

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



**DINÁMICA DEL CITOESQUELETO DE ACTO-MIOSINA
DURANTE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA DE
LOS PRECURSORES DEL ÓRGANO DE LA LATERALIDAD
EN PEZ CEBRA**

LORETO MARISOL LÓPEZ GUTIÉRREZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN MORFOLOGÍA

Director de Tesis: Prof. Dr. Miguel Concha N.

Co-Director de Tesis: Dr. Eduardo Pulgar P.

2017

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

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

LORETO MARISOL LÓPEZ GUTIÉRREZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Morfología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 31 de Julio de 2017.

Prof. Dr. Miguel Concha
Director de Tesis
Departamento de Anatomía y Biología del desarrollo,
Facultad de medicina, Universidad de Chile

Dr. Eduardo Pulgar
Co-director de Tesis

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Alicia Colombo

Prof. Dr. Patricio Olguín

Prof. Dr. Marcelo Antonelli
Presidente Comisión

A Diego,
No sé cómo lo hace la gente que
va por la vida sin un hermano.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Concha por recibirme en su laboratorio y cree en mí, entregándome las herramientas para aprender y desarrollarme.

Al Dr. Andrés Sarrazín por devolverme la fascinación por la ciencia, y mostrarme el maravilloso mundo de la biología de desarrollo, por todos sus consejos.

Al Dr. Eduardo Pulgar por sus enseñanzas, paciencia, dedicación y entrega durante todo este proyecto, por su tiempo dentro y fuera del laboratorio, por los momentos de básquet y conversaciones, por convertirse en un amigo.

A Lucas, Marilyn, Mauricio, Víctor y Edu por su apoyo experimental, sin su colaboración este proyecto no podría haberse llevado a cabo.

A los miembros del Laboratorio Jani, Camilo, Ailen, Pato, Margarita, Sergio, en especial a Karina y Nané por los cafés, consejos y amistad, y obvio por leer toda esta tesis, se pasaron chicas.

A Yoya, German y Made por escucharme y compartir sus conocimientos además de los mates, vinos y cervezas.

A Nacho y Javi por ser tan prendidos y sacarme del estrés con sus buenos eventos.

A Jorge Jara por acompañarme en las noches de trabajo, preocuparse de que comiera y llegara bien a casa, eres único.

A Néstor por su misteriosa compañía y profundas conversaciones.

A Luis, José y Kathy porque son las personas que hacen que todo funcione.

A los amigos que a pesar de la distancia siempre han estado presentes Pablo, Gito, Roberto, Milo, Nico, Kathy y Camilita.

A Ángela y Consuelo porque junto a ustedes no hay nada que no podamos resolver, por las locuras, por traer un poquito de San Fernando a esta gran ciudad.

A la familia Caamaño Dubó por recibirme en su casa y hacerme parte de su familia, por cuidarme tanto. Nico, Cata, Pauli y Nelson son mis hermanos del alma, los quiero mucho, sin ustedes esto no hubiese sido posible.

A Erick por ser el mejor compañero de vida, apoyándome, soportándome y haciéndome reír en los momentos de tristeza, por el ánimo que me entregas cada día, por acompañarme en las aventuras y ser mi cable a tierra. Te Amo.

A mis Papás por siempre creer en mí y apoyarme incondicionalmente, por su sabiduría y cariño, por enseñarme a luchar por mis sueños, a no darme por vencida y ser fuerte para enfrentar los obstáculos. Los Amo mucho

A mi hermano por convencerme cada día que puedo ser y hacer lo que quiera, por acompañarme en todos los procesos, por entenderme como nadie, por confiar en mí, por las tardes de frío comiendo helado y escuchando música, pero sobre todo por regalarme junto con la Fran al mejor sobrino, mi Gaspi que llenó de alegría y energía nuestras vidas. Los Amo

RESUMEN.

El órgano de la lateralidad es una estructura supra-celular encargada de establecer el eje izquierda-derecha durante el desarrollo embrionario de vertebrados. En el pez cebra, los precursores del órgano de la lateralidad (POL) forman un pequeño grupo de aproximadamente 20-30 células que surgen tras la delaminación de un subconjunto de células epiteliales pertenecientes al epitelio envolvente superficial (EES), lo cual es mediado por un proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM). Basado en resultados preliminares que revelaron la acumulación de F-actina en la cara apical de los POL durante su delaminación, el objetivo de este trabajo de tesis fue investigar la dinámica de este proceso y explorar un posible papel de mecanismos de constricción apical en el proceso. Para ello se combinaron metodologías de inmunofluorescencia indirecta en embriones fijados, microscopia *in vivo* de sábana de luz y disco rotatorio en embriones transgénicos que marcan F-actina y miosina no muscular con proteínas fluorescentes, y análisis de imágenes. Se observó que los POL se originan de las células del EES dorsal, tanto marginal como submarginal, por un proceso de delaminación asincrónico con respecto a su inicio, duración y término. En este proceso, la disminución del área apical de los POL se correlaciona con un aumento de intensidad de actina, y con la existencia de cuatro dinámicas de acto-miosina en el área apical de los POL, denominadas medial, hacia el borde, cortical y de cierre tipo cremallera. Los resultados de esta tesis sugieren que la delaminación de una célula del EES destinada a ser POL es mediada por un proceso autónomo de contracción apical del citoesqueleto de acto-miosina durante la TEM. Este trabajo muestra, por primera vez, cómo operan los flujos de acto-miosina en los procesos de TEM y sugieren un mecanismo de delaminación mediante el cual se impediría el aumento de la resistencia del tejido circundante, disminuyendo el estrés mecánico de la contracción apical de los POL.

ABSTRACT

The laterality organ is a supra-cellular embryonic structure formed during gastrulation that is involved in the establishment of left-right asymmetry in vertebrates. In zebrafish, laterality organ precursors (LOP) form a small group of approximately 20 to 30 cells that arise after the delamination of a subset of cells from the extra-embryonic surface enveloping epithelium (SEE), a process mediated by an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). Based on preliminary results that reveal an accumulation of F-actin in the apical surface of LOP during their delimitation, in this thesis we aimed to investigate the dynamics of this process and to explore a possible role for apical constriction mechanisms within the process. To this end, we combined a series of methodological approaches, including in vivo light-sheet and spinning-disk microscopy in transgenic embryos, labeling of F-actin and non-muscular myosin with fluorescent proteins, indirect immunofluorescence in fixed embryos, and image analysis. We observed that the LOP originate by delamination from cells of the dorsal SEE located in both marginal and submarginal positions. The delimitation process of LOP was asynchronous with respect to their onset, duration and end. We also observed that during LOP delimitation, the decrease of apical area correlates with an increase in actin intensity, and identified four dynamics of non-muscular myosin in the apical area that associated to this process: medial, towards the border, cortical and zipper-like closure. The results of this thesis show for the first time how actin-myosin dynamics operates during EMT. The process of delimitation of LOP appear mediated by the actin-myosin cytoskeleton in a cell-autonomous manner, through an asynchronous process of apical constriction.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Transición epitelio-mesénquima.....	2
1.2. Extrusión Celular.....	6
1.3. Dinámica de acto-miosina durante la contracción apical.....	8
1.4. TEM de las células precursoras del órgano de la lateralidad.....	10
2. HIPÓTESIS.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo General.....	15
3.2. Objetivos Específicos.....	15
4. RESULTADOS.....	16
4.1. Determinar el origen temporal y espacial por delaminación de los POL en pez cebra.....	16
4.2. Describir la dinámica contráctil del citoesqueleto de acto-miosina de la delaminación de los POL en pez cebra.....	22
5. DISCUSIÓN.....	33
5.1. Nodal y el proceso de delaminación de los POL.....	34
5.2. Tensión y asincronismo en la delaminación de los POL.....	35
5.3. Distintas dinámicas contráctiles de acto-miosina se asocian a la delaminación de los POL.....	36
5.4. Transmisión de fuerzas y uniones célula-célula durante la delaminación de los POL.....	39
6. CONCLUSIÓN.....	41
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
7.1. Líneas de Pez cebra.....	42
7.2. Inyecciones de ARNm.....	42
7.3. Inmunofluorescencia.....	44
7.4. Microscopía in vivo y análisis de imágenes.....	45
7.5. Análisis de datos y estadística.....	46
8. REFERENCIAS.....	47

ÍNDICE FIGURAS

FIGURA 1. Mecanismo de Transición Epitelio Mesénquima.....	6
FIGURA 2. Proceso de extrusión celular.....	7
FIGURA 3. Dinámica de la red de acto-miosina y generación de fuerzas durante la contracción apical.....	9
FIGURA 4. Origen de las células precursoras del órgano de la lateralidad en pez cebra.....	11
FIGURA 5. Los POL inicialmente forman parte del EES y son extruídas por un mecanismo dependiente de acto-miosina.....	13
FIGURA 6. Origen temporal y espacial de los POL en pez cebra.....	19
FIGURA 7. Ritmicidad en el origen de los POL.....	20
FIGURA 8. Dinámica de citoesqueleto de actina durante la delaminación de los POL.....	27
FIGURA 9. Co-distribución de miosina II NM con F-actina en la delaminación de los POL.....	28
FIGURA 10. Dominios de miosina II NM <i>in vivo</i> durante la delaminación de un POL.....	29
FIGURA 11. Patrones dinámicos <i>in vivo</i> de la miosina II NM durante la delaminación de los POL.....	30
FIGURA 12. Miosina II NM activa durante la delaminación de los POL.....	31
FIGURA 13. Actividad contráctil de la miosina II NM apical de los POL durante un evento de división celular.....	32

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario es el resultado combinado de procesos de adquisición de destino celular, o especificación celular, y de comportamientos celulares que en su conjunto generan la forma de tejidos y órganos durante la morfogénesis. Ambos procesos son regulados y coordinados tanto por señales bioquímicas como por fuerzas mecánicas, y la interacción de estos dos tipos de señales juega un papel fundamental en el desarrollo (Aegerter-Wilmsen *et al.*, 2010). El papel de las fuerzas mecánicas durante el desarrollo, aun cuando ha sido históricamente ignorado, ha recibido especial atención en los últimos años, vinculándolo tanto a la regulación de la expresión génica como a la morfogénesis. La generación de las fuerzas mecánicas radica, a nivel celular, en la dinámica contráctil del citoesqueleto de acto-miosina, necesaria para inducir reordenamientos celulares y para mantener la homeostasis tisular (Behrndt *et al.*, 2012, Guillot *et al.*, 2013). A nivel supracelular, estas fuerzas son transmitidas a través de la interacción del cito-esqueleto de acto-miosina con moléculas de adhesión, formando uniones intercelulares especializadas las cuales coordinan la respuesta mecánica de las células (Heisenberg y Bellaiche, 2013). En los epitelios se ha descrito que la pulsación y el recambio de acto-miosina son críticos para la integridad mecánica de los tejidos, teniendo un papel fundamental en los procesos de remodelación y movimiento celular (Heisenberg y Bellaiche, 2013).

Los epitelios pueden sufrir una diversidad de transformaciones durante el desarrollo embrionario, pero tal vez la más llamativa y clave para el desarrollo es la transición epitelio mesénquima (TEM). En este proceso, las células epiteliales

pierden su polaridad ápico-basal y se delaminan hacia la cara basal para dar origen a células de tipo mesenquimáticas capaces de migrar y colonizar otros tejidos (Kamai et. al 2003). Este proceso se asocia en muchos casos a eventos de especificación celular, y requiere de un estricto control de la adhesión celular, dinámica del citoesqueleto y la motilidad celular, en los cuales están involucrados los reordenamientos del citoesqueleto de acto-miosina (Schmid et. al 1998). Cómo ocurre esta reorganización del citoesqueleto durante el proceso de TEM es aún poco claro.

1.1. Transición epitelio-mesénquima

Los epitelios se caracterizan por proporcionar una barrera física necesaria para establecer y mantener un ambiente interno regulado. Además, esta característica de barrera proporciona integridad biomecánica al tejido, la cual es soportada por complejos de unión célula-célula. Estos comprenden uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas (Micalizzi *et al.*, 2010).

Durante el desarrollo embrionario y la homeostasis celular, grupos determinados de células dentro de un epitelio pueden sufrir cambios bioquímicos y morfológicos dramáticos que los llevan a dejar el tejido (Kalluri *et al.*, 2009). Esto debe ocurrir preservando las características de barrera del epitelio, y permite a las células movilizarse desde su posición original para establecer nuevas estructuras en otras posiciones del embrión durante la morfogénesis de órganos y tejidos (Micalizzi *et al.*, 2010). Este proceso, que se denomina transición epitelio mesénquima (TEM), también ocurre durante la adultez en procesos de regeneración y reparación de

tejido, y en patologías como el cáncer (Chaffer *et al.*, 2007). La TEM inducida por factores de crecimiento permite a las células epiteliales reorganizar el citoesqueleto y los componentes de polaridad, e inducir cambios en las interacciones célula-célula y célula-matriz (Fig.1) Estas modificaciones moleculares instruyen cambios en el estado de la diferenciación celular, que le confiere a las células la habilidad de migrar e invadir, pasando de un estado epitelial diferenciado a un estado mesenquimático de alta potencialidad (Kalluri *et al.*, 2009, Hay *et al.*, 2005).

La organización de las uniones entre las células epiteliales establece un dominio apical y otro basolateral. Las células epiteliales premigratorias forman un epitelio con polaridad típica que se pierde con el objetivo de que estas migren, conforme las uniones estrechas se reemplazan progresivamente por uniones de tipo comunicante. Se han descrito tres complejos moleculares principales implicados en la regulación de la polaridad ápico-basal de las células epiteliales: Scribble, Crumbs y Par (Whiteman *et al.*, 2008, Humbert *et al.*, 2008). Cuando el factor de transcripción *Snail1* reprime la transcripción de *Crumbs3*, se anula la localización de los complejos Par y de las proteínas de polaridad celular del complejo Crumbs en las uniones estrechas (Gonzales y Medici, 2014). Se cree que el rearrreglo de estos complejos ocurre para permitir la migración celular en los procesos de TEM.

Un aspecto clave que ocurre durante la TEM, es la variación del balance de fuerzas adhesivas. Las células epiteliales expresan típicamente E-cadherina mientras que las células mesenquimáticas expresan N-cadherina (Scarpa *et al.*, 2015). Se ha demostrado, que durante la TEM, existe un cambio de E-cadherina por N-cadherina, disminuyendo de este modo la magnitud de fuerzas adhesivas, que permiten a las células epiteliales delaminarse del tejido circundante (Scarpa *et al.*, 2015). Este

cambio se regula a nivel transcripcional disminuyendo la expresión de E-cadherina y aumentando la de N-cadherina a través de la activación de los factores de transcripción *Snail* y *Twist*, los cuales podrían trabajar de forma concertada o de manera secuencial (Nieto M.A. 2002, Kalluri *et al.*, 2009). Posterior a estos cambios de regulación transcripcional, N-cadherina induce la reorganización de Rac1 activo, polarizando las protrusiones de membrana, lo cual resulta en el aumento de la motilidad celular (Micalizzi *et al.*, 2010). En principio estos eventos sub-celulares instruyen a la célula epitelial polarizada, para desencadenar variados cambios bioquímicos que le permiten finalmente a la célula epitelial asumir un fenotipo mesenquimático, resultando en el incremento de la capacidad migratoria, una elevada resistencia a la apoptosis y anoikis, y el aumento de la producción de componentes de la matriz extracelular (Kalluri *et al.*, 2003). La finalización del proceso de TEM está marcada por la degradación de la membrana basal subyacente, permitiéndole a la nueva célula mesenquimática migrar fuera de la capa epitelial de la que se originó (Kalluri *et al.*, 2009).

La formación de las células de la cresta neural (CCN) es uno de los modelos más estudiados del proceso TEM (Knecht and Bronner-Fraser 2002). Las CCN constituyen una población celular multipotente, capaz de originar diversos tipos celulares como neuronas, células gliales, miocitos lisos, condrocitos y odontoblastos, entre otros (Crane *et al.*, 2006, Achilleos *et al.*, 2012). Una característica notoria de las CCN es su capacidad migratoria. La cresta neural se desarrolla a partir de una pequeña porción del tubo neural dorsal (Huang *et al.*, 2004). Posteriormente, experimentan una TEM, se desprenden y migran a sitios distantes para diferenciarse y formar los respectivos derivados. En *Xenopus leavis* la TEM de las células de la

cresta neural es inducida por la activación de *Snail*, el cual induce la formación de grandes espacios intercelulares producto de la pérdida de la expresión de E-cadherina y la disrupción de la lámina basal del epitelio neural, permitiéndoles a las células de la cresta neural migrar fuera del tejido epitelial. Seguidamente, la lámina basal del tejido neuroectodérmico se repone rápidamente para preservar las características de barrera del epitelio (Aybar *et al.*, 2002).

Los eventos celulares que ocurren durante la TEM de los derivados de la cresta neural se han descrito además en la fusión de los procesos palatinos, la formación de las válvulas cardíacas del corazón y el músculo esquelético, entre otros (Mercado-Pimentel *et al.*, 2007).

Se ha estudiado extensa y detalladamente el papel de las uniones célula-célula dependientes de cadherinas durante el proceso de TEM, sin embargo, a nuestro entender no existen estudios que aborden la descripción y el papel que cumple la reorganización del citoesqueleto de acto-miosina, otra de las modificaciones macromoleculares que ocurren durante el proceso de TEM. La contracción del citoesqueleto de acto-miosina es suficiente para generar fuerzas de deformación celular, las que transmitidas a nivel de tejido pueden provocar cambios drásticos de la reorganización celular, como invaginaciones tisulares, además de estar involucradas en procesos de mantención de la homeostasis tisular, un proceso descrito como extrusión celular.

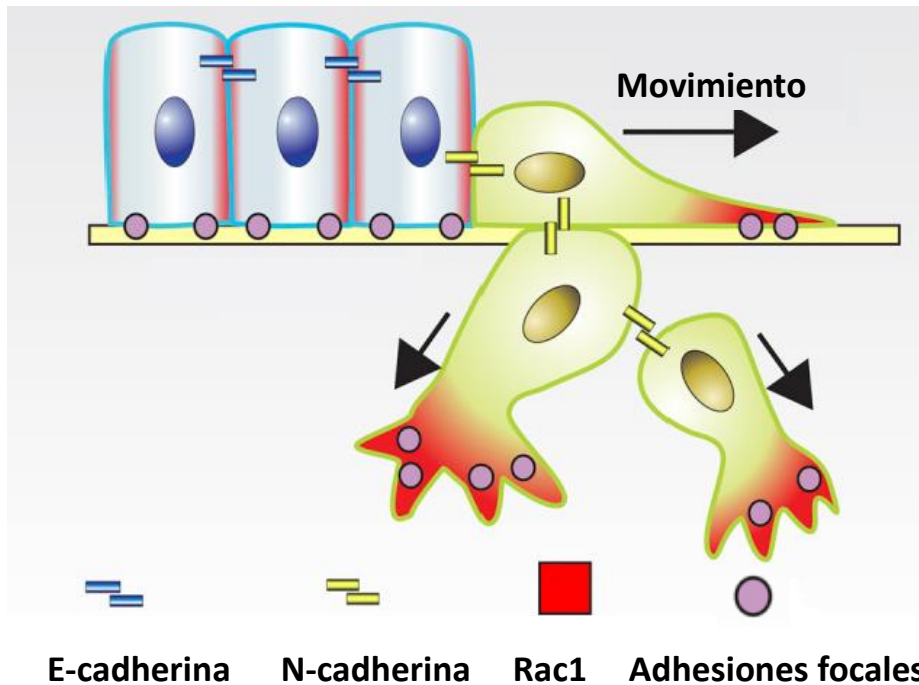


Figura 1: Mecanismo de Transición Epitelio Mesénquima. Reorganización del citoesqueleto de acto-miosina e intercambio de E-cadherina por N-cadherina (Modificado de Scarpa *et al.*, 2015). Para más detalles ver texto.

1.2 Extrusión Celular

El mantenimiento de la homeostasis tisular de los tejidos epiteliales es un fenómeno común presente tanto en el desarrollo embrionario como en la vida adulta. Mediante este proceso, los tejidos epiteliales mantienen un número celular adecuado y descartan las células apoptóticas (Rosenblatt J *et. al.*, 2001). Para lograr esto, algunas células del tejido deben ser eliminadas mientras se preservan las propiedades de barrera del tejido epitelial. El mecanismo descrito para cumplir este propósito ha sido llamado extrusión celular (Rosenblatt J *et. al.*, 2001).

Durante este proceso, se ha demostrado un papel fundamental de la reorganización y actividad contráctil del citoesqueleto de acto-miosina. Se ha observado que la actividad cooperativa entre la contracción apical de la célula a ser eliminada junto con la contracción de los ejes de las células vecinas son suficientes para eliminar la célula apoptótica o en estado de anoikis (Fig. 2) (Schewayer *et al.*, 2016). Así, ha sido reportada la formación de dos anillos de acto-miosina contráctil, uno interno de la célula y otro externo formado por las células circundantes (Rosenblatt J *et. al.*, 2001). Aún no es claro como estas dos estructuras supra-moleculares se coordinan para dirigir la extrusión de una célula, por ejemplo, si trabajan en conjunto para potenciar la extrusión celular o funcionan realizando relevos de contractibilidad. Asimismo, no se han documentado las características dinámicas de los flujos de acto-miosina que ocurren durante este proceso.

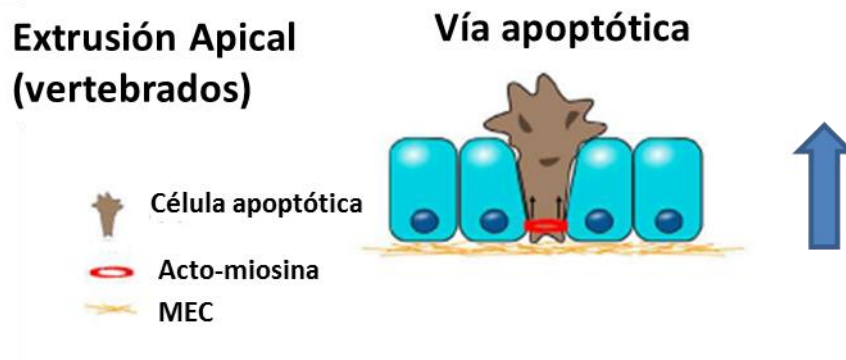


Figura 2: Proceso de extrusión celular. Eliminación del plano de una célula destinada a morir, sin afectar la integridad de la barrera epitelial (Modificado de Schewayer *et al.*, 2016).

1.3 Dinámica de acto-miosina durante la contracción apical

La contracción apical ocurrida en células epiteliales individuales y transmitida a nivel de tejido es necesaria para generar fuerzas de deformación celular, por ejemplo para provocar el pliegue de tejidos, y para la reparación epitelial posterior a un daño tisular (Martin *et al.*, 2014). Asimismo, como ya se ha mencionado, cumple un papel fundamental en la eliminación de células apoptóticas durante el proceso de extrusión celular (Martin *et al.*, 2014).

Sólo recientemente se ha comenzado a describir los patrones dinámicos del citoesqueleto de acto-miosina durante la contracción apical y a entender cómo las fuerzas generadas operan a nivel-supracelular durante el desarrollo embrionario de invertebrados y vertebrados (Heisenberg y Bellaiche, 2013). De acuerdo a su temporalidad, se han descrito flujos pulsados de acto-miosina con duraciones que van desde los segundos a los minutos. Estos pulsos generan ciclos repetitivos de contracción del ápice celular seguida por un periodo de estabilización (Martin *et al.*, 2009; Rauzi *et al.*, 2010 y Rho-johnson *et al.*, 2012). Dependiendo de la distribución espacial de estos pulsos, estos dan origen a fuerzas contráctiles isotrópicas o anisotrópicas (Fig. 3) (Heisenberg y Bellaiche, 2013). Las fuerzas contráctiles isotrópicas, generadas por pulsos centrípetos de acto-miosina, generan una propagación uniforme de fuerzas que provocan la disminución uniforme del área apical de la célula (Fig. 3A) (Martin *et al.*, 2009). Por otro lado, fuerzas de contracción anisotrópica, generadas a partir de pulsos laterales direccionados contra uno de los contornos del ápice celular, dan origen a fuerzas de contracción local de uno de estos contornos (Fig.3B) (Rauzi *et al.*, 2010). Asimismo, se han descrito

contracciones circunferenciales corticales, que generan fuerzas isotrópicas alrededor de todo el contorno apical (Fig. 3C) (Martin *et al.*, 2014, Coravos *et al.* 2017).



Figura 3. Dinámica de la red de acto-miosina y generación de fuerzas durante la contracción apical. A) Flujo pulsátil centrípeto de la red de acto-miosina apical, el cual genera una constricción apical isotrópica. **B)** Flujo pulsátil centrípeto lateral de la red de acto-miosina, el cual provoca la contracción anisotrópica de un eje cortical. **C)** Contracción apical circunferencial cortical de acto-miosina, la cual desencadena fuerzas contráctiles isotrópicas (Modificado de Heisenberg y Bellaiche, 2013).

Las fuerzas locales generadas en células individuales mediada por la actividad contráctil del citoesqueleto de acto-miosina, son transmitidas a nivel supracelular por uniones célula-célula dependientes de cadherinas (Martin *et al.*, 2009; Rauzi *et al.*, 2010 Behrndt *et al.*, 2012; Heisenberg y Bellaiche, 2013, He *et al.*, 2014).

Tomando en cuenta que existen dramáticos cambios en la reorganización del citoesqueleto de acto-miosina durante la TEM y el papel que cumple la dinámica de estas estructuras macromoleculares en la generación de fuerzas durante la deformación epitelial y la homeostasis tisular, en este proyecto de tesis se plantea estudiar el papel de la dinámica del citoesqueleto de acto-miosina durante la TEM, utilizando como modelo biológico la formación del órgano de la lateralidad de pez cebra.

1.4 TEM de las células precursoras del órgano de la lateralidad

El primer órgano que se forma durante el desarrollo embrionario corresponde al órgano de la lateralidad, una estructura encargada de establecer el eje izquierda-derecha del embrión en desarrollo (Komatsu y Mishina, 2013). En pez cebra este órgano es llamado vesícula de Kupffer (VK) y se forma a partir de los progenitores del órgano de la lateralidad (POL) (Oteiza *et al.*,2008).

Los POL son un grupo pequeño de células situado en el margen dorsal del embrión de pez cebra en la gástrula temprana (Fig. 4A-C). En esta etapa, el embrión está formado por cuatro dominios celulares: (i) una gran célula vitelina compuesta por una capa sincicial de núcleos (CSV); (ii) la células de blastodermo embrionario profundo (BP), localizadas sobre la CSV; (iii) el epitelio envolvente superficial (EES), que cubre a las BP y está unido en su región marginal a la CSV (Fig. 4D); y iv) el dominio de los POL, localizado en el margen dorsal por delante del BP, debajo del EES y encima de la CSV (Fig. 4D)

Los POL se originan mediante un proceso de TEM durante el cual un subconjunto de células dorsales del EES se delaminan para dar origen a estas células precursoras (Fig. 4). Sin embargo, el mecanismo biomecánico mediante el cual estas células se delaminan no ha sido descrito.

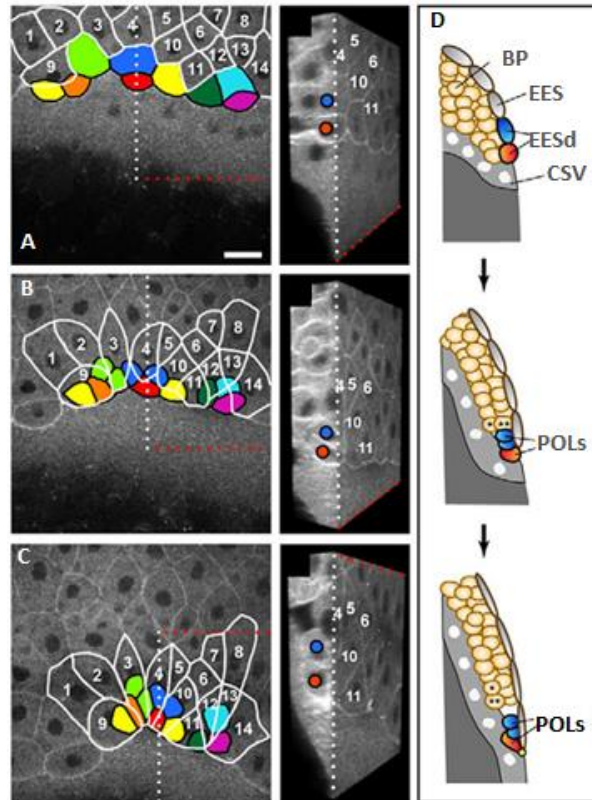


Figura 4. Origen de las células precursoras del órgano de la lateralidad en pez cebra. A) Vista dorsal de embrión en estadio de escudo, muestra la ubicación de los POL (en colores) en el margen dorsal del EES (delineado en blanco). **B)** y **C)** Secuencia temporal del proceso de delaminación de los POL para ubicarse debajo del EES, sobre el CSV, y delante del BP. **D)** Representación esquemática de la ubicación y el movimiento de los POL (en color) durante la gastrulación pez cebra (Modificado de Oteiza *et al.*,2008)

En estudios preliminares de nuestro laboratorio que utilizaron microscopía de inmunofluorescencia, se observaron acumulaciones de actina en la cara apical de los POL durante su delaminación del EES. Estas acumulaciones parecen aumentar en intensidad a medida que disminuía el área apical de los POL, evocando un proceso de contracción apical dependiente de acto-miosina. Asimismo, se observaron distintos tamaños del área apical de los POL, sugiriendo que la delaminación

ocurriría de manera asincrónica durante la TEM. Adicionalmente, se observó que la porción apical de los POL durante el proceso de delaminación parecen mantener una continuidad tisular con las células circundantes del EES, la cual podría ser mediado por uniones estrechas (Fig. 5A-C).

En resumen, el proceso descrito de delaminación de los POL parece fenocopiar los procesos de extrusión celular. Sin embargo, se observan algunas diferencias. Por un lado, las células epiteliales vecinas de aquellas destinadas a ser POL no muestran acumulaciones de acto-miosina sugiriendo que durante la TEM no existe apoyo contráctil del epitelio circundante para la delaminación de los POL. Por otro lado, el proceso de delaminación de los POL parece ser más lento comparado al de extrusión celular, demorando horas en vez de minutos, respectivamente. (Marinari et. al 2012).

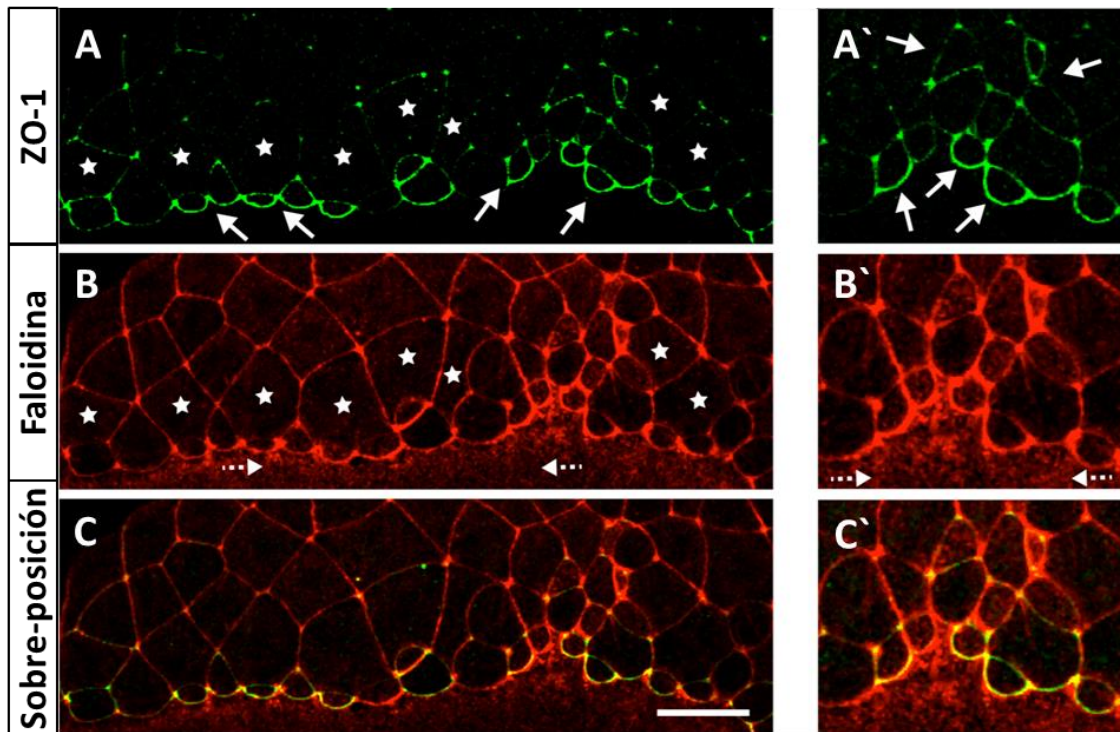


Figura 5: Los POL inicialmente forman parte del EES y son extruídas por un mecanismo dependiente de acto-miosina. A, A') Inmunohistoquímica para la visualización de uniones estrechas (ZO-1) y **B, B')** F-actina (faloidina). **C, C')** Superposición de las inmunotinciones de ZO-1 y F-actina. Se observa que el polo apical de los POL forman un continuo con el EES y acumulan F-actina (flechas). Las estrellas indican las células del EES. La barra de magnificación representa 50 μ m (Pulgar et al, resultados no publicados).

2. HIPÓTESIS

En base a los antecedentes presentados proponemos la siguiente hipótesis:

La delaminación de los precursores del órgano de lateralidad de pez cebra es mediada por un mecanismo de contracción apical asincrónico durante la transición epitelio mesénquima.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General.

Investigar el origen temporal y espacial por delaminación de los progenitores del órgano de la lateralidad en pez cebra y la dinámica contráctil del citoesqueleto de acto-miosina asociada, durante la transición epitelio mesénquima.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Determinar el origen temporal y espacial por delaminación de los POL en pez cebra.

3.2.2. Describir la dinámica contráctil del citoesqueleto de acto-miosina durante la delaminación de los POL en pez cebra.

4. RESULTADOS

4.1. Determinar el origen temporal y espacial por delaminación de los POL en pez cebra

En esta sección de la tesis se estudió el origen y la secuencia temporal del proceso de delaminación de los POL en pez cebra, desde el estadio de esfera (4 hpf) hasta el 75% de epibolía (8hpf). Para ello se utilizó microscopia *in vivo* de sábana de luz en embriones *Tg* (β *actin:Utrophin-mCherry*) inyectados con ARNm para *h2b-GFP*, para visualizar F-actina y el núcleo celular, seguido del procesamiento de imágenes, segmentación de membrana y seguimiento manual reverso de los POL (ver Materiales y Métodos). El análisis reveló que los POL se originan sólo de células del EES, no encontrándose POL provenientes del BP (Fig 6A). Se observaron cuatro tipos distintos de origen de los POL. El más frecuente, cerca del 50%, fue aquel en el cual la delaminación de una célula del EES da origen a un solo POL (Fig 6A tipo I). Este caso se observó durante todo el proceso de delaminación siendo más frecuente al inicio de este. Adicionalmente, se observaron casos en los cuales una célula del EES se divide previamente en el plano, para luego sus dos células hijas delaminarse para formar dos POL. Este segundo tipo se observó en el 28% de los casos analizados (Fig. 6A, tipo II). Un tercer tipo se observó cuando una célula del EES se divide previamente en el plano, y sólo una de las dos células hijas se delamina para dar origen a un POL, y corresponde a cerca del 7% de los casos analizados (Fig. 6A, tipo III). Los tipos II y III, fueron observados con mayor frecuencia en las etapas tempranas de la delaminación de los POL. Finalmente, se observó que durante el

proceso de delaminación de un POL, este puede dividirse para dar origen a dos POL (Fig. 6A, tipo IV). Este tipo de origen de POL va aumentando a medida que transcurre la epibolia.

Como segunda aproximación se determinó la distribución espacial de las células que dan origen a los POL. Se observó que aproximadamente un 60% de los POL provienen de las células marginales del EES, mientras que el 40% restante se origina de células submarginales. Las células submarginales del EES que dieron origen a los POL se localizaron hasta tres filas más arriba de las células marginales (Fig. 6B-C). No obstante, la mayoría de los POL submarginales, alrededor del 75%, provinieron de la primera fila. Además, se observó que en promedio ($n = 3$ embriones) las células ubicadas en la segunda y tercera fila submarginal correspondieron a aproximadamente un 17% y 8%, respectivamente. Sin embargo, estas no fueron encontradas en todos los embriones analizados (dato no mostrado). Finalmente, se observó que todos los casos de delaminación que daban origen a los POL ocurrieron sólo en la cara dorsal del embrión y se extendieron a lo largo del eje medio-lateral en una distancia de hasta 15 células (Fig. 6B).

El siguiente paso fue determinar la ritmicidad del proceso de delaminación que da origen a los POL, para poder describir (Fig. 7A). Para ello se realizó un seguimiento reverso manual y se consideró como el tiempo de inicio de la delaminación de un POL al primer tiempo donde se observa la acumulación de actina (aumento de intensidad de la señal) en la cara apical de estas células. Por otro lado, el tiempo final se estimó como aquel en el cual el área apical se reduce hasta formar un patrón denso puntual de actina (Fig. 7B). De acuerdo a estos parámetros, se observó un asincronismo temporal en la delaminación de los POL, tanto en su inicio,

duración y término (Fig. 7C). El análisis de un embrión único mostró diferencias temporales en el inicio de la delaminación entre POL de hasta 75 minutos. Considerando el tiempo de duración, se observaron diferencias notorias entre los POL, donde la célula más rápida demoró aproximadamente 10 minutos, mientras que la más lenta completó el proceso de delaminación en 110 minutos. Finalmente, el tiempo de término de la delaminación arrojó diferencias de hasta 130 minutos entre POL (Fig. 7C).

Por último, se estudió si existía alguna relación entre los tiempos de delaminación y la distribución espacial de las células de EES que dan origen a los POL. El análisis reveló que no existen diferencias en los tiempos de duración de la delaminación según la localización espacial de las células del EES (Fig. 7E). Asimismo, los tiempos de inicio (Fig.7D) y término (Fig.7F) de la delaminación tampoco mostraron diferencias con respecto a la localización espacial del EES. Sin embargo, se observó que en las células submarginales, los tiempos de inicio de la delaminación parecen agruparse en periodos más reducidos, presentando menos tiempos extremos, en comparación a lo que se observó en las células marginales.

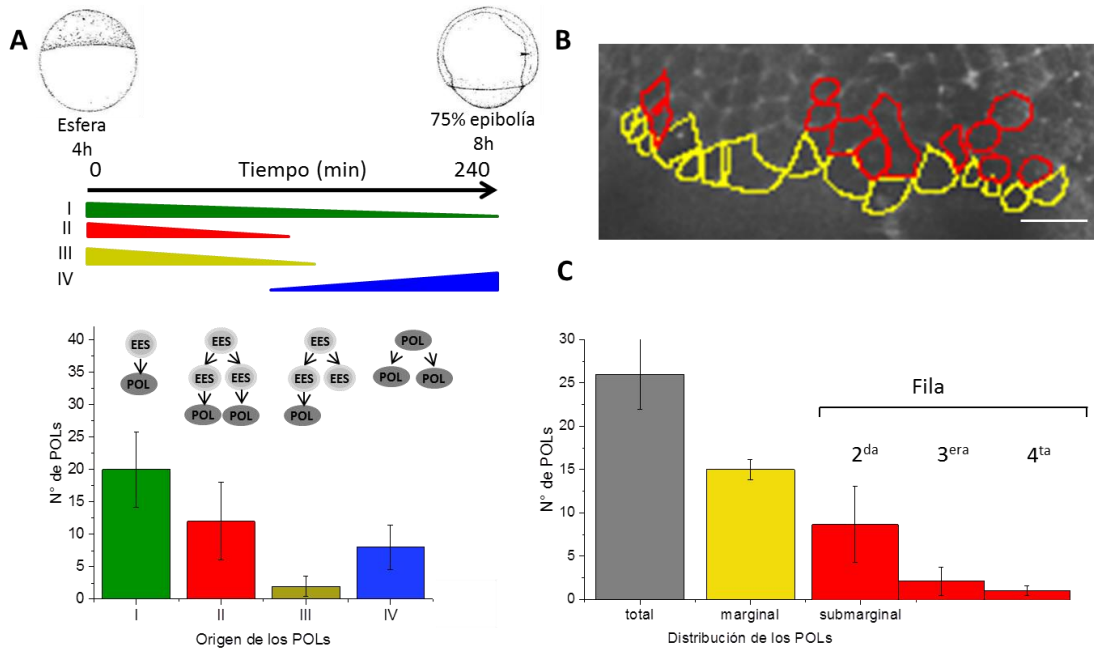


Figura 6: Origen temporal y espacial de los POL en pez cebra. A) Cuantificación y secuencia temporal de los tipos de eventos que dan origen a los POL. Tipo I, una célula EES da origen a un POL (verde). Tipo II, una célula EES se divide y da origen a dos POL (rojo). Tipo III, una célula EES se divide, y solo una de las células hija da origen a un POL mientras la otra se mantiene como EES (amarillo). Tipo IV, una célula POL se divide durante su delaminación para dar origen a dos células POL (azul). Estos eventos ocurren entre el tiempo 0 min (esfera) hasta 240 min (75% epibolia). Valores corresponden a media \pm DS (n = 3 embriones). **B)** Proyección plana de la vista dorsal de un embrión transgénico *Tg:(β -actin:Utrophin-mCherry)* en el estadio de esfera. En colores se ven dibujados los bordes de las células del EES que darán origen a los POL según su ubicación marginal (amarillo) o submarginal (azul) con respecto al margen del epitelio envolvente. Barra de magnificación = 30 μ m. **C)** Cuantificación del número de POL respecto de su ubicación respecto del borde del EES al inicio de su delaminación: marginal (amarilla) o submarginal (rojo). El número total de POL se indica en color gris. Valores corresponden a media \pm DS (n = 3 embriones).

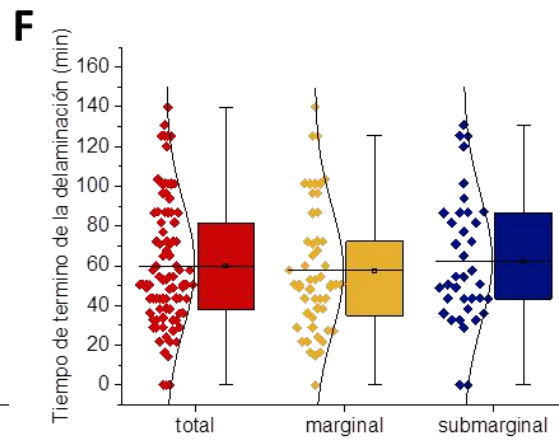
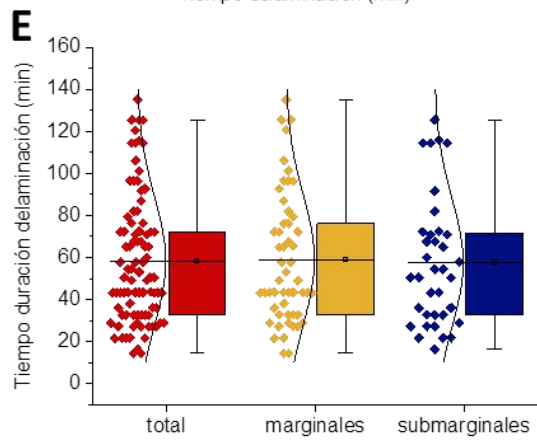
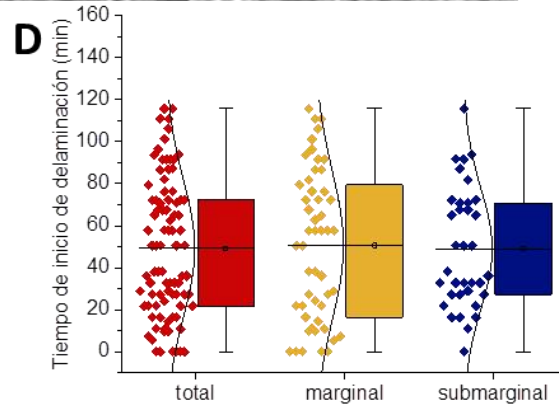
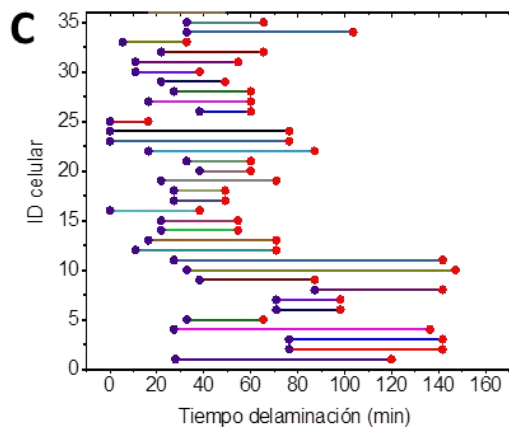
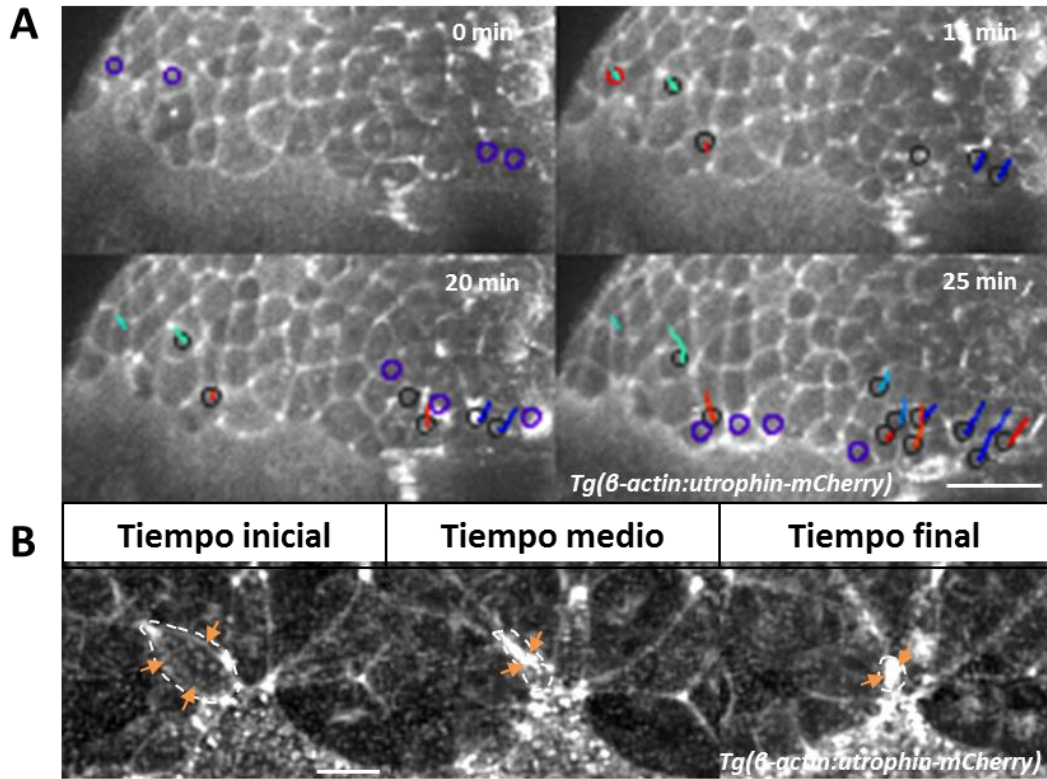


Figura 7: Ritmicidad en el origen de los POL. A) Vista dorsal de las proyecciones en el plano Z de un embrión *Tg:(β -actin *Utrophin-mCherry*)* obtenido por microscopía de sábana de luz. El inicio la delaminación de los POL (acumulación de actina en la cara apical) se muestra con círculos morados. Las líneas de colores muestran el seguimiento de las células, el término de la delaminación se muestra con círculos rojos. La barra de magnificación corresponde a 50 μ m. **B)** Ejemplo de la progresión del proceso de delaminación en una POL. Se indican los tiempos de inicio, medio y final, las flechas indican la acumulación de actina, las líneas punteadas indican los bordes de un POL. La barra de magnificación corresponde a 10 μ m. **C)** Gráfico que muestra la progresión temporal del proceso de delaminación en cada uno de los POL en un embrión (diferentes colores). El tiempo del inicio de la acumulación de actina en la cara apical de cada POL se indica con un punto morado. El tiempo en el cual el área apical de cada POL se reduce a un punto con alta intensidad de marcación de actina se indica con un punto rojo. Los datos corresponden a un embrión representativo, de un total de 3 analizados. **D-F)** Gráficos de caja con bigotes de los tiempos de inicio (D), duración (E) y término (F) de la delaminación del total de los POL (rojo) y relativo a su ubicación de origen con respecto al margen del EES (marginales en amarillo; submarginales en azul). t_i indica el comienzo de acumulación de actina en el área apical, $t_{1/2}$ indica el tiempo medio entre el inicio y fin de la acumulación de actina en el área apical y t_f indica el tiempo final que se definió como la reducción de área apical hasta quedar solo un punto de acumulación de actina. En cada uno de los gráficos, los valores individuales se representan con puntos, la caja delimita los datos ubicados entre el percentil 25 y 75, el promedio se indica con una línea horizontal mientras que las líneas verticales indican las DS ($n = 3$ embriones).

4.2 Describir la dinámica contráctil del citoesqueleto de acto-miosina durante la delaminación de los POL en pez cebra

Estudios no publicados de nuestro laboratorio demostraron, por inmunofluorescencia, la existencia de acumulaciones de actina en la cara apical de los POL durante su delaminación, lo que sugeriría una relación entre la disminución del área de la cara apical de los POL y la dinámica de acto-miosina (Fig. 5). Para estudiar esta relación en más detalle, se cuantificó el área apical de los POL y la intensidad apical de F-actina, realizando segmentación manual de imágenes obtenidas por microcopia de disco rotatorio de embriones transgénicos *Tg(β-actin::UTRN-mCherry)* (Fig. 8). El análisis mostró que existe una relación inversa entre la intensidad de F-actina y el área apical de los POL. Así, en promedio, la intensidad de F-actina aumenta en el tiempo a medida que el área apical disminuye (Fig 8E-F). Para analizar si ambas variables estaban correlacionadas se realizó un análisis de correlación (Fig. 8G), encontrándose una correlación de segundo orden de decaimiento exponencial con un valor del coeficiente $R^2 = 0,85$. Dos componentes fueron identificados. El primero acontece durante las etapas iniciales de la delaminación de los POL y muestra un rápido decaimiento del área apical (alrededor de un 80%) acoplado con un lento aumento de la intensidad de F-actina apical (mostrando un cambio del 40%). Un segundo componente, observado en las etapas finales de la delaminación, muestra un pausado decaimiento del área apical (cerca de un 20%) junto con un rápido aumento de la intensidad de la F-actina apical (60% de cambio).

Ya que se observó una fuerte correlación entre la dinámica de F-actina y el decaimiento del área apical de las POL, y que el componente contráctil que trabaja sobre la malla de actina es la miosina II no muscular (NM), se estudió su distribución y relación con la actina apical. Se realizó inmunofluorescencia contra GFP en embriones transgénicos *Tg(β -actin::Myo-GFP)* teñidos con faloidina, y se analizaron los resultados por microscopía de disco rotatorio a alta resolución espacial (Fig. 9). Se observó que la miosina II NM co-distribuye con F-actina en la cara apical de las células durante los distintos periodos de delaminación de los POL (Fig.9 A-C). Asimismo, se observó una relación entre el aumento de la intensidad de F-actina y el aumento de la intensidad de miosina II NM, los cuales estuvieron acoplados a una disminución del área apical de los POL (Fig.9 A-C). Adicionalmente, se detectó miosina II NM y F-actina en células del EES que no dan origen a los LOP, sin embargo, en estas células no se advirtieron variaciones en la intensidad de actina y miosina en el tiempo (dato no mostrado).

En forma interesante, los análisis de inmunofluorescencia revelaron distintos tipos de organización apical de acto-miosina, los cuales se relacionaron con los cambios en el tamaño del área apical de los POL (Fig. 9). Durante los periodos iniciales de delaminación, se observaron cúmulos de acto-miosina dispersos en un área apical extensa (Fig. 9A-A"). Seguidamente, se observó una malla de acto-miosina continua dentro de un área apical más pequeña, además de la presencia de una estructura cortical tipo anillo (Fig. 9B-B"). Finalmente, se detectaron grandes aglomeraciones de acto-miosina localizadas en pequeñas áreas apicales (Fig. 9C-C").

Para estudiar de manera detallada estas supra-estructuras de acto-miosina durante la delaminación de los POL, se utilizó microscopia *in vivo* de alta resolución espacio-temporal de disco rotatorio en embriones transgénicos *Tg(β-actin::Myo-GFP)*. Estos análisis *in vivo* revelaron la presencia de dos dominios de miosina. El primero se localizó medialmente en la cara apical de los POL, mostrando inicialmente una distribución de cúmulos discontinuos que confluye, junto con la disminución del área apical, para organizarse como una malla continua que se mantiene convergiendo, para formar densos agregados de miosina hacia el término de la delaminación de los POL (Fig. 10), del mismo modo a lo observado en los experimentos por inmunofluorescencia. Adicionalmente, se observó un segundo componente, observado en la membrana cortical apical de los POL formando una estructura de miosina tipo anillo (Fig. 10). Inicialmente, esta estructura se presentó con una intensidad débil y a veces discontinua en la membrana cortical, posteriormente a medida que el área apical comenzaba a disminuir, este anillo aumentó tanto su intensidad como continuidad para formar una densa estructura anular hacia el fin del proceso de delaminación de los POL (Fig. 10). Ambos dominios de miosina fueron detectados en una misma célula y con mayor frecuencia en las delaminaciones de las células del EES marginales y submarginales de primera fila (dato no mostrado).

El análisis de la dinámica de miosina a alta resolución temporal evidenció cuatro patrones durante la delaminación de los POL, nombrados en este trabajo como *dinámica medial*, *dinámica hacia el borde*, *dinámica cortical* y *cierre tipo cremallera* (Fig. 11). La *dinámica medial* se localizó en la zona media de la cara apical de los

POL, y corresponde al componente medial de miosina descrito previamente. Se observaron ciclos de formación pulsátil de pequeños grupos de miosina distribuidos en diversas regiones del área apical medial de los POL (Fig. 11A) El tiempo transcurrido entre la formación y desensamblaje de estas agrupaciones de miosina tuvo una duración en promedio de 2 minutos. La dinámica hacia el borde y la dinámica cortical parecen sustentar el componente anular de la actina cortical apical de los POL (Fig. 11B-C). La dinámica hacia el borde, tuvo una duración en promedio de alrededor de 5 minutos y corresponde al desplazamiento de miosina desde la zona medial hacia la cortical de los POL (Fig. 11C). La dinámica cortical de miosina, parece relacionarse con la fusión directa del componente de la miosina cortical, estas fusiones intra-corticales presentaron en promedio 8 minutos de duración (Fig. 11B). Estas dinámicas de miosina en su mayoría fueron observadas durante la delaminación de las células del EES marginal y submarginal de primera fila. Una cuarta dinámica, denominada cierre tipo cremallera reveló la movilización de parches de miosina, desde el área medial de los POL hacia un vértice de estas células. Luego del contacto con este vértice, las aglomeraciones de miosina se contrajeron para formar una estructura tipo cierre que selló las membranas contiguas de dos células del EES que no mostraron delaminación (Fig. 11D). Esta dinámica fue observada con mayor frecuencia en la cara apical de los POL provenientes del EES submarginal de segunda y tercera fila, los cuales normalmente se rodearon de células del EES que no mostraron delaminación (Fig. 11D).

Los resultados detallados anteriormente muestran una fuerte relación entre la actividad contráctil del citoesqueleto de acto-miosina y la disminución del área apical de los POL durante el periodo de delaminación celular. Para corroborar esto, se

estudió la activación del aparato contráctil de esta supra-estructura, realizando inmunofluorescencias doble contra miosina II NM fosforilada en la cadena liviana en serina 19 y contra miosina II NM total (Fig.12A-A``). Se observó miosina II NM fosforilada durante este proceso, lo cual indica que la miosina II NM se encuentra activa durante la delaminación de las POL, y apoya el argumento que la reducción del área apical de los POL es mediada por la contracción del citoesqueleto de acto-miosina.

Otra evidencia que apoya la idea que la actividad contráctil de acto-miosina es la responsable de la reducción del área apical de los POL emerge del comportamiento de los POL durante la división celular. Se observó que cuando los POL sufren eventos de división celular durante su delaminación, la acto-miosina desaparece de sus ápices con la consiguiente relajación de su área apical (Fig. 13A-B). Una vez terminado el proceso de división celular tras la citoquinesis, la miosina II NM se vuelve a acumular en la cara apical de las células POL hijas observándose una disminución rápida del área apical de estas células (Fig. 13C).

En resumen, las observaciones anteriormente expuestas sugieren que la delaminación de una célula del EES destinada a ser POL es mediada por la contracción apical del citoesqueleto de acto-miosina durante la TEM de estas células.

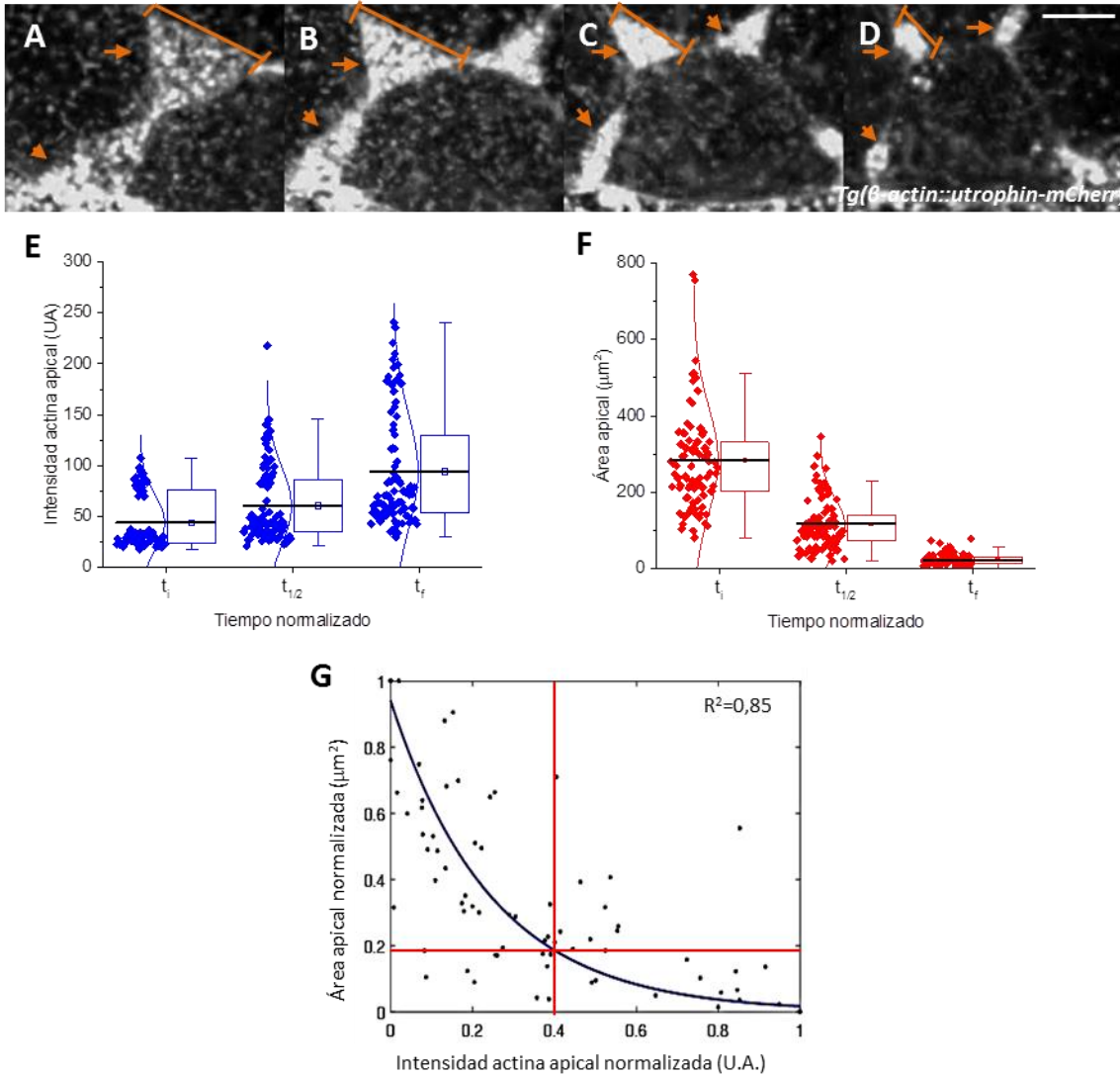


Figura 8: Dinámica del citoesqueleto de actina durante la delaminación de los POL. **A-D)** Serie temporal de la dinámica de F-actina en un embrión transgénico $Tg:(\beta\text{-actin } Utrophin\text{-mCherry})$. El área ocupada por la superficie apical de un POL está delimitada por un corchete, y las fechas naranjas indican la progresión de los cambios de intensidad de actina en la cara apical de los POL. La barra de magnificación corresponde a $10\mu\text{m}$. **E)** Gráfico de caja con bigote que muestra la disminución del área apical en el tiempo. **F)** Gráfico de caja con bigote que muestra el aumento de la intensidad media en el área apical en el tiempo. En E y F, t_i indica el comienzo de acumulación de actina en el área apical, $t_{1/2}$ indica el tiempo medio entre el inicio y fin de la acumulación de actina en el área apical y t_f indica el tiempo

final que se definió como la reducción de área apical hasta quedar solo un punto de acumulación de actina. En cada uno de los gráficos, los valores individuales se representan con puntos, la caja delimita los datos ubicados entre el percentil 25 y 75, el promedio se indica con una línea horizontal mientras que las líneas verticales indican las DS (n = 3 embriones). **G)** Gráfico de correlación entre el área apical e intensidad de actina. Los datos corresponden al total de POL de un embrión.

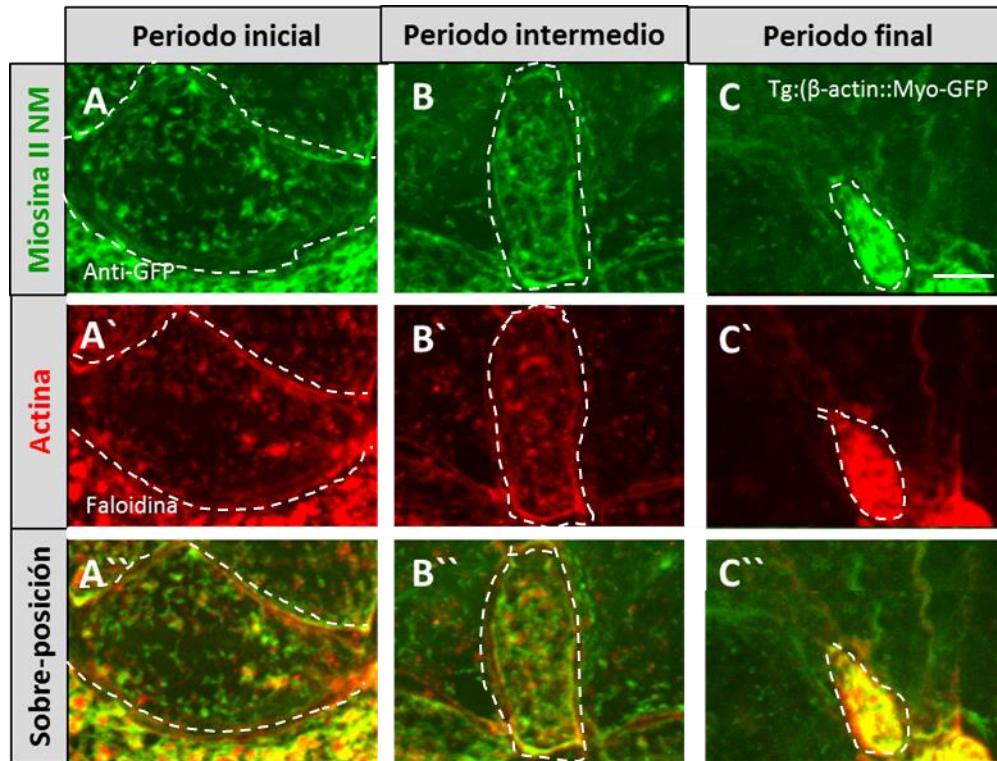


Figura 9: Co-distribución de miosina II NM con F-actina en la delaminación de los POL. Inmunofluorescencia contra GFP y tinción para F-actina (faloidina) en el margen dorsal de un embrión transgénico *Tg:(β -actin::Myo-GFP)*. Las imágenes de microscopía de disco giratorio muestran la cara apical de POL en diferentes etapas de delaminación, inicial (A, A', A''), intermedia (B, B', B'') y final (C, C', C''). La línea punteada indica el borde de los POL. La barra de magnificación corresponde a 10 μ m.

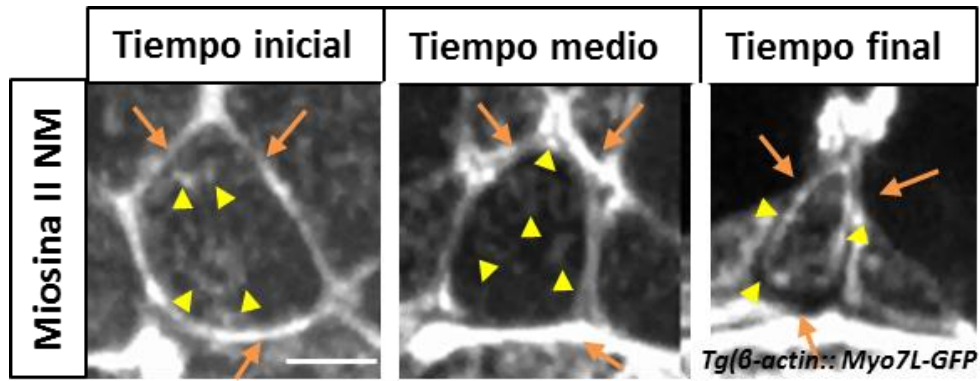


Figura 10: Dominios de miosina II NM *in vivo* durante la delaminación de un POL. Serie temporal de la dinámica de miosina II NM en un embrión transgénico *Tg(β-actin::Myo7L-GFP)* en los tiempos inicial (izquierda), intermedio (centro) y final (derecha) del proceso de delaminación. Las flechas naranjas indican acumulaciones de actina cortical en un POL y la posterior formación de un anillo cortical. Las cabezas de flecha amarillas indican la localización medial de miosina en la cara apical de los POL y la formación de la malla de miosina. La barra de magnificación corresponde a 10μm.

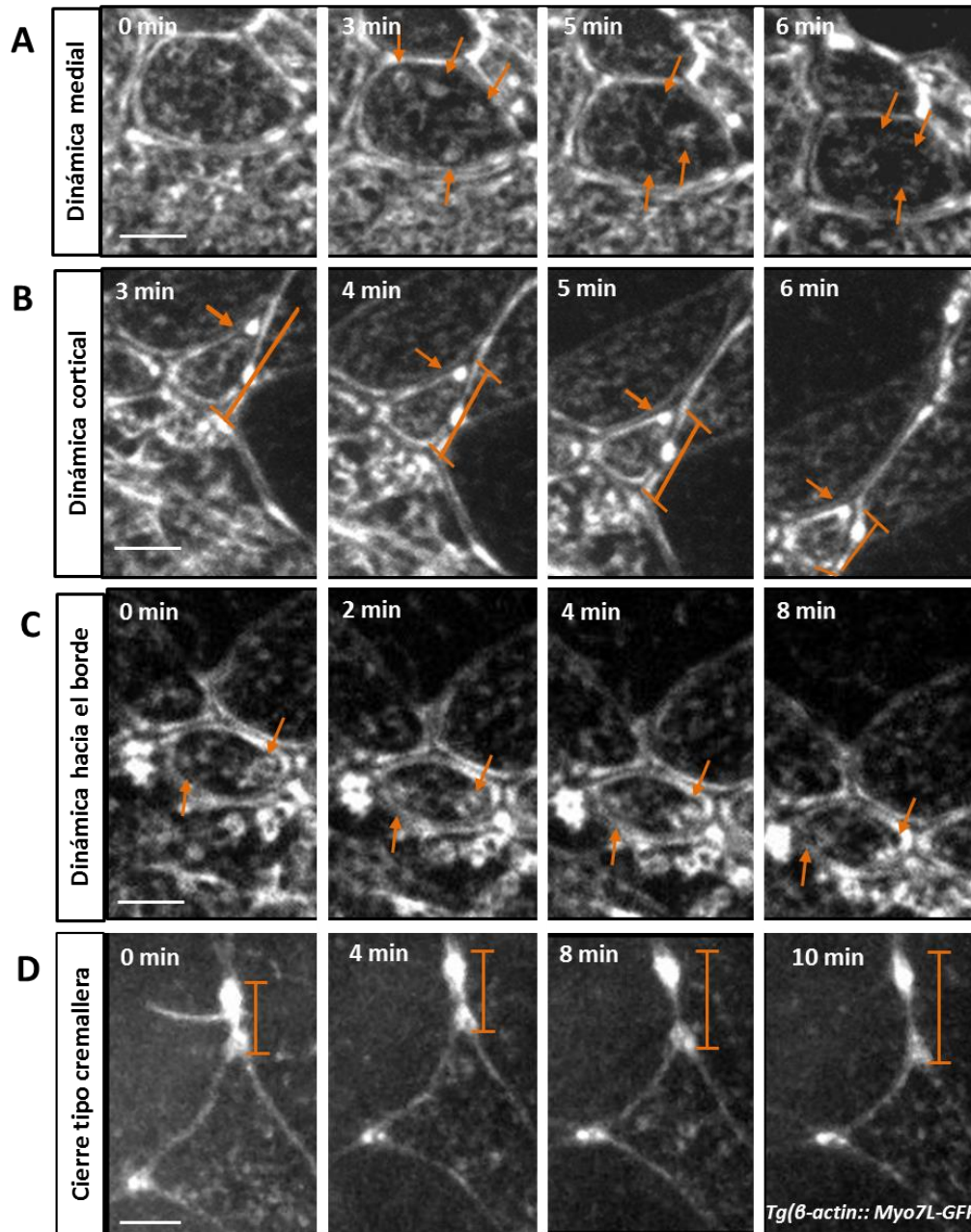


Figura 11: Patrones dinámicos *in vivo* de la miosina II NM durante la delaminación de los POL. Series temporales de microscopía de disco rotatorio mostrando la dinámica de miosina II NM en embriones transgénicos *Tg:(β-actin Myo7L-GFP)*. Se pueden observar cuatro patrones distintivos de miosina denominados como dinámica medial (A), dinámica hacia el borde (B), dinámica cortical (C) y cierre tipo cremallera (D). Las flechas naranjas indican acumulaciones de actina en la cara apical de un POL (A y C). Los corchetes indican el área ocupada por la superficie apical de un POL (B) y la progresión del cierre tipo cremallera (D).

Los resultados corresponden a un embrión representativo de 4 embriones analizados. Las barras de magnificación corresponden a 10 μ m.

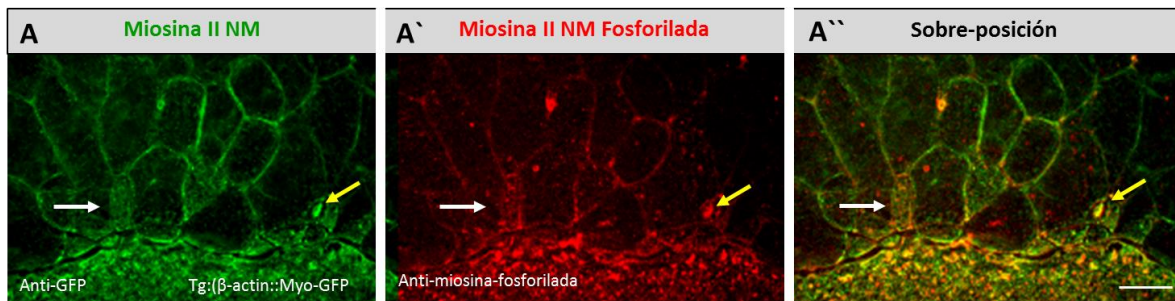


Figura 12: Miosina II NM activa durante la delaminación de los POL. Inmunofluorescencia indirecta doble contra GFP (revelando miosina II NM total en verde) y miosina fosforilada en serina 19 de la cadena liviana (revelando miosina activa en rojo), y la sobreposición de ambas imágenes (derecha, amarillo) en una vista dorsal de un embrión transgénico *Tg:(β -actin::Myo-GFP)*, en el estadio de Shield. Las flechas indican la acumulación de miosina II NM activa en la cara apical de dos POL. La barra de magnificación corresponde a 20 μ m.

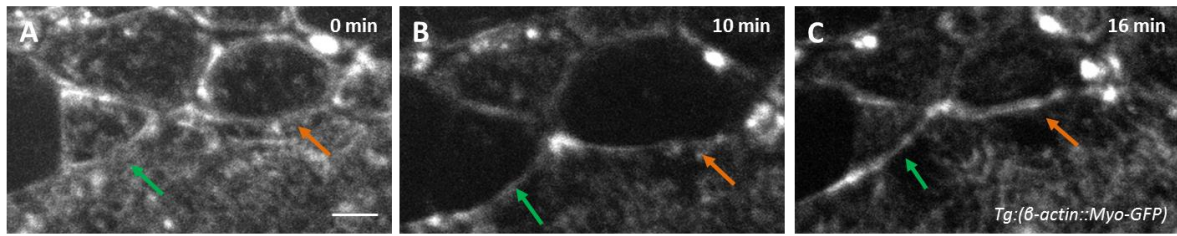


Figura 13: Actividad contráctil de la miosina II NM apical de los POL durante un evento de división celular. Serie temporal de la actividad contráctil de miosina II NM en los POL en el contexto de una división celular, en un embrión transgénico *Tg:(β -actin Myo7L-GFP)*. Las flechas verde y naranja apuntan a dos POL que experimentan división celular no planar y pierden en forma transciente la acumulación de actina en la cara apical con el consecuente incremento de su área apical (panel B). La barra de magnificación corresponde a 10 μ m.

5. DISCUSIÓN

Desde las primeras etapas del desarrollo embrionario, las células de origen mesenquimático y epitelial contribuyen a la formación, estructura y función de los órganos en desarrollo (Shook *et al.*, 2003). Se ha visto que tanto durante el desarrollo embrionario como en el cáncer, las conversiones celulares entre estados mesenquimáticos y epiteliales son altamente dinámicas, y se denominan Transición Mesénquima Epitelio (TME) y Transición Epitelio Mesénquima (TEM). El proceso denominado TEM ha sido estudiado en muchos epitelios, entregando información de los cambios fenotípicos que experimentan las células (referirse a sección 1.1). Sin embargo el papel dinámico que cumple el citoesqueleto de acto-miosina no ha sido estudiado en profundidad en este proceso. Esta tesis abordó esta problemática estudiando el proceso de TEM que sufren los POL al delaminarse del EES dorsal durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

Los resultados encontrados en esta tesis muestran que la delaminación de los POL ocurre de manera asincrónica en relación al inicio, término y duración del proceso, y que involucra a células del EES dorsal mayoritariamente localizadas en el márgen del epitelio, a través de la participación contráctil del citoesqueleto de acto-miosina. Este último, se reorganiza para formar estructuras dinámicas que participarían en la generación de las fuerzas implicadas en la delaminación de los POL.

5.1 Nodal y el proceso de delaminación de los POL

Estudios previos demostraron que el mecanismo de delaminación de los POL es mediado por la cascada de señalización de Nodal / TGF β (Oteiza *et al.*, 2008), sin embargo, los mecanismos bio-mecánicos que dirigen esta internalización aún permanecen sin resolver. Este trabajo reveló que la mayoría de los POL proviene de las células del margen del EES dorsal, en contraste con aquellas localizadas en posiciones submarginales de este epitelio. Esto es consistente con la mayor expresión de *nodal* presente en el margen del blastodermo (Rebagliati *et al.*, 1998), y sugiere que la inducción del proceso de delaminación de los POL requiere de altos niveles de señalización Nodal. Estudios previos han demostrado Nodal puede actuar como morfógeno y generar distintas respuestas dependiendo de su concentración, induciendo diferentes tejidos, lo que sería consecuencia de gradientes de difusión de los ligandos (Dougan *et al.*, 2003). La activación de la vía de señalización Nodal en los POL podría provenir de ligandos secretados por las células del blastodermo profundo, los cuales podrían difundir hacia las células del EES teniendo un efecto paracrino. Un mecanismo alternativo sería que las células del EES lleven la señalización desde su programación inicial y que se iniciara la liberación del ligando por medio de una activación externa, siempre independiente a la de la célula vitelina (Fan *et al.*, 2007). La presencia de un mayor número de POL provenientes del margen dorsal del embrión podría responder a que, en esa zona hay una mayor concentración del ligando, la que disminuiría hacia las filas superiores del EES más alejadas del margen del epitelio. Por otro lado, se ha demostrado que la actividad de

la vía Nodal se regula por retroalimentación positiva y negativa, donde la expresión del agonista se necesita para que se exprese el antagonista, el cual difunde de manera mucho más rápida que los agonistas. De esta forma, la difusión de algún antagonista de la vía Nodal podría estar inhibiendo la repuesta a Nodal de las células de EES localizadas en posiciones más lejanas del margen en periodos posteriores. Estudios futuros deberán abordar en forma directa la forma en que Nodal actúa para inducir el proceso de delaminación de los POL.

5.2 Tensión y asincronismo en la delaminación de los POL

El alargamiento de la banda germinal en *Drosophila* se produce a través del reordenamiento de células polarizadas impulsado por la contractibilidad del citoesqueleto de acto-miosina. En este proceso se ha demostrado que el aumento de tensión en el tejido circundante genera el reclutamiento de miosina II NM cortical de las células (Fernández-González *et al.*, 2009). La delaminación de los primeras POL podría generar un aumento en la tensión del tejido circundante, lo que actuaría como semilla para el reclutamiento de miosina II NM de otras células del EES, permitiéndoles responder dinámicamente a los cambios mecánicos de su entorno, de manera similar a lo que ocurre en *Drosophila*. Sin embargo, esta inducción se vería limitada por la capacidad de tensión que pueda soportar el EES, gatillando la delaminación de células, lo que liberaría la tensión circundante, que le permitiría iniciar nuevamente el proceso. El resultado de esta dinámica podría explicar el asincronismo observado en el proceso de delaminación.

Durante la TEM de los POL existe una actividad contráctil del citoesqueleto de acto-miosina que se correlaciona con la disminución del área apical de estas células. Como se mencionó anteriormente, el aumento de tensión en las células EES vecinas podría estar ayudando al reclutamiento de miosina II NM en la cara apical. Esto corresponde a un fenómeno de mecanotransducción que podría ocurrir por diferentes vías. Se ha demostrado que el aumento de tensión influye en la expresión de genes reguladores de miosina II NM (Desprat *et al.*, 2008), pero debido al rápido reclutamiento de miosina que se observa en la cara medial es probable que sea independiente de transcripción. Además, se ha descrito que la vía Nodal independiente de factores de transcripción de tipo Smad juega un papel importante en la regulación de la dinámica de actina durante la motilidad celular en el endodermo de pez cebra. En este caso, se demostró que la actividad de Rac1 puede ser activada tanto a través de una vía dependiente como independiente de transcripción (Woo *et al.*, 2012). Es así como los POL podrían sentir el aumento de tensión e iniciar el proceso de señalización independiente de cambios en factores de transcripción (Kardassis *et al.*, 2009).

5.3 Distintas dinámicas contráctiles de acto-miosina se asocian a la delaminación de los POL

Las acumulaciones de miosina II NM en la cara apical de los POL presentan diferentes dinámicas asociadas a la disminución del área apical. Se observó que la actividad contráctil temprana corresponde a flujos mediales en la cara apical, la cual se mantiene en etapas tardías, acompañada de un enriquecimiento de la acto-

miosina cortical, que a su vez parece enriquecerse por flujos mediales dirigidos al borde. Sumado a esto, se determinó que en etapas tempranas de la delaminación la disminución del área apical es más rápida, sin embargo, la intensidad de acto-miosina es mucho mayor durante las etapas finales. Esta dinámica sugiere que los componentes de acto-miosina podrían participar de forma distinta en estos periodos. Durante las etapas tempranas, sería el flujo medial el que podría producir la disminución del área apical actuando como componente contráctil. En etapas tardías, el aumento de intensidad se podría relacionar con la dinámica cortical, la que en este caso podría contribuir como un estabilizador de la reducción del área apical, más que como un componente contráctil. Esta dinámica explicaría la disminución más rápida del área apical en etapas tempranas y una disminución lenta en etapas finales de la TEM de los POL. Por otro lado, en los POL submarginales rodeados de células del EES se observó una acumulación de acto-miosina medial en los vértices, que se relaciona con un sellado tipo cremallera durante la delaminación de los POL.

Este cierre tipo cremallera ha sido descrito en el cierre dorsal de *Drosophila* y en el sellado de las heridas. En *Drosophila*, el cierre dorsal consiste en el sellado de un intersticio de la epidermis del embrión. El sellado se lleva a cabo mediante la coordinación de varios mecanismos de generación de fuerzas, la contracción de la amnioserosa, el anillo de acto-miosina de la epidermis y la actividad protrusiva de las células, ya que se trata de una estructura supra-celular. (Hayes et. al., 2016). En el caso de los POL no se observan diferentes mecanismos de generación de fuerzas en este sellado, posiblemente porque se trata del sellado del área de una sola célula. En este caso se presentan acumulaciones de miosina II NM en los bordes, que podrían generar las fuerzas suficientes y transmitir las a las células del EES circundante,

desencadenado el sellado tipo cremallera a través de uniones estrechas o adhesiones celulares, sin necesidad de fuerzas adicionales.

La distribución de miosina II NM y F-actina presenta diferentes formas dependiendo del área apical de la célula. En tiempos iniciales se observaron mallas dispersas de acto-miosina, sin embargo para que esta malla realice la actividad contráctil es necesario que la actina y miosina se encuentren unidas. Este contacto podría ser a través de pequeñas estructuras de miosina intermedias, las cuales realizarían la unión entre dos actinas distantes. Por otro lado, estas mallas dispersas podrían conformar redes a través de la unión a otros componentes del citoesqueleto como α y β catenina, además de vinculina. Cuando el área de los POL se comienza a reducir se observan mallas de miosina que se co-distribuyen con la actina, lo cual le permitiría generar una contracción sostenida (Coravos *et al.*, 2017). Cuando el área apical de los POL se reduce casi en su totalidad es difícil diferenciar alguna estructura, ya que se observa una aglomeración de acto-miosina que antecede a la delaminación.

Durante la división celular no planar de los POL se observó una pérdida de miosina II NM en la cara apical que se relaciona con un aumento de su área. En este caso, la miosina II NM sería requerida en el surco de segmentación citoquinética para mantener la simetría de las dos células hijas durante la división celular (Coravos *et al.*, 2017). Esto facilitaría el aumento del área apical por ausencia de miosina en esta zona. Luego de la división celular, la miosina II NM se re-localiza en la cara apical de los POL lo que podría sugerir que como una célula hija sale del plano y la otra se mantiene, la miosina sería necesaria para continuar el proceso de delaminación, retornando desde el surco de segmentación posterior a la división y

observándose una disminución del área apical de estas células. Esta observación demuestra que la contracción apical en la delaminación de los POL durante la TEM es mediada por la contracción del citoesqueleto de acto-miosina ubicado en la cara apical de las células.

5.4 Transmisión de fuerzas y uniones célula-célula durante la delaminación de los POL

El proceso de TEM de los POL es asincrónico y mediado por el citoesqueleto de acto-miosina, sin embargo no está claro cómo se transmiten las fuerzas generadas por el citoesqueleto a las células vecinas. La transmisión de fuerzas a través de uniones intercelulares se atribuye tradicionalmente a uniones adherentes, que proporcionan una conexión física entre las proteínas del citoesqueleto de acto-miosina y las proteínas transmembrana de la superfamilia de cadherina. Nuestro laboratorio ha demostrado, por inmunofluorescencia indirecta, el aumento de ZO-1 en la cara apical de los POL durante su delaminación. Este hallazgo demuestra que estas células permanecen unidas al EES a través de uniones estrechas. Adicionalmente, la pérdida de cadherina en los POL no produce alteraciones de su delaminación, y se muestra un aumento normal de ZO-1 durante este proceso (datos no mostrados). La presencia de ZO-1 sugiere que la transmisión de fuerzas generadas por la contracción del citoesqueleto de acto-miosina hacia las células vecinas en los POL podría ser mediada por uniones de tipo estrecha.

Los eventos celulares observados durante la delaminación de los POL muestran semejanzas con el proceso de extrusión (referirse a sección 1.2), aunque presentan

algunas diferencias importantes. Por una lado, las células delaminadas no están destinadas a morir sino más bien a dar origen a un nuevo tipo celular por TEM (Yapeng *et al.*, 2012). Por otro lado, en el proceso de delaminación de los POL no se observa la acumulación local de acto-miosina en las células EES vecinas, lo cual podría estar relacionado con el tiempo que demora una célula POL en delaminarse. Se ha estudiado el tiempo de delaminación en otras especies como es el caso de *Drosophila* (Marinari *et al.*, 2012), demostrándose que una célula epitelial tarda en extruirse minutos. Sin embargo, en el caso de una POL esta tarda cerca de cuatro horas, posiblemente por la ausencia de actividad contráctil de las células vecinas.

Durante la TEM ocurre una variación del balance de fuerzas adhesivas a través de un intercambio de E-cadherina por N-cadherina, lo que facilita la delaminación de las células. Sin embargo en la TEM de los POL, se ha observado que la función de E-cadherina y N-cadherina parecen no seguir este patrón. E-cadherina es necesaria para la convergencia del grupo de los POL, manteniendo uniones POL-POL, mientras que N-cadherina sería necesaria para la polarización y formación de la vesícula epitelial ciliada en etapas tardías y no tiene efecto en la TEM ni en la convergencia (datos no mostrados). Por otro lado, se ha visto que en ausencia de E-cadherina la delaminación de los POL unidos al EES ocurre de manera normal, lo que podría deberse a la presencia de ZO-1 en estas uniones, indicando que E-cadherina no sería necesaria para la TEM de los POL.

6. CONCLUSIÓN

Los resultados de esta tesis indican que: i) los POL se originan de las células del EES dorsal, marginal y submarginal; ii) la delaminación de los POL es asincrónica con respecto al inicio, duración y término de la misma; iii) la disminución del área apical de los POL se correlaciona con el aumento de intensidad de actina; iv) existen cuatro dinámicas de acto-miosina en el área apical de los POL: medial, hacia el borde, cortical y de cierre tipo cremallera; v) la delaminación de una célula del EES destinada a ser POL sería mediada por la contracción apical del citoesqueleto de acto-miosina durante la TEM.

Estos resultados sugieren un mecanismo de contracción autónomo en la cara apical de los POL, el cual dirige la delaminación asincrónica de estas células progenitoras. Este trabajo muestra, por primera vez, cómo operan los flujos de acto-miosina en los procesos de TEM y sugiere un mecanismo de delaminación por el cual se impediría el aumento de la resistencia del tejido circundante, disminuyendo el estrés mecánico de la contracción apical de los POL. En el futuro, sería interesante investigar cómo las reorganizaciones y diferentes dinámicas del citoesqueleto de acto-miosina generarían fuerzas a ser transmitidas en los POL y si, en efecto, estas son independientes de cadherinas.

En resumen, esta tesis sugiere que la delaminación asincrónica de los POL durante la TEM es mediada por la actividad contráctil del citoesqueleto de acto-miosina apical.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Líneas de Pez cebra

Ejemplares adultos de pez cebra (*Danio rerio*) se mantuvieron en el bioterio del ICBM de la Universidad de Chile, siguiendo los protocolos internacionalmente aceptados para el cuidado de los animales de laboratorio, con la aprobación del comité de bioética sobre investigación en animales, certificado CBA 0746 FMUCH. Se utilizaron las siguientes líneas de peces: tipo salvaje TAB, y transgénicos *Tg* (β *actin:Utrophin-mCherry*) y *Tg* (β *actin:Myo7L-GFP*). Las líneas transgénicas se utilizaron para visualizar la dinámica del citoesqueleto de acto-miosina *in vivo*. Los embriones se obtuvieron por desove natural de acuerdo a procedimientos estandarizados (Westerfield 2000), y se cultivaron a 28 °C en medio E3 (5mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,33mM CaCl₂ y 0,33mM MgSO₄ x 7H₂O), con ciclos de 14 horas luz y 10 horas oscuridad. El estadio del desarrollo se determinó de acuerdo a morfología y edad (horas post-fertilización, hpf) según Kimmel *et al.*, 1995.

7.2 Inyecciones de ARNm

Se inyectó ARNm de *h2b-GFP* en embriones de peces *Tg* (β *actin:Utrophin-mCherry*) con el fin de marcar los núcleos celulares y realizar el posterior seguimiento de los POL bajo fluorescencia. La micro-inyección de ARNm se realizó en embriones de estadio de 1 célula utilizando una micropipeta de vidrio acoplada a un micro manipulador y al equipo IM-300 Cell Microinjector (Narishige Instrument

Inc.) que funciona generando pulsos de gas nitrógeno. Para monitorear la inyección se utilizó una lupa de baja magnificación (Nikon). Los embriones se posicionaron en una placa petri plástica utilizando un porta objeto como cuña para ordenarlos formando una línea antes de ser inyectados. La cantidad de ARNm de *h2b-GFP* inyectada por embrión fue de 100pg.

El ARNm de *h2b-GFP* se generó por transcripción *in vitro* utilizando el sistema comercial mMessage mMachine™ de Ambion®. Se mezclaron 1 µg de DNA molde lineal con 2 µl de la solución de reacción 10X para la RNA polimerasa correspondiente (SP6), 10 µl de la mezcla de ribonucleótidos 2X (ATP, CTP y UTP 10 mM, GTP 2 mM y un análogo de cap 8 mM), 2 µl de la RNA polimerasa correspondiente y H2O libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 µl. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 2h. Luego se agregó 1 µl de DNasa1 2U/µl libre de RNasas y se incubó a 37°C por 15 min. Posteriormente se recuperó el RNA sintético por precipitación alcohólica, para lo cual se agregó 15 µl de NaAc 3M pH 5,2 y 115 µL de H2O libre de nucleasas, se mezcló y se adicionaron 150 µl de fenol:cloroformo (1:1) pH 4,5 y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min a 4°C y se recuperó la fase acuosa superior, la cual fue transferida a un nuevo tubo de 1,5 ml y se agregó 150 µl de cloroformo y se repetía la extracción en las mismas condiciones. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó 170 µl de isopropanol. Se mezcló homogéneamente y se incubó a -20°C durante 1 h o a -80°C por 15 min, se centrifugó a 10.000 x g durante 30 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se agregó 500 µl de etanol 80% v/v preparado en H2O nanopura, se mezclaron y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones por 10 min. Se eliminó la solución alcohólica y

se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 min. Finalmente el ARNm fue resuspendido en 20 μ l de H₂O libre de nucleasas y se almacenó a -20°C o -80°C.

7.3 Inmunofluorescencia

Los embriones fueron fijados en 4% paraformaldehído toda la noche a 4°C, luego lavados en PBS-Tritón 0.5% (PBT) y decorionados manualmente. Posteriormente, fueron lavados 4 veces por 15 minutos en PBT, seguido de 4 horas de bloqueo en solución de bloqueo (10% suero de cabra y 1% DMSO en PBT). Luego fueron incubados toda la noche en solución de bloqueo conteniendo los anticuerpos primarios. Al día siguiente, los embriones fueron lavados en PBT e incubados con los anticuerpos secundarios. Los anticuerpos primarios usados fueron anti-GFP (1:1000, MAB3580 *Chemicom Millipore*) y anti-Miosina-fosforilada (1:50, 3671 *Cell Signaling*). Los anticuerpos secundarios usados fueron anti-ratón Alexa 488 (1:200, A11001 *Invitrogen*) y anti-conejo Alexa 647 (1:200, A21244 *Invitrogen*). Además se usó Alexa Fluor 568 Phalloidin (1/200, A12380 *Life Technologies*) para marcar F-actina. Al finalizar el procedimiento, los embriones fueron montados en discos de montaje conteniendo 1% de agarosa en PBS. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio invertido Zeiss Axiovert 200, usando un objetivo 63X W/NA 1.2.

7.4 Microscopía in vivo y análisis de imágenes

Los embriones fueron decorionados manualmente, montados en agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Sigma) y mantenidos a 28°C. Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio spinning disk conformado por una unidad confocal de disco rotatorio PerkinElmer modelo Ultraview asociada a un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200, usando un objetivo 63X W/NA 1.2. Para la microscopía de fluorescencia de sábanas de luz, los embriones fueron decorionados manualmente, montados en agarosa de bajo punto de fusión al 0.8% (Sigma) en tubos FEP y mantenidos a 28°C, usando un objetivo de 10X. Para sustraer el ruido de fondo y así aumentar su definición, las imágenes se deconvolucionaron utilizando el programa Huygens Scripting (Scientific Volume Imaging BV, www.svi.nl, Hilversum, Holanda).

Para el procesamiento de imágenes obtenidas por microscopía de sábanas de luz utilizamos pairwise Stitching-ImageJ (Preibisch *et al.*, 2009), ya que la obtención de imágenes se realiza a través de dos objetivos de iluminación y dos objetivos de detección, así la iluminación paralela al plano de detección se alterna entre ambos objetivos, obteniéndose dos imágenes por plano, una correspondiente al lado derecho y la otra al lado izquierdo. Mediante pairwise Stitching-ImageJ se realiza el pagado de imágenes (derecha e izquierda) a través de un barrido de una imagen sobre otra y se calcula la correlación de cada uno de los barridos. El que obtenga mayor correlación es el que se selecciona. Además, para la zona de solapamiento se utilizó la función "blending" con el fin de ponderar las intensidades de las imágenes.

Para realizar el seguimiento manual de los POL se utilizó MaMuT (<http://imagej.net/MaMuT>) (Wolff *et al.*, 2017) el cual unifica BigDataViewer y

TrackMate, lo que permite la visualización de grandes volúmenes de datos (su formato se basa en xml y hdf5), por esto es que antes de utilizar MaMuT, se convierten las imágenes desde el formato ".tif" a los formatos xml y hdf5, utilizando el plugin Multiview Reconstruction-ImageJ. El seguimiento celular se realizó de manera reversa. En éste, se comienza con el último tiempo de grabación donde se identifican los núcleos de las células que se delaminaron. Posteriormente, se siguen los núcleos en cada tiempo hasta llegar al primero, de esta forma se asegura que se siguió solamente a los POL. Finalmente, se utilizan las imágenes de membrana y las trayectorias obtenidas por los núcleos para formar la imagen compuesta.

7.5 Análisis de datos y estadística

Los análisis estadísticos se efectuaron con el programa estadístico Origin 8 (OriginLab). Para analizar si los datos obtenidos seguían una distribución Normal, se realizó la prueba de Normalidad según Shapiro-Wilk y según Kolmogorov-Smirnof. Para evaluar si existían diferencias significativas entre las poblaciones analizadas se realizó la prueba de t-student con un nivel de significancia de 0,05.

8. REFERENCIAS

Aegerter-Wilmsen, T., Smith, A.C., Christen, A.J., Aegerter, C.M., Hafen, E., and Basler, K. (2010) Exploring the effects of mechanical feedback on epithelial topology. *Development.* ; 137: 499–506

Achilleos A, Trainor PA. (2012) Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res* 22(2):288- 304.

Amack, J. D. and Yost, H. J. (2004) 'The T box transcription factor no tail in ciliated cells controls zebrafish left-right asymmetry', *Current biology* 14(8): 685-90.

Aybar MJ, Glavic A, Mayor R. (2002) Extracellular signals, cell interactions and transcription factors involved in the induction of the neural crest cells. *Biol Res*;35(2):267-75.

Behrndt M., G. Salbreux, P. Campinho, R. Hauschild, F. Oswald, J. Roensch, S.W. Grill, C.P. Heisenberg (2012), Forces driving epithelial spreading in zebrafish gastrulation. *Science*, 338: 257–260.

Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. (2007) Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*;185: 7–19.

Coravos JS, Mason FM, Martin AC. (2017) Actomyosin Pulsing in Tissue Integrity Maintenance during Morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 276-283.

Crane JF, Trainor PA. (2006) Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol. Annual Reviews*; 22:267-86.

Desprat, W. Supatto, P. Pouille, E. Beaurepaire, E. Farge (2008) Tissue deformation modulates twist expression to determine anterior midgut differentiation in *Drosophila* embryos *Dev. Cell*, 15: 470-477

Dougan ST, Warga RM, Kane DA, Schier AF, Talbot WS (2003) The role of the zebrafish nodal-related genes *squint* and *cyclops* in patterning of mesendoderm. *Development*. 130(9):1837-51.

Fan X, Hagos EG, Xu B, Sias C, Kawakami K, Burdine RD, Dougan ST (2007) Nodal signals mediate interactions between the extra-embryonic and embryonic tissues in zebrafish. *Dev Biol.* ;310(2):363-78.

Fernandez-Gonzalez R, .Sérgio de Matos Simoes. Jens-Christian Röper..Suzanne Eaton. Jennifer A. Zallen. (2009)Myosin II Dynamics Are Regulated by Tension in Intercalating Cells *Dev. cell* 5;736-743

Gonzalez David M., Damian Medici, (2014), Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition, *Sci. Signal.* Vol. 7, Issue 344, pp. re8.

Guillot, C. and Lecuit, T. (2013) Adhesion disengagement uncouples intrinsic and extrinsic forces to drive cytokinesis in epithelial tissues. *Dev. Cell.* 2013; 24: 227–241

Hay ED.(2005) The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn*;233(3):706–20.

Hayes P, Solon J (2017) *Drosophila* dorsal closure: An orchestra of forces to zip shut the embryo. *Mech Dev*;144:2-10

Heisenberg CP, Bellaïche Y (2013) Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell* 153(5):948-62.

Huang X, Saint-Jeannet J-P(2004) Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Dev Biol*;275(1):1- 11.

Humbert PO, Grzeschik NA, Brumby AM, Galea R, Elsum I, Richardson HE (2008) Control of tumourigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene* 27(55):6888-907.

Kalluri R, Neilson EG,(2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest*; 112: 1776-1784.

Kalluri R, Weinberg R, (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition *J. Clin. Invest*; 119: 1420-1428.

Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, (2003) Significant Association of Rho/ROCK Pathway with Invasion and Metastasis of Bladder Cancer. *Clin Cancer Res*;9(7):2632-41.

Kardassis D., Murphy C., Fotsis T., Moustakas A., Stournaras C. 2009. Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases. *FEBS J.* 276:2947–2965

Kimmel CB, Halpern ME, Thisse C, Ho RK, Thisse B, Riggleman B, Trevarrow B, Weinberg ES, Postlethwait JH. (1995) Cell-autonomous shift from axial to paraxial mesodermal development in zebrafish floating head mutants.

Development. 1995 Dec;121(12):4257-64.

Komatsu Y1, Mishina Y. (2013) Establishment of left-right asymmetry in vertebrate development: the node in mouse embryos. *Cell Mol Life Sci.*70(24):4659-66.

Kon S, Ishibashi K, Katoh H, Kitamoto S, Shirai T, Tanaka S, Kajita M, Ishikawa S, Yamauchi H, Yako Y, Kamasaki T, Matsumoto T, Watanabe H, Egami R, Sasaki A,

Nishikawa A, Kameda I, Maruyama T, Narumi R, Morita T, Sasaki Y, Enoki , Honma S, Imamura H, Oshima M7, Soga T, Miyazaki JI, Duchen MR, Nam JM, Onodera Y, Yoshioka S, Kikuta J, Ishii M, Imajo M, Nishida Fujioka Y, Ohba Y, Sato T, Fujita Y. (2017) Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nat Cell Biol.* 530-541.

Knecht A.K., Bronner-Fraser M. (2002) Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat. Rev. Genet*;3:453–461.

Marinari, E., Mehonic, A., Curran, S., Gale, J., Duke, Y. and Baum, B (2012). Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding, *Nature* 484(7395): 542-545

Martin, AC., M. Gelbart, R. Fernandez-Gonzalez, M. Kaschube, E.F. Wieschaus, (2010) Integration of contractile forces during tissue invagination *J. Cell Biol.*, 188: 735–749.

Martin Adam C, and Bob Goldstein, (2014) Apical constriction: themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis. *Development* 141: 1987-1998.

Mayer, M., Depken, M., Bois, J.S., Jülicher, F., and Grill, S.W, (2010), Anisotropies in cortical tension reveal the physical basis of polarizing cortical flows. *Nature*; 467: 617–621.

Mercado-Pimentel ME, Runyan RB. (2007) Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Cells Tissues Organs*;185: 146–56

Micalizzi D, Farabaugh S, Ford H, (2010) Eoithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 117-134.

Moustakas A, Heldin CH. (2016) Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *J clin Med* 5(7).

Nieto M.A. (2002) The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*;3:155–166.

Oteiza P, Köppen, M. Concha, M. L. and Heisenberg, C.-P. (2008) 'Origin and shaping of the laterality organ in zebrafish.', *Development* (Cambridge, England) 135(16): 2807-2813.

Preibisch S., S. Saalfeld, P. Tomancak (2009) Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions", *Bioinformatics*, 25(11):1463-1465.

Rauzi M., P.F. Lenne, T. Lecuit (2010), Planar polarized actomyosin contractile flows control epithelial junction remodelling, *Nature*, 468:1110–1114.

Rebagliati MR, Toyama R, Fricke C, Haffter P, Dawid IB.(1998) Zebrafish nodal-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Dev Biol*;199(2):261-72.

Roh-Johnson M., G. Shemer, C.D. Higgins, J.H. McClellan, A.D. Werts, U.S. Tulu, L. Gao, E. Betzig, D.P. Kiehart, B. Goldstein (2012), Triggering a cell shape change by exploiting preexisting actomyosin contractions *Science*, 335: 1232–1235.

Rosenblatt J, Raff MC, Cramer LP (2001), An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism, *Curr Biol.* (23):1847-57.

Scarpa E, Szabó A, Bibonne A, Theveneau E, Parsons M, Mayor R, (2015) Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Forces. *Dev Cell*. 34(4):421-34.

Shook D, Keller R. (2003) Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev*. 1351–83.

Schmidt A, Hall MN. (1998) Signaling to the actin cytoskeleton. *Annual Rev Cell Dev Biol* ;14:305-38.

Schwayer C, Sikora M, Slováková J, Kardos R, Heisenberg CP.(2016) Actin Rings of Power. *Dev Cell*.;37(6):493-506.

Scott F. Gilbert and Michael J. F. Barresi (2016), *Developmental Biology*, Elevent Edition.

Stegmaier J, Amat F, Lemon WC, McDole K, Wan Y, Teodoro G, Mikut R, Keller PJ. (2016) Real-Time Three-Dimensional Cell Segmentation in Large-Scale Microscopy Data of Developing Embryos *Dev Cell*. 36(2):225-40.

Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.

Whiteman EL, Liu C-J, Fearon ER, Margolis B. (2008) The transcription factor snail represses *Crumbs3* expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene*27(27):3875-9.

Woo S, Housley MP, Weiner OD, Stainier DY (2012) Nodal signaling regulates endodermal cell motility and actin dynamics via Rac1 and Prex1. *J Cell Biol*;198(5):941-52

Wolff, C.; Tinevez, JY. & Pietzsch, T. *et al.* (2017), "Reconstruction of cell lineages and behaviors underlying arthropod limb outgrowth with multi-view light-sheet imaging and tracking.", bioRxiv.

Yapeng, G. and Rosenblatt, J. (2012) New emerging roles for epithelial cell extrusion, *Curr Opin Cell Biol* 23(4):856-870