

UCH-FC  
MAG-B  
R 459  
C. 1



**Diseño de una estrategia de marcaje  
genético de células individuales en  
pez cebra**

**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Nicole Reynaert Godefroy**

**Director de Tesis:**

**Dr. Miguel Luis Allende Connelly**

**Santiago, 2014**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGISTER**

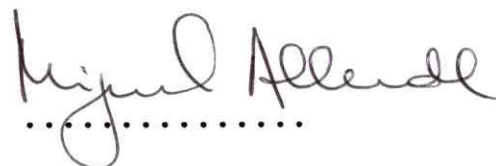
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

**Nicole Reynaert Godefroy**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 20 de Enero, 2014.

Director de Tesis:

Dr. Miguel Luis Allende Connelly .....

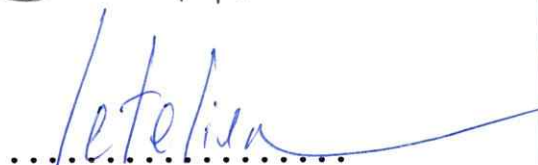


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. María Rosa Bono Merino .....



Dr. Juan Carlos Letelier Parga .....



When you sail across the ocean waters, and you reach the other  
side safely,

Could you smile a little smile for me? 'cause I'll be thinking  
about you...

## BIOGRAFIA



Ingresé al programa de Magister en Ciencias Biológicas de la Universidad de Chile porque simplemente mi tesis de pregrado no había sido suficiente. Estaba tan maravillada con el pez cebra como modelo animal de investigación que decidí continuar mis estudios con este increíble ser. Admito que el tiempo se me pasó volando y fue una experiencia muy enriquecedora. Por esta razón me encuentro infinitamente agradecida con todos los que me acompañaron en esta aventura y que sobre todo la hicieron posible y grandiosa. En los 2 años que duró la tesis crecí como persona y aprendí varias lecciones. Aprendí a ser independiente y a tomar decisiones importantes por mí misma. Aprendí a caer y a volver a pararme con la frente en alto. Aprendí que el esfuerzo y cuidado que uno dedica a su trabajo tiene buenas recompensas al final del camino a pesar de que las cosas no funcionen como estaba planificado. Aprendí que la clave del éxito está en ser capaz de ver el vaso medio lleno. Aprendí la importancia de tomar distancia ante un problema para poder verlo claramente. Aprendí a ser flexible y paciente. En resumen, esta experiencia no sólo me enseñó técnicas de biología molecular y microscopía, sino un sinnúmero de nuevas lecciones de vida. Y como si fuera poco, además esta tesis trajo a mi vida un grupo de personas maravillosas que permanecerán siempre en mi corazón.

## AGRADECIMIENTOS

A Big Fish por guiarme sabiamente y por creer en mí. Gracias por ayudarme a cumplir mis sueños.

A Jochen y Lázaro por recibirme en Heidelberg como a una más de su familia.

A Floro por su cariño y notable sentido del humor.

A Juanito y Don Víctor por cuidar de nuestro ambiente de trabajo y nuestros regalones, los peces.

A Mario y Elvis por su ayuda molecular.

A Salome de las Nieves por ser mi ángel guardián, mi mejor amiga, mi hermana, mi salomini, mi parabiota y mi amor platónico.

A Pedro Hernández y Tomas Egaña por sacar a pasear a mis peces.

A Shahad, Katha y Silvi por ser las mejores.

A Janina, Eva, Isa y Tinatiny por su apoyo, consejos y especialmente por su amistad.

A Alessio por cederme espacio en el vivero y un sinfín de risas.

A mi hermanito corazón, Bryan, por encender la chispa que desencadeno en este incendio llamado "mi tesis de magister".

A mi familia por ser mis mayores fans.

A Cristian por darme el empujón que necesitaba para completar esta etapa.

A Ariel por ser el mejor roomie.

A Nolambar por acompañarme en esta travesía.

A Nami y Sona por supportearme.

## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
Desarrollo de una herramienta molecular para el seguimiento de células individuales <i>in vivo</i>	1
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>7</b>
Materiales.....	7
Material biológico.....	7
Material de plástico y vidrio .....	7
Reactivos.....	8
Medios de cultivo .....	9
Equipos .....	9
Programas.....	10
Métodos.....	10
Generación de una herramienta de marcaje genético de células individuales de forma ubigua .....	11
Generación de una herramienta de marcaje genético de células individuales del sistema inmune innato.....	13
Microinyección de vectores en embriones de pez cebra .....	20
Análisis de expresión transitoria.....	21
Búsqueda de peces fundadores.....	21
Evaluación de la recombinación inducida por estrés térmico .....	22
Evaluación de la recombinación inducida por tamoxifeno .....	22
Trasplantes de células entre líneas transgénicas del sistema inmune innato .....	23
Electroablación de neuromastos y nervio periférico para evaluar la respuesta inmune innata .....	24
Microinyección de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en embriones de pez cebra.....	25
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
Generación de una herramienta de marcaje genético de células individuales de forma ubigua .....	26
Sc(Ubi:BBW).....	26
Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP) .....	28
Evaluación de la recombinación inducida por estrés térmico .....	29

Generación de una herramienta de marcaje genético de células individuales del sistema inmune innato .....	33
Sc(Mpx:BBW) .....	33
Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP) .....	37
Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP) .....	39
Sc(Mpx-MCS cmlc2:EGFP) .....	41
T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP) .....	42
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
Generación de una herramienta de marcaje genético de células individuales .....	45
Inducción de recombinación del vector Sc(Ubi:BBW) por estrés térmico .....	46
Generación de una herramienta genética de marcaje individual del sistema inmune innato .....	47
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>53</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>56</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Microinyección de Sc(Ubi:BBW) .....	27
<b>Tabla 2.</b> Microinyección de Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP).....	28
<b>Tabla 3.</b> Microinyección de Sc(Mpx:BBW).....	34
<b>Tabla 4.</b> Microinyección de Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP) .....	38
<b>Tabla 5.</b> Microinyección de Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP).....	40
<b>Tabla 6.</b> Resumen de peces fundadores.....	56



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del sistema Brainbow/Cre-LoxP .....	5
Figura 2. Esquema del vector Sc(Ubi:BBW) .....	13
Figura 3. Esquema del vector Sc(Mpx:BBW) .....	15
Figura 4. Digestión del clon 5 y 16 Sc(Ubi:BBW) con EcoRI, Paul y XhoI .....	26
Figura 5. Larva Sc(Ubi:BBW) de la generación F1 de 3 dpf.....	27
Figura 6. Larva silvestre (WT) y hermano transgénico para el vector Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP) de 3 dpf.....	29
Figura 7. Expresión de proteínas fluorescentes como producto de la recombinación azarosa del <i>cassette Brainbow</i> por la recombinasa Cre .....	30
Figura 8. Recombinación ubicua en la cabeza de una larva Sc(Ubi:BBW) <sup>+</sup> /Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP) <sup>+</sup> de 4 dpf.....	31
Figura 9. Recombinación ubicua en el tronco de una larva Sc(Ubi:BBW) <sup>+</sup> /Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP) <sup>+</sup> de 4 dpf.....	31
Figura 10. Recombinación ubicua en la cola de una larva Sc(Ubi:BBW) <sup>+</sup> /Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP) <sup>+</sup> de 4 dpf.....	32
Figura 11. Digestión de Sc(Mpx:BBW) con EcoRI y HindIII .....	33
Figura 12. Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 3 dpf.....	35
Figura 13. Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 3 dpf.....	35
Figura 14. Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 3 dpf.....	36
Figura 15. Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 3 dpf.....	36
Figura 16. Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 5 dpf.....	36
Figura 17. Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 5 dpf.....	37
Figura 18. Digestión de Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP) con EcoRI .....	38
Figura 19. Digestión de Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP) con HindIII.....	40
Figura 20. Digestión de Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP) con XhoI .....	40
Figura 21. Larva T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP) de la generación F1 de 2 dpf .....	43
Figura 22. Larvas T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP) de la generación F1 de 3 dpf.....	43
Figura 23. Antes y después de la axotomía en una misma larva de 3 dpf Mpx:GFP <sup>+</sup> /Nrd:GFP <sup>+</sup> ..	60
Figura 24. Larva de 3 dpf microinyectada con <i>C. reinhardtii</i> .....	63
Figura 25. Larva control Mpo:GFP de 3 dpf.....	64
Figura 26. Larva de 3dp Mpo:GFP microinyectada con <i>C. reinhardtii</i> .....	64

## LISTA DE VIDEOS

- Video 1.** Células GFP<sup>+</sup> recombinadas circulan en el torrente sanguíneo de larvas Sc(Ubi:BBW)<sup>+</sup>/Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP)<sup>+</sup>.
- Video 2.** Respuesta inmune innata luego de la electroablación de un único neuromasto.
- Video 3.** Respuesta inmune innata luego de la electroablación de dos neuromastos consecutivos.
- Video 4.** Trayectorias de migración de neutrófilos durante la respuesta inmune innata luego de la electroablación de dos neuromastos consecutivos.
- Video 5.** Respuesta inmune innata luego de la electroablación de un nervio periférico.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
BBW	<i>Brainbow</i>
Dpf	Días post fertilización
Dpi	Días post inyección
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Hfp	Horas post fertilización
Kb	Kilobase
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MM	Marcador de peso molecular
Nls	<i>Nuclear localization signal</i>
PAMPs	<i>Patogen associated molecular patterns</i>
Pb	Pares de base
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
Rpm	Revoluciones por minuto
Sc	I-SceI
TCH	Tejido caudal hematopoyético
T2	Tol2
WT	<i>Wild type</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

## RESUMEN

El seguimiento de células individuales en un organismo multicelular ha sido difícil hasta ahora por la carencia de las herramientas apropiadas. En el sistema inmune, no ha sido posible hasta ahora examinar a nivel individual el destino de células como los neutrófilos que participan en los procesos inflamatorios y de resolución de la inflamación. Una forma de enfrentar este problema es mediante el marcaje genético y permanente de las células de interés para poder distinguir las durante y después de los eventos en que participan. Como primer paso en esta dirección, en esta tesis se estableció en pez cebra el sistema de recombinación Cre/LoxP y el *cassette* de proteínas fluorescentes llamado *Brainbow* para marcar células con combinaciones únicas de colores para cada célula *in vivo*. Se generaron numerosos vectores con estos elementos en diferentes configuraciones y promotores y se probaron de manera transitoria inyectándolos en embriones de pez cebra. Finalmente, se logró generar diversas líneas transgénicas en las que se evaluó la capacidad de obtener células marcadas por recombinación. La combinación de dos de estas líneas transgénicas produjo la expresión de las distintas proteínas fluorescentes en embriones y larvas, demostrando que es una potente herramienta para el seguimiento *in vivo* de células individuales inequívocamente de forma controlada en el tiempo. En estos peces, se identificaron diversos tipos celulares marcados incluyendo epidermis, neuronas, pigmentos, músculos y células de la sangre.

## ABSTRACT

Tracking individual cells in a multicellular organism has been difficult so far by the lack of appropriate tools. In the immune system, it has not been possible until now to examine the fate of individual cells such as neutrophils involved in inflammation and its resolution. One way to address this problem is through the genetic and permanent label of the cells of interest in order to distinguish them during and after the events in which they participate. As a first step in this direction, in this thesis the recombination system Cre /LoxP and the Brainbow strategy were established in zebrafish to label cells with unique color combinations for each cell *in vivo*. Numerous constructs were generated with these elements in different configurations and promoters and tested transiently by injecting them into zebrafish embryos. Finally, we were able to generate several transgenic lines in which the ability to obtain labeled cells was assessed through recombination assays. The combination of two of these transgenic lines produced the expression of different fluorescent proteins in embryos and larvae, showing that it is a powerful tool for the *in vivo* monitoring of individual cells in a controlled manner unequivocally in time. In such fish, various cell types including epidermis, neurons, pigments, muscles and blood cells were identified.

## INTRODUCCIÓN

### **Desarrollo de una herramienta molecular para el seguimiento de células individuales *in vivo***

El desarrollo de tratamientos efectivos para enfermedades inflamatorias, como la aterosclerosis y artritis, requiere de un detallado conocimiento del sistema inmune. Si bien se han logrado grandes avances en este campo, existen aspectos aún desconocidos en cuanto a las señales moleculares que reciben las células inmunes así como las respuestas que ejecutan estas células individualmente para modificar su comportamiento. En detrimento de un mayor avance en este sentido, está la dificultad de hacer observaciones sin intervención y en tiempo real de las células durante los eventos claves de la respuesta inmune. Uno de los fenómenos de mayor interés en la inmunología actual, es entender cómo ocurre la inflamación y cuáles son las causas del descontrol en este proceso.

La función del sistema inmune es proteger al organismo contra daño, estrés celular o la presencia de microorganismos. La inflamación, se caracteriza por el rápido reclutamiento de células inmunes innatas a la zona de daño o infección. Los protagonistas de este proceso son los macrófagos y neutrófilos, los que eliminan restos celulares y agentes infecciosos. Sin embargo, con el fin de recuperar la funcionalidad de los tejidos dañados y así mantener la salud del organismo, la inflamación debe eventualmente disminuir en intensidad y finalmente cesar mediante un proceso denominado resolución. Durante este proceso las células inmunes abandonan la zona afectada, dando paso al restablecimiento de la homeostasis tisular. Se conoce que esto puede ocurrir por la recircularización sistémica de las células inmunes o por apoptosis de ellas, seguida de su fagocitosis por parte de macrófagos derivados de monocitos. Sin embargo, el fenómeno se ha descrito principalmente desde una perspectiva poblacional

(cuantificación de células residentes, infiltrantes o circulantes) y no se considera la conducta de células individuales, su linaje o su destino, ya que no es posible distinguirlas entre sí.

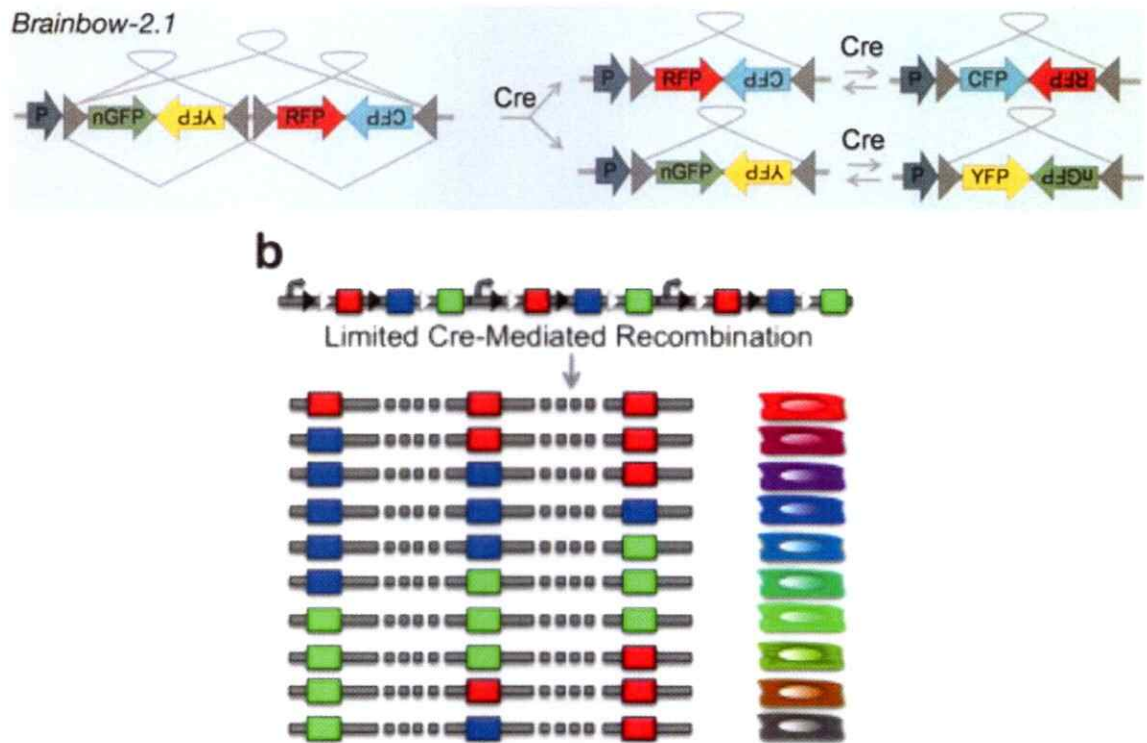
En el pez cebra, se ha podido seguir células *in vivo* gracias a su transparencia óptica en estadios embrionarios y larvales y a las herramientas de transgénesis existentes, las que han permitido dirigir la expresión de proteínas fluorescentes en poblaciones celulares específicas. La captura de imágenes en tiempo extendido (*time lapse*) de larvas transgénicas sometidas a procesos de daño e inflamación han permitido seguir en el tiempo a las células inmunes, pero esta aproximación está limitada por la capacidad de distinguir a las células unas de otras y de reconocer los patrones de migración y comportamientos a largo plazo de cada una de ellas. Esta es una de las pocas especies de vertebrados donde es posible reconstruir en cuatro dimensiones (4D) un proceso de desarrollo, morfogenético o fisiológico que involucre conductas celulares medibles mediante microscopía (división celular, crecimiento axonal, migración, muerte celular, etc.). Con secuencias de ADN regulatorias específicas de determinados linajes es posible estudiar procesos biológicos trascendentales del organismo a nivel poblacional durante el desarrollo, la respuesta inmune y la regeneración. Sin embargo, el conocimiento sobre el comportamiento y destino celular a nivel de células individuales es más refractario al análisis. Existen algunas opciones para resolver esta limitación. Es posible generar mosaicos genéticos en pez cebra mediante la expresión de transgenes integrados en estadios tardíos del desarrollo. La inserción al azar de ADN exógeno que ha sido inyectado en el cigoto ocurre sólo en algunas células de la blástula o gástrula, lo que genera expresión del gen reportero en forma de mosaico (en un subconjunto de las células que normalmente activan el promotor usado y que han integrado o heredado el transgen). El inconveniente de esta metodología radica en que no es reproducible ya que todos los individuos inyectados con la

construcción de ADN serán distintos entre sí y es necesario buscar (a veces con bajas probabilidades) aquellos que expresen el reportero en el lugar y tiempo deseados. Otra alternativa similar es la técnica de trasplantes de blastómeros entre embriones de distinto fondo genético, como lo sería la incorporación de células de un animal que exprese el reportero de manera ubicua o tejido específica en un hospedero silvestre. La integración al azar de estas células embrionarias transgénicas en el hospedero generan un individuo mosaico que expresará el reportero en una o en pocas células dentro de un fondo silvestre no-transgénico (y que por ende, no expresa el reportero). Al igual que la técnica descrita previamente, esta metodología conduce a muy bajas tasas de éxito debido al bajo número de individuos que manifiestan las características de marca específica deseada. Además, es una metodología técnicamente compleja y poco reproducible. La tercera alternativa disponible consiste en usar la reconstrucción digital en 4D de un embrión cuyas células se encuentran todas marcadas con una proteína fluorescente nuclear (Keller y cols. 2008). La marca nuclear permite hacer una correcta segmentación (la separación por resolución óptica e informática de las células individuales de un embrión) y el uso de microscopía "light sheet" (LSM) para documentar en tiempo extendido el movimiento y destino de todas las células. Este procedimiento presenta la limitación importante de requerir un microscopio LSM de alta resolución y de recursos bioinformáticos de alta complejidad (para procesar el embrión digital reportado por Keller y cols. en el 2008, se requirió usar íntegramente el *cluster* del Centro Bioinformático Europeo de Hinxton, UK, por 7 días consecutivos). Además, esta técnica es viable, por el momento, sólo en embriones de pez cebra de hasta 48 horas post fecundación (hpf), lo que impide su uso en eventos de desarrollo tardíos o que involucren al sistema inmune, que se diferencia después de esta etapa.

En otros organismos, se ha resuelto el problema de los mosaicos genéticos con elegantes estrategias de recombinación controlada de ADN genómico. Es el caso de *Drosophila melanogaster*, donde además de disponer de innumerables herramientas de transgénesis y de expresión controlada de transgenes, existe la recombinación inducible por recombinasas procariotas como Flp y Cre. Con esta metodología, es posible tener tejidos o territorios de células donde algunas de ellas sufren una recombinación irreversible en su genoma que redundará en un cambio genético heredado a todas las células hijas. Combinado con sistemas que reflejan la recombinación mediante la expresión de un gen reportero (usualmente, GFP), es posible hacer un seguimiento y comparación de las células marcadas en el tiempo con facilidad. Claramente, en un organismo como el pez cebra, se hace necesario contar con este tipo de estrategia. El sistema de recombinación Cre-LoxP y el sistema Flp han sido probados con éxito en esta especie, al igual que lo ha sido en ratón (Livet y cols. 2007, Pan y cols. 2011, Weissman y cols. 2011). En el modelo murino además, se ha usado el sistema Cre-LoxP para realizar estudios de linaje y conectividad neuronal en tejidos complejos como el cerebro. Por ejemplo, la recombinación al azar de transgenes que permitan la expresión de GFP en mosaico, permite evaluar el *pedigree* o destino de células troncales neurales y permite seguir axones y dendritas provenientes de una neurona única en el cerebro. Hace algunos años, se diversificó esta técnica, incluyendo una serie secuencial de tres o hasta cuatro proteínas fluorescentes codificadas en un solo transgen, flanqueada cada secuencia codificante por secuencias LoxP (los blancos de la recombinasa Cre) (figura 1). Dado que la recombinasa combina los sitios LoxP al azar, es posible obtener la expresión de cualquiera de las proteínas fluorescentes en una célula. Si a esto sumamos la posibilidad de tener múltiples transgenes de este tipo en cada célula, cada inserción sufriendo recombinaciones distintas por el azar, se genera una



combinación de colores casi única en cada evento. Esto permite la identificación de muchas células simultáneamente de manera inequívoca en un tejido u órgano. A este sistema se le llamó *Brainbow*, por haber sido usado por primera vez en el cerebro y por generar un verdadero arcoíris de colores en el tejido.



**Figura 1. Esquema del sistema Brainbow/Cre-LoxP.** Adaptado de Weissman y cols. 2011 y de Gupta y Poss, 2012. Las flechas grises y negras, respectivamente, corresponden a los sitios LoxP.

En este trabajo de tesis, se generaron dos líneas transgénicas de pez cebra. Por un lado, una línea transgénica que expresa la recombinasa Cre y por otro, una que posee el *cassette Brainbow*. Como se mencionó, la combinación de estas líneas es una herramienta que posibilita el seguimiento de células únicas en el organismo íntegro a lo largo del tiempo sin la necesidad de sacar a las células de su contexto, ni de fijar el tejido, es decir, en un contexto realmente *in vivo*.

Propusimos originalmente en esta tesis, abordar el problema con estrategias que nos permitieran realizar marcaciones específicas en células individuales del sistema inmune y realizar seguimientos en el tiempo. Desarrollamos una serie de vectores específicos para el sistema inmune basados en el sistema *Brainbow*/Cre-LoxP. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que el promotor usado, del gen mieloperoxidasa, no confirió expresión específica.

**Hipótesis:** Mediante el uso del sistema de recombinación del *cassette Brainbow*, es posible generar una herramienta genética de marcaje *in vivo* de células individuales en pez cebra, incluyendo células del sistema inmune innato.

**Objetivo general:** Generar una herramienta de marcaje genético de células individuales de forma ubicua y/o específica del sistema inmune innato.

**Objetivos específicos:**

1. Construcción de vectores que expresen el *cassette Brainbow* y la recombinasa Cre usando promotores ubicuos y tejido-específicos.
2. Microinyección de los vectores en embriones de pez cebra.
3. Búsqueda de individuos fundadores de las líneas transgénicas generadas por la microinyección de los vectores construidos.
4. Evaluación de recombinación del *cassette Brainbow* inducida tanto por estrés térmico como por tamoxifeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

#### Material biológico

Como modelo animal de estudio se utilizó el pez cebra (*Danio rerio*). Para la obtención de embriones se cruzaron peces adultos, cuyas condiciones de mantención fueron las estándar (Nüsslein-Volhard & Dahm, 2002): un ciclo de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad, 28°C, con circulación de agua y aire constantes, pH de 7-7,3, conductividad de 400-600  $\mu$ S y una dieta alimenticia basada en *Artemia salina* suplementada con hojuelas Tetra.

Las líneas transgénicas utilizadas en el desarrollo de esta tesis son las siguientes:

- BACmpx:GFP (Renshaw y cols. 2006) expresa GFP en neutrófilos.
- LysC:GFP (Hall y cols. 2007) expresa DsRed en neutrófilos y macrófagos.
- Cxcr4b:RFP (Gamba y cols. 2010) expresa RFP en la línea lateral posterior.
- Brn3c:mGFP (Xiao y cols. 2005) expresa GFP en células ciliadas.
- Mpx:mCherry (Mathias y cols. 2006) expresa Cherry en neutrófilos.
- NeuroD:GFP (Obholzer y cols. 2008) expresa GFP en el nervio.

En particular para la generación de líneas transgénicas nuevas se utilizó la línea silvestre WIK/AB (Rauch y cols. 1997).

Para las técnicas de biología molecular se utilizaron las siguientes cepas:

- *Escherichia coli* quimio-competentes MachT1 generadas en el laboratorio.
- *Chlamydomonas reinhardtii*.

#### Material de plástico y vidrio

Placas Petri de poliestireno de 100x15 mm, VWR.

Pipetas de transferencia de plástico, Biologix.

Tubos Falcon de 15 ml, Nest.

Capilares de vidrio con diámetro interno de 0,69 mm y diámetro externo de 1,2 mm, Sutter Instrument.

Pipetas Pasteur de vidrio.

Porta-objetos de vidrio, Sail Brand.

### Reactivos

Vector tol2-mpx-mCherry de Addgene (29585).

Vector T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP) (Mario Sánchez y Elvis Acevedo)

3167 Vector I-SceI/ubiq::LoxP-DsRed-LoxP-H2B::EGFP Cry::ECFP

2642 Vector I-SceI/DS/MCS/\_BBW2.1\_MCS

2637 Vector I-SceI/MCS\_cmlc2::ECFP (Lázaro Centanin)

1945 Vector I-SceI/MCS\_cmlc2::EGFP (Robert Reinhardt)

2556 Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP)

Enzimas de restricción y sus respectivas soluciones amortiguadoras provinieron de MBI Fermentas (St.Leon-Roth, Germany) y/o New England Biolabs (Frankfurt, Germany): BglI, BglIII, ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, I-SceI, KpnI, NcoI, NheI, NotI, PvuI, PvuII, SpeI, XhoI.

Ligasa T4 y su solución amortiguadora, Roche.

Klenow, Roche.

DNTP's, Roche.

Fosfatasa alcalina, Roche.

Polietilenglicol.

TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM Ácido acético, pH 7,8).

Bromuro de etidio, Sigma.

Agarosa, Gibco.

Ampicilina, Sigma.

Penicilina, Sigma.

Estreptomicina, Sigma.

Tricaína (Ethyl-m-aminobenzoatemethanesulphonate), Sigma.

Pronasa

Trans tamoxifeno (T5648), Sigma.

4-OH Tamoxifeno (H7904), Sigma.

Kit de purificación plasmidial MIDI, QIAGEN

Kit InnuPREP DOUBLE pure, Analytik jena.

### **Medios de cultivo**

Medio de cultivo para pez cebra "E3" (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>) (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002).

LB (Bactotripton 10 g/L, NaCl 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaOH 3,5 mM.).

TB (peptona 1.2% (peso/volumen), extracto de levadura 2.4% (peso/volumen), 72 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glicerol 0.4% (peso/volumen)).

Medio de trasplante Holtfreter (3,5 g/L NaCl, 0,05 g/L KCl, 0,1 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>).

Medio de trasplante Holtfreter libre de Calcio (3,5 g/L NaCl, 0,05 g/L KCl, 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>).

### **Equipos**

*Puller* de agujas Sutter Instrument, Model P-97.

Microinyector MPPI-2 Pressure Injector, ASI.

Micromanipulador mhc, Industrial Supply.

Lupa de disección, Arquimed.

Balón de N<sub>2</sub>, Indura.

Lupa de fluorescencia MVX10, Olympus.

Microscopio Confocal Laser Scanning TCS SP5, Leica.

Microscopio Confocal Laser Scanning TCS SPE, Leica.

Cámara digital Micropublisher 3.3, QImaging.

Transiluminador UV, PeqLab.

Impresora de transiluminador P93, Mitsubishi.

Cámara de electroforesis, PeqLab.

Fuente de poder para cámara de electroforesis Power Pac 300, BioRadIncubadora.

Espectrofotómetro Nanodrop ND-2000c, Nanodrop Technologies.

### **Programas**

QCapture Pro 6.0.0.412 S/N 47N60203-24701 (32-bit).

ImageJ 1.46r (Java 1.6.0\_20 (64-bit)).

Adobe Photoshop 13.0 (13.0 20120315.r.428 (32-bit)).

### **Métodos**

#### **Protocolo de transformación de células quimio-competentes MachT1**

- Transferir 100 µl de células quimio-competentes de -80°C a una cubeta con hielo hasta que las células se descongelen.
- Transferir 50 µl del tubo de microcentrifuga a uno nuevo para dividir el cultivo en dos.
- Agregar el ADN o la ligación (3-10 µl) a las células e incubar por 30 minutos en hielo.
- Sumergir los tubos de microcentrifuga en un baño termo-regulado a 42°C por 2 minutos.
- Se colocan los tubos nuevamente en hielo por 2 minutos.
- Agregar 300-600 ml de TB a los tubos e incubar por 1 hora a 37°C con agitación constante.
- Cultivar alrededor de 100-300 µl de células en placas Petri con Agar, LB y el medio de selección (antibiótico).
- Incubar las placas por 16 horas a 37°C.

#### **Protocolo de extracción plasmidial (MINIPREP)**

- Centrifugar 2 ml de un cultivo celular de 18 horas a 12.000 rpm por 2 minutos.
- Remover el sobrenadante.
- Agregar 250 µl de P1 (en hielo) y resuspender completamente en vortex.
- Agregar 250 µl de P2 y mezclar por inversión hasta 6 veces.
- Incubar a temperatura ambiente hasta 5 minutos.
- Agregar 250 µl P3 (en hielo) y mezclar inmediatamente por inversión hasta 6 veces.
- Incubar en hielo por 10 minutos.
- Centrifugar 20 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente.
- Remover el sobrenadante (ADN) y verterlo en un nuevo tubo de microcentrifuga.
- Agregar 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
- Centrifugar 15 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente.
- Remover el sobrenadante (isopropanol).
- Agregar 500 µl de etanol 70% a temperatura ambiente.
- Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente.

- Remover el sobrenadante (etanol) completamente.
- Agregar 40-50  $\mu$ l de agua y resuspender completamente.

#### **Generación de una herramienta de marcaje genético de células individuales de forma ubicua**

Para generar un vector que exprese el *cassette Brainbow* de forma ubicua se utilizó la región regulatoria de ubiquitina de pez cebra. El vector disponible en el laboratorio que contiene esta región dirige la expresión de DsRed como proteína que se expresa por defecto en todas las células. Río abajo de DsRed el vector codifica para GFP, la cual está flanqueada por sitios LoxP. Además contiene un reportero insercional en el ojo, *cry::ECFP*. En primer lugar, se extrajo *cry::ECFP* del vector 3167 dado que DsRed actúa de reportero y la presencia de ambos sería redundante. Se cortó el vector con KpnI y se cargó la digestión en un gel de agarosa al 1%. Se corrió el gel en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV y se extrajo una banda de 9,6 kb a partir del gel con un escalpelo estéril y se siguió el protocolo de purificación de ADN del Kit innuPREP Double Pure Kit de Analytikjena. Se eluyó el ADN en agua y se obtuvo un rendimiento de 57 ng/ $\mu$ l. Se religó el vector con T4 Ligasa, su respectiva solución amortiguadora y agua por una hora a temperatura ambiente y se transformaron 50  $\mu$ l de células quimio-competentes con 4  $\mu$ l de la ligación. Se cultivaron las células en placas Petri con agar y LB suplementado con ampicilina como medio de selección. Se seleccionaron 6 colonias para realizar la extracción plasmidial y corroborar con HindIII que *cry::ECFP* estuviera ausente en el vector. Todas las colonias resultaron positivas. Con el objetivo de intercambiar GFP por el *cassette Brainbow*, se digirió el nuevo vector con NotI, se agregó Klenow y nucleótidos para rellenar los extremos cohesivos generados por NotI y después se realizó la digestión con HindIII. Se agregó fosfatasa alcalina para evitar que el vector se religue y se cargó en un gel de agarosa al 1% y se corrió en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV. Se extrajo una banda de 8,4 kb a partir del gel con un

escalpelo estéril y se siguió el protocolo de purificación de ADN del Kit innuPREP Double Pure Kit de Analytikjena. Se eluyó el ADN en agua y se obtuvo un rendimiento de 22,8 ng/ $\mu$ l.

En paralelo, se obtuvo el *cassette Brainbow* a partir del vector 2642. Para esto se digirió el vector con XhoI, luego se agregó Klenow y nucleótidos para rellenar los extremos cohesivos generados por XhoI y después se realizó la digestión con HindIII. Se cargó en un gel de agarosa al 1% y se corrió en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV. Se extrajo una banda de 5,2 kb a partir del gel con un escalpelo estéril y se siguió el protocolo de purificación de ADN del Kit innuPREP Double Pure Kit de Analytikjena. Se eluyó el ADN en agua y se obtuvo un rendimiento de 33,7 ng/ $\mu$ l.

Para la ligación del inserto (5,2 kb) con el vector de destino (8,4kb) se utilizó una relación 2:1, respectivamente. Se incubaron con Ligasa T4, su respectiva solución amortiguadora y agua a temperatura ambiente por 18 horas. Se transformaron 5  $\mu$ l de la ligación en 50  $\mu$ l de células quimio-competentes y se cultivaron en placas Petri con agar y LB suplementado con ampicilina como medio de selección.

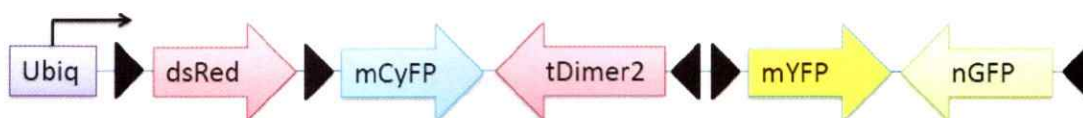
Al día siguiente se inocularon 19 colonias en 4 ml de LB suplementado con ampicilina y se incubaron a 37°C por 18 horas con agitación constante.

Se realizó la extracción plasmidial como está descrito en el protocolo y se revisó el nuevo vector mediante la digestión con EcoRI, Paul y XhoI. Se corrió la digestión en un gel de agarosa al 1% en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV y 2 colonias resultaron positivas según el patrón de bandas esperado para cada enzima (EcoRI: 2,7kb, 11kb; Paul: 2,85kb, 5,4kb, 5,5kb; XhoI: 723 pb, 3,3kb, 3,6kb, 6,1kb).



Se realizó una extracción plasmidial de una de las colonias positivas en columnas del Kit de purificación plasmidial MIDI (QIAGEN) para obtener ADN altamente puro y así poder microinyectarlo en embriones de pez cebra.

El nombre que recibió este vector fue Sc(Ubi:BBW) y a continuación se observa un esquema.



**Figura 2. Esquema del vector Sc(Ubi:BBW).** La proteína fluorescente dsRed se expresa por defecto bajo la dirección de la región reguladora de *ubiquitina* en este sistema.

### **Generación de una herramienta de marcaje genético de células individuales del sistema inmune innato**

Para generar las construcciones específicas de neutrófilos se obtuvo la región reguladora de *mpx* a partir de vector tol2-*mpx*-mCherry mediante enzimas de restricción. Por un lado se generaron vectores donde *mpx* dirige la expresión del *cassette Rainbow* y por otro lado se generaron vectores donde *mpx* dirige la expresión de Cre.

### **Sc(Mpx:BBW)**

Se obtuvo la región reguladora de *mpx* a partir de una co-digestión del vector tol2-*mpx*-mCherry con XhoI y SpeI. La digestión se cargó en un gel de agarosa al 1% y se corrió en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV. Se extrajo una banda de 8,1 kb (inserto) a partir del gel con un escalpelo estéril y se siguió el protocolo de purificación de ADN del Kit innuPREP Double



Pure Kit de Analytikjena. Se eluyó el ADN en la solución amortiguadora de elución del kit en 30  $\mu$ l finales y se obtuvo un rendimiento de 80 ng/ $\mu$ l.

El vector de destino para la región regulatoria de *mpx* corresponde al 2642. Este vector fue co-digerido con XhoI y NheI, y posteriormente tratado con fosfatasa alcalina. La digestión se corrió en el mismo gel que el inserto. Los pasos de extracción y purificación fueron los mismos que se mencionaron y se obtuvo un rendimiento de 88 ng/ $\mu$ l para un volumen final de elución de 20  $\mu$ l de una banda de 8,8 kb.

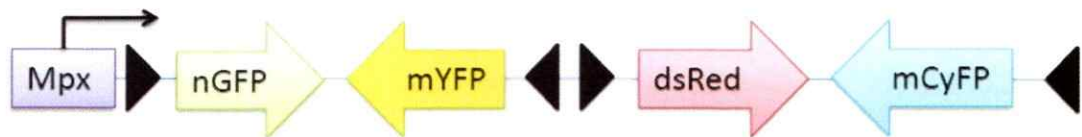
Para la ligación del inserto (8,1kb) con el vector de destino (8,8kb) se utilizó una relación 2:1, respectivamente. Se incubaron con Ligasa T4, su respectiva solución amortiguadora y agua a temperatura ambiente por 15 horas. Se realizó un control negativo carente del inserto para corroborar que el vector no religara. Se transformaron 6  $\mu$ l de la ligación en 50  $\mu$ l de células quimio-competentes y se cultivaron en placas Petri con agar y LB suplementado con ampicilina como medio de selección.

Al día siguiente se inocularon 6 colonias en 4 ml de LB suplementado con ampicilina y se incubaron a 37°C por 18 horas con agitación constante.

Se realizó la extracción plasmidial como está descrito en el protocolo y se revisó el nuevo vector mediante la digestión con HindIII y EcoRI. Se corrió la digestión en un gel de agarosa al 1% en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV y 4 colonias resultaron positivas según el patrón de bandas esperado para cada enzima (HindIII: 2,9kb, 3,8kb, 10,1kb; EcoRI: 2,1kb, 3,6kb, 5,6kb, 5,6kb).

Se realizó una extracción plasmidial de una de las colonias positivas en columnas del Kit de purificación plasmidial MIDI de QIAGEN para obtener ADN altamente puro y así poder microinyectarlo en embriones de pez cebra.

El nombre que recibió este vector fue Sc(Mpx:BBW) y a continuación se observa un esquema de la construcción.



**Figura 3. Esquema del vector Sc(Mpx:BBW).** La proteína fluorescente GFP se expresa por defecto bajo la dirección de la región regulatoria de *mpx* en este sistema.

### Sc(Mpx:BBW *cm1c2*:ECFP)

Se generó una variante del vector Sc(Mpx:BBW) que contiene un reportero insercional en el corazón. Para esto se introdujo la región regulatoria de *mpx* dirigiendo la expresión del *cassette Brainbow* (Mpx:BBW) en un vector de destino que dirige la expresión de GFP en cardiomiocitos. Se digirió el vector Sc(Mpx:BBW) con *SpeI* y *XhoI*. Primero se realizó la digestión con *SpeI*, luego se agregó Klenow y nucleótidos para rellenar los extremos cohesivos que generó *SpeI* y después se realizó la digestión con *XhoI*. La digestión se cargó en un gel de agarosa al 0,8% y se corrió en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV. Se extrajo una banda de 13,5 kb (inserto) a partir del gel con un escalpelo estéril y se siguió el protocolo de purificación de ADN del Kit innuPREP Double Pure Kit de Analytikjena. Se eluyó el ADN en agua y se obtuvo un rendimiento de 118 ng/ $\mu$ l.

El vector de destino para el inserto (Mpx:BBW) corresponde al 2637. Este vector fue co-digerido con XhoI y EcoRV, y posteriormente tratado con fosfatasa alcalina. Se cargó la digestión en un gel de agarosa al 1% y se corrió en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV. Se extrajo una banda de 4,7 kb (vector) a partir del gel con un escalpelo estéril y se siguió el protocolo de purificación de ADN del Kit innuPREP Double Pure Kit de Analytikjena. Se obtuvo un rendimiento de 120 ng/μl para un volumen final de agua de 20 μl.

Para la ligación del inserto (13,5 kb) con el vector de destino (4,7 kb) se utilizó una relación 5:1, respectivamente. Se incubaron con Ligasa T4, su respectiva solución amortiguadora, polietilenglicol y agua a temperatura ambiente por 15 horas. Se realizó un control negativo carente del inserto para corroborar que el vector no religara. Se transformaron 4 μl de la ligación en 50 μl de células quimio-competentes y se cultivaron en placas Petri con agar y LB suplementado con ampicilina como medio de selección.

Al día siguiente se inocularon 14 colonias en 5 ml de LB suplementado con ampicilina y se incubaron a 37°C por 18 horas con agitación constante.

Se realizó la extracción plasmidial como está descrito en el protocolo y se revisó el nuevo vector mediante su digestión con EcoRI. Se corrió la digestión en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X a un voltaje constante de 100 mV y 1 colonia resultó positiva según el patrón de bandas esperado para la enzima (EcoRI: 2,1kb, 3,6kb, 5,6kb, 6,7kb).

Se realizó una extracción plasmidial la colonia positiva en columnas del Kit de purificación plasmidial MIDI (QIAGEN) para obtener ADN altamente puro y así poder microinyectarlo en embriones de pez cebra.

El nombre que recibió este vector fue Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP).

#### **Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP)**

Se obtuvo la región regulatoria de *mpx* a partir de una digestión del vector tol2-mpx-mCherry con XhoI y ClaI. Primero se realizó la digestión con XhoI, luego se agregó Klenow y nucleótidos para rellenar los extremos cohesivos que generó XhoI y después se realizó la digestión con ClaI. Se cargó un gel de agarosa al 1% y se corrió en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV. Se extrajo una banda de 8,1 kb a partir del gel con un escalpelo estéril y se siguió el protocolo de purificación de ADN del Kit innuPREP Double Pure Kit de Analytikjena. Se eluyó el ADN en 20  $\mu$ l finales de agua y se obtuvo un rendimiento de 23 ng/ $\mu$ l.

El vector de destino para la región regulatoria de *mpx* corresponde al 2639. Este vector fue digerido con KpnI y ClaI y la digestión se corrió en el mismo gel que la digestión del inserto. Primero se realizó la digestión con KpnI, luego se agregó Klenow y nucleótidos para rellenar los extremos cohesivos que genera KpnI y después se realizó la digestión con ClaI. Los pasos de extracción y purificación fueron los mismos que se mencionaron y se obtuvo un rendimiento de 32 ng/ $\mu$ l para un volumen final de elución de 20  $\mu$ l de una banda de 7,3 kb.

Para la ligación del inserto (8,1kb) con el vector de destino (7,3 kb) se utilizó una relación 2:1, respectivamente. Se incubaron con Ligasa T4, su respectiva solución amortiguadora, polietilenglicol y agua a temperatura ambiente por 15 horas. Se transformaron 6  $\mu$ l de la ligación en 50  $\mu$ l de células quimio-competentes y se cultivaron en placas Petri con agar y LB suplementado con ampicilina como medio de selección.

Al día siguiente se inocularon 16 colonias en 5 ml de LB suplementado con ampicilina y se incubaron a 37°C por 18 horas con agitación constante.

Se realizó la extracción plasmidial como está descrito en el protocolo y se revisó el nuevo vector mediante la digestión con HindIII y XhoI. Se corrió la digestión en un gel de agarosa al 1% en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV y 1 colonia resultó positiva según el patrón de bandas esperado para cada enzima (HindIII: 1,2 kb, 2,9 kb, 5 kb, 6,3 kb; XhoI: 1,2 kb, 5 kb, 9,2 kb).

Se realizó una extracción plasmidial de la colonia positiva en columnas del Kit de purificación plasmidial MIDI (QIAGEN) para obtener ADN altamente puro y así poder microinyectarlo en embriones de pez cebra.

El nombre que recibió este vector fue Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP). *Mpx* dirige la expresión de la recombinasa Cre y ésta posee un elemento de respuesta a tamoxifeno (ERT2). En presencia de tamoxifeno, la recombinasa se transloca al núcleo de las células, lo que otorga un punto más de control.

#### **Sc(Mpx-MCS cmlc2:EGFP)**

Se generó un vector con un sitio de clonación múltiple (MCS) río abajo de la región regulatoria de *mpx* y un reportero insercional que expresa GFP en el corazón. Se obtuvo la región regulatoria de *mpx* a partir de una co-digestión del vector tol2-mpx-mCherry con NheI y SpeI. Se cargó un gel de agarosa al 1% y se corrió en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV. Se extrajo una banda de 8,1 (inserto) kb a partir del gel con un escalpelo estéril y se siguió el protocolo de purificación de ADN del Kit innuPREP Double Pure Kit de Analytikjena. Se eluyó el ADN en 20 µl finales de agua y se obtuvo un rendimiento de 13,6 ng/µl.

El vector de destino para la región regulatoria de *mpx* corresponde al 1945. Este vector fue digerido con SpeI y se corrió un gel de agarosa al 1% en TAE 1x a un voltaje constante de 100

mV. Los pasos de extracción y purificación fueron los mismos que se mencionaron y se obtuvo un rendimiento de 168 ng/μl para un volumen final de agua de 20 μl de una banda de 4,6 kb. Se trató el vector con Fosfatasa Alcalina por 25 minutos a temperatura ambiente.

Para la ligación del inserto (8,1kb) con el vector de destino (4,6 kb) se utilizó una relación 2:1, respectivamente. Se incubaron con Ligasa T4, su respectiva solución amortiguadora, polietilenglicol y agua a temperatura ambiente por 15 horas. Se transformaron 7 μl de la ligación en 50 μl de células quimio-competentes y se cultivaron en placas Petri con agar y LB suplementado con ampicilina como medio de selección.

Al día siguiente se inocularon 3 colonias en 5 ml de LB suplementado con ampicilina y se incubaron a 37°C por 18 horas con agitación constante. En el control negativo no crecieron colonias.

Se realizó la extracción plasmidial como está descrito en el protocolo y se revisó el nuevo vector mediante la digestión con HindIII. Se corrió la digestión en un gel de agarosa al 1% en TAE 1x a un voltaje constante de 100 mV y 1 colonia resultó positiva según el patrón de bandas esperado para cada enzima (HindIII: 3 kb, 4,8 kb, 5 kb).

Se realizó una extracción plasmidial de la colonia positiva en columnas del Kit de purificación plasmidial MIDI (QIAGEN) para utilizarlo en la construcción de otros vectores que requieran la región regulatoria *mpx*.

El nombre que recibió este vector fue Sc(Mpx-MCS cmlc2:EGFP)

### Microinyección de vectores en embriones de pez cebra

Se estiraron capilares de vidrio con un *puller* para generar las agujas de microinyección en dos pasos de calentamiento, el primero a 88.3°C y el segundo a 99.2°C.

Para generar las líneas transgénicas se microinyectaron los vectores construidos en embriones en estadio de 1 célula. En el caso del vector que posee sitios Tol2, se microinyectó en conjunto con mRNA de la transposasa Tol2 transcrito *in vitro* (Kawakami y Shima, 1999). En el caso de los vectores que poseen sitios I-SceI, se microinyectaron en conjunto con la enzima I-SceI y su respectiva solución amortiguadora (Soroldoni y cols. 2009). Se microinyectó directamente en el polo animal del embrión, el cual corresponde a la primera célula que dará origen al organismo completo. Se microinyectaron alrededor de 5 nl por embrión de cada vector. Los embriones se incubaron en grupos de 50 en placas Petri con E3 a 28°C en condiciones de oscuridad hasta el 1 dpf y con un ciclo de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad a partir del 2 dpf. Se removieron los embriones muertos y se renovó el medio de cultivo de las placas todos los días hasta el análisis de la expresión de los vectores.

Además de los vectores generados en este trabajo también se microinyectó un vector que contiene la región regulatoria *hsp70*, la cual dirige la expresión de la recombinasa Cre en respuesta a estrés térmico. La recombinasa tiene a su vez una señal de localización nuclear (nls). Este vector contiene un reportero insercional en el corazón, lo que hace posible la selección de peces transgénicos. El vector lleva el nombre de Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP).

Además de microinyectar cada vector individualmente, también se co-inyectaron combinaciones de interés como:



- Sc(Ubi:BBW) x Sc(HS:Cre cmlc2:EGFP).
- Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP).
- Sc(Mpx:BBW) xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP).
- Sc(Mpx:BBW) x Sc(HS:Cre cmlc2:EGFP).
- Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP) x Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP).

### **Análisis de expresión transitoria**

Se evaluó la expresión de cada vector en lupa de fluorescencia de larvas de 3 a 5 dpf anestesiadas con tricafna. Independientemente del vector inyectado, se evaluó la presencia de fluorescencia tanto en los filtros verde, azul y rojo, con el fin de corroborar la especificidad de las regiones regulatorias, una posible filtración en la fuente de Cre y la estabilidad del *cassette Rainbow*.

Se seleccionaron aquellas larvas con mejor expresión de proteínas fluorescentes y se criaron hasta la adultez (3 meses) bajo las condiciones estándar descritas previamente.

### **Búsqueda de peces fundadores**

Después de 3 meses se cruzaron los peces adultos inyectados con peces de la línea WIK/AB y se analizó la descendencia. La pareja de adultos se mantuvo aislada del sistema hasta el análisis de las larvas. Nuevamente se evaluó la expresión de los vectores en larvas de 3 a 5 dpf anestesiadas con tricafna. Para el análisis de la transgénesis se estableció un mínimo de 100 larvas por pez para asegurar una evaluación exhaustiva, por lo que si la pareja de adultos producía menos, se devolvían al sistema y se cruzaban nuevamente días después. Los peces que se mantuvieron aislados del sistema continuaron recibiendo alimento y se les cambió el agua una vez por día.

Aquellos peces que resultaron fundadores de una línea transgénica se establecieron en el sistema de forma aislada y se crió su descendencia (F1), mientras que los peces cuya descendencia resultó negativa fueron descartados.

#### **Evaluación de la recombinación inducida por estrés térmico**

Una vez que la F1 alcanzó la adultez (3 meses), se cruzó un pez de la línea Sc(Ubi:BBW) con un pez de la línea Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP) y se trabajó con la descendencia doble transgénica (F2). Se decorionaron con pinzas las larvas de 2 dpf que aún no habían eclosionado y se transfirieron a tubos de microcentrífuga en E3 a 28°C. Luego, se removió la máxima cantidad de E3 y se agregó nuevo E3 pre-calentado a 42°C. Los tubos se incubaron por una hora a 37°C y luego se repitió el cambio de E3 por nuevo E3 pre-calentado a 42°C. Las larvas se traspasaron a una placa Petri con E3 a 28°C y se incubaron en las condiciones estándar hasta los 3 o 4 dpf. Se repitió el protocolo descrito pero esta vez la incubación fue de 18 horas a 37°C.

Se repitió el protocolo de estrés térmico en la descendencia doble transgénica (F2) proveniente de los cruces de la línea Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP) con Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP).

#### **Evaluación de la recombinación inducida por tamoxifeno**

Se cruzaron diferentes combinaciones de la línea Sc(Ubi:BBW) con Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP) y T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP) y se trabajó con la descendencia doble transgénica (F2). Se realizaron diversos protocolos utilizando dos variedades de tamoxifeno, diferentes concentraciones, tiempos de exposición y estadios de incubación.

- A) A los 3 dpf se trataron las larvas con tamoxifeno 5  $\mu$ M por dos horas y por 1 día en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Se evaluó la recombinación hasta los 6 dpf en lupa de fluorescencia.

- B) A los 2 dpf se trataron las larvas con tamoxifeno 5  $\mu\text{M}$  por un día condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Se evaluó la recombinación hasta el 5 dpf en lupa de fluorescencia.
- C) A los 2 dpf se trataron las larvas con tamoxifeno hidroxilado 1  $\mu\text{M}$  o con tamoxifeno no-hidroxilado 5  $\mu\text{M}$  por 6 horas en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Se evaluó la recombinación hasta el 5 dpf en lupa de fluorescencia.
- D) A los 6 dpf se trataron las larvas con tamoxifeno 5  $\mu\text{M}$  por 2 horas y por un día condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Se evaluó la recombinación hasta el 7 dpf en lupa de fluorescencia.

### **Trasplantes de células entre líneas transgénicas del sistema inmune innato**

Se colectaron embriones de las líneas Mpx:GFP y Mpx:mCherry y se criaron en E3 a 28 °C hasta alcanzar el estadio de blástula. Para decorionar a los embriones receptores, se colocaron embriones en estadio de blástula en E3 con 25 gotas de pronasa (30 mg/ml) en un vaso de vidrio. Se agitó el vaso suavemente en forma circular por ~10 minutos. En cuanto se observó el primer embrión decorionado, se inició el lavado de los embriones con medio Holtfreter (con  $\text{Ca}^{+2}$ ) para diluir y quitar la pronasa. Este proceso debe ser lento y suave para evitar dañar a los embriones decorionados. Se absorbieron los embriones receptores con una pipeta Pasteur de vidrio y se los depositó en una placa Petri cubierta por una capa de agarosa al 1% en agua. Los dadores (en estadio de blástula) se decorionaron de la misma forma, con la excepción de que se utilizó Holtfreter (sin  $\text{Ca}^{+2}$ ). Se disgregaron las células al resuspender los embriones con una pipeta Pasteur de vidrio y se traspasaron a un tubo Falcon de 15 ml. Se centrifugaron 3 veces a 1500 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Entre cada paso de centrifugación se descartó el sobrenadante y se renovó el medio. Finalmente se obtuvo el pellet (células dadoras) en ~500  $\mu\text{l}$  y se distribuyeron sobre un portaobjetos de vidrio. En todo momento, tanto los dadores como receptores, estuvieron cubiertos por medio. El contacto con el aire daña inmediatamente

a las células y es importante que los medios Holtfreter sean preparados el mismo día del trasplante.

Para generar la aguja de microinyección, se estiró con fuego una pipeta Pasteur de vidrio hasta lograr el diámetro deseado. Se cortó la punta de la pipeta con una pinza y se conectó el lado ancho de la pipeta a una manguera de plástico. Se succionaron las células dadoras Mpx:GFP del porta-objetos y se microinyectaron en las blástulas de los embriones receptores Mpx:mCherry.

Los embriones inyectados se desarrollaron en la misma placa de inyección en condiciones estándar hasta el 1 dpf. Se removieron los embriones muertos y se agregó E3 con penicilina/estreptomicina al 1% v/v. A los 3 dpf se analizó la presencia de neutrófilos que expresen GFP en las larvas Mpx:mCherry.

Los trasplantes se repitieron invirtiendo las líneas dadoras y receptoras.

#### **Electroablación de neuromastos y nervio periférico para evaluar la respuesta inmune innata**

Se utilizó un método de daño basado en un electrodo de tungsteno, el cual está conectado a una fuente de poder y a un micromanipulador. El electrodo descarga pulsos de corriente, cuyo amperaje y duración son configurables (Moya y cols. 2014). El primer objetivo de este experimento fue eliminar un único neuromasto en larvas de 3 dpf mediante un pulso de corriente y analizar la respuesta inmune innata que esto genera. Se utilizaron larvas provenientes de un cruce de la línea Mpx:GFP y Cxcr4b:RFP, lo que permitió identificar a los neuromastos para generar el pulso y a los neutrófilos que expresan GFP para realizar la captura de imágenes. Se montaron las larvas en Agarosa de bajo punto de fusión al 0,75% con E3 con tricaina en placas de silicona diseñadas especialmente para estos efectos. Se realizaron 2 pulsos de 20  $\mu$ A con un electrodo de 1 megaohm. Luego de generar el daño localizado en el

neuromasto L3 con el microelectrodo, se trasladó la larva inmediatamente a la lupa de fluorescencia que se encuentra acoplada a una cámara. Se inició la captura de imágenes alrededor de 10 minutos después de realizado el daño. Las imágenes se tomaron cada 30 segundos y con éstas se realizó un *time-lapse* en ImageJ de la larva dañada durante los primeros 30 minutos. Con el mismo programa se evaluó la posibilidad de seguir neutrófilos individuales.

Además, como segundo objetivo se repitió el protocolo de electroablación, montaje en larvas y captura de imágenes en larvas del mismo cruce por 2 horas, pero esta vez se dañaron dos neuromastos consecutivos, el L3 y L4.

Por último, se repitió el protocolo completo en un nervio periférico de larvas de 3 dpf *Mpx:GFP<sup>+</sup>/Nrd:GFP<sup>+</sup>* en la región dorsal al vitelo. Se realizó un *time-lapse* y se analizó de la misma forma que los experimentos de electro-ablación en neuromastos.

#### **Microinyección de *Chlamydomonas reinhardtii* en embriones de pez cebra**

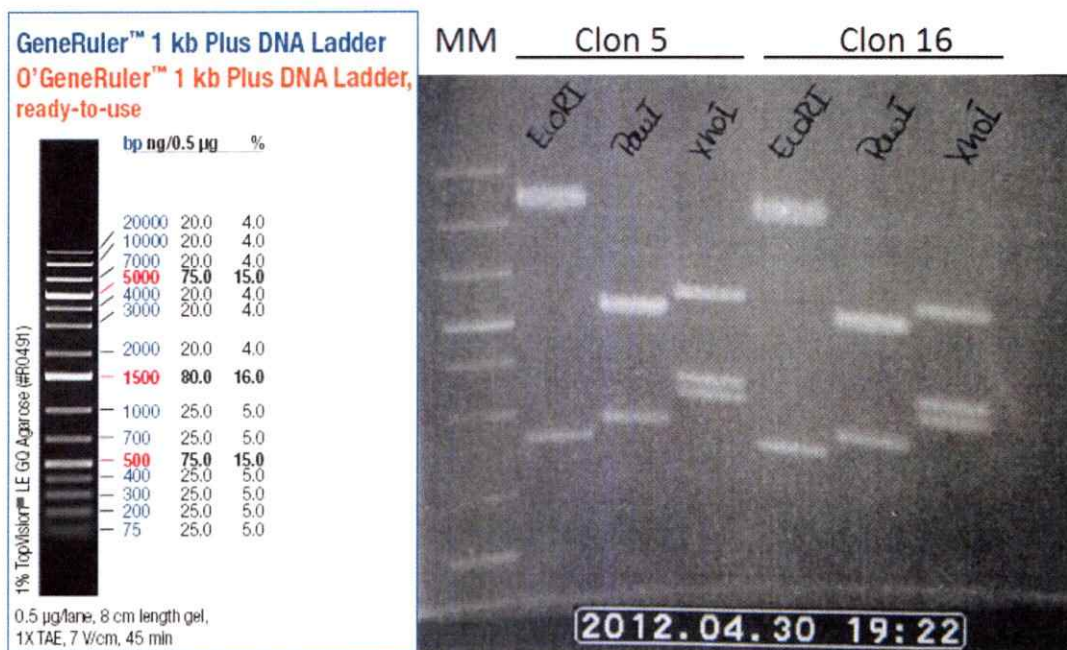
Se microinyectó alrededor de 5 nL de un cultivo de *C. reinhardtii* en embriones en estadio de 1 célula en el polo vegetal. Los embriones se incubaron en placas Petri con E3 a 28°C con un ciclo de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad. Se removieron los embriones muertos y se renovó el medio de cultivo de las placas todos los días hasta el análisis de la respuesta inmune de larvas de 3 a 5 dpf y la supervivencia de las algas en las larvas.

## RESULTADOS

### Generación de una herramienta de marcaje genético de células individuales de forma ubicua

Se construyó un vector que dirige la expresión del *cassette Brainbow* de forma ubicua y se verificó mediante el análisis del patrón de bandas que resulta de la digestión con las enzimas de restricción EcoRI, Paul y XhoI. En la figura 4 se muestra un gel de agarosa donde los clones 5 y 16 resultaron positivos.

**Sc(Ubi:BBW):** EcoRI: 2,7 kb, 11 kb; Paul: 2,85 kb, 5,4 kb, 5,5 kb; XhoI: 723 pb, 3,3 kb, 3,6 kb, 6,1 kb.



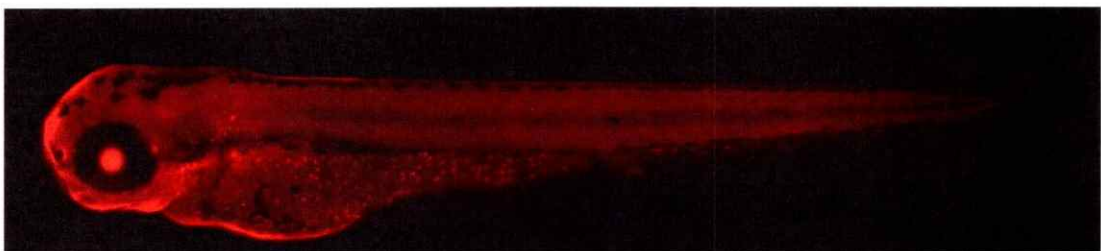
**Figura 4. Digestión del clon 5 y 16 Sc(Ubi:BBW) con EcoRI, Paul y XhoI.** Ambos clones resultaron positivos dado que el patrón de bandas esperado para la digestión con cada enzima coincide con la predicción. MM: marcador de peso molecular.

Se inyectaron embriones en estadio de una célula con 14 ng/µl del vector Sc(Ubi:BBW), Clon 16. De 729 embriones inyectados, el 80% sobrevivió la inyección y de éste porcentaje se seleccionaron y criaron 500 larvas hasta la etapa adulta de maduración sexual (3 meses). Se

realizaron cruces entre estos peces, potencialmente fundadores, con peces silvestres y se buscó expresión de la proteína DsRed en la descendencia. Dado que la integración del ADN es azarosa, en múltiples copias y genera individuos fundadores mosaico, observamos que el 85% de las larvas microinyectadas expresan DsRed en alguna medida independiente de la zona del cuerpo. En la figura 5 se observa una larva de 3 dpf que corresponde a un individuo F1 de uno de los peces fundadores encontrado para el vector Sc(Ubi:BBW). Se observa que la proteína expresada por defecto, DsRed, se expresa homogéneamente a lo largo de todo el cuerpo de la larva, incluyendo la epidermis de las aletas y el lente del ojo. No se observó fluorescencia de ningún tipo en los filtros verde y azul, por lo que la expresión del *cassette Brainbow* fue la esperada.

[ADN] (ng/μl)	14
Embriones Inyectados	729
% Sobrevida	80
% Expresión	85
Marca	Músculos
Larvas seleccionadas	500

**Tabla 1. Microinyección de Sc(Ubi:BBW).** El porcentaje de sobrevida corresponde a los embriones que alcanzaron los 3 dpi en buenas condiciones. El porcentaje de expresión corresponde a larvas microinyectadas que expresaron fluorescencia independiente de la zona o intensidad. Las larvas seleccionadas se criaron hasta la adultez para realizar la búsqueda de peces fundadores.



**Figura 5. Larva Sc(Ubi:BBW) de la generación F1 de 3 dpf.** La larva expresa la proteína fluorescente DsRed de forma ubicua.

Del total de peces adultos analizados durante la búsqueda de peces fundadores, se descartaron 48 peces cuya descendencia resultó idéntica a larvas silvestres mientras que se encontraron 18

peces fundadores de la línea Sc(Ubi:BBW). De estos 18 fundadores se seleccionaron aquellos peces con mejor expresión de la proteína fluorescente DsRed para generar una línea estable.

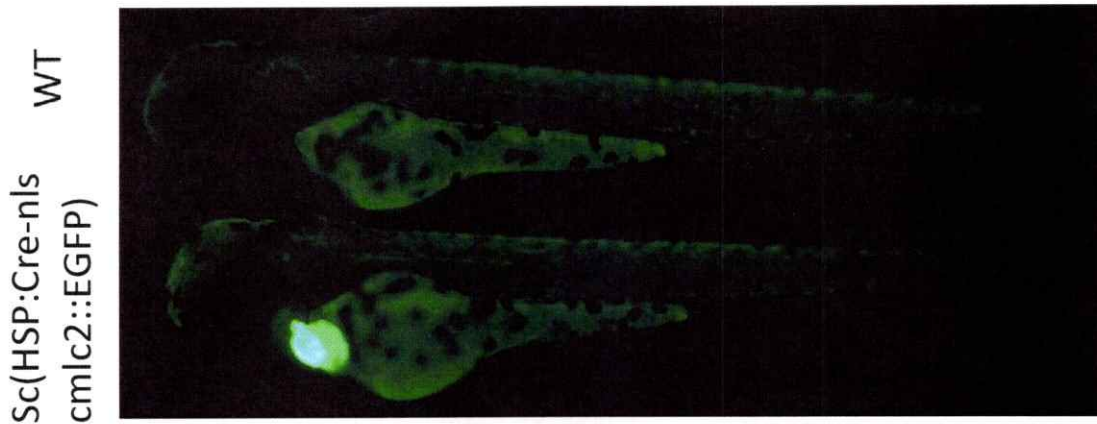
**Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP)**

Se microinyectó un vector que dirige la expresión de la recombinasa Cre en células sometidas a estrés térmico. La recombinasa Cre posee una señal de localización al núcleo (nls). Además, contiene un reportero insercional independiente con expresión de GFP en el corazón para identificar las larvas transgénicas. De 221 embriones microinyectados, el 85% sobrevivió la inyección y entre las larvas sobrevivientes un 75% exhibió expresión del reportero insercional en el corazón de forma específica. Se seleccionaron y criaron 95 larvas hasta la etapa adulta de maduración sexual (3 meses). Se realizaron cruces entre estos peces, potencialmente fundadores, con peces silvestres y se buscó expresión del reportero insercional en la descendencia. En la figura 6 se observa una larva silvestre de 3 dpf y una larva transgénica de la generación F1 de uno de los peces fundadores encontrado para el vector Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP). Se observa expresión del marcador insercional en el corazón de la larva transgénica, la cual no posee ningún tipo de expresión inespecífica de GFP, dado que el resto de la larva se observa igual que la silvestre.

<b>[ADN] (ng/μl)</b>	10
<b>Embriones Inyectados</b>	221
<b>% Sobrevida</b>	85
<b>% Expresión</b>	75
<b>Marca</b>	Corazón verde
<b>Larvas seleccionadas</b>	95

**Tabla 2.** Microinyección de Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP). El porcentaje de sobrevida corresponde a los embriones que alcanzaron los 3 dpi en buenas condiciones. El porcentaje de expresión corresponde a larvas que expresaron fluorescencia independiente de la zona o intensidad. Las larvas seleccionadas se criaron hasta la adultez para realizar la búsqueda de peces fundadores.



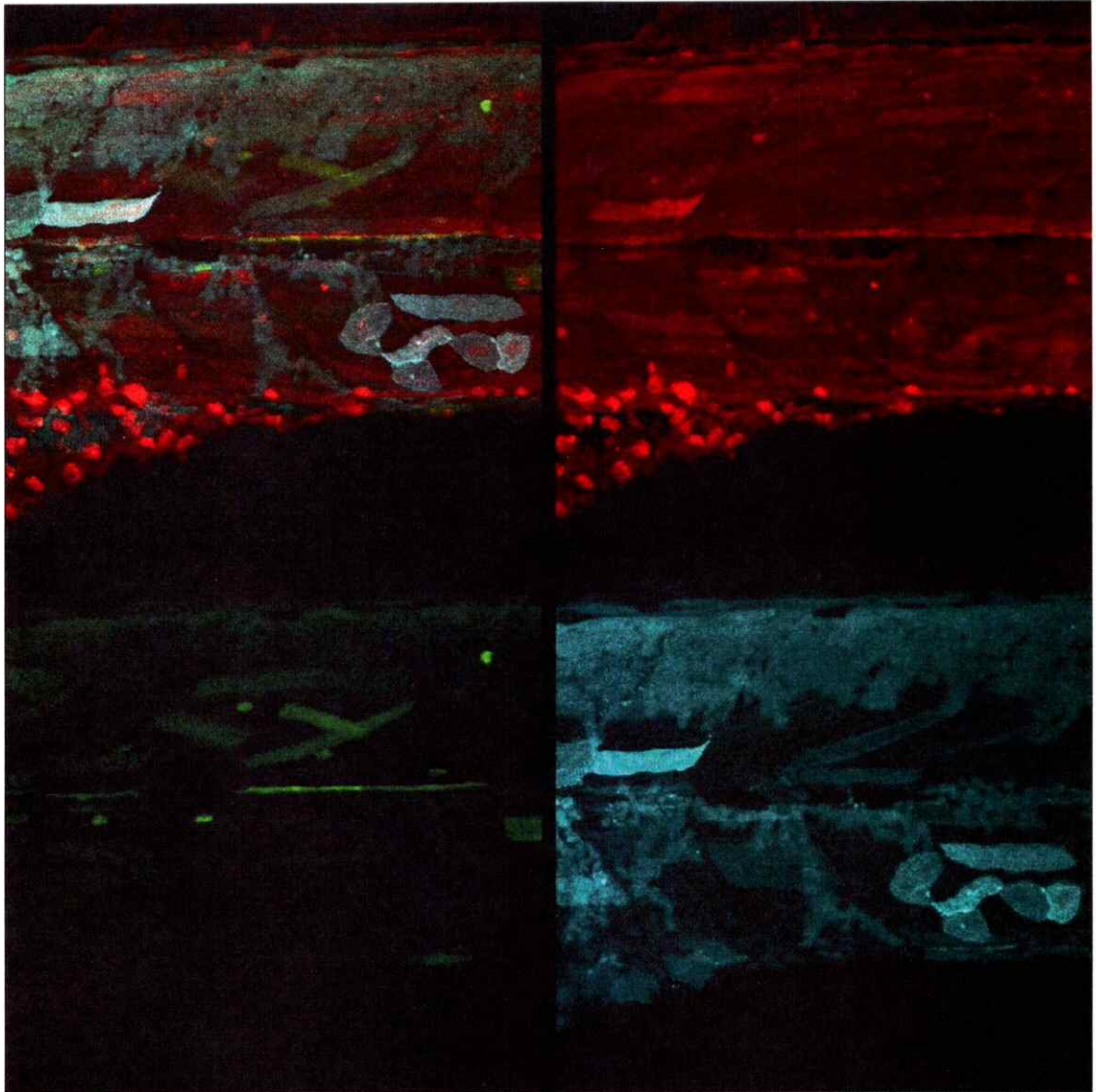


**Figura 6. Larva silvestre (WT) y hermano transgénico para el vector Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP) de 3 dpf.** La larva que expresa GFP en los cardiomiocitos del corazón fue microinyectada con el vector Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP) en estadio de 1 célula.

Del total de peces adultos analizados durante la búsqueda de peces fundadores, se descartaron 15 peces cuya descendencia resultó idéntica a larvas silvestres mientras que se encontraron 2 peces fundadores de la línea Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP). Ambos exhibían fuerte expresión del reportero por lo que se escogió uno de los fundadores para generar una línea estable.

#### **Evaluación de la recombinación inducida por estrés térmico**

Para evaluar si el *cassette Rainbow* integrado vía transgénesis efectivamente recombina en presencia de la recombinasa Cre, se cruzaron adultos F1 transgénicos de la línea Sc(Ubi:BBW) con adultos F1 transgénicos de la línea Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP). Se criaron los embriones en condiciones estándar hasta los 2 dpf y se les indujo estrés térmico. Al día siguiente, las larvas mostraron recombinación exitosa expresando las proteínas fluorescentes esperadas en diversos tejidos y en patrones azarosos, expresión que no se observó en larvas no inducidas. En la figura 7 se observan células que expresan exclusivamente una proteína fluorescente (cyan, verde o rojo) y en otros casos células de dos o de tres colores. En el caso del filtro verde es posible observar tanto GFP nuclear como YFP de membrana dado el amplio espectro de absorción del filtro utilizado.



**Figura 7.** Expresión de proteínas fluorescentes como producto de la recombinación azarosa del *cassette Brainbow* por la recombinasa *Cre*. A, fusión de las tres imágenes tomadas con los distintos filtros para luz fluorescente. B, fluorescencia roja. C, fluorescencia verde y amarilla. D, Fluorescencia cyan. Se muestra el tronco de una larva  $Sc(Ubi:BBW)^+/Sc(HSP:Cre-nls\ cmlc2:EGFP)^+$  de 3 dpf inducida para expresar *Cre* por estrés térmico.

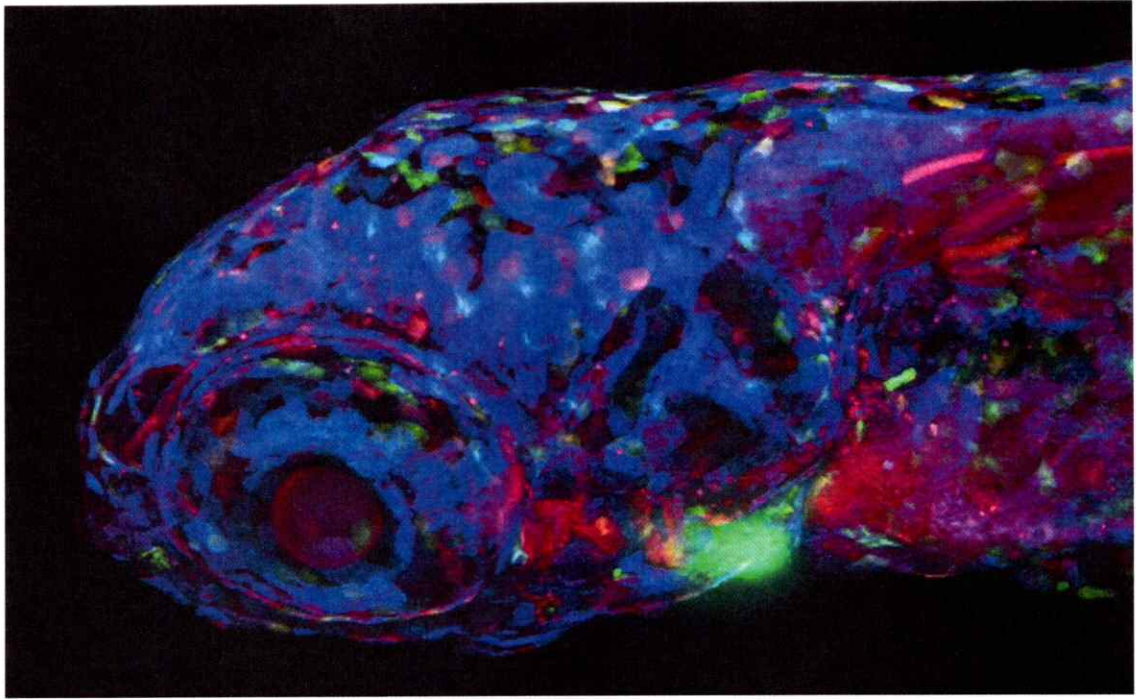


Figura 8. Recombinación ubicua en la cabeza de una larva  $Sc(Ubi:BBW)^+/Sc(HSP:Cre-nls\ cmlc2:EGFP)^+$  de 4 dpf. Imagen fusionada de los cuatro filtros de fluorescencia.

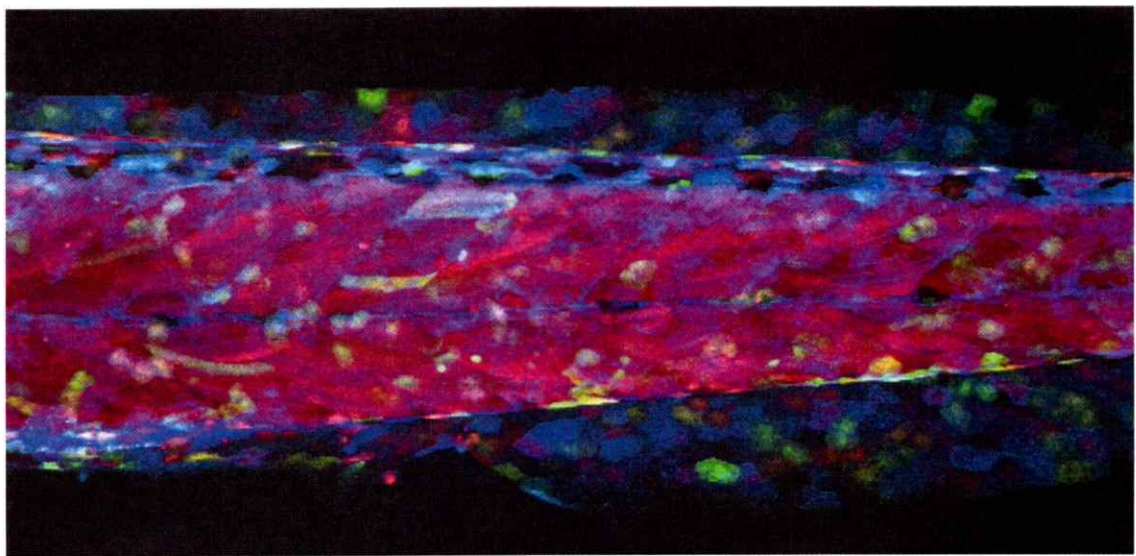
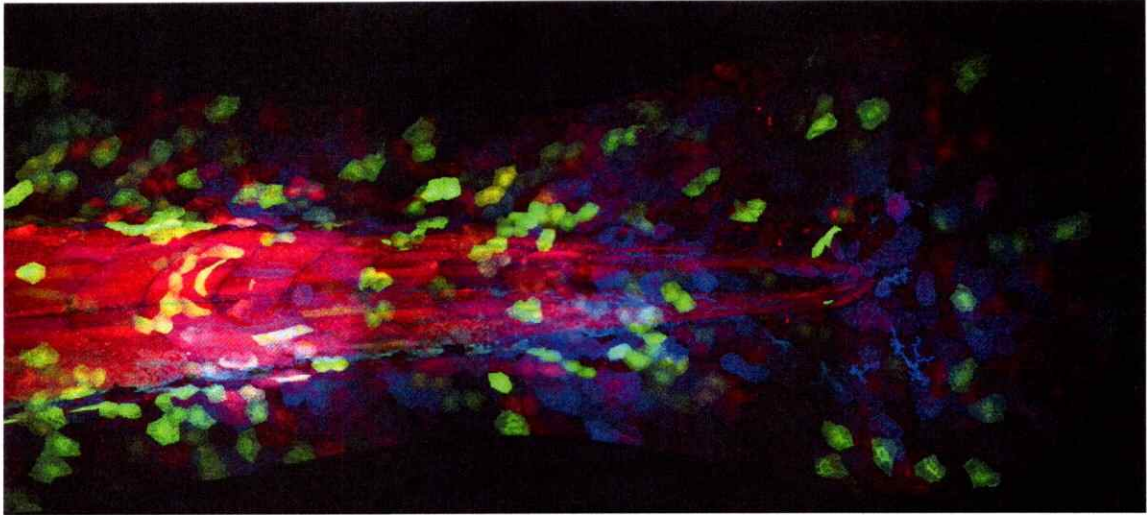


Figura 9. Recombinación ubicua en el tronco de una larva  $Sc(Ubi:BBW)^+/Sc(HSP:Cre-nls\ cmlc2:EGFP)^+$  de 4 dpf. Imagen fusionada de los cuatro filtros de fluorescencia.



**Figura 10.** Recombinación ubicua en la cola de una larva  $Sc(Ubi:BBW)^+/Sc(HSP:Cre-nls\ cmlc2:EGFP)^+$  de 4 dpf. Imagen fusionada de los cuatro filtros de fluorescencia.

En las figuras 8, 9 y 10 se observa la cabeza, tronco y cola de una larva de 4 dpf luego de haber recibido un *shock* térmico, lo que activa la expresión de la recombinasa Cre, y por ende, la recombinación en los sitios LoxP que flanquean diversas proteínas fluorescentes. Por microscopía confocal se observaron los tipos celulares individuales marcados diferencialmente por la recombinación azarosa. Se identificaron células de epidermis, pigmentos, fibras musculares y neuronas, entre otros.

Cuando se generó estrés térmico de forma extendida (18 horas a 37°C), se observaron principalmente células GFP<sup>+</sup>, mientras que con un estrés más acotado (1 hora a 37°C), se observaron más células cyan<sup>+</sup>. En el caso de estrés extendido se logró observar que numerosas células GFP<sup>+</sup> circulaban por el torrente sanguíneo de las larvas (Video 1). Esto suma un tipo celular más a la lista previamente mencionada e indica que la mayoría de los tejidos son susceptibles de sufrir recombinación mediada por recombinasa Cre en el genoma de sus células.

## Generación de una herramienta de marcaje genético de células individuales del sistema inmune innato

Para generar una herramienta que permita el marcaje de células del sistema inmune innato, se utilizó la región reguladora *mpx*, la cual dirige la expresión del mRNA de mieloperoxidasa específicamente en neutrófilos. Por un lado se generaron vectores donde *mpx* dirige la expresión del *cassette Brainbow* y por otro lado se generaron vectores donde *mpx* dirige la expresión de la recombinasa Cre.

### Sc(Mpx:BBW)

En primer lugar, se generó **Sc(Mpx:BBW)**, el cual se corroboró mediante su digestión con las enzimas de restricción, HindIII y EcoRI. El patrón de bandas esperado para este vector es el siguiente: HindIII: 2,9 kb, 3,8 kb, 10,1 kb y EcoRI: 2,1 kb, 3,6 kb, 5,6 kb, 5,6 kb.

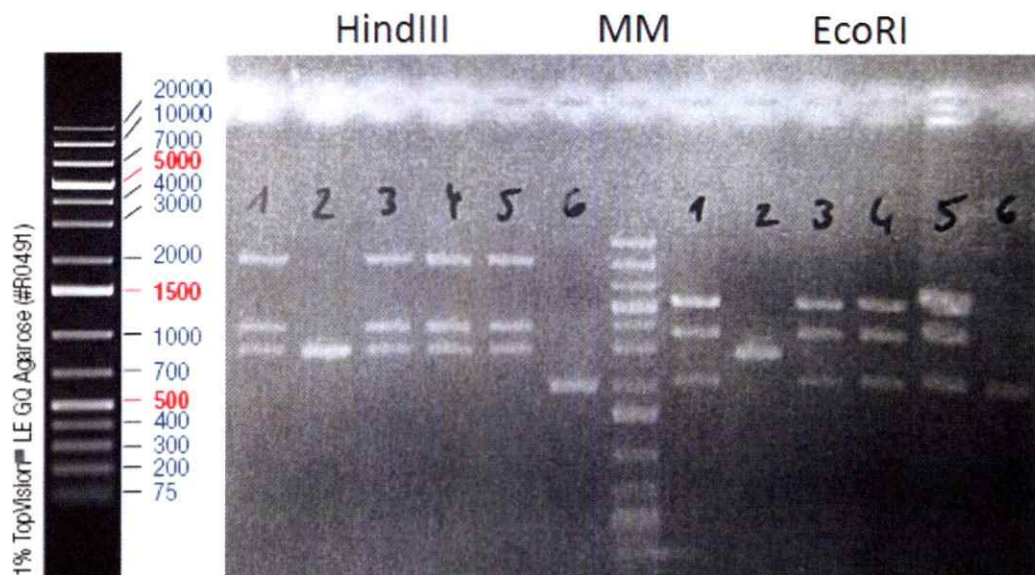


Figura 11. Digestión de Sc(Mpx:BBW) con EcoRI y HindIII. Las colonias 1, 3, 4 y 5 resultaron positivas dadas las bandas esperadas: HindIII: 2,9 kb, 3,8 kb, 10,1 kb y EcoRI: 2,1 kb, 3,6 kb, 5,6 kb, 5,6 kb. MM: marcador de peso molecular.

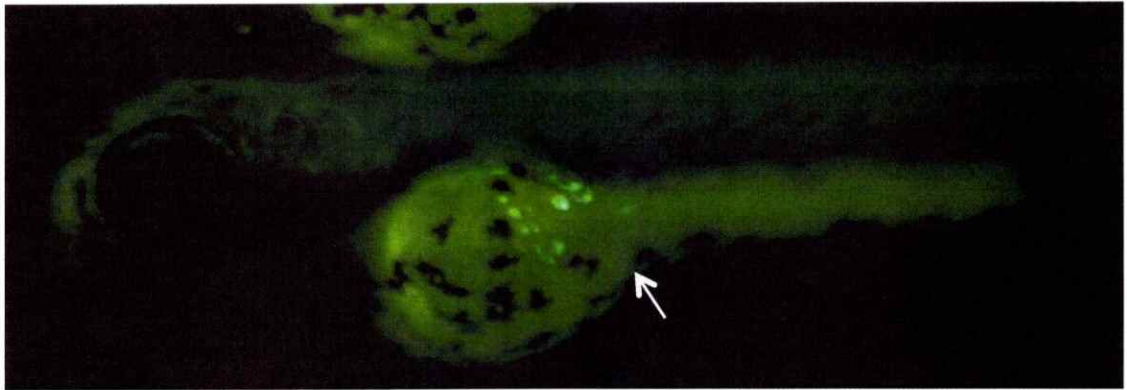
De la figura 11 se desprende que las colonias 1, 3, 4 y 5 son positivas, por lo que se microinyectó el ADN plasmidial proveniente del Kit de purificación plasmidial MIDI realizado a estas colonias. Se microinyectaron diferentes concentraciones de ADN, hasta encontrar una concentración óptima entre el porcentaje de sobrevida y el porcentaje de expresión del transgen. Este óptimo se encuentra alrededor de los 60 ng/ $\mu$ l.

[ADN] (ng/ $\mu$ l)	Embriones Inyectados	%Sobrevida	%Expresión	Marca	Larvas seleccionadas
<b>MIDI 1</b>					500
7,5	107	92	0	Ninguna	
14	356	94	0	Ninguna	
60	674	29	17	Células aisladas	
80	795	26	13	Células aisladas	
100	361	28	13	Células aisladas	
<b>MIDI 2</b>					
80	918	19	22	Saco vitelino y tronco	
<b>Total inyectados</b>	<b>3,211</b>				

**Tabla 3. Microinyección de Sc(Mpx:BBW).** Se realizaron dos MIDIs de dos colonias positivas distintas para la microinyección. El porcentaje de sobrevida corresponde a los embriones que alcanzaron los 3 dpi en buenas condiciones. El porcentaje de expresión corresponde a larvas que expresaron fluorescencia independiente de la zona o intensidad. Las larvas seleccionadas se criaron hasta la adultez para realizar la búsqueda de peces fundadores.

En las figuras 12, 13 y 14 se observa la expresión transitoria del vector Sc(Mpx:BBW) en la zona del saco vitelino y su prolongación. De todas las larvas analizadas (F0), muy pocas presentaron fluorescencia en el tejido caudal hematopoyético, como se observa en la figura 15 y 16. Se

escogieron aquellas larvas que tuvieran un patrón de expresión similar a la figuras 15, 16 y 17 para criar hasta la adultez y realizar la búsqueda de peces fundadores.



**Figura 12.** Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 3 dpf. Células ubicadas sobre el vitelo e indicadas con una flecha expresan GFP.



**Figura 13.** Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 3 dpf. Células ubicadas en la extensión del vitelo e indicadas con una flecha expresan GFP.



**Figura 14.** Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 3 dpf. Células ubicadas en la superficie del vitelo e indicadas con una flecha expresan GFP.

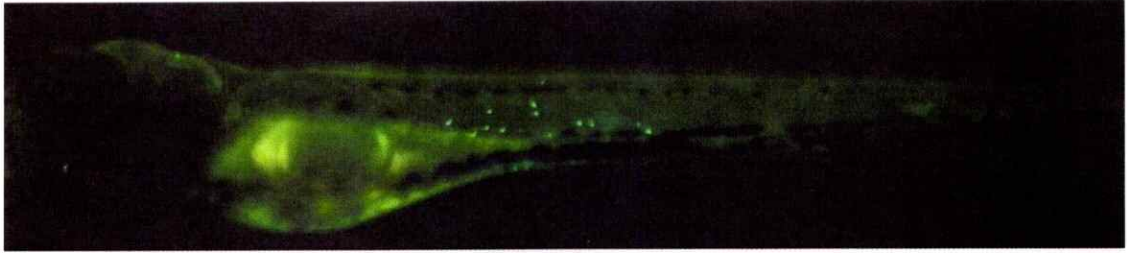


**Figura 15.** Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 3 dpf. Se observan células que expresan GFP en el tejido caudal hematopoyético, indicadas con una flecha.



**Figura 16.** Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 5 dpf. Se observan células que expresan GFP en el tejido caudal hematopoyético y levemente en algunos somitos.



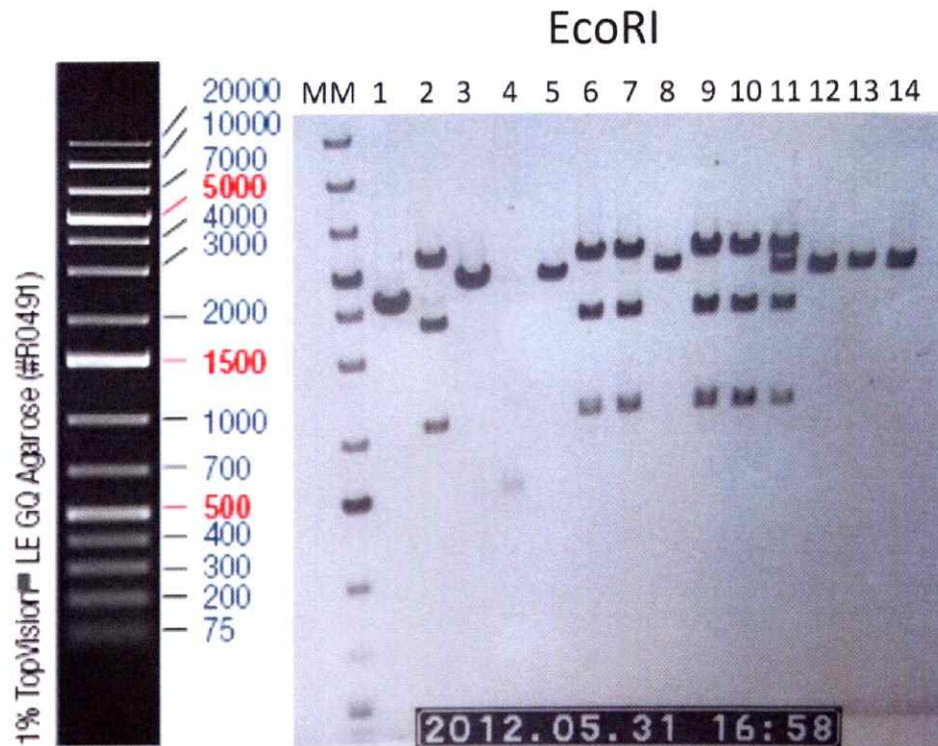


**Figura 17.** Larva microinyectada con Sc(Mpx:BBW) de 5 dpf. Se observan células que expresan GFP en el tronco.

Luego de 3 meses, cuando las larvas seleccionadas alcanzaron la madurez sexual, se cruzaron los peces adultos inyectados con peces silvestres de la línea WIK/AB. Se analizó la descendencia de los cruces de 163 peces adultos potencialmente fundadores. Sin embargo, debido a que ninguno presentó fluorescencia, ni ubicua ni en células inmunes, se descartó la totalidad de ellos.

#### **Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP)**

En paralelo con las microinyecciones del vector Sc(Mpx:BBW), se generó un vector similar que además incluye un reportero insercional en el corazón, con el objetivo de corroborar que el vector se estuviera integrando correctamente en el genoma. Este nuevo vector se verificó mediante el patrón de bandas esperado para su digestión con EcoRI: 2,1 kb, 3,6 kb, 5,6 kb, 6,7 kb.



**Figura 18.** Digestión de Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP) con EcoRI. La colonia 11 resultó positiva dadas las bandas 2,1 kb, 3,6 kb, 5,6 kb, 6,7 kb, esperadas para la digestión del vector con EcoRI. MM: marcador de peso molecular.

Se escogió la colonia 11 para realizar la MIDI y microinyectar 80 ng/μl de ADN plasmidial en embriones en estadio de 1 célula. La microinyección resultó exitosa, dado que casi todas las larvas sobrevivientes exhibieron específicamente un corazón cian. Sin embargo, nuevamente no se observaron neutrófilos en el TCH de manera transitoria, como era lo esperado según la construcción. Es decir, se confirmó la integración estable en este caso, pero aun así, no se observó expresión del reportero en ningún tejido.

[ADN] (ng/μl)	Marca	Peces negativos	Peces fundadores	% Transgénesis
80	Corazón Cian	35	3	8

**Tabla 4.** Microinyección de Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP). Los peces negativos corresponden a los adultos que fueron descartados durante la búsqueda de fundadores. Los fundadores corresponden a los peces cuya descendencia exhibió fluorescencia específicamente en el corazón. El porcentaje de transgénesis corresponde al número de fundadores sobre el número total de peces analizados para este vector.

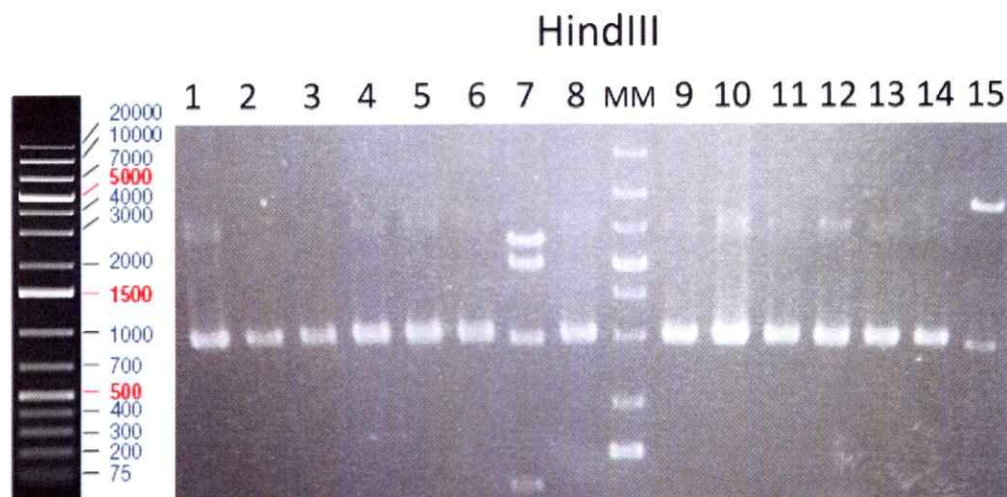
Del total de peces adultos analizados durante la búsqueda de peces fundadores, se descartaron 35 peces cuya descendencia resultó idéntica a larvas silvestres mientras que se encontraron 3 peces fundadores de la línea Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP). Sin embargo, la descendencia de estos peces fundadores nuevamente expresó CFP en el corazón y en ninguna otra región de las larvas.

Además, se evaluó la recombinación por estrés térmico en larvas Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP)<sup>+</sup>/Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP)<sup>+</sup>. Se aplicaron los protocolos de estrés térmico que funcionaron exitosamente con la línea Sc(Ubi:BBW), pero no se observó recombinación en el TCH ni en otra región de las larvas.

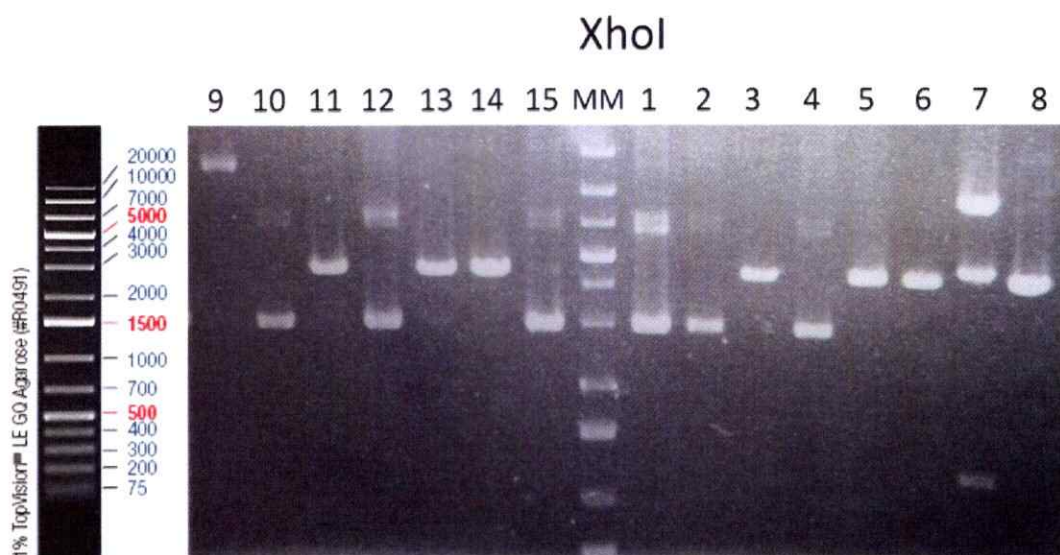
#### **Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP)**

Considerando los resultados obtenidos con los vectores Sc(Mpx:BBW) y Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP), se generó un nuevo vector donde *mpx* dirige la expresión de la recombinasa Cre y que además posee un reportero insercional en el corazón. El objetivo de este vector fue utilizarlo en conjunto con Sc(Ubi:BBW), dado que así también sería posible obtener recombinación específica de los neutrófilos. Se verificó la construcción mediante el patrón de bandas esperado para las siguientes enzimas de restricción: HindIII: 1,2 kb, 2,9 kb, 5 kb, 6,3 kb; XhoI: 1,2 kb, 5 kb, 9,2 kb.





**Figura 19.** Digestión de *Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP)* con *HindIII*. La colonia 7 resultó positiva dadas las bandas 1,2 kb, 2,9 kb, 5 kb, 6,3 kb, esperadas para la digestión del vector con *HindIII*. MM: marcador de peso molecular.



**Figura 20.** Digestión de *Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP)* con *XhoI*. La colonia 7 resultó positiva dadas las bandas 1,2kb, 5 kb, 9,2 kb, esperadas para la digestión del vector con *XhoI*. MM: marcador de peso molecular.

[ADN] (ng/μl)	Marca	Peces negativos	Peces fundadores	% Transgénesis
30	Corazón Cyan	33	3	8

**Tabla 5.** Microinyección de *Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP)*. Los peces negativos corresponden a los que fueron descartados durante la búsqueda de fundadores. Los fundadores corresponden a los peces cuya descendencia exhibió fluorescencia específicamente en el corazón. El porcentaje de transgénesis corresponde al número de fundadores sobre el número total de peces analizados para este vector.

Según la figura 19 y 20, la colonia 7 resultó positiva por lo que se realizó la MIDI a este clon y posteriormente se microinyectaron 30 ng/ $\mu$ l en embriones en estadio de 1 célula. Nuevamente, la microinyección resultó exitosa dado que la mayoría de las larvas exhibieron un corazón cyan y ninguna otra marca, como era lo esperado. De los peces adultos criados para este vector, se descartaron 33 peces que no transmitieron el transgen a la descendencia y se encontraron 3 peces fundadores que sí generaron una descendencia transgénica.

Se cruzaron peces adultos transgénicos de la línea Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP) con peces adultos transgénicos Sc(Ubi:BBW) para evaluar si ocurre recombinación únicamente de neutrófilos en estas larvas. Se aplicaron diversos protocolos de tratamiento con tamoxifeno, sin embargo en ninguno de los casos se observó algún tipo de recombinación en el cuerpo de las larvas doble transgénicas.

#### **Sc(Mpx-MCS cmlc2:EGFP)**

Dadas ciertas dificultades durante la clonación de Sc(Mpx:BBW) y Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP), se construyó Sc(Mpx:MCS cmlc2:EGFP) para facilitar los pasos de clonación. Este nuevo vector posee un sitio de clonación múltiple (MCS) río abajo de la región regulatoria *mpx*. Sin embargo, los tres vectores se terminaron de construir al mismo tiempo. Se microinyectó este vector con el fin de confirmar que el reportero insercional estuviera funcionando. Se observó que la mayoría de las larvas sobrevivientes poseían el corazón verde, dada la presencia de GFP en sus cardiomiocitos. El vector se confirmó por digestión con enzimas de restricción.

### **T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)**

Además de los vectores mencionados, se generó un vector similar a Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP) con la diferencia de que T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP) utiliza elementos Tol2 y a la transposasa Tol2 para integrar el vector en el genoma de los peces. Por otro lado, el reportero insercional es GFP y no CFP. La parte central del vector, Mpx:CreERT2, es esencialmente la misma.

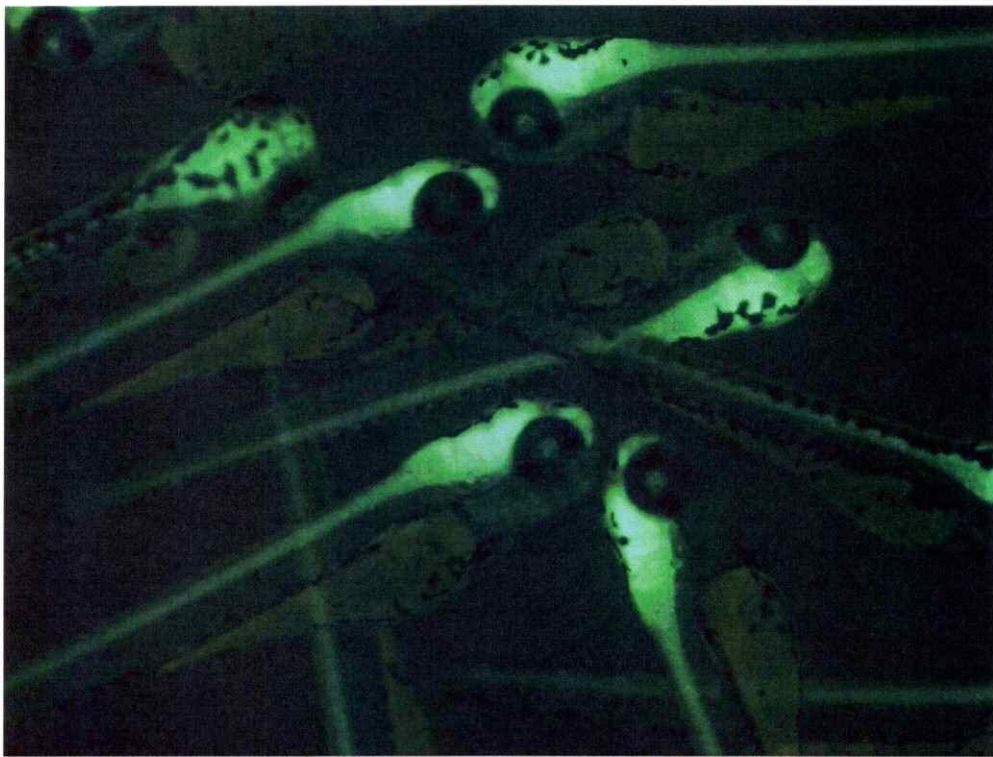
Se microinyectaron 50 ng/ul del vector y 8,5 ng/ul de mRNA de Tol2. Se esperaba que este vector exprese GFP únicamente en el corazón, sin embargo, ya en la generación de larvas microinyectadas (F0) se observaron otros tipos celulares marcados, como por ejemplo los músculos. El vector se co-inyectó con otros vectores como Sc(Ubi:BBW), Sc(Mpx:BBW) y Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP) y el resultado fue el mismo en términos de la expresión de GFP.

Durante la búsqueda de peces fundadores se descartaron 58 peces negativos mientras que se encontraron un total de 25 fundadores diferentes de la línea T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP). Todos los fundadores poseían el reportero insercional en el corazón pero además exhibían la expresión de GFP de forma inespecífica, como en la notocorda, agallas, o en el cuerpo entero.

A continuación, con las figuras 21 y 22 se ejemplifica un caso de larvas F1 con expresión inespecífica de GFP.



**Figura 21.** Larva T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP) de la generación F1 de 2 dpf. Se observa expresión inespecífica de GFP en todo el cuerpo, incluyendo el corazón.



**Figura 22.** Larvas T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP) de la generación F1 de 3 dpf. Se observa expresión inespecífica de GFP en el sistema nervioso central y muy levemente en el corazón.

Del total de peces adultos analizados durante la búsqueda de peces fundadores, se descartaron 58 peces cuya descendencia resultó idéntica a larvas silvestres mientras que se encontraron 25 peces fundadores de la línea T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP). De estos 25 fundadores, ninguno expresó el reportero específica y únicamente en el corazón. La mayoría expresó GFP de forma

ubicua en el cuerpo y algunos de forma específica en determinados órganos como el ejemplo de la figura 22.

La expresión inespecífica de GFP puede resultar inconveniente para los futuros experimentos de recombinación con las líneas que poseen el *cassette Brainbow*, ya que la expresión ubicua de GFP podría interferir con la de las proteínas fluorescentes codificadas en el *cassette*. De tal modo, se descartaron todas estas líneas de peces transgénicos.

Por último, se evaluó la recombinación inducida por tamoxifeno en larvas  $Sc(Ubi:BBW)^+/T2(Mpx:CreERT2\ cmlc2:GFP)^+$  mediante los protocolos descritos. No se observó recombinación en ningún tipo celular en ninguna larva en los estadios observados.



## DISCUSIÓN

### **Generación de una herramienta de marcaje genético de células individuales**

El objetivo de este trabajo consistió en la generación de una herramienta genética versátil que permitiera el marcaje azaroso de células mediante expresión de proteínas fluorescentes. Con ello, son posibles experimentos de seguimiento individual de células *in vivo*, un requisito para comprender sus relaciones de linaje, migración y contactos con otras células a través del tiempo. Tal herramienta podría ayudar a contestar preguntas aún no resueltas en biología regenerativa, desarrollo embrionario, respuesta inmune, morfogénesis y diferenciación. Si bien, es posible marcar células de diversas maneras, el marcaje genético es el más elegante por su robustez, marca permanente y control de especificidad. La metodología ha sido usada extensamente en *Drosophila* para la generación de clones genéticamente distintos al tejido silvestre y ha involucrado la aplicación de recombinasas de ADN de origen procariótico. En el caso del pez cebra, se ha comenzado a usar la recombinación mediada por el sistema Cre-loxP para expresar proteínas fluorescentes de manera inducible y tejido específica. En el modelo murino se ha usado con relativo éxito el sistema Cre-loxP desde los años 90, y más recientemente, ha aparecido el vector *Brainbow* que no sólo permite hacer un *switch* de color, pero además lo hace de manera azarosa combinando varios colores. La ventaja de ello, es que permite observar varias células marcadas de manera distinguible en un mismo individuo, ahorrando tiempo y animales.

Esta tesis consistió en la generación de vectores de ADN que incorporaran la tecnología *Brainbow* al pez cebra, primero poniendo en evidencia su funcionamiento básico con vectores de expresión ubicua y luego de manera tejido específica. La primera etapa del proyecto fue

exitosa y se generaron vectores de expresión ubicua para diversos experimentos con esta especie. La segunda parte, donde pretendimos obtener recombinación en el linaje inmune, en particular, en los neutrófilos, no fue posible por la ineficacia del promotor utilizado. Dados los resultados obtenidos, es importante destacar que este sistema de recombinación genética no es del todo eficiente en el pez cebra puesto que fue necesario generar numerosas líneas transgénicas de ambos tipos de vectores para sólo obtener unas pocas que tuvieron integraciones en el genoma y que además fueran funcionales. En futuras aplicaciones, debería tenerse en cuenta esta realidad para dimensionar adecuadamente los tiempos y esfuerzos requeridos para obtener un resultado positivo.

#### **Inducción de recombinación del vector Sc(Ubi:BBW) por estrés térmico**

Para este efecto usamos el promotor del gen de ubiquitina (*ubi*) que ha sido reportado como el único de expresión realmente ubicua en pez cebra. En efecto, la expresión de la proteína fluorescente DsRed en todo el cuerpo de larvas transgénicas Ubi:BBW es evidencia de esta amplia expresión. Para tener un control temporal sobre la recombinación, diseñamos que el promotor del gen *hsp70*, el cual es inducible por estrés térmico (entre otros factores estresantes), dirija la expresión del mRNA de la recombinasa Cre. De tal modo, se esperaba obtener recombinación del vector *Brainbow* y expresión de diversas proteínas fluorescentes en aquellos tejidos que expresaran altos niveles de Cre.

La construcción y microinyección de vectores que expresan el sistema *Brainbow*/Cre-loxP de forma ubicua resultó exitosa dado que se confirmó por digestión con enzimas de restricción y por la expresión correspondiente de los reporteros. Además, se logró inducir la recombinación de diferentes tipos celulares en las larvas doble transgénicas, Sc(Ubi:BBW)<sup>+</sup>/Sc(HSP:Cre-nls

cmlc2:EGFP)<sup>+</sup>. La recombinación se observó en células que son principalmente superficiales, como la epidermis, pigmentos, neuronas y somitos. Esto se debe a que el *shock* térmico estresa a las células que están más expuestas al exterior y por lo tanto son las que producen más recombinasa Cre. Para lograr inducir estrés de forma más específica y así dirigir la recombinación en zonas u órganos de interés, sería necesario utilizar otras técnicas como por ejemplo iluminación láser (Placinta y cols. 2009), pulsos de corriente con microelectrodos de tungsteno (Moya y cols. 2014), microscopía de 2 fotones o incluso tratamientos con sulfato de cobre (d'Alençon y cols. 2010), que sabemos induce el gen *hsp70* (Hernández y cols. 2011).

Para la mantención de la línea Sc(Ubi:BBW) será importante realizar cruces entre peces transgénicos para mantener un alto número de copias del transgen *Brainbow* y así generar alta diversidad de colores en las células a lo largo de las generaciones. En los diversos experimentos de inducción efectuados, se ha observado además variabilidad entre líneas, lo que indica que es apropiado realizar una selección de aquellas que muestren la mejor tasa de recombinación.

#### **Generación de una herramienta genética de marcaje individual del sistema inmune innato**

Actualmente existen líneas transgénicas de pez cebra que utilizan la secuencia regulatoria del gen *mpx* permitiendo observar neutrófilos *in vivo*. En este trabajo se extrajo esta región regulatoria a partir del vector original que se utilizó para generar las líneas transgénicas pre-existentes. La primera estrategia utilizada para producir novedosas líneas que expresen el *cassette Brainbow* en el sistema inmune fue la construcción del vector Sc(Mpx:BBW). En este último, la secuencia regulatoria de *mpx* dirige la expresión del *cassette Brainbow*, donde la proteína fluorescente que se expresa por defecto en neutrófilos es GFP. La adecuada construcción se confirmó mediante digestión con enzimas de restricción, sin embargo, las

larvas microinyectadas con este vector no expresaron GFP en el tejido caudal hematopoyético, donde habitan mayoritariamente los neutrófilos. La expresión transitoria del vector no necesariamente recapitula lo que ocurrirá en la descendencia, dado que las inserciones en el genoma pueden ser tanto en células somáticas como germinales. En el caso de que una inserción ocurra en la línea germinal, esta no necesariamente exhibirá un fenotipo en los peces inyectados pero sí dará origen a una descendencia transgénica. Por esta razón, a pesar de no observar el fenotipo esperado para el vector Sc(Mpx:BBW) de forma transitoria, se criaron las larvas con algún grado de expresión de GFP (existen casos donde la expresión de un vector es muy buena a nivel transitorio y sin embargo se pierde el transgen en las siguientes generaciones). Por esta razón se realizó una búsqueda exhaustiva de peces fundadores de la línea Sc(Mpx:BBW).

En paralelo con la microinyección de Sc(Mpx:BBW), se construyó un vector que además tuviera un reportero insercional para comprobar la eficiencia de integración del vector en el genoma de los embriones. El nuevo vector, Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP), también codifica a GFP como la proteína fluorescente que se expresara por defecto. Las larvas microinyectadas con este vector expresaron CFP en el corazón, por lo que la presencia del reportero insercional descarta que la microinyección fuera el paso limitante y se confirma que efectivamente el vector se está integrando en zonas del genoma que son permisivas para su transcripción y posterior traducción. El hecho de que el vector Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP) expresara el reportero insercional pero no GFP en neutrófilos, nos sugiere que la limitación observada ocurrió a nivel de la región reguladora *mpx*.

Como estrategia paralela y dado que el vector Sc(Ubi:BBW) sí resultó exitoso en términos de recombinación azarosa, se diseñó un vector para inducir la expresión de Cre específicamente en neutrófilos: Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP). Se observó la presencia del reportero insercional, cmlc2:CFP, en el corazón de las larvas microinyectadas. Sin embargo, esto nuevamente no asegura que la recombinasa Cre esté siendo expresada en los neutrófilos. Paralelamente se construyó un vector que posee una forma diferente de integración en el genoma de los embriones, T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP), el cual se integra por la integrasa Tol2 y no por la enzima I-SceI como lo hacen todos los otros vectores construidos en este trabajo. Pero en ambas construcciones la recombinación será inducida cuando la recombinasa Cre sea transportada al núcleo. Esto sólo debiera ocurrir en presencia de la droga tamoxifeno, la cual funciona como ligando del dominio de unión que posee la región quimérica de la recombinasa Cre y cataliza su translocación al núcleo.

Al combinar las líneas que expresan la recombinasa Cre presumiblemente en neutrófilos con la línea Sc(Ubi:BBW) e inducir la recombinación por tamoxifeno, nuevamente no se observó expresión de las proteínas fluorescentes. Posiblemente, la región regulatoria *mpx* en estos vectores presenta el mismo problema que para Sc(Mpx:BBW) y Sc(Mpx:BBW cmlc2:ECFP).

Una posibilidad podría ser que los vectores que expresan CreERT2 estén funcionando pero que el tamoxifeno sea incapaz de permeabilizar hasta los neutrófilos. Sin embargo, los neutrófilos que habitan el TCH se encuentran altamente expuestos al medio por la delgadez de este tejido en la zona ventral, por lo que no debería representar un obstáculo para el ingreso de tamoxifeno. Sin embargo, el tamoxifeno también puede ser ingerido por las larvas cuando está disuelto en el agua y en tal caso es procesado por el hígado. Una vez que ingresa al sistema de

los peces puede demorar de 6 a 12 horas en inducir recombinación de las células (Hayashi y McMahon, 2002). Para descartar el efecto retardado del procesamiento hepático que debe sufrir el tamoxifeno para inducir la recombinación, se expusieron larvas doble transgénicas a distintos tiempos de incubación y se analizaron hasta 3 días después del tratamiento. Incluso se utilizó un tamoxifeno que se encuentra hidroxilado y corresponde a la forma activa y procesada que el hígado normalmente entrega al organismo. Los resultados fueron los mismos con este tipo de tamoxifeno por lo que se descarta la posibilidad de que el tamoxifeno no haya ingresado a las larvas por alguna de las vías posibles. Por último, se evaluaron distintas concentraciones con ambos tipos de tamoxifeno y tampoco se obtuvo recombinación por lo que el paso limitante en la recombinación de los constructos es posiblemente la región regulatoria de *mpx*.

Por otro lado, se intentó inducir la recombinación por estrés térmico en peces  $Sc(Mpx:BBW\ cmlc2:ECFP)^+/Sc(HSP:Cre-nls\ cmlc2:EGFP)^+$  para descartar que la limitación fuera a nivel del tamoxifeno. Nuevamente, no se logró observar células de ningún tipo en ningún color que haya recombinado. Sabemos que el estrés térmico sí es capaz de generar recombinación en células inmunes, dado que con los promotores ubicuos se observó amplia recombinación en este tejido. Esto refuerza la hipótesis de que el obstáculo está a nivel de la región regulatoria *mpx*.

Observamos además, expresión aberrante de GFP en el caso del vector T2( $Mpx:CreERT2\ cmlc2:GFP$ ), dado que se esperaba expresión únicamente en el corazón y se observó en otros tejidos. Se propone que la expresión ectópica proviene de influencias regulatorias inespecíficas sobre secuencias del reportero insercional, dado que no hay otra proteína fluorescente

codificada en este vector. También podrían existir efectos posicionales relacionados con el sitio genómico de la integración (efecto *enhancer trap*). Esto no necesariamente implica que lo mismo esté ocurriendo con *mpx* donde se observa una total ausencia de expresión. En comparación con los otros vectores construidos, donde la integración en el genoma ocurre en sitios I-SceI mediante meganucleasa, T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP) es el único que exhibe una expresión altamente inespecífica. Se sabe que la transposasa Tol2 y la meganucleasa I-SceI poseen distintos mecanismos de integración, posiblemente también teniendo distintas preferencias de cromatina, lo que explicaría las diferencias expuestas. Por esto, el mecanismo y los sitios de inserción en el genoma son relevantes cuando se quiere diseñar una estrategia de clonación para la generación de nuevas líneas transgénicas. Sin embargo, existen numerosos casos exitosos donde esta tecnología funciona muy bien, incluyendo vectores donde la región regulatoria de *mpx* dirige la expresión de proteínas fluorescentes (Mathias y cols. 2006). Nuestra conclusión es que la combinación de los vectores utilizados y el fragmento regulatorio seleccionado, impidieron una correcta expresión de los transgenes de manera eficiente y específica en el sistema inmune. El trabajo futuro en esta dirección debe considerar el uso de nuevos vectores y la clonación de secuencias promotoras distintas a las ya ensayadas, ya sea del gen *mpx* u otros que presenten expresión en células inmunes.



## CONCLUSIONES

- La combinación de las líneas Sc(Ubi:BBW) y Sc(HSP:Cre-nls cmlc2:EGFP) funciona como una potente herramienta para el estudio y seguimiento de linajes celulares, dado que permiten el marcaje genético de células individuales de forma controlada.
- Esta herramienta otorga la posibilidad de seguir células únicas a lo largo del tiempo en un organismo completo sin la necesidad de sacar a las células de su contexto.
- La estrategia que utiliza el estrés térmico para inducir la recombinación es muy efectiva pero poco específica mientras que aquella que utiliza tamoxifeno para inducir la recombinación puede ser tejido-específica pero poco efectiva.
- Muchos tejidos del pez cebra son susceptibles de sufrir recombinación mediada por recombinasa Cre (inducible por estrés térmico) en el genoma de sus células, como por ejemplo pigmentos, epidermis, neuronas, somitos y sangre.
- El mecanismo y los sitios de inserción en el genoma son relevantes cuando se quiere diseñar una estrategia de clonación para la generación de nuevas líneas transgénicas.
- La secuencia regulatoria de *mpx* seleccionada para la construcción de los vectores mencionados, no permite expresión específica en neutrófilos del sistema inmune.



## BIBLIOGRAFÍA

- D'Alençon, C., Peña, O., Wittmann, C., Gallardo, V. E., Jones, R., Loosli, F., Liebel, U., Grabher, C., Allende, M.L. 2010. A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC biology*, 8(1), 151. BioMed Central Ltd. doi: 10.1186/1741-7007-8-151.
- De Negri A, De Negri G. 1876. Farbstoff aus *Elysia viridis*. *Ber Deut Chem Gesellsch* 9: 84.
- Gamba, L., Cubedo, N., Ghysen, A., Lutfalla, G., Dambly-Chaudière, C. 2010. Estrogen receptor ESR1 controls cell migration by repressing chemokine receptor CXCR4 in the zebrafish posterior lateral line system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), 6358-63. doi:10.1073/pnas.0909998107.
- Gilroy, D. W., Lawrence, T., Perretti, M., & Rossi, A. G. 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(5), 401-16. doi: 10.1038/nrd1383.
- Gupta, V., Poss, K.D. 2012. Clonally dominant cardiomyocytes direct heart morphogenesis. *Nature* 484(7395):479-84. doi: 10.1038/nature11045.
- Hall, C., Flores, M. V., Storm, T., Crosier, K., Crosier, P. 2007. The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC developmental biology*, 7, 42. doi: 10.1186/1471-213X-7-42.
- Hans, S., Kaslin, J., Freudenreich, D., Brand, M. 2009. Temporally-Controlled Site-Specific Recombination in Zebrafish. *PLoS ONE* 4(2): e4640. doi:10.1371/journal.pone.0004640
- Hayashi, S., McMahon, A.P. 2002. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 15: 305–18.
- Hernandez, P.P., Undurraga, C., Gallardo, V.E., Mackenzie, N., Allende, M.L., Reyes, A.E. 2011. Sublethal concentrations of waterborne copper induce cellular stress and cell death in zebrafish embryos and larvae. *Biol Res.* 44(1):7-15. doi: 10.4067/S0716-97602011000100002.
- Kawakami, K., Shima, A. 1999. Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene* 15; 240(1):239-44.
- Keller, P.J., Schmidt, A.D., Wittbrodt, J., Stelzer, E.H. 2008. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science* 14; 322(5904):1065-9. doi: 10.1126/science.1162493.

- Livet, J., Weissman, T., Kang, H., Draft, R. W., Lu, J., Bennis, R., Sanes, J. R., Lichtman, J.F. 2007. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 450(7166), 56-62. doi: 10.1038/nature06293.
- Mathias, J. R., Perrin, B. J., Liu, T.-xi, Kanki, J., Look, A. T., Huttenlocher, A. 2006. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(December). doi:10.1189/jlb.0506346.1.
- Moya, J., Peña, O. A., Sánchez, M., Ureta, D., Reynaert, N., Anguita, C., Marín, G., Allende, M. L. 2014. Electroablation: a method for axotomy and localized tissue injury. *BMC Developmental Biology*, 14:7. doi:10.1186/1471-213X-14-7
- Obholzer, N., Wolfson, S., Trapani, J.G., Mo, W., Nechiporuk, A., Busch-Nentwich, E., Seiler, C., Sidi, S., Söllner, C., Duncan, R.N., Boehland, A., and Nicolon, T. 2008. Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells. *J. Neurosci.* 28(9): 2110-2118.
- Pan, Y.A., Livet, J., Sanes, J. R., Lichtman, J. W., Schier, A. F. 2011. Multicolor Brainbow Imaging in Zebrafish. *Cold Spring Harbor Protocols*, pdb.prot5546-pdb.prot5546. doi:10.1101/pdb.prot5546.
- Placinta, M., Shen, M-C., Achermann, M., Karlstrom, R.O. 2009. A laser pointer driven microheater for precise local heating and conditional gene regulation *in vivo*. Microheater driven gene regulation in zebrafish. *BMC Developmental Biology*, 9:73 doi: 10.1186/1471-213X-9-73.
- Priestley, J. 1772. Observations on different kinds of air. *Philosophical Transactions* 62, 147.
- Rauch, G.J, Granato, M., Haffter, P. 1997. A polymorphic zebrafish line for genetic mapping using SSLPs on high-percentage agarose gels. *Tech. Tips Online* T01208.
- Renshaw, S., Loynes, C., Trushell, D. M. I., Elworthy, S., Ingham, P. W., Whyte, M. K. B. 2006. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood*, 108(13), 3976-8. doi: 10.1182/blood-2006-05-024075.
- Rumpho ME, Summer EJ, Manhart JR. 2000. Solar-powered sea slugs. *Mollusc/algal chloroplast symbiosis. Plant Physiol.* 123:29-38.
- Rumpho ME, Pelletreau KN, Moustafa A, Bhattacharya D. 2011. The making of a photosynthetic animal. *J Exp Biol.* 214:303-11.
- Soroldoni, D., Hogan, B.M., Oates, A.C. 2009. Simple and efficient transgenesis with meganuclease constructs in zebrafish. *Methods Mol Biol.*; 546:117-30. doi: 10.1007/978-1-60327-977-2\_8.

Weissman, T., Sanes, J. R., Lichtman, J. W., Livet, J. 2011. Generating and imaging multicolor brainbow mice. *Cold Spring Harbor protocols* (7), 763-769. doi:10.1101/pdb.top114.

Xiao T, Roeser T, Staub W, y Baier H. 2005. A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. *Development* 132: 2955-67.

ANEXO

Linea	Peces Negativos	% Transmisión	Patrón de expresión	% Transgénesis
Sc(Mpx:BBW)	55	0,5	Body	1,8
Sc(Mpx:BBW) x Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP)	18	65	BH en filtro GFP/CFP	5
Sc(HS:Cre cmlc2:CFP) x Sc(Ubi:BBW)	15	3	BH en filtro GFP/CFP	12
Sc(HS:Cre cmlc2:CFP) x Sc(Ubi:BBW)	15	7	BH/GFP	
Sc(Mpx:BBW) xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	17	13	BH/Body en filtro GFP	15
Sc(Mpx:BBW) xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	17	4	BH/Body en filtro GFP	
Sc(Mpx:BBW) xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	17	9	BH/Body VERY BRIGHT	
REC(Sc(Mpx:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP))	23	3	BH/Body en filtro GFP	12
REC(Sc(Mpx:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP))	23	-	BH/Body GFP	
REC(Sc(Mpx:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP))	23	-	BH/Body GFP	
T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	10	11	BH/Body en filtro GFP	29
T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	10	1	BH/Body en filtro GFP	
T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	10	-	BH/Body	
T2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	10	18	BH/Body VERY BRIGHT	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	-	Ubi:dsRed/BH/Body	65
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	27	BH/Body dim filtro GFP	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	4	BH/Body filtro GFP	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	20	BH/Body filtro GFP	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	3	Ubi:dsRed	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	-	BH/Body filtro GFP	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	13	Ubi:dsRed /BH/SN/Body heter.label	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	1	BH/Body GFP	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	5	Dim Ubi:dsRed/BH/Body	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	10	BH/Body dim GFP	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	18	Ubi:dsRed/BH/SN strong GFP	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	23	Dim Ubi:dsRed/Eye/BH notochord GFP	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	1	BH and gills in GFP	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	-	BH/Body green + too few body red	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	-	BH/Body green	
Sc(Ubi:BBW)xT2(Mpx:CreERT2 cmlc2:GFP)	8	-	BH/Body green Bright	
Sc(Ubi:BBW)	40	56	Ubi:dsRed	
Sc(Ubi:BBW)	40	1	Ubi:dsRed apparently only muscles	
Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP)	15	7	BH/GFP/CFP	17
Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP)	15	0,4	BH/GFP/CFP	
Sc(Mpx:CreERT2 cmlc2:CFP)	15	2	BH/CFP/GFP	
Sc(Mpx:BBW cmlc2:CFP)	17	35	BH dim CFP	15
Sc(Mpx:BBW cmlc2:CFP)	17	-	BH CFP/GFP	
Sc(Mpx:BBW cmlc2:CFP)	17	15	BH CFP	

Tabla 6. Resumen de peces fundadores. BH: bleeding heart (reportero insercional de corazón cmlc2). REC: se indujo la recombinación de las larvas con tamoxifeno.

### **Trasplantes de células entre líneas transgénicas del sistema inmune innato**

Como estrategia alternativa, para generar individuos mosaico que presentaran marcaje diverso de células inmunes se implementó un experimento de trasplante de células entre cepas de peces transgénicos distintas. Los trasplantes de células embrionarias en estadio de blástula generan individuos genéticamente mosaicos lo que ha permitido hacer experimentos de linaje y autonomía celular en diversos contextos. Trasplantamos células de una línea transgénica de pez cebra que marca neutrófilos con fluorescencia verde en una segunda línea que marca neutrófilos en rojo. El fin último de esta estrategia es poder describir el comportamiento de estas células en detalle, conociendo las respuestas que ejecutan frente a diversos estímulos, como la inflamación y la resolución, en tiempos extendidos.

Luego de trasplantar células de una línea transgénica que posee neutrófilos verdes a una que los tiene rojos, se analizaron las larvas sobrevivientes y no se observaron células con la marca fluorescente correspondiente a la línea donante. El proceso se repitió de la forma inversa, es decir, los embriones dadores correspondían a la línea Mpx:mCherry y los receptores a la línea Mpx:GFP y nuevamente no se observaron células trasplantadas.

Esperábamos poder tener peces que presentaran neutrófilos de dos colores, lo que permitiría distinguirlos en un experimento de inflamación y resolución. Sin embargo, en varios experimentos distintos de trasplante, no se obtuvo peces que presentaran neutrófilos provenientes del animal donante. Sabemos que el experimento de trasplante en sí resultó exitosamente, debido a que en el mismo experimento, se trasplantaron células de embriones transgénicos en que se marcan otros tipos celulares, como neuronas, que sí se encontraron presentes en los individuos mosaico. Nuestra hipótesis es que el sistema inmune podría ser

refractario a este tipo de análisis. Una posibilidad es que las células que dan origen a este tejido estén ubicadas en la blástula tardía en un lugar del embrión que es inaccesible para las células trasplantadas. Estas normalmente se alojan en el polo animal del embrión que embriológicamente tiene como destino la parte anterior del animal, mientras que el sistema inmune tiene un origen en el endodermo posterior. Por otro lado, es posible que el linaje celular que da origen al sistema inmune ya esté segregado en esa etapa y que nuevas células estén impedidas de ingresar a ese compartimiento celular por algún mecanismo de inhibición. Finalmente, es posible pensar que el procedimiento empleado para el trasplante genere una respuesta genómica en las células manipuladas que inhiba la ruta de diferenciación que lleve a los neutrófilos. Pensamos que una potencial solución a las posibles trabas para el éxito de este experimento podría ser el trasplante de neutrófilos ya diferenciados a las blástulas. Incluso, se podrían usar neutrófilos de peces transgénicos que expresaran en estas células distintas proteínas fluorescentes o el mismo *cassette* BBW recombinado *in vitro*. Esto no demandaría la generación de nuevas herramientas y podría ponerse a punto con las líneas de peces generadas en este trabajo.

#### **Electroablación de neuromastos y un nervio periférico para evaluar la respuesta inmune innata**

Anteriormente en nuestro laboratorio (d'Alençon et al., 2010), se desarrolló un protocolo de inflamación aguda inducida por exposición a cobre disuelto en el agua con larvas de pez. Sin embargo, para el estudio del comportamiento de los neutrófilos, era deseable tener un sistema de daño focalizado que pudiera generarse en tiempos distintos en diversos lugares del cuerpo. Para ello, aprovechamos un sistema de electroablación generado en nuestro laboratorio (Moya y cols. 2014) que permite dañar células o tejidos de manera muy localizada.

Luego de dañar el neuromasto L3 usando un microelectrodo de tungsteno que genera pulsos de corriente, se observó una rápida respuesta innata, manifestada como el reclutamiento dirigido y robusto de neutrófilos hacia la herida (Video 2). Los neutrófilos migraron intersticialmente desde el tejido caudal hematopoyético, principalmente desde la zona más cercana a la herida pero también desde la región dorsal de la larva. Dada la robustez de la respuesta al daño, no fue posible seguir la trayectoria de neutrófilos individuales durante periodos largos de tiempo. En el caso donde se dañaron dos neuromastos, los neutrófilos nuevamente migraron desde la región ventral más próxima a la herida (video 3) y además hubo migración entre ambas heridas como se puede observar claramente en el video 4.

En la figura 23 se muestra una larva  $Mpx:GFP^+/Nrd:GFP^+$  de 3 dpf previo al pulso de corriente con el microelectrodo y posterior a este tratamiento. Antes de aplicar el pulso de corriente, se observa que el nervio de la línea lateral posterior de la larva está intacto y que los neutrófilos se encuentran principalmente en el TCH. Luego del daño se observa que el nervio queda interrumpido y que hay infiltración de neutrófilos. Sin embargo, no fue posible seguir neutrófilos individuales dada la robustez de la respuesta (Video 5).

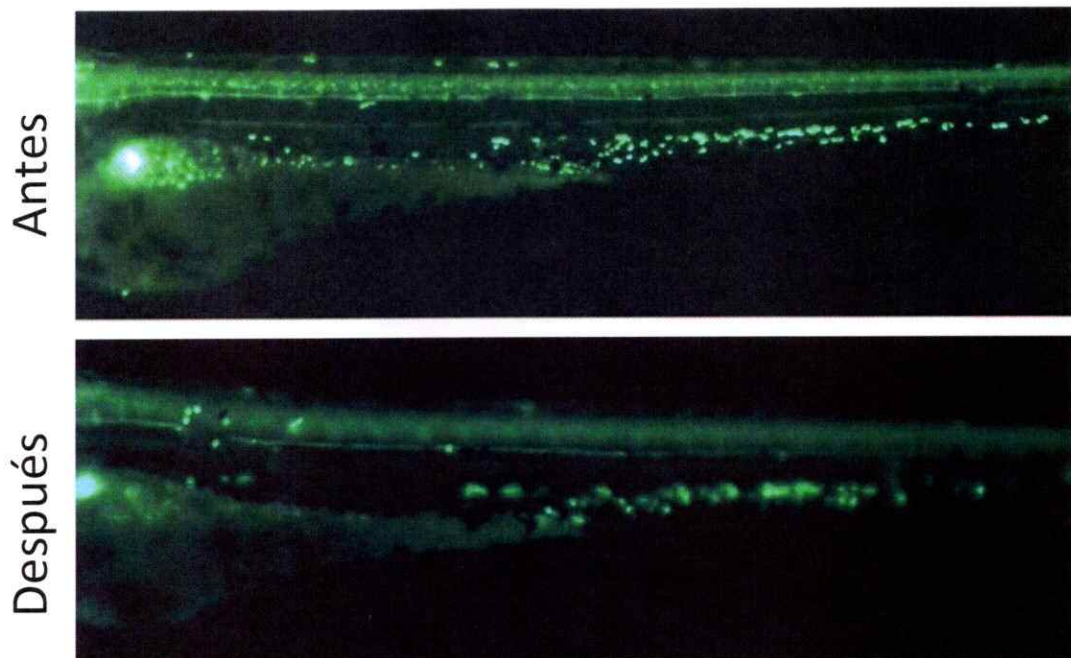


Figura 23. Antes y después de la axotomía en una misma larva de 3 dpf  $Mpx:GFP^+/Nrd:GFP^+$ .

El propósito de estos experimentos fue el seguimiento de neutrófilos individuales por largos periodos de tiempo durante la respuesta inmune con el fin de conocer sus interacciones, destino celular y capacidad de responder a diversos estímulos. Por un lado, no se logró el seguimiento de células individuales, pero sí se observó que los neutrófilos son capaces de responder a más de un tipo de daño durante una respuesta inmune y que daños consecutivos provocan una iteración en la respuesta celular a ellos. En todas las ocasiones se observó que aquellas células que respondían rápidamente al daño residían en la zona más cercana a éste, por lo que la migración celular que se induce por un proceso de quimiotaxis es proporcional a la distancia de las células al foco de la señal. A pesar de lo anterior, los experimentos de electroablación nos permitieron determinar que un daño focalizado puede concentrar una respuesta sistémica del sistema inmune innato, ya que células ubicadas a gran distancia del



evento podían integrarse a la respuesta. Un efecto similar se ha visto en peces adultos frente a un corte en la aleta caudal (resultados no publicados de Marjorie Alvarez).

#### **La respuesta del sistema inmune innato del pez cebra a la presencia de células de *Chlamydomonas reinhardtii***

Como capítulo anexo de este trabajo, también se evaluó la respuesta del sistema inmune innato de larvas de pez cebra en presencia del alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* internalizada en su organismo.

En 1772, Joseph Priestley demostró claramente la dependencia a la fotosíntesis que tienen los animales para su supervivencia. Mostró que un ratón muere si se encuentra en un compartimento completamente cerrado, pero sobrevive si además se introduce una planta en el compartimento. Priestley concluyó que las plantas restauran aquello que los animales remueven (Priestley, 1772). Posteriormente, se estableció que el oxígeno era la molécula liberada por las plantas y requerida por los animales. Esta fuerte dependencia de los animales de un suministro externo continuo de oxígeno contrasta con otras moléculas clave para el metabolismo celular, que pueden almacenarse en tejidos especializados. Por ejemplo, el calcio se almacena en los huesos y la energía en el tejido graso, lo que confiere un cierto grado de autonomía a los animales.

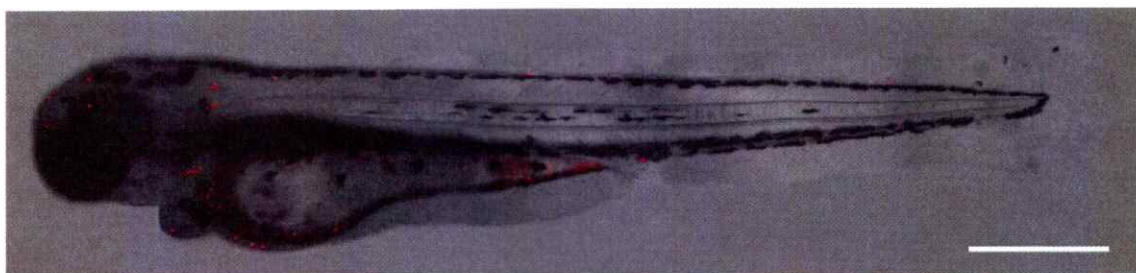
Aunque la gran mayoría de los animales no producen oxígeno, unas pocas excepciones han demostrado que la capacidad fotosintética es fisiológicamente compatible con la vida animal. Este fenómeno ha llamado la atención de los científicos desde el siglo 19 cuando se reportó acerca de la presencia de pigmentos verdes en animales (De Negri, 1876). Mecanismos especiales para establecer relaciones simbióticas con algas unicelulares o cianobacterias han aparecido en animales de algunos órdenes (Mollusca, Porífera, Cnidaria, Acoelomorpha y

Chordata (Rumpho y cols. 2011). Entre tales organismos, probablemente el mejor estudiado es la babosa de mar *Elysia chlorotica*, que desarrolló una estrategia de camuflaje basado en cloroplastos simbióticos, los que se incorporan específicamente en las células intestinales a través de fagocitosis. Como consecuencia de esta relación simbiótica, *E. chlorotica* no sólo se ve como una planta, sino que también es fotosintéticamente activa, mediante la fijación de carbono y la liberación de oxígeno en presencia de la luz (Rumpho y cols. 2000). Curiosamente, *E. chlorotica* puede sobrevivir durante varios meses en cautiverio sin un suministro de alimento externo, siempre y cuando sea expuesta a la luz. Sin embargo, este tipo de relaciones simbióticas parecen estar restringidas a unos pocos organismos acuáticos no vertebrados, llamados "Plantimals". En este sentido, nos preguntamos si es posible generar "Plantebrates", es decir, si es posible incorporar células eucariotas fotosintéticas en un modelo animal vertebrado. En el presente trabajo, se microinyectó la microalga *C. reinhardtii* en embriones de pez cebra y se estudió la interacción y viabilidad de ambos organismos. Por primera vez, se establece un modelo de simbiosis vertebrado-planta en que se evalúa la factibilidad de la sobrevivencia de *C. reinhardtii* en un animal que posee un sistema inmune funcional.

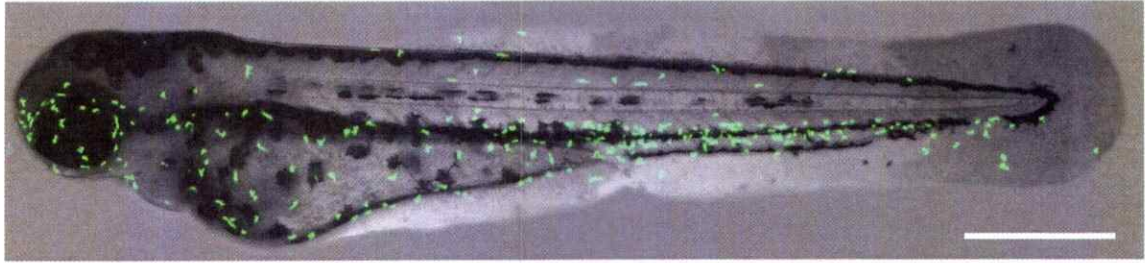
Como parte de este trabajo de caracterización de las células inmunes presentes en la larva del pez cebra y su comportamiento, se efectuaron experimentos con un microorganismo, *C. reinhardtii*, que es un alga unicelular. El objetivo consistió en determinar si las células inmunes (principalmente los neutrófilos) son capaces de detectar estas algas unicelulares e interactuar con ellas. En el laboratorio se desarrolló un protocolo de microinyección de una suspensión de algas para estos efectos. Las algas poseen autofluorescencia roja por presencia de clorofila y por lo tanto, son fácilmente visualizadas durante el desarrollo del pez. La mayoría de embriones microinyectados con algas sobrevivieron hasta al menos 5 dpf. Además, se confirmó

la sobrevivencia de las algas en larvas de pez cebra (figura 24). En las larvas sobrevivientes no se indujo una respuesta inmune innata evidente, según la distribución de los neutrófilos respecto del control. En la figura 25, la cual corresponde a una situación control, los neutrófilos se observan mayoritariamente en el tejido caudal hematopoyético (TCH), el vitelo y la zona anterior de la larva. Se sabe que frente a un daño o infección, los neutrófilos responden inmediatamente y migran al sitio, ya sea por el torrente sanguíneo o intersticialmente. El mecanismo que utilizan los neutrófilos para neutralizar un daño o patógeno es la liberación de enzimas al medio, pero también se ha descrito que son capaces de fagocitar. En las larvas inyectadas con algas no se observó fagocitosis y tampoco un reclutamiento particular robusto de los neutrófilos alrededor de las algas (figura 26-A). Sin embargo, se observaron algunos casos donde un alga que ha perdido la forma circular característica y su autofluorescencia, se encuentra rodeada de neutrófilos (figura 26-E).

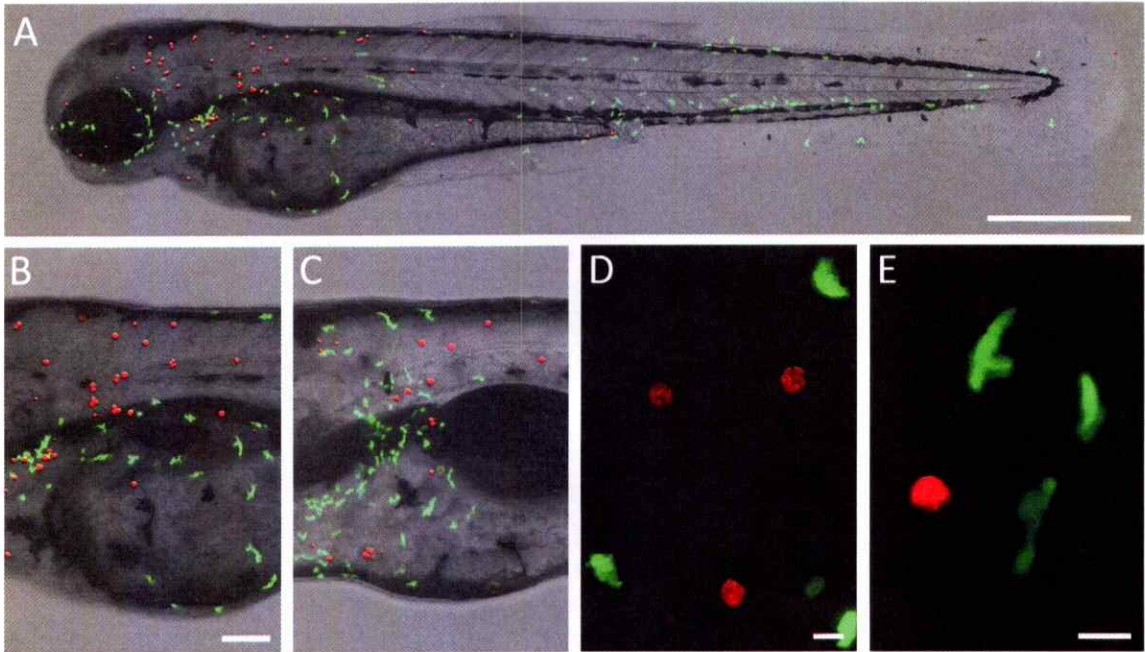
Se analizaron las larvas hasta los 5 dpf y se observó que las algas ocupaban mayoritariamente la zona anterior de la larva. Se realizó un seguimiento de la cantidad de algas presentes en las larvas de 3 a 5 dpf y se observó una disminución de éstas (figura 26-B, C). Aquellas algas que se mantuvieron en el cuerpo de la larva se situaban en las mismas regiones comparando los 3 y 5 dpf.



**Figura 24.** Larva de 3 dpf microinyectada con *C. reinhardtii*. Las algas se observan en color rojo dispersas en el cuerpo de la larva, mayoritariamente en la zona anterior.



**Figura 25.** Larva control Mpo:GFP de 3 dpf. Se observan a los neutrófilos principalmente en el TCH y en la zona anterior de la larva (ojo y vitelo). Algunos neutrófilos patrullan alrededor del miosepto.



**Figura 26.** Larva de 3dp Mpo:GFP microinyectada con *C. reinhardtii* (A). En (B) se muestra un acercamiento de la larva en (A). En (C) se observa la misma larva que en (B) pero a los 5 dpf. En (D) se observan claramente 3 algas en color rojo y 4 neutrófilos en color verde. En (E) se observa que un alga ha perdido fluorescencia y la forma circular además de 3 neutrófilos y un alga en buenas condiciones.

La introducción de algas unicelulares en larvas de pez cebra tenía dos propósitos vinculados a este trabajo. Por un lado, deseábamos establecer una metodología para la incorporación estable de microorganismos en los embriones y larvas para luego estudiar la potencial respuesta inmune que éstos podrían generar. Lo segundo, era determinar si era posible lograr la persistencia de las algas en los peces para la generación de individuos fotosintéticos como resultado de una simbiosis. Los resultados muestran que ambos objetivos se cumplieron. Las

larvas de pez cebra sobreviven la microinyección del alga unicelular *C. reinhardtii* y también, el alga es capaz de sobrevivir por al menos 5 dpf en el cuerpo de las larvas. Sin embargo, observamos una disminución en el número de algas sobrevivientes en las larvas a medida que el tiempo transcurrió.

La disminución de las algas en las larvas de 5 dpf respecto a lo observado a 3 dpf puede explicarse de varias formas y se requiere de una investigación más exhaustiva. Las algas son microinyectadas en los embriones desde que tienen 1 célula y probablemente el sistema inmune innato no las reconoce como agentes foráneos y dañinos. Esto puede significar que la disminución de algas sea consecuencia de muerte celular por falta de nutrientes en los tejidos de las larvas y no a la respuesta inmune. Por otro lado, es posible que los neutrófilos sí reconozcan las algas como cuerpos extraños (presentan en su superficie PAMPs, o patrones moleculares asociados a patógenos) y estén liberando agentes citotóxicos al medio para neutralizar a las algas, fenómeno que no puede ser captado en nuestros experimentos. Por último, los macrófagos podrían jugar un rol en la eliminación de las algas y nuevamente, por haber utilizado una línea transgénica que únicamente revela neutrófilos, no observamos el fenómeno de fagocitosis por parte de los macrófagos.

Como conclusión, el alga unicelular *C. reinhardtii* sobrevive en el interior de -y es compatible con- un animal vertebrado como el pez cebra, al menos por periodos acotados.