénesis de neuronas habenules.

VII.c. *Daam1* tiene un rol dual en la morfogénesis asimétrica habenules en pez cebra

Nuestros resultados han demostrado que *Daam1* tiene un doble rol durante el desarrollo de las asimetrías habenules: (i) Lateralidad de las asimetrías habenules; (ii) Desarrollo de proyecciones neuronales habenules.

Durante la especificación temprana del eje izquierdo-derecho el órgano de lateralidad denominado Vesícula de Kupffer (VK), determina hacia qué lado de la línea media se localizarán las asimetrías tanto a nivel de vísceras y corazón, como en el cerebro de pez cebra (Essner *et al.* 2004, Hirokawa *et al.* 2006, Oteiza *et al.* 2008, Hirokawa *et al.* 2009, Ibañes & Izpisúa 2009). Publicaciones recientes han demostrado que la vía Wnt/PCP participa en la morfogénesis de la VK, de tal manera que la falta de componentes de esta vía afecta la adhesión célula-célula de las DFC (*dorsal forerunner cells*), células precursoras de éste órgano, produciendo fallas en la formación del lumen

de la vesícula y alteración en el flujo Nodal. Esto tiene como consecuencia, la expresión randomizada de genes de la vía Nodal en la PLM (Oteiza *et al.* 2008 y 2010). Dado que *Daam1* es un componente de esta vía de señalización, su ausencia podría inducir los mismos cambios en la expresión de Nodal, lo que induciría reversión de las estructuras epitalámicas, fenómeno que observamos en los resultados de esta tesis y que se correlacionan con los resultados de nuestro laboratorio. Para verificar esta hipótesis, se están realizando experimentos para determinar la expresión de componentes de la vía Nodal (*spaw*, *lefty 2* y *pixt2*) en la PLM y diencéfalo. Además, corroborando los resultados encontrados en esta tesis, respecto al posible rol que *Daam1* tendría en la determinación a la lateralidad de las asimetrías epitalámicas, el *looping* (curvatura del tubo cardiaco) del corazón en los embriones morfantes de *Daam1* presenta una distribución similar a lo que ocurre en neuropila: *looping* derecho (condición normal) reversión y ausencia *looping* (Comunicación personal, Colombo A). Es importante señalar que en modelo de ratón, ya se ha demostrado que *Daam1* está involucrado en la morfogénesis cardíaca (Li *et al.* 2011), así como también en pez cebra este gen es expresado durante el desarrollo del corazón (Colombo 2007, Tesis Doctoral), de allí los fenotipos encontrados. Además, para descartar que la expresión randomizada de los componentes de la vía Nodal se produjo debido a un rompimiento en la línea media, se realizaron hibridaciones *in situ* de ***sonic-hedgehog (shh)*** (marcador de placa del piso y notocorda) y ***no-tail (Ntl)*** (marcador de notocorda) en pez cebra, que confirmó que ésta se mantiene intacta y sin alteración (Resultados no mostrados).

Por otra parte, *Daam1* estaría regulando el desarrollo de las proyecciones neuronales de la habénula, de acuerdo a los resultados de este trabajo en donde la conformación de la neuropila es afectada por la ausencia de este gen. Confirman esta observación, el efecto que induce la ausencia de *Daam1* en la arquitectura del NIP, que presenta desfasciculación y menor número de proyecciones axonales habenulares (Comunicación personal, Colombo A). Como ya hemos mencionado en la introducción, recientemente *Daam1* ha sido involucrado en la morfogénesis axonal y dendrítica en cultivo hipocampales y en un circuito neuronal de mosca (Salomon *et al.* 2008; Matussek *et al.* 2008), relacionando esta función a su rol en la modulación del citoesqueleto (Ang *et al.* 2010; Babayeva *et al.* 2010). De acuerdo a la literatura, el citoesqueleto cumple un papel fundamental en procesos que permiten la morfogénesis de proyecciones neuronales, como polaridad neuronal, especificación y crecimiento axonal (Arimura and Kaibuchi 2007; Jan and Jan 2003). En este sentido, *Daam1* estaría jugando una importante función en el desarrollo axonal y dendrítico de neuronas habenulares al regular la dinámica del citoesqueleto y de esta manera controlar algunos de los procesos celulares mencionados. Más estudios se están realizando en nuestro laboratorio para dilucidar estos fenómenos.

La disección de ambos fenómenos (morfogénesis asimétrica habenular vs lateralidad de las asimetrías habenulares), se ha realizado a través de la electroporación local del morfolino de *Daam1*, durante las etapas previas a la morfogénesis del circuito PP-Hab-NIP y posterior al establecimiento de la lateralidad temprana inducida por la VK y Nodal. De tal manera que en este caso, sólo se observan alteraciones en el desarrollo de las proyecciones, sin afectar la lateralidad de las

mismas, así como tampoco las de los sub-territorios de expresión génica habenulares. Estos resultados confirmar el efecto dual que *Daam1* tiene sobre la morfogénesis asimétrica del sistema PP-Hab-NIP.

Finalmente podemos decir que esta tesis ha contribuido al conocimiento del establecimiento de las asimetrías cerebrales en el pez cebra y de la función que *Daam1* podría estar cumpliendo en este proceso durante el desarrollo embrionario.

VII. Bibliografía

Aizawa H., Bianco I., Hamaoka T., Uemura O., Concha M.L., Russell C., Wilson S.W., Okamoto H. 2005. "Laterotopic representation of the left-right information onto the dorso-ventral axis of a zebrafish midbrain target nucleus". *Curr Biol.* 15: 238-243.

Aizawa H., Goto M., Sato T., Okamoto H. 2007. "Temporally regulated asymmetric neurogenesis causes left-right difference in the zebrafish habenular structures". *Dev Cell.* 12: 87-98

Ang SF, Zhao ZS, Lim L, Manser E. 2010. "DAAM1 is a formin required for centrosome re-orientation during cell migration". *PLoS One.* 5(9).

Arimura N., Kaibuchi K. 2007. "Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanism". *Nature Reviews Neuroscience.* 8, 194-205

Bianco I.H., Wilson S.W. 2009. "The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain". *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364:1005–1020.

Babayeva S, Zilber Y, Torban E. 2010. "Planar cell polarity pathway regulates actin rearrangement, cell shape, motility, and nephrin distribution in podocytes". *Am J Physiol Renal Physiol.* 300(2):F549-60.

Bisgrove B.W., Essner J.J., Yost H.J. 1999. "Regulation of midline development by antagonism of lefty and nodal signaling". *Development*. 126(14): 3253-62.

Carl M., Bianco I.H., Bajoghli B., Aghaallaei N., Czerny T., Wilson S.W. 2007. "Wnt/Axin1/beta-catenin signaling regulates asymmetric nodal activation, elaboration, and concordance of CNS asymmetries". *Neuron*. 55(3):393-405.

Colombo A. 2007. "Identificación de genes implicados en el desarrollo embrionario de las asimetrías cerebrales en pez cebra (*Danio rerio*)". Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

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

Concha M.L., Russell C., Regan J.C., Tawk M., Gilmour D.T., Kapsimali M., Sumoy L., Goldstone K., Amaya E., Kimelman D., Nicolson T., Grunder S., Gomperts M., Clarke J.D., Wilson S.W. 2003. "Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality". *Neuron*. 39 (3): 423-38.

Concha M.L. 2004. "The dorsal diencephalic conduction system of zebrafish as a model of vertebrate brain lateralisation". *Neuroreport*. 15(12): 1843–1846.

Concha M.L., Signore I., Colombo A. 2009. "Mechanisms of directional asymmetry in the zebrafish epithalamus". *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 20(4): 98-509.

Escalante-Mead P.R., Minshew N.J., Sweeney J.A. 2003. "Abnormal brain lateralization in high-functioning autism". *J. Autism Dev. Disord.* 33: 539–543.

Essner J., Amack J.D., Nyholm M.K., Harris E.B., Yost H.J. 2004. "Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut". *Development*. 132: 1247-1260.

Faix J., Groose R. 2006. "Staying in Shape with Formins" *Dev Cell*. 10: 693-706.

Gamse J.T., Thisse C., Thisse B., Halpern M.E. 2003. "The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon". *Development*. 130 (6): 1059-68.

Gamse J.T., Kuan Y.S., Macurak M., Brosamle C., Thisse B., Thisse C., Halpern M.E. 2005. "Directional asymmetry of the zebrafish epithalamous guides dorsoventral innervations to the midbrain target". *Development*. 132(21): 4869-81.

Güntürkün O., Diekamp B., Manns M., Nottelmann F., Prior H., Schwarz A., Skiba M. 2000. "Asymmetry pays: visual lateralization improves discrimination success in pigeons". *Curr. Biol*. 10: 1079–1081.

Habas R., Kato Y., He X. 2001. "Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell*. 107(7): 843-54.

Halpern M.E., Liang J.O., Gamse J.T. 2003. "Leaning to the left: laterality in the zebrafish forebrain". *Trends Neurosci*. 26(6): 308–313.

Hirokawa N., Tanaka Y., Okada Y., Takeda S. 2006. "Nodal Flow and the Generation of the Left-Right Asymmetry". *Cell*. 125 (1): 33-45.

Hirokawa N., Tanaka Y., Okada Y. 2009. "Left-Right Determination: Involvement of Molecular Motor KIF3, Cilia, and Nodal Flow". *Cold Spring Harb Perspect Biol*.

Hutsler J., Galuske R.A.W. 2003. "Hemispheric asymmetries in cerebral cortical networks". *Trends Neurosci*. 26: 429–435.

Ibañes M., Izpisua J.C. 2009. "Left-right axis determination". John Wiley & Sons, Inc. *WIREs Syst Biol Med*. 1: 210–219.

Jan Y.N., Jan L.Y. 2003. "The control of dendrite development". *Neuron*. 40, 229-242

Jowett C. 2001. "Double in situ hybridization techniques in zebrafish". *Methods*. 23(4): 345-58.

Ju R, Cirone P, Lin S, Griesbach H, Slusarski DC, Crews CM. 2010. "Activation of the planar cell polarity formin DAAM1 leads to inhibition of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13;107(15):6906-11.

Khadka DK, Liu W, Habas R. 2009. "Non-redundant roles for Profilin2 and Profilin1 during vertebrate gastrulation". *Dev Biol* 332(2):396-406.

Kida Y., Shiraishi T., Ogura T. 2004. "Identification of chick and mouse Daam1 and Daam2 genes and their expression patterns in the central nervous system". *Developmental brain research* 153(1): 143-50.

Kida Y., Sato T., Miyasaka K., Suto A., Ogura T. 2007. "Daam1 regulates the endocytosis of EphB during the convergent extension of the zebrafish notochord". *PNAS* 104(16): 6708-6713.

Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T. 1995. "Stages of Embryonic Development of the Zebrafish". *Developmental Dynamics*. 203: 255-310.

Kuan Y., Yu H., Moens C., Halpern M.E. 2007. "Neuropilin asymmetry mediates a left-right difference in habenular connectivity". *Development*. 134: 857-865.

LaMonica K, Bass M, Grabel L. 2009. "The planar cell polarity pathway directs parietal endoderm migration". *Dev Biol.* 1;330(1):44-53.

Li D., Hallett M.A., Zhu W., Rubart M., Liu Y., Yang Z., Chen H., Haneline L.S., Chan R.J., Schwartz R.J., Field L.J., Atkinson S.J., Shou W. 2011. "Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam1) is required for heart morphogenesis". *Development.*138(2):303-15.

Li X., Branch C.A., Ardekani B.A., Bertisch H., Hicks C., DeLisi L.E. 2007. "fMRI study of language activation in schizophrenia, schizoaffective disorder and in individuals genetically at high risk". *Schizophr. Res.* 96: 14–24.

Liu W., Sato A., Khadka D., Bharti R., Diaz H., Runnels L.W., Habas R. 2008. "Mechanism of activation of the formin protein Daam". *PNAS.* 105(1): 210-215.

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

Matusek T., Dijane A., Jankovics F., Brunner D., Mlodizik M., Mihály J. 2006. "The *Drosophila* formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton" *Development.* 133(5): 957-966.

Nayaka M., Habas R., Biris K., Dunty W. Jr., Kato Y., He X., Yamaguchi T. 2006. "Identification and comparative expression analyses of Daam genes in mouse and Xenopus". *Gene Expression Patterns*. 5: 97-105.

Oteíza P., Köppen M., Concha M.L., Heisenberg C. 2008. "Origin and shaping of the laterality organ in zebrafish". *Development*. 135: 2807-2813.

Oteíza P., Köppen M., Krieg M., Pulgar E., Farías C., Melo C., Preibisch S., Müller D., Tada M., Hartel S., Heisenberg C., Concha M.L. 2010. "Planar cell polarity signalling regulates cell adhesion properties in progenitors of the zebrafish laterality organ". *Development*. 137: 3459-3468.

Pascual A., Huang K.L., Neveu J., Preat T. 2004. "Neuroanatomy: brain asymmetry and long-term memory". *Nature*. 427: 605–606.

Regan J.C., Concha M.L., Roussigne M., Russell C., Wilson S.W. 2009. "An Fgf8-Dependent Bistable Cell Migratory Event Establishes CNS Asymmetry". *Neuron*. 61: 27-34.

Rogers L.J. 2000. "Evolution of hemispheric specialization: advantages and disadvantages". *Brain Lang*. 73: 236–253.

Rogers L.J, Vallortigara G. 2008. "From antenna to antenna: lateral shift of olfactory memory recall by honeybees". PLoS ONE. 3: e2340.

Roussigné M., Bianco I.H., Wilson S.W., Blader P. 2009. "Nodal signalling imposes left-right asymmetry upon neurogenesis in the habenular nuclei". Development. 136(9):1549-57.

Salomon S.N., Haber M., Murai K., Dunn J.R. 2008. "Localization of the diaphanous-related formin Daam1 to neuronal dendrites". Neuroscience Letters. 447: 62-67.

Sato A., Khadka D., Liu W., Bharti R., Runnels L., Dawid I., Habas R. 2006. "Profilin is an effector for Daam1 in non-canonical Wnt signaling and is required for vertebrate gastrulation". Development. 133: 4219-4231.

Sun T., Walsh C.A. 2006. "Molecular approaches to brain asymmetry and handedness". Nat Rev Neurosci. 7(8): 655-62.

Thisse C., Thisse B. 1999. "Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction". Development. 126(2): 229-240.

Toth C., Rajput M., Rajput A.H. 2004. "Anomalies of asymmetry of clinical signs in Parkinsonism". Mov. Disord. 19: 151-157.

Trinh L.A., McCutchen M.D., Bonner-Fraser M., Fraser S.E., Bumm L.A., McCauley D.W. 2007. "Fluorescent in situ hybridization employing the conventional NBT/BCIP chromogenic stain". *BioTechniques*. 42(6): 756–759.

Vallortigara G., Rogers L.J. 2005. "Survival with an asymmetrical brain: advantages and disadvantages of cerebral lateralization". *Behav. Brain Sci.* 28: 575–589. Discussion 589–633.

Wallar B.J., Alberts A.S. 2003. "The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton". *Trends in Cell Biology*. 13(8): 435-46.

Welten M.C., de Haan S.B., van den Boogert N., Noordermeer J.N., Lamers G.E., Spaik H.P., Meijer A.H., Verbeek F.J. 2006. "ZebraFISH: fluorescent in situ hybridization protocol and three-dimensional imaging of gene expression patterns". *Zebrafish*. 3(4): 465-76.