

UCH-FC
DOC-BMEN
F954
C1



Estudio de las Propiedades Dinámicas del Citoesqueleto y Análisis de Mutantes de Efecto Materno Durante la Segregación Ovocitoplásmica

Tesis entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial

de los requisitos para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

Por

Luis Ricardo Fuentes Pardo

Enero, 2012

Director de Tesis:

Dr. Juan Fernández Hidalgo

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

LUIS RICARDO FUENTES PARDO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 24 de Octubre de 2011.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Juan Fernández Hidalgo



COMISION DE EVALUACION DE LA TESIS

Dr. Miguel Allende (Presidente)



Dr. Octavio Monasterio

Dr. Juan Larráin

Dr. Mauricio González



Dr. Christian González



A mis padres, hermanas y esposa

BIOGRAFIA



La historia comienza hace un tiempo atrás, en una galaxia muy, muy lejana... en Providencia, el día 7 de Diciembre de 1978, cuando las estrellas se alinearon cercanas al sistema Dagobah para anunciar la llegada de quien traería equilibrio a la Fuerza.

Mis recuerdos de la infancia comienzan dentro de un excelente núcleo familiar, junto a mis padres y hermanas en la ciudad del futuro como la llamaban... San Bernardo o San Beca para los amigos. Allí realicé gran parte de mis estudios básicos, desarmando y armando mis robots y autitos luminosos, entre eternas batallas en los videos del paradero 40 de la Gran Avenida, viajes al cerro Chena y en las canchas de Tenis donde trabajaba mi padre.

Ya adolescente, volví a Ñuñoa para realizar mis estudios de enseñanza media en el emblemático Liceo Particular INSUME, frente del mítico Restaurant "La Paila" donde cruzar a jugar a los videos a dicho lugar ó aplanar la vereda de la esquina junto a los compañeros fue también parte de mis estudios secundarios. Ya en tercero y cuarto medio y dada la cercanía, comenzaron algunos formidables paseos por el Campus Juan Gómez Millas, lugar que finalmente sería mi refugio por muchos años más.

Años más tarde, ingresé a Licenciatura en Ciencias con mención en Biología en la Universidad de Chile, carrera que estableció aún más mi nexo con esta ciencia y además me permitió conocer a grandes amistades que afortunadamente aún tengo el agrado de mantener.

Ya en mi segundo año de licenciatura, surgió la motivación por investigar y hasta el día de hoy me encuentro trabajando en el área de la Biología Celular y del Desarrollo junto al Dr. Juan Fernández. Además, una colaboración junto a mis amigos César Díaz y Luis Pouchucq en sus proyectos de investigación motivaron aún más el querer adquirir mayor conocimiento y experiencia en otros aspectos de la Biología. Es por eso que ingresé al programa de Doctorado BMCN en la misma Universidad. En el, me reencontré con compañeros de la licenciatura y conocí a otros con los cuales entablamos relaciones muy estrechas.

Durante mi primer año de tesis, la conocí a ella... a Lorena, en la actualidad mi flamante esposa !!!... la mujer que trajo orden a mi aún adolescente vida y que fue mi gran apoyo en el momento de la partida de uno de mis mentores durante mi formación... mi gran tío, bullanguero y filósofo Marco Fuentes.

Hoy, parte de la historia finaliza con esta tesis. Lo que sigue en nuestro camino pretendemos continúe en otro lugar y para eso estamos trabajando.

TIP para las generaciones venideras:

"Concéntrate en el momento, siente, no pienses". —Qui-Gon Jinn a Anakin Skywalker, antes de la carrera en Boonta Eve.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por la esforzada, delicada, cariñosa y por sobre todo relevante dedicación que han y aún siguen entregando para el crecimiento y desarrollo de sus hijos... como así también para el de sus nietos.

A mis hermanas, por el amor incondicional que siempre me han demostrado y entregado. Amor que hoy tengo el agrado de compartir con mis excelentes cuñados Omar y Miguel Angel y por sobre todo con mis hinchas número uno Julio, Jeremy, Marco y Sebastián.

A mi nueva familia integrada por la Ricky, Pablo, Raquel y su familia, Albán, Valentina, Iván y el super Antu. Gracias por la calurosa y acogedora bienvenida y por tantos momentos agradables que hemos compartido y por los que seguiremos compartiendo por mucho tiempo más.

A mi tutor, el Dr. Juan Fernández, que desde que llegué a su laboratorio ha sabido entregar tiempo, experiencia, sabiduría científica, paciencia y dedicación a mi formación. Gracias por aceptar el desafío de indagar y trabajar en un área de la biología nueva para nuestro laboratorio y por esos consejos críticos que hicieron posible durante este trabajo un continuo diálogo para el enriquecimiento de nuestro conocimiento.

A los integrantes del laboratorio de Biología Celular del Desarrollo por transmitirme lo que es el trabajo en equipo y el entusiasmo compartido de trabajar con el pez cebra. A aquellos que fueron parte de él: Andrea Ubilla, Jessica Toño, Macarena Valladares, Rodrigo Álvarez, Bendelín Hernández, Uziel Carrera, Miguel Salinas, Luis Ossa, Felipe Oyarzún y a los que en la actualidad lo son: Víctor Guzmán, Francisco Araya, María Fernanda Palominos, Aroldo, Las Sanguijuelas y Los Patos. Gracias a todos ellos, ya que de alguna u otra manera han sido parte importante de mi trabajo. Gracias por sus ayudas puntuales, comentarios, horas agradables durante el día, el almuerzo, el postre y sobre todo por las interesantes discusiones para el desarrollo de esta tesis.

A mis profesores de pregrado, postgrado y a los integrantes de mi comisión de doctorado por sus enseñanzas y entusiasmo invertido en la discusión de resultados durante todo mi proceso de formación.

Al Dr. Octavio Monasterio, Dr. Miguel Allende, Dra. Verónica Palma y Dr. Alvaro Glavic por darme las facilidades de completar parte importante de mi trabajo en sus laboratorios y por permitirme interactuar con la gente que ahí trabaja. En particular al Dr. Alvaro Glavic por su buena disposición en la revisión del escrito y comentarios positivos de mi trabajo durante su escritura.

A mis amigos en la ciencia y a los que no son parte de ella. Gracias a todos que acompañaron y acompañan mi día a día y por todas las experiencias vividas. En especial, a mi gran amigo Leonardo, Emler, a la Vivi, la Carmen, Javiera, Polo, Elvis, Consuelo, Claudio y Luis por sus consejos de biología molecular y de la vida. A todas las ninfas. Al Undu, César, Francisco, Canicas, Alexander, Raúl, Andrés,

Omar, Rodrigo, integrantes de Pianteam y al resto de los integrantes y barra del Club Deportivo y Social OPA, por aquellos momentos de buenas discusiones, distracción y regocijo en base al color... el color amarillo de OPA.

A los integrantes del laboratorio de la Dra. Mary Mullins por hacerme sentir como en casa. A Sumei Lu, Hong Zhong, Tripti Gupta y Dave Cobb por su asistencia técnica durante mi pasar por Filadelfia. A Elliott Abrams y Lee Kapp por su ayuda y consejos en el clonamiento posicional de *emulsion*. A la Dra. Mary Mullins por darme la oportunidad de realizar parte de mi tesis en su laboratorio, por las agradables conversaciones y por sus aportes al entendimiento del desarrollo embrionario.

Al financiamiento que permitió el desarrollo de mi doctorado en Chile y en el extranjero. Beca para Estudios de Doctorado CONICYT, Beca para Estadías Cortas otorgada por la Vicerrectoría de Estudios Académicos de la Universidad de Chile, Beca de la "Society of Developmental Biology" (SDB) y Beca MECESUP UCH7013.

Finalmente quiero agradecer a mi hermosísima, amada y adorada esposa Lorena. Por ser el complemento que me ha entregado un apoyo y cariño incondicional desde que comenzó nuestra historia y la de esta tesis. Por todos esos momentos que hemos compartido y compartiremos en pos de nuestra carrera de científicos y de amantes...

INDICE

1.	INTRODUCCION.....	1
	1.1. Acumulación de determinantes maternos y. el proceso de segregación ovoplásmica durante la gametogénesis.....	2
	1.2. El cigoto del pez cebra como modelo para el estudio de la segregación ovoplásmica.....	5
	1.3 Papel del citoesqueleto en la segregación ovoplásmica.....	9
	1.4 Organización y propiedades dinámicas del citoesqueleto.....	12
	1.5 Motores moleculares en el movimiento del citoesqueleto y el transporte de organelos, proteínas y RNAs.....	13
2.	HIPOTESIS.....	20
3.	OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS.....	20
4.	MATERIALES Y METODOS.....	22
	4.1. Materiales.....	22
	4.1.1. Material Biológico.....	22
	4.1.2. Reactivos de uso común.....	22
	4.1.3. Soluciones.....	23
	4.1.4. Anticuerpos.....	25
	4.1.5. Reactivos de Biología Molecular.....	26

4.1.6. Partidores.....	27
4.1.7. Medio de Cultivo.....	28
4.1.7.1 Medio de Luria-Bertani (LB).....	28
4.2 Métodos.....	28
4.2.1. Mantenimiento y colección de ovocitos, huevos y cigotos...	28
4.2.2. Fijación ácida de cigotos y embriones tempranos completos.....	29
4.2.3. Tinción del DNA nuclear.....	29
4.2.4. Inmunohistoquímica.....	29
4.2.5. Seguimiento de inclusiones citoplasmáticas, dextrano y microesferas fluorescentes.....	31
citoplasmáticas y microesferas fluorescentes.....	32
4.2.7. Video microscopía de fluorescencia y confocal, obtención y procesamiento de imágenes.....	32
4.2.8. Determinación del volumen del blastodisco y de la esfera de vitelo durante la primera interfase.....	33
4.2.9. Tratamiento con drogas que afectan el citoesqueleto.....	34
4.2.10. Extracción de proteínas asociadas al citoesqueleto e Inmunoblot.....	35
4.2.11. Inhibición de la actividad de motores moleculares.....	38
4.2.12. Hibridación <i>in situ</i> en cigotos y embriones tempranos.....	39
4.2.12.1. Obtención de DNA plasmidial.....	39
4.2.12.2. Síntesis de sondas antisentido.....	39

4.2.13. Generación y obtención de mutantes de efecto materno <i>bucky ball</i> y <i>emulsion</i>	41
4.2.14. Clonamiento posicional del gen <i>emulsion</i> (<i>emn</i>).....	43
4.2.14.1. Análisis bioinformático de la mutación <i>emn</i>	43
4.2.14.2. Búsqueda de nuevos marcadores polimórficos cercanos al locus <i>emn</i>	44
4.2.14.3. RT PCR y secuenciación de genes candidatos.....	45
5. RESULTADOS.....	48
5.1. Análisis de la segregación ovoplásmica en el cigoto y embrión temprano del pez cebra.....	48
en 3 estados relacionados con cambios nucleares que caracterizan el primer ciclo celular.....	48
5.1.b. La formación del blastodisco se asocia con la reorganización del endoplasma y su transporte hacia el polo animal del cigoto.....	52
5.1.c. El flujo ovoplásmico ocurre a distintas velocidades: lento, rápido y ultrarápido.....	56
5.1.c.1. Movimiento lento de endoplasma y ectoplasma durante la primera interfase (estado 1b).....	56
5.1.c.2. Crecimiento del blastodisco durante el flujo lento de ovoplasma (estado 1b).....	60
5.1.c.3. Movimiento rápido de endoplasma y ectoplasma durante la primera división de clivaje (estado 1c	

temprano).....	63
5.1.c.4. Movimiento lento de ovoplasma durante el término de la primera división de clivaje (estado 1c tardío).....	67
5.1.c.5. Movimiento de ovoplasma en el huevo no fecundado y durante el transcurso del clivaje.....	67
5.1.c.6. El fenómeno de las pulsaciones.....	70
5.2. Análisis de la organización y propiedades dinámicas del citoesqueleto durante la segregación ovoplásmica.....	70
5.2.a. Organización del citoesqueleto en lagunas de endoplasma y canales de transporte o “streamers”.....	70
5.2.b. Efecto de venenos del citoesqueleto.....	74
dependientes del citoesqueleto de actina.....	74
5.2.c. Identificación y distribución de motores moleculares y proteínas asociadas al citoesqueleto.....	78
5.2.d. Análisis del papel de motores moleculares en el flujo ovoplásmico.....	83
5.2.e. Localización y distribución temporal de transcritos maternos durante la segregación ovoplásmica.....	87
5.2.e.1. Distribución de <i>gsc</i> , <i>sqt</i> y <i>vas</i>	87
5.3. Análisis de las alteraciones de la segregación ovoplásmica provocadas por mutaciones de efecto materno.....	90
5.3.a. El mutante de efecto materno <i>bucky ball</i> (<i>buc</i>).....	90
5.3.a.1. El mutante <i>buc</i> muestra una pérdida de la polaridad	

animal/vegetal y la formación de numerosos dominios de ovoplasma (blastodiscos) alrededor del cigoto y embrión temprano.....	91
5.3.a.2. Organización del endoplasma y del citoesqueleto durante el desarrollo temprano del mutante <i>buc</i>	96
5.3.a.3. El transporte de ovoplasma y de transcritos maternos en el mutante <i>buc</i> es multidireccional.....	101
5.3.b. El mutante de efecto materno <i>emulsion (emn)</i>	106
5.3.b.1. El fenotipo <i>emn</i> muestra defectos en el transporte de ovoplasma y en la formación del eje dorsal.....	106
5.3.b.2. Organización del endoplasma y de sus rutas de mutante <i>emn</i>	112
5.3.b.3. El transporte de ovoplasma y mRNAs en el mutante <i>emn</i> ocurre más lento y probablemente por rutas alternativas.....	113
5.3.b.4. Organización del citoesqueleto durante el desarrollo temprano del mutante <i>emn</i>	116
5.3.b.5. Identificación molecular del gen <i>emn</i>	119
5.3.b.5.1. El gen <i>emn</i> codifica para un transportador Ca^{2+}/H^{+} de tipo II.....	119
6. DISCUSION.....	127
6.a. Una red de citoesqueleto; junto a motores moleculares están	

probablemente involucrados en el transporte de ovoplasma hacia el blastodisco.....	127
6.b. El transporte rápido de endoplasma está asociado a la contracción de actina y a la formación de “streamers” largos.....	133
6.c. Movimiento de ectoplasma animal, pero no vegetal, hacia el blastodisco.....	134
6.d. Los “streamers” como rutas de transporte de mRNAs hacia el blastodisco.....	135
6.e. Pulsaciones en el cigoto y embrión temprano del pez cebra.....	136
6.f. Mutantes de efecto materno para el estudio de la segregación ovoplásmica.....	137
el ovocito.....	138
6.f.2. Una expansión de la identidad animal en el mutante <i>buc</i> tiene como consecuencia un cambio en la dirección del flujo de ovoplasma.....	140
6.f.3. El gen <i>emn</i> y su papel en el transporte de ovoplasma y en la determinación del eje dorsal.....	143
6.f.4. Posible papel del gen <i>emn/cax1</i> en la regulación de la segregación ovoplásmica.....	146
7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	150
8. ANEXO I	151

8.1. Material Suplementario.....	151
9. BIBLIOGRAFIA.....	153

LISTA DE TABLAS

1.	Tabla 1. RNAs polimerasas y enzimas de restricción utilizadas en la síntesis de las sondas de <i>gsc</i> , <i>sqt</i> y <i>vasa</i>	26
2.	Tabla 2. Lista de partidores utilizados.....	27
3.	Tabla 3. Tiempos de desarrollo del cigoto, expresado en minutos, en función de la temperatura.....	49
4.	Tabla 4. Cambios en el volumen del blastodisco y la esfera de vitelo, expresado en nanolitros, durante la primera interfase (estado 1b).....	61

LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1. El pez cebra (*Danio rerio*) y su cigoto como modelo para el estudio de la embriogénesis temprana..... 8
2. Figura 2. Diagrama que ilustra los movimientos de inclusiones citoplasmáticas hacia o desde el blastodisco, a través del ectoplasma y endoplasma 11
3. Figura 3. Diagrama que muestra los genes de mutantes de efecto materno del pez cebra que detienen el desarrollo embrionario en distintos estadios..... 18
4. Figura 4. Estados del desarrollo en el cigoto del pez cebra..... 51
5. Figura 5. Reorganización del endoplasma durante la segregación ovoplásmica..... 55
6. Figura 6. Movimiento lento de inclusiones ovoplásmicas y microesferas fluorescentes..... 58

8. Figura 8. Gráficos que representan los cambios ocurridos en el volumen del blastodisco y la esfera de vitelo durante el flujo lento..... 62
9. Figura 9. Movimiento rápido de inclusiones ovoplásmicas y microesferas fluorescentes..... 65
10. Figura 10. Movimiento de endoplasma y glóbulos de vitelo durante el clivaje en el embrión temprano del pez cebra..... 69
11. Figura 11. Organización del citoesqueleto en lagunas de endoplasma y "streamers"..... 73
12. Figura 12. Efecto de drogas que afectan el citoesqueleto en la generación de pulsaciones y en la organización del endoplasma..... 77
13. Figura 13. Identificación de proteínas asociadas a microtúbulos y filamentos de actina en cigotos del pez cebra..... 80
14. Figura 14. Distribución de motores moleculares y proteínas nucleadoras del citoesqueleto en el cigoto del pez cebra..... 82
15. Figura 15. Efecto de anticuerpos anti-motores moleculares asociados a microtúbulos en el desarrollo temprano del pez cebra..... 85

16.	Figura 16. Efecto de N-etilmaleimida (NEM) y Blebbistatina en el desarrollo temprano del pez cebra.....	86
17.	Figura 17. Distribución de transcritos maternos en los dominios de ovoplasma del cigoto y embrión temprano del pez cebra.....	89
18.	Figura 18. Fenotipo del mutante de efecto materno <i>bucky ball</i> (<i>buc</i>) observado <i>in vivo</i>	93
19.	Figura 19. Organización de ovoplasma durante la embriogénesis temprana del mutante <i>buc</i> después de la fijación ácida.....	95
20.	Figura 20. Reorganización del endoplasma para la formación de rutas de transporte radiales en el mutante <i>buc</i>	97
21.	Figura 21. Organización del citoesqueleto y establecimiento de ciclos celulares durante el desarrollo temprano del mutante de efecto materno <i>buc</i>	100
22.	Figura 22. Imágenes de una animación que muestran el flujo ovoplásmico en el cigoto silvestre y mutante <i>bucky ball</i> microinyectados con dextrano-fluorescente.....	103
24.	Figura 24. Desarrollo embrionario temprano del mutante de efecto materno <i>emulsion</i> (<i>emn</i>).....	109
25.	Figura 25. El huevo del mutante <i>emn</i> no muestra defectos en la exocitosis de los gránulos corticales durante su activación.....	111
26.	Figura 26. El transporte hacia el polo animal de endoplasma y mRNAs maternos está severamente retardado en el mutante <i>emn</i>	115
27.	Figura 27. Organización del citoesqueleto en el cigoto y embrión temprano del mutante <i>emni</i>	118
28.	Figura 28. Cruces para el mapeo fino y propagación de individuos de la línea mutante <i>emn</i>	121
29.	Figura 29. El gen <i>emulsion</i> codifica para <i>cax1</i> , un intercambiador Ca^{2+}/H^{+} de tipo II.....	126

ABREVIATURAS

ASB: Amortiguador de Estabilización de Actina (Actin Stabilizing Buffer)

ATP: Adenosín Trifosfato (Adenosine TriPhosphate)

BCIP: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate

BSA: Albúmina Sérica de Bovino (Bovin Serum Albumin)

BM Purple: NBT/BCIP

DAPI: 4',6'-DiAmidino-2-PhenylIndole

DMSO: Dimetilsulfóxido (DiMetylSulfOxide)

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (DeoxyriboNucleic Acid)

DTT: Ditiotreitól (DiThioThreitól)

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

EGTA: Ácido Etilenglicoltetraacético (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid)

HB: Amortiguador de Homogenización (Homogenization Buffer)

HRP: Peroxidasa de Rábano (HorseRadish Peroxidase)

HEPES: 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic Acid

IgG: Inmunoglobulina G (ImmunoGlobulin G)

IgM: Inmunoglobulina M (ImmunoGlobulin M)

kb: Kilobases

min: Minutos

MPA: Aglutinina de *Maclura pomifera* (Maclura pomifera Aglutinin)

NEM: *N*-etilmaleimida (N-EthylMaleimide)

NBT: Nitro Blue Tetrazolium

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimersase Chain Reaction)

PBS: Amortiguador Fosfato y Sodio (Phosphate Buffer Saline)

PMSF: Fenilmetano Sulfonilfluoruro (PhenylMethaneSulphonylFluoride)

RNA: Ácido ribonucleico (RiboNucleic Acid)

RT: Transcriptasa Reversa (RetroTrascriptase)

s: Segundos

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio (Sodium Dodecil Sulphate)

SSC: Cloruro de Sodio/Citrato de Sodio

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

TBS: Tris Buffered Saline

tRNA: RNA de tórula

PIPES: Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)

µm: Micrómetros

mm: Milímetros

µl: Microlitros

L: Litros

M: Molar

RESUMEN

La distribución de organelos y determinantes citoplasmáticos cambia durante la ovogénesis, pero adquiere un cierto patrón en el cigoto. Así, se forman dominios citoplasmáticos, que son ordenadamente transferidos a los diferentes blastómeros durante las divisiones de clivaje. Vastos movimientos del ovoplasma (citoplasma rico en organelos y ribonucleoproteínas), que ocurren durante el desarrollo temprano del huevo del pez cebra, hacen posible la redistribución y el establecimiento de dominios citoplasmáticos de importancia morfogenética. Este proceso se conoce con el nombre de segregación ovoplásmica, iniciado durante la ovogénesis, reanudado después de la activación del huevo y concluido durante la embriogénesis. El resultado del estudio de cigotos tratados con drogas, que despolimerizan importante en el flujo de citoplasma durante la segregación ovoplásmica. Por lo tanto, el conocimiento de las propiedades dinámicas de los microtúbulos y filamentos de actina es sustancial para comprender cómo se localizan organelos y determinantes maternos.

Por otro lado, la aplicación de variadas técnicas genéticas y moleculares tanto en modelos de invertebrados como vertebrados, ha permitido la identificación de mutaciones de efecto materno que afectan procesos tempranos del desarrollo, pudiendo llegar a detenerlo. Por lo tanto, el conocimiento de la identidad de los genes maternos y la funcionalidad de sus productos es fundamental para determinar cómo es regulado el desarrollo temprano en vertebrados.

Comprender como el citoesqueleto participa en la segregación ovoplásmica y como este proceso prepara el cigoto para la embriogénesis es el principal objetivo de

este trabajo. Para satisfacer este propósito se eligió el cigoto del pez cebra, con el cual se investigaron los siguientes tópicos: a) análisis detallado de los movimientos ovoplásmicos que ocurren en el cigoto y embrión temprano del pez cebra, que junto al citoesqueleto y motores moleculares participan en el traslado de organelos y macromoléculas para formar el blastodisco, lugar que originará el embrión y b) análisis de mutantes de efecto materno cuyos fenotipos muestran alteraciones en la segregación y distribución de dominios de ovoplasma.

Los resultados indican que la segregación ovoplásmica en el cigoto del pez cebra transcurre en tres estados correlacionados con cambios nucleares que caracterizan el primer ciclo celular y que la formación del blastodisco se asocia con la reorganización y el transporte hacia el polo animal de ovoplasma desde la esfera ultrarrápido y a través de rutas precisas de transporte. Además, distintos transcritos maternos e inclusiones citoplasmáticas codistribuyen en éstos canales de transporte o "streamers" y probablemente se mueven junto a diferentes motores moleculares a través de una delicada red tridimensional de microtúbulos y filamentos de actina. Concomitantemente, pulsaciones, dependientes de filamentos de actina, ocurren en general a alta frecuencia a lo largo del eje animal/vegetal del cigoto y embrión temprano, contribuyendo al transporte de ovoplasma hacia el blastodisco.

El análisis fenotípico y del flujo de ovoplasma en mutantes de efecto materno sugieren lo siguiente: 1) que el producto del gen *bucky ball* (*buc*) es responsable del establecimiento de la polaridad animal/vegetal durante la ovogénesis. Además, participa en la regulación de la organización y funcionamiento del citoesqueleto involucrado en la segregación ovoplásmica, ya que el flujo

unidireccional de ovoplasma hacia el blastodisco, observada en el cigoto silvestre, se transforma en un flujo multidireccional hacia la periferia en el cigoto mutante. Se confirma así, la pérdida de la polaridad descrita por la mutación de éste gen y 2) que el producto del gen *emulsion* (*emn*) regularía también el patrón de organización del citoesqueleto y los movimientos citoplasmáticos del cigoto, ya que el flujo de ovoplasma es más lento que en el cigoto silvestre, afectando el traslado de determinantes citoplasmáticos de gran importancia morfogénica hacia el blastodisco. Importantes resultados se han obtenido durante este trabajo en relación al clonamiento posicional y la identificación molecular del gen *emn*. Este codifica para el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ ó *Cax1* (CAtion/proton eXchanger 1), proteína requerida para el mantenimiento de la homeostasis de estos iones durante la desarrollo temprano de un vertebrado. Futuros estudios funcionales permitirán averiguar cómo el gen *emn/cax1* regula los movimientos citoplasmáticos durante la segregación ovoplásmica.

ABSTRACT

The distribution of organelles and cytoplasmic determinants changes during oogenesis, but acquire a certain pattern of distribution in the zygote. This leads to formation of cytoplasmic domains, which are orderly transferred to different blastomeres during cleavage divisions. Evident ooplasm (cytoplasm rich in organelles and ribonucleoproteins) movements during early development of the zebrafish egg, allow the redistribution and establishment of cytoplasmic domains of great morphogenetic importance. This process is known as ooplasmic segregation, initiated during oogenesis, reactivated after egg activation and concluded during embryogenesis. The study of zygotes treated with drugs that depolymerize microtubules and actin filaments, indicates that the cytoskeleton plays an important role. The dynamic properties of microtubules and actin filaments is substantial to understand how organelles and maternal determinants become localized.

On the other hand, the application of various genetic and molecular techniques to both vertebrate and invertebrate organisms allowed the identification of maternal effect mutations that affect early developmental processes. Therefore, knowledge of the identity of the maternal genes and the functionality of their products is essential to determine how development is regulated in early vertebrate development.

An understanding of how the cytoskeleton participates in ooplasmic segregation and how this process prepares the zygote for embryogenesis is the main aim of this work. To this end the following topics were investigated: a) detailed analysis of ooplasmic movements taking place in the zebrafish zygote and early

embryo, that together with the cytoskeleton and molecular motors are involved in the transport of organelles and macromolecules to form the blastodisc, region that will originate the embryo and b) analysis of maternal-effect mutants whose phenotypes show alterations in the segregation and distribution of ooplasmic domains.

Results indicate that ooplasmic segregation in the zebrafish zygote occurs in three steps correlated with nuclear changes that characterize the first cell cycle and that the formation of the blastodisc is associated with ooplasm reorganization and transport to the animal pole from the yolk cell. Ooplasmic flow occurs at different speeds: slow, fast and ultrafast and along precise transportation routes. In addition, different maternal transcripts and cytoplasmic inclusions codistribute along these transport channels or "streamers" and probably move together with different microtubules and actin filaments. Actin filament-dependent pulsations generally occur at high frequency along the animal/vegetal axis of the zygote and early embryo, contributing to the transport of ooplasm toward the blastodisc.

A phenotypical analysis and the study of ooplasmic flow in maternal-effect mutants, suggest the following: 1) that the product of the *bucky ball* (*buc*) gene is required for the establishment of animal/vegetal polarity during oogenesis. Furthermore, the gene product participates in the regulation of cytoskeleton organization and function because it transforms the normal unidirectional ooplasm flow toward the blastodisc, into a multidirectional flow toward the periphery of the mutant. This result confirmed the loss of animal/vegetal polarity described for the gene mutation and 2) that the product of the *emulsion* (*emn*) gene appears to regulate the pattern of organization of the cytoskeleton and the cytoplasmic movements of the

zygote. Thus, the ooplasmic flow occurs slower than in the wild type zygote affecting the transfer of cytoplasmic determinants to the blastodisc. Interesting results concerning with the positional cloning and molecular identification of the *emn* gene have been reported in this thesis work. This encodes a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchanger or Cax1 (CAtion/proton eXchanger 1), protein required for the maintenance of ions homeostasis during embryogenesis. This appear to be the first $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ transporter studied in early vertebrate development. Future functional studies are expected to show how the *emn* gene regulates the cytoplasmic movements during ooplasmic segregation.

1. INTRODUCCION

Un interesante problema en el desarrollo embrionario temprano tiene que ver con los mecanismos por los cuáles distintos componentes del huevo son segregados para formar dominios citoplasmáticos ricos en organelos y ribonucleoproteínas. La ordenada transferencia de estos dominios durante el desarrollo temprano lleva a la canalización de los determinantes citoplasmáticos hacia diferentes células embrionarias encargadas de la fundación de los distintos linajes celulares. Este es un proceso dependiente del citoesqueleto y es conocido como segregación ovoplásmica. El cigoto y embrión temprano del pez cebra constituyen un excelente modelo para el estudio de éste proceso. Primero, los movimientos citoplasmáticos en el embrión son bastante evidentes y llevan a la formación de un prominente dominio ovoplásmico, o (Fernández y col., 2006; Fuentes y Fernández, 2010). Segundo, el papel del citoesqueleto en la segregación ovoplásmica puede ser estudiado mediante el uso de drogas que alteran la estabilidad de microtúbulos y filamentos de actina (Katow, 1983; Dondua y col., 1997; Shimizu, 1999; Leung y col., 2000; Fuentes y Fernández, 2010). Tercero, la marcación con precursores fluorescentes permiten el estudio de la participación del citoesqueleto en el transporte de marcadores exógenos y endógenos. Cuarto, la disponibilidad de mutantes de efecto materno que muestran defectos en la segregación ovoplásmica permite el estudio de las bases genéticas del control de éste proceso (Dosch y col.; Wagner y col., 2004; Abrams y Mullins; Lindeman y Pelegri, 2009).

Durante el desarrollo de ésta tesis se describirán los eventos que ocurren en el cigoto y embrión temprano del pez cebra durante la segregación ovoplásmica, con un

enfoque en el patrón de organización del citoesqueleto, los movimientos ovoplásmicos y las rutas para el transporte de organelos y transcritos maternos. Además, se mostrará el resultado del estudio de mutantes de efecto materno que presentan alteraciones en éste proceso, como así también, el clonamiento de uno de los genes involucrados en el control de la segregación ovoplásmica.

1.1. Acumulación de determinantes maternos y el proceso de segregación ovoplásmica durante la gametogénesis

La evidencia experimental suministrada por el estudio de diversos modelos animales del desarrollo indica, que la ontogenia comienza durante la ovogénesis como resultado de la acumulación en el ovocito de organelos y determinantes embriogénesis temprana (St Johnston y Nüsslein-Volhard, 1992; Howley y Ho, 2000; Pelegri, 2003; Lyman-Gingerich y Pelegri, 2007; Nüsslein-Volhard; Marlow y Mullins, 2008). Los determinantes citoplasmáticos son mRNAs producidos por los ovocitos y/o células nodrizas asociadas a él (Selman y col., 1993; Mahajan-Miklos y Cooley, 1994; Fernández y Olea, 1995). Estos transcritos maternos son sintetizados, transportados y finalmente localizados en regiones precisas y específicas del ovocito en crecimiento (Pelegri, 2003; Fernández y col., 2004; St Johnston, 2005). La localización de estos mRNA puede cambiar durante la ovogénesis (Bashirullah y col., 1998; Bally-Cuif y col., 1998; Howley y Ho, 2000; Gore y Sampath, 2002; Pelegri, 2003; Lyman-Gingerich y Pelegri, 2007), pero adquieren un cierto patrón de distribución en el cigoto. Así, se forman dominios citoplasmáticos que son ordenadamente transferidos a los diferentes blastómeros durante las divisiones de

clivaje. La visualización de los dominios de citoplasma (ovoplasma) se ve favorecida cuando el ovocito es transparente y/o sus componentes destacan por sus propiedades ópticas (Hart y Fluck, 1995; Bowerman, 1999; Fuentes y Fernández, 2010).

La segregación ovoplásmica involucra la separación física de vitelo (viteloplasma) del resto de los componentes citoplasmáticos (ovoplasma) y ocurre tanto en huevos que presentan desarrollo en mosaico, como es el caso de muchos invertebrados, o regulado, como en vertebrados. En el primer caso, ésta separación conlleva a la formación de dominios polares de ovoplasma como en oligoquetos (Shimizu, 1982) y sanguijuelas (Fernández y Olea, 1982; Fernández y col., 2004); dominios citoplasmáticos pigmentados con forma de creciente como en el caso de ascidias (Reverberi, 1971; Jeffery y Meier, 1983); plasma germinal en nemátodos e algunos poliquetos y moluscos (Wilson, 1904; Lillie, 1906; Kostyuchenko y Dondua, 2000). En vertebrados un característico ejemplo del establecimiento de dominios de ovoplasma, es la formación de un disco embrionario o blastodisco en embriones de peces, reptiles y aves (Nielsen, 1953).

El papel de la segregación ovoplásmica en la organización y distribución de determinantes morfogenéticos ha sido estudiado en el pasado con el fin de adquirir conocimiento de cómo se establecen los destinos celulares durante el desarrollo temprano. Las propiedades ópticas de algunos huevos y cigotos y su fácil manipulación, ha permitido el estudio *in vivo* de éste proceso y su relación con la formación de dominios específicos de citoplasma. Dentro de los organismos en que se ha estudiado la segregación ovoplásmica se puede mencionar a la ascidia y algunos peces teleósteos (Reverberi, 1971; Jeffery y Meier, 1987; Abraham y col.,

1993; Leung y col., 2000; Fernández y col., 2006; Fuentes y Fernández, 2010).

En el huevo de ascidia, la visualización de la segregación ovoplásmica es favorecida por la presencia de 3 dominios citoplasmáticos pigmentados y/o coloreados: el mioplasma, el endoplasma y el ectoplasma. El mioplasma consiste de un pigmento amarillo/anaranjado y mitocondrias, el endoplasma presenta un color grisáceo y contiene los glóbulos de vitelo, y el ectoplasma, que es más transparente, contiene un fino material granular y membranoso derivado de la vesícula germinal (Conklin, 1905; Jeffery y Meier, 1983; Jeffery, 1984).

La segregación ovoplásmica en el huevo de ascidia comienza rápidamente después de la entrada del espermatozoide, cuando una delgada capa subcortical, el mioplasma, comienza a moverse por la periferia del huevo en dirección hacia el polo creciente amarilla, la cuál será distribuida en células mesenquimáticas y originará a los músculos de la larva durante la embriogénesis (Conklin, 1905). El tratamiento de huevos de ascidia con ionóforo de calcio, induce la formación de la creciente amarilla en lugares ectópicos del huevo, demostrándose así, una participación del calcio en la formación de dominios citoplasmáticos durante la segregación ovoplásmica (Jeffery, 1982). Por otro lado, la redistribución del ectoplasma y del endoplasma durante éste proceso, permitirá la formación de linajes celulares que darán origen a estructuras del embrión derivadas del ectodermo y endodermo, respectivamente.

Adicionalmente, variadas especies de peces teleósteos han sido utilizadas para el estudio de la embriogénesis temprana de vertebrados. Sin embargo, éste estudio ha sido enfocado a eventos como la fecundación y a aquellos que tienen lugar

después del clivaje, haciendo referencia sólo en ocasiones a la segregación ovoplásmica. Lo anterior es apoyado por la escasa literatura disponible sobre éste fenómeno, realizado en peces teleósteos como: medaka (*Oryzias latipes*) y el pez cebra (*Danio rerio*). En ambas especies, se observa el movimiento de ovoplasma hacia el polo animal del huevo y cigoto, para formar el blastodisco (Roosen-Runge, 1938; Beams y col., 1985; Abraham y col., 1993; Iwamatzu, 2004).

Estos estudios, junto a los realizados en otros cigotos como el de anélidos (Fernández y Olea, 1982) y nemátodos (Strome y Wood, 1983), han proporcionado valiosa información para la comprensión de la contribución de la segregación ovoplásmica al desarrollo embrionario temprano.

ovoplásmica

En las últimas décadas, el pez cebra ha emergido como una importante herramienta para el estudio del desarrollo embrionario de vertebrados (Figura 1A). Algunas ventajas de éste modelo son el corto tiempo generacional, fecundación externa y los numerosos embriones obtenidos después de un cruce de individuos adultos. Esto ha permitido el estudio de los mecanismos involucrados en distintos procesos celulares del desarrollo temprano del embrión como: activación del huevo, generación de ondas de calcio, fusión de pronúcleos, segregación ovoplásmica, localización de transcritos maternos, clivaje y establecimiento de ejes (Kane y Kimmel, 1993; Becker y Hart, 1996; Becker y Hart; Mizuno y col., 1999; Leung y col.; Howley y Ho, 2000; Sharma y Kindsey, 2008).

El desarrollo del ovocito en el pez cebra ocurre en 5 estadios (Selman y col.,

1993). La acumulación de mRNAs se inicia en el ovocito de los estados I ó II y su localización puede cambiar en los restantes períodos de la ovogénesis (Bally-Cuif y col., 1998; Howley y Ho, 2000; Gore y Sampath, 2002; Pelegri, 2003). La mayor acumulación de organelos y ribonucleoproteínas parece ocurrir en los estados II-III y la de vitelo en el estado III. La segregación ovoplásmica se inicia dentro del ovario entre los estados IV y V como resultado de: a) la formación de una empalizada de glóbulos de vitelo periféricos que genera una capa de ovoplasma periférico o ectoplasma, b) la segregación de organelos y ribonucleoproteínas dentro de la esfera de vitelo, fenómeno que lleva a la formación de un dominio central de ovoplasma o endoplasma, constituido por una red de lagunas interconectadas y c) la acumulación de ovoplasma en el polo animal del ovocito formando el preblastodisco dominios de ovoplasma en el ovocito V: preblastodisco, ectoplasma y endoplasma. Posteriormente, el ovocito es descargado y su activación por el contacto con agua no induce, como se creía (Ho, 1992; Kimmel y col., 1995; Lee y col., 1996), sino que reanuda el proceso de segregación ovoplásmica (Fernández y col., 2006).

El huevo y cigoto del pez cebra es voluminoso (diámetro alrededor de 700 μm), fácil de obtener y manipular y gracias a su gran transparencia (Figura 1B), los movimientos citoplasmáticos que acompañan a la segregación ovoplásmica son lo suficientemente evidentes como para detectarlos con la ayuda de un microscopio de disección (Roosen-Runge, 1938; Katow, 1983; Leung y col., 2000). Consiste de viteloplasma, que contiene glóbulos de vitelo y de ovoplasma, que contiene citoesqueleto y numerosos organelos y ribonucleoproteínas, distribuidos a lo largo de interconectados dominios ovoplásmicos (Figura 1C). Así, el huevo y cigoto del pez

cebra resultan ser un conveniente modelo para el estudio del establecimiento de dominios citoplasmáticos.

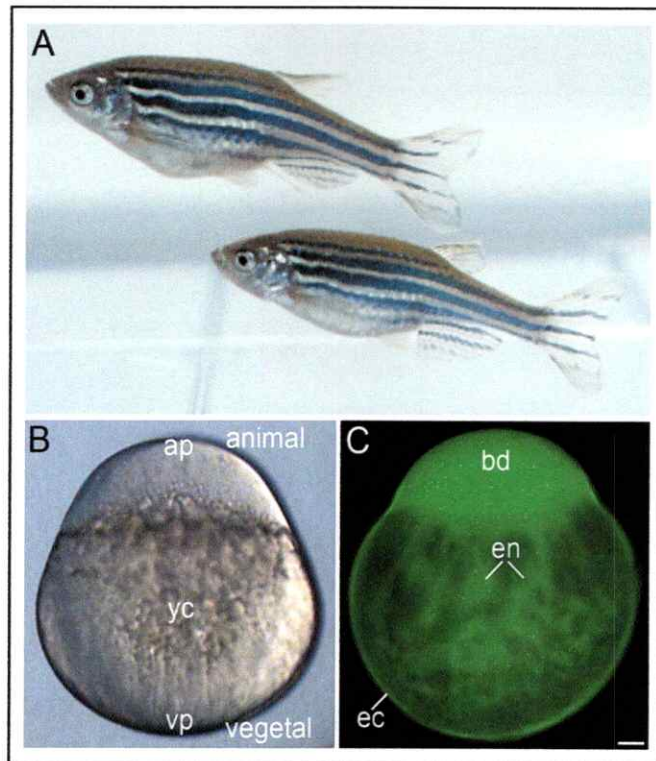


Figura 1. El pez cebra (*Danio rerio*) y su cigoto como modelo para el estudio de la embriogénesis temprana. A: individuos adultos del pez cebra de aproximadamente 1 año de edad (Tomado de Mullins, 2002). **B:** cigoto del pez cebra de 40 min postfertilización (pf) desarrollado a 25 °C que muestra los ejes de polaridad animal/vegetal establecidos durante la ovogénesis y su gran esfera de vitelo central (yc). **C:** cigoto del pez cebra de 45 min pf desarrollado a 25 °C y microinyectado con Dextrano-Fluoresceína de 10 kD. Nótese los 3 dominios de ovoplasma (en verde) formados: blastodisco (bd), endoplasma (en) y ectoplasma (ec). ap, polo animal; vp, polo vegetal; min pf, minutos postfertilización. Barra= 80 μ m (B y C).

1. 3. Papel del citoesqueleto en la segregación ovoplásmica

El análisis realizado sobre la literatura disponible, sugiere que el citoesqueleto está fuertemente involucrado en la segregación ovoplásmica (Jeffery y Meier, 1983; Abraham y col., 1993; Glotzer y Ephrussi, 1996; Dondua y col.; Kempfues y Strome 1997; Fernández y col., 1998; Shimizu; Danilchick y Denegre, 1999; Leung y col., 2000, Fuentes y Fernández, 2010). Entonces surge la pregunta: ¿Cómo participa el citoesqueleto en éste proceso? Esto se ha dilucidado por medio de la acción de drogas que despolimerizan o estabilizan los microtúbulos y filamentos de actina, lográndose establecer que el citoesqueleto está involucrado no solo en el traslado sino también en el anclaje de los determinantes citoplasmáticos.

Este trabajo y el de otros investigadores con el cigoto y embrión temprano del formación de los referidos dominios ovoplásmicos. Así, el tratamiento con venenos de microfilamentos detiene el flujo ovoplásmico (Katow, 1983; Leung y col., 2000). En nuestro laboratorio hemos determinado que durante el desarrollo temprano del pez cebra, el flujo ovoplásmico es intermitente y preferentemente unidireccional (desde el polo vegetal al animal). Además, las inclusiones citoplasmáticas se desplazan a distinta velocidad (Figura 2). El hallazgo de la presencia ubicua de microtúbulos y filamentos de actina a través de todos los dominios de ovoplasma en el cigoto del pez cebra (Fernández y col., 2006; Fuentes y Fernández, 2010), indica que es apresurado proponer que el flujo de ovoplasma en el cigoto del pez cebra es sólo dependiente de filamentos de actina (Katow, 1983; Leung y col., 2000). De acuerdo a esto último, por mucho tiempo se ha pensado que la fuerza que dirige a la segregación ovoplásmica en el pez cebra, es la contracción de un anillo de actina

presente en la region marginal del blastodisco.

Para dilucidar el papel de los filamentos de actina en la segregación ovoplásmica, Leung y col. (2000) bloquearon la contracción del referido anillo de actina mediante el uso de una droga despolimerizante de filamentos de actina como lo es la Citochalsina B. Por otro lado, el uso de una droga que depolimeriza a los microtúbulos, la colchicina, no afectó la segregación ovoplásmica. Sin embargo, existe evidencia de que microtúbulos están involucrados en el transporte de bolitas de látex marcadas (microinyectadas en la esfera de vitelo) y mRNAs en el cigoto del pez cebra (Jesuthasan y Strähle, 1997; Gore y Sampath, 2002; Nojima y col., 2010). Esto sugiere, que no sólo los filamentos de actina tendrían un papel relevante durante la segregación ovoplásmica. Por esto es importante dilucidar la participación de los

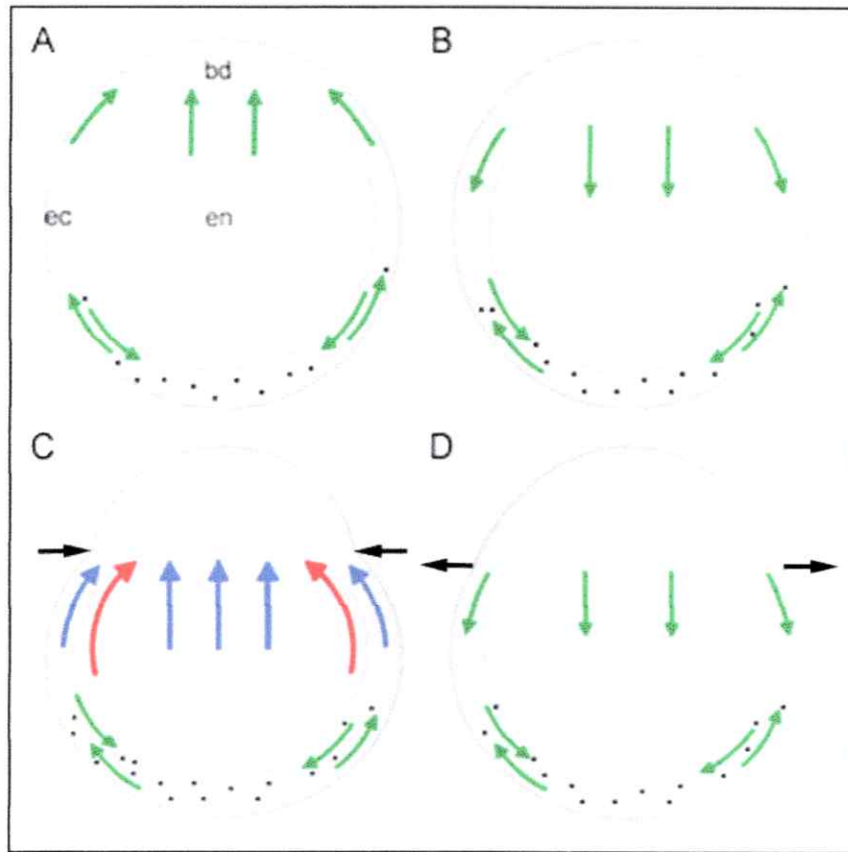


Figura 2. Diagrama que ilustra los movimientos de inclusiones citoplasmáticas hacia o desde el blastodisco (bd), a través del ectoplasma (ec) y endoplasma (en). Vista lateral de: **A y B**, cigotos tempranos. **C y D**, cigoto tardío. Las flechas verdes pequeñas indican la dirección del movimiento lento a lo largo del ecto y endoplasma. Las flechas medianas azules indican la dirección del movimiento rápido a lo largo del ecto y endoplasma. Las flechas grandes rojas indican la dirección del movimiento ultrarápido a lo largo del endoplasma periférico. Los puntos negros indican la presencia de inclusiones que permanecen estacionarias. Además se ilustra el ciclo de contracción/relajación de el anillo de actina en la base del blastodisco. Contracción, flechas negras dirigidas hacia adentro (C) y relajación, flechas negras dirigidas hacia afuera (D) (Tomado de Fuentes y Fernández, 2010).

1. 4. Organización y propiedades dinámicas del citoesqueleto

El estudio de la segregación ovoplásmica permite ahondar en el conocimiento de cómo la organización y propiedades del citoesqueleto permiten el transporte masivo de organelos y ribonucleoproteínas. En el pez cebra, el citoesqueleto de microtúbulos y filamentos de actina está organizado en una red tridimensional que forma parte del ovoplasma. Esto se desprende de la observación que microtúbulos y microfilamentos codistribuyen en distintos dominios ovoplásmicos estudiados por microscopía electrónica e inmunofluorescencia óptica o confocal (Fernández y col., 2006; Fuentes y Fernández, 2010). Por otro lado, el análisis *in vivo* de cigotos de sanguijuela y pez cebra cuyos citoesqueletos han sido marcados con precursores fluorescentes (Fernández y col., 2004 y trabajo no publicado del laboratorio) sugiere manifiesta en su movilidad y alta velocidad de recambio de sus componentes (Gardner y col., 2005).

Propiedades dinámicas del citoesqueleto tales como: inestabilidad dinámica (Kirschner y Mitchison, 1984), “treadmilling” (Neuhaus y col., 1983), nucleación/polimerización y fragmentación/despolimerización (Howard y Hyman, 2007; Roll-Mecak y McNally, 2010) y desplazamiento espacial, juegan un papel importante en el transporte de determinantes citoplasmáticos.

Es importante recalcar que un citoesqueleto que traslada consigo numerosos componentes citoplasmáticos debiera estar sometido a dramáticos cambios de organización que lo harían aún más dinámico. Esto ocurre, por ejemplo, durante la mitosis (Rieder, 1999; Dumont y Mitchison, 2009; Uehara y Goshima, 2010), extensión de lamelipodios (Watanabe y Mitchison, 2002) y motilidad de

fluoroesferas de látex suspendidas en un medio sintético (Pantaloni y col., 2000). Así, uno puede suponer que el citoesqueleto en el cigoto y embrión temprano del pez cebra posee proteínas claves para su reorganización durante la segregación ovoplásmica, tales como GTPasas, Wasp, ARP 2/3, ADF/cofilina, γ -tubulina, etc. y que además han sido identificadas en otros organismos en desarrollo (Higgs y Pollard, 2001; Blair y col., 2006; Liu y Lessmann, 2008). Así, la idea de que una red de citoesqueleto se desplaza durante la segregación ovoplásmica da lugar a un modelo en el que los filamentos de actina y microtúbulos, junto a la acción concertada de numerosos motores moleculares, se desplazarían unos con respecto a los otros (ver Orokos y col., 2000) hacia los polos del cigoto, arrastrando consigo los otros componentes citoplasmáticos.

1. 5. Motores moleculares en el movimiento del citoesqueleto y el transporte de organelos, proteínas y RNAs

Se sabe que el transporte de los diversos componentes celulares, entre ellos organelos y determinantes maternos, es dependiente de motores moleculares (Fernández y col., 1998; Schnorrer y col., 2000; Januschke y col., 2002). Estas ATPasas poseen un dominio catalítico que está altamente conservado en las 3 familias de motores: las kinesinas, dineínas y miosinas. Es por esto que pueden ser detectadas con anticuerpos mono o policlonales provenientes de especies distintas. Hay buenas razones para pensar que el citoesqueleto de microtúbulos y microfilamentos del cigoto del pez cebra (Leung y col., 2000; Fernández y col., 2006; Fuentes y Fernández, 2010) funciona junto a motores moleculares y que en conjunto harían posible el flujo de ovoplasma. Existe evidencia de la presencia de

ciertos motores moleculares como la miosina II en la periferia del huevo recién fertilizado durante la exocitosis de gránulos corticales y la segregación del plasma germinal (Becker y Hart, 1999; Urven y col, 2006) y de una proteína asociada a la kinesina I, como la Sintabulina, y su papel en la determinación temprana del eje dorsal (Nojima y col., 2010). La evidencia existente muestra que motores moleculares están presentes en el cigoto del pez cebra, pero se desconoce como participan en los distintos tipos de flujo ovoplásmico.

Entender cómo los mRNAs son transportados durante la embriogénesis (Bashirulla y col., 1998; Lindemann y Pelegri, 2009) y cómo son derivados a regiones específicas de los blastómeros (Kloc y Etkin; St Johnston; Gore y col., 2005) constituyen un interesante problema a estudiar. Este proceso involucra la sido reportado en organismos como *Drosophila* (Stephenson y col., 1988; Mahajan-Miklos y Cooley, 1994;), *C. elegans* (Kemphues y col., 1988), *Xenopus* (Houliston y Elinson, 1991) y en el pez cebra (Nojima y col., 2010). En la actualidad, el uso de mRNAs marcados fluorescentemente abre la posibilidad de explorar *in vivo* como éstos son translocados (Bullock y Ish-Horowicz, 2001; Gore y col., 2005).

De esta manera, la marcación de componentes del ovoplasma *in vivo* puede constituir un importante paradigma para el estudio de la segregación ovoplásmica y el papel de motores moleculares.

1. 6. Control génico de la segregación ovoplásmica

Un problema central de la Biología del Desarrollo de organismos multicelulares se refiere al control del desarrollo embrionario temprano como resultado de la activación concertada de genes maternos (Alexander y col., 1999a, b). Ya en la década de los 90s, el hallazgo de numerosos mutantes de efecto materno dieron cuenta de un control materno del desarrollo embrionario temprano. Lo anterior, ha sido bien estudiado en invertebrados como la mosca *Drosophila melanogaster* (St Johnston y Nüsslein-Volhard, 1992), el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Kemphues y col., 1988) y en vertebrados como la rana africana *Xenopus laevis* (Wylie y Haesman, 1997; Moody, 1999), el pez cebra (Driever y col.; Hammerschmidt y col.; Mullins y col., 1996) y el ratón (Roy y Matzuk, 2006; Sun y col., 2006). La identificación de mutantes de efecto materno que muestran defectos en el desarrollo embrionario temprano, mediante el uso de mutágenos químicos (Pelegri y col.; Dosch y col.; Wagner y col., 2004) ó de herramientas genético-moleculares como la mutagénesis insercional (Amsterdam y col., 1999; Golling y col., 2002; Kotani y Kawakami, 2008). De esta manera, se ha logrado identificar el producto de genes maternos que controlan los procesos tempranos del desarrollo, fenómeno muy poco explorado en vertebrados.

Durante ésta búsqueda de mutantes de efecto materno en el pez cebra se han identificado más de 60 mutantes en los cuáles se ven afectados procesos temprano del desarrollo como establecimiento de la polaridad animal/vegetal, activación del huevo, segregación citoplasmática, clivaje, establecimiento de ejes y morfogénesis (Pelegri y col.; Dosch y col.; Wagner y col., 2004). La identidad molecular de

algunos de los genes afectados en los mutantes ha sido aclarada y la de otros está en vías de serlo, paso importante para el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en los estados tempranos del desarrollo (Figura 3). Por ejemplo, el mutante de efecto materno *brom bones (brb)* muestra defectos en la activación del huevo, reorganización del citoesqueleto de microtúbulos y establecimiento del eje dorsal del embrión. Hoy sabemos que el mutante *brb* presenta una mutación sin sentido en el gen que codifica para una ribonucleoproteína heteronuclear (hnRNP I) (Mei y col., 2009). El mutante *cellular atoll (cea)* muestra defectos en la celularización del blastodermo y el gen afectado codifica para Sas-6, proteína centriolar fundamental para la duplicación del centrosoma (Yabe y col., 2007). Finalmente, el gen de efecto materno *betty boop (bbp)* codifica para la proteína severamente afectado en el mutante (Holloway y col., 2009). En la mayoría de éstos mutantes el citoesqueleto ha sido afectado, sin embargo, las alteraciones estructurales y funcionales son una consecuencia indirecta de las mutaciones inducidas, ya que el producto de los genes mutados tienen, en general, una acción río arriba de los genes que controlan la organización del citoesqueleto.

De particular interés para éste trabajo son los mutantes de efecto materno *bucky ball (buc)* y *emulsion (emn)*, cuyos fenotipos revelan alteraciones en el establecimiento de la polaridad animal/vegetal y en la segregación de ovoplasma en el cigoto, respectivamente (Dosh y col., 2004). En el mutante *buc* la polaridad animal/vegetal del cigoto ha sido reemplazada por una multipolaridad y un posible flujo radial de ovoplasma conlleva a una acumulación de éste en toda la periferia del cigoto. Por otro lado, en el mutante *emn* el flujo de ovoplasma hacia el polo animal

está retrasado, lo que tiene gran significancia en la formación del blastodisco y en el establecimiento del eje dorsal. La existencia de este tipo de mutantes sugiere fuertemente que distintas etapas de la segregación ovoplásmica estarían reguladas por una secuencia de genes maternos que se expresan en etapas tempranas del desarrollo y el conocimiento de la naturaleza de éstos permitirá contribuir a descifrar la siguiente pregunta: ¿Cuáles son las bases genéticas y moleculares del proceso de segregación ovoplásmica?

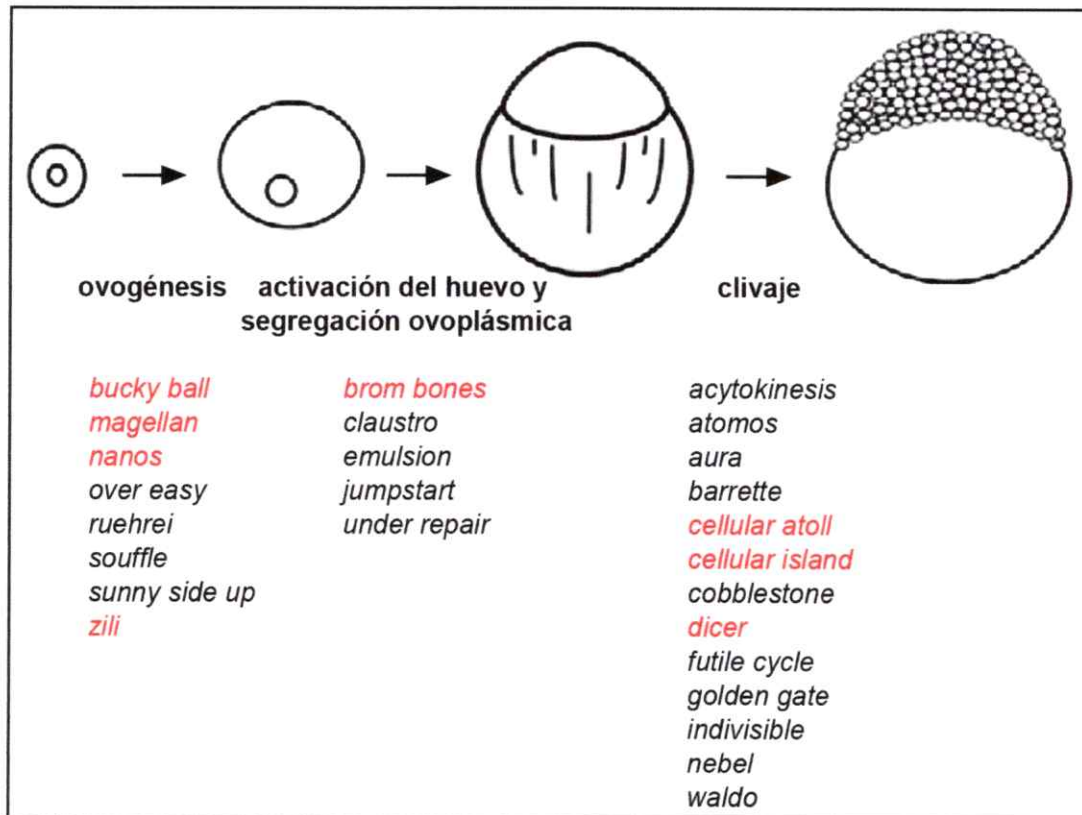


Figura 3. Diagrama que muestra los genes de mutantes de efecto materno del pez cebra que detienen el desarrollo embrionario en distintos estadios. De izquierda a derecha y debajo de cada flecha, se muestran los distintos procesos celulares que tienen lugar durante el desarrollo temprano en el pez cebra antes de la transición de la blástula intermedia. Por debajo de cada proceso, se encuentran algunos de los genes que han sido clasificados, de acuerdo al fenotipo observado en los mutantes, como reguladores de cada uno de éstos. Los genes escritos en rojo representan a aquellos que hasta la fecha ya han sido clonados, mientras que los que están en negro son aquellos que están en vías de serlo (Modificado de Abrams y Mullins, 2009).

El modelo de desarrollo temprano del pez cebra, junto a la disponibilidad de mutantes de efecto materno, ofrece importantes ventajas para profundizar sobre el papel que juega el citoesqueleto en la segregación ovoplásmica. Es por eso que, se propone la siguiente hipótesis.

2. HIPOTESIS

La segregación ovoplásmica en el cigoto del pez cebra ocurriría como resultado del desplazamiento vectorial de una red citoesquelética de microtúbulos y filamentos de actina que, junto a organelos y ribonucleoproteínas, forman el disco embrionario. Este proceso es regulado por genes maternos cuyas mutaciones afectarían directa o indirectamente la estructura y función del citoesqueleto.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio microscópico y un análisis genético-molecular que cómo este proceso prepara el cigoto para la embriogénesis.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Análisis de la segregación ovoplásmica en el cigoto y embrión temprano del pez cebra. Para esto se pretende realizar:

- a) Un estudio de la organización de ovoplasma, después de la activación del huevo, para la formación de rutas para el transporte de organelos y determinantes maternos.
- b) Un estudio del patrón de movimientos citoplasmáticos durante la morfogénesis del blastodisco.

2. Análisis de la organización y propiedades dinámicas del citoesqueleto durante la segregación ovoplásmica. Para lograr este objetivo se propone:

- a) Determinar si organelos y ribonucleoproteínas se mueven insertos al citoesqueleto o se desplazan en procesión a lo largo de los microtúbulos o filamentos de actina.
- b) Determinar la contribución de distintos motores moleculares al movimiento del citoesqueleto, organelos y ribonucleoproteínas.
- c) Determinar la contribución de la nucleación de microtúbulos y filamentos de actina en el recambio de proteínas citoesqueléticas.

3. Análisis de alteraciones de la segregación ovoplásmica provocadas por mutaciones de efecto materno. Para ello se propone lo siguiente:

morfogénesis del blastodisco en los mutantes de efecto materno *bucky ball* y *emulsion*.

- b) Estudio de la organización del citoesqueleto y dirección del flujo de ovoplasma en los mutantes.
- c) Clonamiento posicional e identificación molecular del gen *emulsion*.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Material Biológico

Se utilizaron especímenes del pez cebra (*Danio rerio*). Los peces fueron mantenidos a 28 °C en agua aireada y desionizada preparada con 60 mg/L de Instant Ocean pH 7,0 y sometidos a ciclos de luz/oscuridad (Westerfield, 2000). Los huevos, zigotos y embriones fueron obtenidos mediante cruces espontáneos de líneas silvestres y mutantes, y mantenidos en medio E3. Los peces usados en esta tesis fueron de la cepa silvestre AB y de las líneas mutantes *bucky ball* (*buc*) y *emulsion* (*emn*), ambas obtenidas del laboratorio de la Dra. Mary Mullins (Universidad de Pensilvania, Estados Unidos). La línea mutante *bucky ball* animal/vegetal del ovocito, mientras que la línea mutante *emulsion* corresponde a aquella en la cuál se ve afectada la activación del huevo y la segregación ovoplásmica (Dosch y col., 2004).

4.1.2. Reactivos de uso común

Cloruro de Potasio (Merck), Cloruro de Calcio (Merck), Cloruro de Magnesio (Merck), Cloruro de Sodio (Merck), Cloruro de sodio/Acetato de sodio (Sigma), Hidróxido de Sodio (Merck), Ácido Acético Glacial (Merck), Ácido Isobutírico (Sigma), Ácido Propiónico (Sigma), Ácido Cítrico (Merck), Ácido Clorhídrico (Merck), Ácido cumárico (Sigma), Formaldehído (Merck), Paraformaldehído (Fluka), Tricaína (Sigma), 2-mercaptoetanol (Sigma), Azul de Bromofenol (Merck), Azul de Coomassie R250 (Merck), Azul de Metileno (Fisher

Scientific Company), Tween 20 (Winkler), DAPI (Sigma), Luminol (Sigma), SDS (Merck), BSA (Calbiochem), Acrilamida (Merck), DMSO (Calbiochem), EDTA (Winkler), EGTA (Sigma), PMSF (Sigma), Apirasa (Sigma), Taxol (Sigma), Faloidina (Sigma), Faloidina-Rodamina (Sigma), MPA (E-Y Laboratories, Inc), Colchicina (Sigma), Colcemida (Life Tech), Citochalasin B (Sigma), Latrunculina B (Calbiochem), Dextrano-Fluoresceína (Molecular Probes), Microesferas de carboxilato fluorescentes (Molecular Probes), Anti-proteasas (Sigma), ATP (Sigma), GTP (Sigma), DTT (UsBiological), NEM (Sigma), Blebbistatina (Calbiochem), Formamida (Merck), Glicerol (Merck), Glicina (Merck), Agua sin nucleasas (Winkler), Heparina (Sigma), TRIS-base (Calbiochem), HEPES (Sigma), PIPES (Sigma), Marcador de peso molecular de 200 kD (Fermentas), Etanol

4.1.3. Soluciones

Solución de Fijación/Permeabilización: Formaldehído 5%, Ácido Acético 5-8 %.

PBS 10X: NaCl 1,37 M, KCl 26,8 mM, Na₂HPO₄ 78,1 mM, KH₂PO₄ 14,7 mM, pH 7,5.

Solución de Hanks: NaCl 0,137 M, KCl 5,4 mM, Na₂HPO₄ 0,25 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgSO₄ 1 mM, NaHCO₃ 4,2 mM.

Amortiguador de Establización de Actina (ASB): PIPES 10 mM (pH 7,3), EGTA 10 mM, MgCl₂ 5 mM y KCl 100 mM.

Amortiguador de Homogeinización 1 (HB1): PIPES 100 mM pH 6,9, EGTA 2 mM, MgSO₄ 1 mM, DTT 1 mM, GTP 1 mM.

Amortiguador de Homogeinización 2 (HB2): HEPES 100 mM pH 6,9, EGTA 2

mM, MgSO₄ 1 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM.

Amortiguador de Hibridación: Formamida 50%, SSC 5X, Heparina 50 µg/ml, tRNA 500 µg/ml, Ácido Cítrico 9,2 mM pH 6,0.

Amortiguador de Lisis: TRIS-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,2%, Proteinasa K 200 µg/ml.

Medio E3: NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl₂ 0,33 mM, MgSO₄ 0,3 mM, azul de metileno 0,1%, pH 7,0.

Solución de Bloqueo para Inmunofluorescencias: BSA 2% en solución PBS 1X.

Solución de carga: Amortiguador TRIS-HCl 75 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2.5% (p/v), 2-mercaptoetanol 10 mM, azul de bromofenol 0,01% (p/v).

Solución de gel concentrador: Amortiguador TRIS-HCl 375 mM pH 8,8, SDS

Solución de gel separador: Amortiguador TRIS-HCl 138 mM pH 6,8, SDS 0,1% (p/v).

Solución de Tinción Azul de Coomassie: Azul de Coomassie R250 2,5% (p/v), Metanol 50% (v/v), Ácido Acético 10% (v/v).

Solución de Destinción: Metanol 50% (v/v), Ácido Acético 50% (v/v).

Solución de Bloqueo para Inmunoblot: Amortiguador TRIS-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Leche en polvo descremada comercial 5%.

TBS-Tween: Amortiguador TRIS-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%.

Solución de Transferencia: Amortiguador TRIS 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20%.

Solución de Revelado para Inmunoblot: Amortiguador TRIS-HCl 100 mM pH

8,5, Ácido Cumárico 0,225 mM, Luminol 1,25 mM.

4.1.4. Anticuerpos

Anticuerpos Primarios: anti- α -tubulina monoclonal IgG (Calbiochem), anti-tubulina tirosinada y anti-tubulina acetilada monoclonal IgG (Sigma), anti-actina monoclonal IgM (Calbiochem), anti-miosina IIA no muscular policlonal (Sigma), anti-dineína citoplasmática policlonal (Sigma), anti Arp2 policlonal (Chemicon Inc), anti-Arp3 policlonal (Cytoskeleton Inc), anti-cofilina policlonal (Chemicon Inc), anti-profilina policlonal (Cytoskeleton Inc). En el caso de las hibridaciones *in situ*, se utilizó el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (Roche). La dilución de los anticuerpos primarios utilizados para

los inmunoblots, además de los anticuerpos anti-actina, anti- α -tubulina, anti-miosina IIA y anti-dineína citoplasmática se usaron los anticuerpos anti-dinactina (p50) monoclonal (BD Biosciences), anti-kinesina monoclonal (Sigma), anti-Arp2 policlonal, anti-Arp3 policlonal, anti-cofilina policlonal, anti-profilina policlonal. En este caso, la dilución utilizada fue de 1:2000 en el caso de los anticuerpos anti- α -tubulina y anti-actina y de 1:250 para el resto de los anticuerpos primarios.

Anticuerpos Secundarios: Alexa Fluor 594 de cabra anti ratón IgG, Alexa Fluor 488 de cabra anti ratón IgG (Molecular Probes), Cy2 de cabra anti ratón IgM (Jackson), Alexa 488 y Alexa Fluor 594 cabra anti conejo IgG (Molecular Probes). La concentración de los anticuerpos secundarios utilizados fue de 1:100. Para inmunoblots, se usaron los anticuerpos secundarios policlonales para revelado de quimioluminiscencia de cabra anti conejo IgG-HRP sc 2004 y de cabra anti ratón

IgG-HRP sc 2005 (Santa Cruz Biotechnology). La concentración utilizada es este caso fue de 1:10000.

4.1.5. Reactivos de Biología Molecular

Triptona (BD, Becton/Dickinson y Co), Extracto de Levadura (MoBio Laboratories), Agarosa (Lafken), NBT/BCIP (Sigma), BM Purple (Roche), Proteinasa K (Roche), tRNA (Sigma), Enzimas de Restricción para síntesis de sondas (Fermentas, ver Tabla 1), RNAs polimerasas (Fermentas), Nucleótidos marcados con Digoxigenina (Roche), DNA polimerasa de alta fidelidad *PfuUltra* (Stratagene), DNA polimerasa "Choice Taq Blue" (Denville Scientific Inc), PCR Master Mix (Promega), Transcriptasa Reversa Superscript II (Invitrogen), Trizol DNA plasmidial maxiprep (Qiagen), Kit de extracción en gel (Qiagen), vector pCR[®]2.1 TOPO[®] TA cloning (Invitrogen).

Tabla 1. RNAs polimerasas y enzimas de restricción utilizadas en la síntesis de las sondas de *gsc*, *sqt* y *vasa*. La sonda de *vent* no fue incluida en la tabla, ya que, no fue sintetizada en este trabajo.

Nombre de la sonda	RNA polimerasa	Enzima de reestrcción
<i>goseecoid (gsc)</i>	T7	SmaI
<i>squint (sqt)</i>	SP6	NotI
<i>vasa (vas)</i>	T7	XbaI

4.1.6. Partidores

Los partidores utilizados para el mapeo fino e identificación del locus *emulsion*, como así también para la genotipificación de peces *bucky ball*, son mostrados en la Tabla 2. Todos los partidores fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Inc).

Tabla 2. Lista de partidores utilizados. Se muestra el nombre y la secuencia en una dirección de algunos de los partidores utilizados. F: Forward primer; R: Reverse primer.

Nombre del partidor	Secuencia 5' - 3'
z9247F	CTGCTTGAAAGCCTGAGGAC
z9247R	TGCCCATGTTCATAGCTCTG
z7496F	CGCTCATTAGCATGGACAAG
z7496R	AGACGCAAGGAGGGAAATTT
z24206R	GGAATAATGTGGCAGAGCGT
z13475F	CTCTTCTCCAGTGTGGAGC
z13475R	CCAGCCTGCAGATCTTTTAA
z28278F	TGCGGTGAGATCACACTTCT
z28278R	TTGGGGGAAGTGGCATTATA
(CA) _{n12} F	ATGCAGGTGCAGGACTCTTT
(CA) _{n12} R	TGCACAAACGTTCACTGTCA
(CA) _{n13} F	GAAAAATGGTCTCAATAGGTGAGG
(CA) _{n13} R	GGGTTGCCAAACTTTGACTC
(CA) _{n14} F	GTGGAAAAGGGGGAGTCATT
(CA) _{n14} R	AAAAAGGCTTTCACATTATTTACACA
(CA) _{n15} F	GCAATGTGCTCTGTCAAACG
(CA) _{n15} R	TTCCAGGCCTGCATGTTAGT
(CA) _{n16} F	ACCCTGATGCAGGCACTTAC
(CA) _{n16} R	AGCACCATCACAGCATAGCA
<i>emn/cax1_frag.3F</i>	AGCCACACGTTACTGGTGT
<i>emn/cax1_frag.3R</i>	ACCTGCTGACCTGCTGTTG

<i>emn/cax1_full-length.3F</i>	CCTGAAGCAGGAGGATCAGT
<i>emn/cax1_full-length.3R</i>	TTTTTAAATCATGACGGGTAGC

4.1.7. Medio de Cultivo

4.1.7.1. Medio de Luria-Bertani (LB)

Un litro de éste medio se preparó de la siguiente manera: 10 g de Triptona, 5 g de Extracto de Levadura, 10 g de NaCl, ajustando el pH a 7,5 con NaOH 1N. Posteriormente, el medio LB fue esterilizado mediante autoclave y se agregó el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 µg/ml antes de usar.

4.2. Métodos

Individuos adultos silvestres (wt) del pez cebra (*Danio rerio*) y los mutantes *bucky ball* (*buc*) y *emulsion* (*emn*) fueron mantenidos y sometidos a un fotoperíodo de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad a 28 °C. Un día antes de la colecta de huevos, los machos y hembras fueron separados, con el fin de controlar el tiempo de desarrollo una vez cruzados. Los cruces se realizaron en cámaras de doble fondo para coleccionar los huevos. Las observaciones se realizaron a una temperatura de 20-25 °C y 28 °C (Fernández y col. 2006; Fuentes y Fernández, 2010). La obtención de huevos no fecundados se realizó por laparotomía en hembras previamente anestesiadas con tricaina al 0,2% y fueron colocados en solución de Hanks para evitar su activación. La activación de los huevos se realizó con agua de acuario filtrada ó medio E3.

4.2.2. Fijación ácida de cigotos y embriones tempranos completos

Zigotos y embriones tempranos silvestres y mutantes fueron mecánicamente descorionados y fijados en 3 ml de formaldehído al 5%. Rápídamente se agregaron 30-40 µl de ácido acético glacial a las células en el fijador, agitando constantemente durante 10 min (Fernández y col., 2006; Fuentes y Fernández, 2010). Para su observación, los cigotos y embriones tempranos fueron colocados en placas de cultivo (35x10 mm, CELLSTAR®) en el mismo fijador ácido ó después de 3 lavados de 30 min con PBS 1X. La visualización se realizó bajo microscopía de campo claro, usando la ventaja de inversión de contraste del programa Metamorph 6.1.

Blastodiscos completos fueron disectados con pinzas finas N° 3 o 5 desde cigotos descorionados sometidos a 2h de fijación ácida, los que posteriormente fueron lavados 3 veces por 10 min con PBS 1X e incubados con DAPI 1µg/ml en PBS 1X por 20 min. Después de 3 lavados de 1 h con PBS 1X, los blastodiscos fueron colocados en medio de montaje (glicerol:PBS 1X, 9:1) entre dos cubre objetos separados por pequeños topes de plasticina. Las muestras fueron examinadas bajo microscopía DIC y de fluorescencia combinada.

4.2.4. Inmunohistoquímica

Zigotos y embriones tempranos, silvestres y mutantes, fueron fijados por 2 h en paraformaldehído al 4% ó formaldehído al 5%. Para una mejor preservación del citoesqueleto y de sus proteínas asociadas, en ocasiones se agregó Taxol y Faloidina

(1 µg/ml) al fijador. Después de la fijación, las células fueron lavadas 3 veces por 20 min con PBS 1X y posteriormente incubadas 2-4 h en solución de bloqueo. Para las inmunotinciones los cigotos fueron incubados en el anticuerpo primario a una concentración de 1:100 en solución de bloqueo por 12-18 h a temperatura ambiente. Después los cigotos y embriones tempranos fueron lavados 3 veces por 20 min con PBS 1X, incubados en solución de bloqueo por 2-4 h e inmediatamente incubados en el anticuerpo secundario por toda la noche. Como control de inmunofluorescencia, los cigotos y embriones tempranos fueron solo incubados en el segundo anticuerpo toda la noche a una concentración de 1:100 ó microinyectados con Dextrano-Fluoresceína de 10 kD como control para la detección de estructuras filamentosas en las lagunas. Montajes completos de cigotos y embriones tempranos, previamente punto 4.2.3.

Para la visualización de gránulos corticales, ovocitos, huevos y cigotos fueron fijados con formaldehído frío al 5% en ASB por 2 h. Luego de descorionar las células, éstas fueron tratadas por 30 min con glicina 150 mM-ASB y lavados 3 veces por 15 min en ASB. Posteriormente fueron permeabilizados con Tritón X-100 0,1% en ASB por 40 min e incubados por 90 min en Faloidina-Rodamina y MPA 50 µg/ml (Modificado de Becker y Hart, 1996) para su posterior visualización.

Todas las observaciones se realizaron por microscopía de fluorescencia y confocal.

4.2.5. Seguimiento de inclusiones citoplasmáticas, dextrano y microesferas fluorescentes

Inclusiones citoplasmáticas, dextrano fluorescente de 10 kD o microesferas fluorescentes de 1 μm de diámetro fueron usadas para trazar *in vivo* los movimientos citoplásmicos durante la segregación ovoplásmica y así, determinar la velocidad y dirección a la cuál el ovoplasma es transportado a través del cigoto durante este proceso. Las sondas fueron diluidas en búffer glutamato (Hyman y col., 1991) a una concentración final en la pipeta de 25-50 mM de dextrano y 0.2 % en el caso de las microesferas. Estos trazadores fluorescentes fueron microinyectados con micropipetas preparadas desde capilares de borosilicato (Harvard Apparatus Ltd.) en la esfera de vitelo de cigotos silvestres y mutantes usando un microinyector volúmen del cigoto (~ 200 nl). La difusión de dextrano desde el sitio de inyección hacia los distintos dominios de ovoplasma ocurrió rápidamente. Por el contrario, las microesferas fluorescentes difunden dentro de una misma laguna de ovoplasma y se mueven junto al ovoplasma. Es por esto que, el dextrano fue microinyectado en el centro de la esfera de vitelo, mientras que las microesferas fluorescentes fueron microinyectadas cercanas a la región del cigoto en estudio.

El seguimiento de inclusiones citoplasmáticas y de las sondas marcadas se realizó mediante video animaciones por microscopía de tiempo interrumpido ó "time lapse" con intervalos de 10-13 s entre una imagen y la siguiente. La posición de un determinado objeto fue marcada en cada intervalo de tiempo y éstos fueron seguidos hasta desaparecer del foco. La opción "track points" del programa Metamorph versión 6.1 recreó la trayectoria del objeto, trazando una línea entre cada punto

sucesivamente marcado. En el caso de los objetos que presentaron rápidos movimientos hacia adelante y hacia atrás, el intervalo mínimo de tiempo entre cada imagen capturada fue reducido a 5 s. Finalmente, el programa también indicó la velocidad del objeto perseguido durante el recorrido.

4.2.6. Análisis estadístico de los datos de velocidad de inclusiones citoplasmáticas y microesferas fluorescentes

En total 674 carreras de inclusiones ovoplásmicas y 145 de microesferas fluorescentes, fueron analizadas en 40 cigotos desarrollándose a 23-25 °C. Para ello, se construyó un histograma de frecuencias de velocidades determinadas usando un intervalo de 2 $\mu\text{m/s}$ entre el número de observaciones u objetos seguidos. La

Gaussianas. Así, tres funciones de este tipo fueron obtenidas representando la velocidad lenta, rápida y ultrarápida de inclusiones ovoplásmicas y microesferas fluorescentes en movimiento. Los valores promedio y desviaciones estándar de estas funciones Gaussianas fueron determinadas usando el programa Sigmaplot 10.0.

4.2.7. Video microscopía de fluorescencia y confocal, obtención y procesamiento de imágenes

Zigotos y embriones tempranos silvestres ó mutantes vivos, microinyectados ó después de una fijación ácida e inmunofluorescencia, fueron analizados en un microscopio invertido Zeiss 135 mediante campo claro, DIC ó fluorescencia. El microscopio estaba, además, equipado con un motor Z (Prior) y una cámara Hamamatsu CCD (modelo C5985). Para menores aumentos, se utilizaron los

objetivos Achroplan (x10-40) y para mayores aumentos un objetivo Plan Neofluar (x100, NA 1,4) y el Optovar (x1,6-2,5). La proyección de la imagen en la cámara permitió obtener aumentos de 160-250 aumentos. Posteriormente, las imágenes fueron grabadas y procesadas usando el programa Metamorph 6.1, ImageJ 1.38i, Adobe Photoshop CS4 11.0 y Adobe Illustrator 14.0.0. Para obtener una mejor resolución de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia, algunas inmunofluorescencias de cigotos completos fueron examinadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META equipado con láser de Argón y Helio-Neón y usando los objetivos 20/0,5, 40/0,75 y 63/1,4. Proyecciones en el eje Z y cortes en el eje X e Y fueron realizados desde Z-stacks obtenidos desde secciones ópticas de 1-2 μm de espesor. La desconvolución de las imágenes obtenidas, tanto por microscopía

Huygens Essential versión 3.0 y Huygens Professional 3.5. La captura de imágenes de ovocitos y cigotos, silvestres y mutantes, vivos ó después de una hibridación *in situ* fue realizada en una lupa de fluorescencia Olympus MVX10 equipada con una cámara MicroPublisher 3.3 RTV CCD (Modelo MP3.3-RTV-CLR-10).

4.2.8. Determinación del volumen del blastodisco y de la esfera de vitelo durante la primera interfase

Con el fin de cuantificar el movimiento lento de ovoplasma hacia la región animal, los cambios en el volumen del blastodisco y la esfera de vitelo fueron determinados *in vivo* en 10 cigotos desarrollándose a una temperatura de 25 °C. Para éste estudio, los cigotos fueron orientados de tal manera que su eje animal/vegetal era paralelo a la platina del microscopio. Imágenes de cada cigoto fueron capturadas

dos veces: en los primeros 5-15 min después de la activación del huevo y cercano al inicio de la contracción del anillo de actina. Las imágenes capturadas a 200 aumentos fueron impresas en papel milimetrado quedando finalmente aumentadas 230 veces. El área del blastodisco fue subdividida en intervalos rectangulares de 4 ó 2 mm de ancho (w_i). Además, se determinó la altura (h_i) y el radio (r_i) de cada uno de estos intervalos. El volumen del blastodisco (V) fue calculado en cada cigoto en los dos tiempos de desarrollo descritos más arriba, usando la fórmula $V = [2\pi/(230)^3] \sum_i (r_i h_i w_i)$. El volumen de la esfera de vitelo fue calculado mediante la fórmula $4/3 \pi r^3$ y debido a que esta no es una esfera perfecta, el radio final determinado en cada cigoto, corresponde a la longitud promedio de varios radios trazados en el papel milimetrado. Para un detallado análisis estadístico y de significancia, los datos

4.2.9. Tratamiento con drogas que afectan el citoesqueleto

Para determinar el papel del citoesqueleto en el flujo ovoplásmico y en la generación de las pulsaciones, cigotos silvestres previamente descorionados fueron incubados por 45 min, 80 min ó 2 h en venenos de microtúbulos y filamentos de actina a una temperatura de 23-25 °C. En el caso de los microtúbulos, los cigotos fueron incubados en Colchicina ó Colcemida a una concentración de 0,6 mg/ml. Para los filamentos de actina, los cigotos fueron incubados en Citochalasin B (0,02-0,03 mg/ml) ó Latrunculina B (0,1 mM). Las cuatro drogas fueron preparadas a partir de soluciones "stocks" diluidas en DMSO. Para la incubación, la dilución de la droga "stock" se realizó en agua de acuario. Los cigotos controles fueron incubados, en las mismas condiciones de tiempo y temperatura, en DMSO (0,75-2%) en agua de

acuario. Tanto los cigotos control como los tratados con venenos del citoesqueleto, fueron estudiados mediante video microscopía de campo claro, fijación ácida ó inmunofluorescencia.

4.2.10. Extracción de proteínas asociadas al citoesqueleto e Inmunoblot

Para la extracción de proteínas asociadas al citoesqueleto como motores moleculares y proteínas nucleadoras de éste, se realizaron dos procedimientos bioquímicos destinados a obtener: (1) moléculas asociadas a microtúbulos y (2) moléculas asociadas a filamentos de actina.

(1) Obtención de moléculas asociadas a microtúbulos: Extractos crudos de cigotos del pez cebra fueron obtenidos mediante un protocolo modificado para aislar cigotos (~100 células) se agregó 200 µl de tampón HB1, en el cuál los cigotos fueron macerados dentro de un homogeneizador (vidrio-teflón) de 5 ml por 10 min en frío. Posteriormente, el macerado se centrifugó a 14.000 rpm en una microfuga a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante (S1), rico en proteínas solubles, fue recolectado en un nuevo tubo. Este procedimiento se realizó utilizando una gran cantidad de cigotos (~1000 cigotos) con el fin de recolectar, en tubos de policarbonato de 9 ml, un volumen apropiado de 3,5 ml de extracto crudo, el cuál fue ultracentrifugado durante 1 h a 100.000 xg en un rotor T-880 previamente enfriado. Para hidrolizar el ATP presente en el extracto, el nuevo sobrenadante (S2) fue incubado con Apirasa 2U/ml a 25 °C por 30 min. Finalizado este procedimiento, se agregó tubulina purificada de cerebro de pollo a una concentración de 0,1-0,4 mg/ml (Hyman y col., 1991), Taxol 20 µM y GTP 1 mM y se incubó a 37 °C por 30 min para promover la polimerización

de microtúbulos *in vitro* y así capturar la mayor cantidad de motores moleculares libres en solución. Transcurrida la incubación se procedió a centrifugar a 40.000 xg por 30 min y a temperatura ambiente, obteniéndose un nuevo sobrenadante (S3), el cuál fue descartado. El "pellet" (P3) fue resuspendido en un volumen de 1 ml de tampón HB1, se agregó Taxol 20 μ M y se centrifugó a 4 °C por 30 min a 40.000 xg. El nuevo sobrenadante (S4) fue descartado y el pellet (P4) se resuspendió en 1 ml de tampón HB1, Taxol 20 μ M, Mg-ATP 10 mM y se incubó a 25 °C por 30 min. Esto último se realizó para promover la separación de motores moleculares con actividad ATPásica asociados a los microtúbulos. Una última centrifugación a 4 °C por 30 min a 40.000 xg, permitió obtener un nuevo sobrenadante (S5) en el que eventualmente se encontrarían nuestras proteínas de interés y un pellet (P5) rico en tubulina, el cuál

(2) Obtención de moléculas asociadas a microfilamentos: Para aislar proteínas asociadas al citoesqueleto de actina, extractos crudos de zigotos fueron obtenidos modificando un protocolo ya establecido por otros investigadores para aislar actina y miosina II (Becker y col., 1996). A 200 μ l de células (~100 zigotos) se agregó 200 μ l de tampón HB2. Los zigotos fueron macerados y el homogeneizado obtenido se incubó a 4 °C por 2 h. Finalizado el tiempo de incubación, se centrifugó a 10.000 xg en una ultracentrifuga a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante (S1) fue rescatado y usado como extracto crudo para la posterior identificación de proteínas de alto peso molecular (superior a 100 kD). Una nueva centrifugación en las mismas condiciones de éste extracto permitió obtener un nuevo sobrenadante (S2) el cuál fue rescatado y usado para la identificación de proteínas solubles de bajo peso molecular (inferior a 100 kD).

La confirmación de la presencia de proteínas en los extractos crudos y en las distintas fases obtenidas después de una centrifugación, se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes. Para ello se utilizó acrilamida al 10% en el gel separador (preparado en la solución de gel separador) y al 4% en el gel concentrador (preparado en la solución de gel concentrador) y las muestras fueron disueltas en solución de carga, incubadas a 95 °C por 5 min y cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a una corriente eléctrica constante de 25 mA (80 V) y una vez finalizada, los geles fueron teñidos en solución de tinción de Azul de Coomassie y desteñidos en solución de destinción para su análisis.

Para la realización de inmunoblots, las proteínas no teñidas retenidas en los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante electrotransferencia. Esta se realizó en solución de transferencia durante 90 min a 4 °C y a un voltaje constante de 100 V. Una vez finalizada la transferencia, las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo a 4 °C por toda la noche. La incubación en el anticuerpo primario (ver Materiales) fue llevada a cabo en 5 ml de solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Posterior a la incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces en 20 ml de solución TBS-Tween 20 0,1% e incubadas en el segundo anticuerpo acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) en las mismas condiciones que para el primer anticuerpo. Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces en solución TBS-Tween 20 al 0,1% y reveladas mediante un ensayo de quimioluminiscencia. Para ello, las membranas fueron incubadas en solución de revelado por 3 min a temperatura ambiente y oscuridad. Una vez ejecutada la reacción quimioluminiscente, las membranas fueron expuestas

a una película fotográfica (Fuji Medical X-Ray Film 13x18 cm, FUJIFILM, Tokio, Japón) hasta que la señal fue evidente bajo condiciones adecuadas de iluminación. Finalmente, el film fotográfico fue revelado en una máquina automática de revelado AGFA modelo Curix60.

4.2.11. Inhibición de la actividad de motores moleculares

Una aproximación para explorar el papel que tienen los motores moleculares en la segregación ovoplásmica es su inactivación mediante la microinyección de anticuerpos (Winkelmann y col., 1993; Scholey, 1998), el uso de drogas inhibitoras (Vallee y Bloom, 1991; Phelps y Walker, 1999; Kovács y col., 2004) ó por la sobreexpresión de proteínas asociados a ellos (Burkhardt y col., 1997).

Es por eso, que el bloqueo de la actividad de motores moleculares presentes en el cigoto del pez cebra se realizó mediante: (a) microinyección de 2-4 nl del anticuerpo utilizado en la identificación bioquímica del motor y (b) microinyección de 2-4 nl del inhibidor de ATPasas *N*-etilmaleimida (NEM), que a concentraciones adecuadas (10-100 μ M intracelular) detiene la actividad de la kinesina y dineína citoplasmática (Vallee y Bloom, 1991; Phelps y Walker, 1999) y de blebbistatina, un inhibidor específico de la actividad de la miosina II (Kovács y col., 2004). Para éste último inhibidor, la concentración microinyectada (100 μ M intracelular) fue similar a la utilizada por otros investigadores en el cigoto del pez cebra (Urven y col., 2006).

Huevos y cigotos fueron microinyectados con α zida de sodio (0,1 % intracelular) y DMSO (1-2% intracelular) como control de anticuerpo e inhibidor, respectivamente.

Para visualizar el efecto de anticuerpos e inhibidores sobre el flujo de ovoplasma, los cigotos microinyectados fueron tratados con formaldehído/ácido acético, en distintos intervalos de tiempo postinyección.

4.2.12. Hibridación *in situ* en cigotos y embriones tempranos

4.2.12.1. Obtención de DNA plasmidial

Los RNA mensajeros de *gooseoid* (*gsc*), *squint* (*sqt*), *vasa* (*vas*) y *ventrally expressed dharmabozozok antagonist* (*ved*) fueron detectados en cigotos y embriones tempranos silvestres y mutantes mediante hibridación *in situ*. Usando bacterias electrocompetentes (*Escherichia coli*, cepa DH5 α), se electroporaron cada uno de los plasmidios ligados al inserto génico correspondiente y las células fueron cultivadas en placas de agar con ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml. Las colonias seleccionadas fueron crecidas en 150 ml de medio líquido LB + ampicilina (100 μ g/ml) toda la noche a 37 °C. Posteriormente, el DNA plasmidial fue purificado mediante la realización de Maxipreps (Plasmid Maxi Kit, Qiagen) y linearizado con la adecuada enzima de restricción (Tabla 1). Los plasmidios linearizados fueron purificados mediante extracción fenólica (fenol/cloroformo) y se utilizó 1,5-2 μ g de DNA plasmidial en la reacción de transcripción.

4.2.12.2. Síntesis de sondas antisentido

Para la transcripción de las sondas se siguieron las instrucciones de manufactura de las RNA polimerasas respectivas (Tabla 1). Para la transcripción de la sonda antisentido de *gsc* y *vas* la reacción de transcripción se realizó de la siguiente manera: en un tubo eppendorf libre de RNasas se agregó 4 μ l de cada DNA

lineal, 5 μ l de NTPs Dig mix 5X 2,5 mM, 2 μ l de RNasin, 6 μ l de amortiguador de transcripción 5X, 6 μ l de agua libre de RNasas y 2 μ l de la RNA polimerasa T7. Para la transcripción de la sonda antisentido de *sqt* se mezclaron 5 μ l de DNA lineal, 10 μ l de NTPs Dig mix 5X 2,5 mM, 2 μ l RNasin, 6 μ l de amortiguador de transcripción 5X, 5 μ l de agua libre de RNAsas y 2 μ l de la RNA polimerasa SP6. La mezcla fue incubada durante 2 h a 37 °C, luego se agregó 5 μ l de DNasa I y se incubó por 15 min a 37 °C. Posteriormente las sondas fueron purificadas mediante el uso de Rneasy Mini Kit (Qiagen) según indicaciones del fabricante y finalmente diluidas en 14 μ l de agua libre de RNasas. La sonda de *vent* fue preparada y amablemente donada por el Dr. Lee Kapp (Universidad de Pensilvania, Estados Unidos).

Para la hibridación, cigotos y embriones tempranos silvestres ó mutantes fueron fijados y permeabilizados al igual que para la inmunofluorescencia. Posteriormente, fueron lavados 3 veces por 20 min con PBS 1X, refijados en formaldehído al 5 % y lavados nuevamente con PBS 1X. Una vez terminados los lavados, los cigotos y embriones tempranos fueron prehibridados a 65-70 °C por 4 horas en amortiguador de hibridación. La hibridación se realizó por toda la noche a la misma temperatura y en el mismo amortiguador que contiene 0,5-1 μ g/ml de la sonda antisentido del mRNA de interés. Finalizada la hibridación, los cigotos y embriones fueron lavados usando concentraciones decrecientes de formamida en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a 65 °C y finalmente en SSC puro. Previo a la incubación en el anticuerpo, las células fueron bloqueadas por 2-4 horas en buffer de bloqueo (usado en la inmunofluorescencia), incubadas por 8 horas en anti-digoxigenina conjugada a fosfatasa alcalina en solución de bloqueo (ver título en Materiales) y lavadas 3 veces por 20 min en PBS 1X. Las hibridaciones fueron

reveladas en oscuridad con el sustrato cromogénico NBT/BCIP ó BM Purple por 30-60 min. La reacción fue detenida después de sucesivos lavados en PBS 1X por 1 h y en algunas ocasiones los cigotos y embriones tempranos fueron colocados en placas de cultivo o montados medio de montaje (glicerol:PBS 1X, 9:1) para su observación. La captura de imágenes se realizó en una lupa de fluorescencia.

4.2.13. Generación y obtención de mutantes de efecto materno *bucky ball* y *emulsion*

Los mutantes de efecto materno *bucky ball* (*buc*) y *emulsion* (*emn*) fueron aislados en una búsqueda de factores maternos involucrados en el desarrollo temprano. La mutagénesis se realizó mediante el uso del mutágeno químico *N*-Etil-Nitroso-Úrea (ENU) (Ver Knapick, 2000; Dosch y col, 2004). Para aislar los mutantes se realizó una estrategia de cruces naturales de cuatro generaciones. En la F3 una hembra, proveniente de las 400 familias generadas, es considerada recesiva para una mutación de efecto materno, si su descendencia (F4) muestra un fenotipo 100% mutante, el cuál es uniforme y reproducible. De esta manera, una hembra F3 cruzada con machos silvestres u otro genotipo (homo ó heterocigoto) permite obtener ovocitos, huevos y cigotos F4 mutantes, cuyo fenotipo presenta alteraciones en su desarrollo temprano. Los mutantes *buc* y *emn* usados en éste trabajo, mostraron defectos en la polaridad animal/vegetal y en la segregación ovoplásmica, respectivamente.

Para la propagación de las líneas mutantes y para mapear la mutación, fueron cruzados individuos F2 (hembras heterocigotas y machos homocigotos) (ver Figura 28A en resultados). Para identificar individuos heterocigotos, homocigotos y

recombinantes para la mutación *buc* y *emn* provenientes de éste cruce, se realizaron genotipificaciones mediante el uso de marcadores polimórficos de secuencia simple del tipo SSLP ("*Simple Sequence Length Polimorphism*") ó también conocidos como marcadores Z. Estos son específicos y además segregan junto con la mutación durante la recombinación meiótica (Shimoda y col., 1999; Knapick, 2000). Para la genotipificación, DNA genómico fue extraído con amortiguador de lisis desde un trozo de la aleta caudal de peces adultos. Luego, el DNA fue precipitado con etanol 100 %, lavado en concentraciones decrecientes del mismo alcohol y finalmente diluido en agua libre de nucleasas. Posteriormente, el DNA extraído fue amplificado mediante PCR en los dos mutantes usando las siguientes condiciones: 94 °C por 3 min; 39 ciclos de 94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 45 s y una extensión final por 3 min a 72 °C. Los partidores específicos para los marcadores usados, mostrados en la Tabla 2, corresponden a: z24206 y z13475 (mutante *bucky ball*) y z9247 y z7496 (mutante *emulsion*). El análisis de los resultados de la amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%. El uso de éstos marcadores permite identificar fácilmente individuos heterocigotos, homocigotos y recombinantes de acuerdo al patrón de bandeo que presentan en el gel. Esto porque, al ser polimórficos generan productos de PCR de distinto tamaño, lo que se ve reflejado en una diferencia de movilidad en el gel de agarosa. Los resultados obtenidos de una genotipificación pueden ser observados en la Figura 28C.

4.2.14. Clonamiento posicional del gen *emulsion* (*emn*)

4.2.14.1. Análisis bioinformático de la mutación *emn*

El gen *emn* fue mapeado mediante el uso de 240 marcadores SSLP pertenecientes al panel MGH (Talbot y Schier, 1999), en el cromosoma o grupo de ligamiento 4 a 58,4 cM (centiMorgans) dentro de un intervalo genético de 2,4 cM ó (1,5 Mb) entre los marcadores z9247 a 56,6 cM y z7496 a 59 cM (Dosch y col, 2004).

Una primera aproximación para determinar los posibles candidatos para el gen *emn*, fue indagar en bases de datos de acceso público. Así y antes de iniciar el clonamiento posicional del gen *emn*, se realizó un análisis *in silico* de los genes presentes en el intervalo inicial de 1,5 Mb. Se utilizó la base de datos Ensembl (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index) y Vega (http://vega.sanger.ac.uk/Danio_rerio/Info/Index). Un total de 49 genes fueron encontrados en el intervalo comprendido entre los marcadores z9247 y z7496. Algunos de los genes presentes en dicho intervalo resultaron ser *a priori* buenos candidatos para el gen *emn*, de acuerdo a los descritos en la base de datos del pez cebra (<http://zfin.org>), con respecto a su función molecular y relación con el fenotipo mutante. De los resultados obtenidos en la búsqueda de nuevos marcadores moleculares cada vez más cercanos a la mutación (descritos en la siguiente página), se decidió analizar solamente aquellos genes presentes en el intervalo crítico de 125 Kb comprendido entre los marcadores (CA)_{n14} y (CA)_{n15} (también descritos en la siguiente página). En dicho intervalo se encontraron 7 genes que parecían ser potenciales candidatos para el gen *emn*. Las unidades de transcripción de los genes escogidos dentro del intervalo físico fueron: *la proteína de unión a DNA ó proteína 4*

con dominio PR (*prdm4*), la subunidad 26S del proteosoma, ATPasa 2 (*psmc2*), el transportador de solutos de la familia 26, miembro 5 (*slc26a5*), tetraspanina 33 (*tspan33*), proteína 1 intercambiadora cation/H⁺ (*cax1*), el homólogo de *Drosophila* *smoothened* (*smo*) y la proteína de unión a actina ó proteína 10 con dominio kelch (*klhdc10*).

4.2.14.2. Búsqueda de nuevos marcadores polimórficos cercanos al locus *emn*

Con el fin de estrechar aún más el intervalo genético y físico que contiene el gen *emn* se realizó una búsqueda de nuevos marcadores polimórficos en el intervalo comprendido entre los marcadores z9247 y z7496 mencionado antes. Esto requirió de un gran número de genotipificaciones de peces portadores de la mutación para buscar recombinantes en los cuales los nuevos marcadores estuvieran cada vez más cerca de la mutación. Un total de 1.037 meiosis (genotipificaciones realizadas) fueron analizadas en individuos F3, encontrándose 41 recombinantes. Once nuevos marcadores SSLP, previamente identificados en el cromosoma 4 (Shimoda y col, 1999), fueron analizados usando el DNA genómico extraído de individuos heterocigotos y homocigotos para la mutación. Para la reacción de PCR, la amplificación de los marcadores se hizo bajo las siguientes condiciones: 94 °C por 3 min; 39 ciclos de 94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 45 s y una extensión final por 3 min. Finalmente, los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 3%.

De los 11 marcadores probados, sólo el marcador z28278, a 57,8 cM, resultó ser polimórfico y ligado a la mutación. De esta manera, el intervalo genético inicial quedó dividido en dos regiones de 1,2 cM (0,75 Mb) cada una. Así, se denominó

como intervalo "a", aquel comprendido entre los marcadores z9247 y z28278 y como intervalo "b", al comprendido entre los marcadores z28278 y z7496 (ver Figura 29 en resultados).

Posteriormente, se realizó una búsqueda de nuevos marcadores polimórficos y ligados a la mutación, basados en repeticiones de dupletes CA en el genoma y que fueron llamados en ésta tesis como marcadores (CA)_{n_x}, incluidos en los "contigs" CR786571.6, BX470140.10, BX649347.3, BX571796.10 y AL590150.2 que contienen a los dos nuevos intervalos determinados. El análisis de los "contigs" para la búsqueda de repeticiones CA se realizó utilizando el programa DNA Strider 1.4f6. Ocho nuevos marcadores, (CA)_{n₁} y (CA)_{n₈}, fueron encontrados en el intervalo "a" y nueve nuevos marcadores, (CA)_{n₉} - (CA)_{n₁₇}, fueron encontrados en el intervalo "b". Estos nuevos marcadores fueron analizados en el DNA genómico extraído de individuos recombinantes para la mutación mediante PCR, y usando las mismas condiciones descritas más arriba para los marcadores SSLP ya identificados en el cromosoma 4. Sólo en el intervalo "b" se encontraron nuevos marcadores polimórficos y ligados a la mutación, y de acuerdo a su frecuencia de recombinación (número de recombinaciones en función del número total de meiosis analizadas) se logró estrechar la región de 1,2 cM a un nuevo intervalo denominado "intervalo crítico" de 0,2 cM (125 Kb).

4.2.14.3. RT PCR y secuenciación de genes candidatos

Una vez escogidos los genes presentes en el intervalo crítico de la mutación, como potenciales candidatos para el gen *emn*, se procedió a amplificar, purificar y posteriormente secuenciar a cada uno de ellos. Para ello, lo primero fue sintetizar

cDNA a partir de RNA total, previamente extraído de ovarios de hembras silvestres y mutantes. Para la extracción del RNA total, ovarios silvestres fueron disectados de hembras adultas pertenecientes a la línea silvestre AB. Esta fue la línea de hembras que fueron cruzadas con machos mutagenizados durante la búsqueda de los mutantes de efecto materno (ver Dosch y col.; Wagner y col., 2004). Para la extracción de RNA total, proveniente de ovarios mutantes, la disección se realizó a partir de hembras homocigotas para la mutación *emn*. Los ovarios disectados fueron rápidamente sumergidos en nitrógeno líquido y el RNA extraído usando el reactivo Trizol, de acuerdo a lo indicado por el fabricante. La concentración del RNA obtenido se midió en un gel de agarosa al 1% y fue de 100-350 ng/ μ l.

La transcripción reversa para la obtención del cDNA se realizó usando el kit "SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR" según protocolo del fabricante. Se transcribieron 5 μ g de RNA en cada caso y se utilizó la enzima retrotranscriptasa "Superscript™ II RT" (50 U/ μ l). La transcripción se realizó a 42 °C durante 50 min y la enzima fue inactivada a 70 °C por 15 min y en hielo por 2 min. Para eliminar el RNA remanente cada tubo se trató con RNasa H (2 U/ μ l). Como control se realizó la transcripción sin incluir la transcriptasa reversa (RT negativo).

Para amplificar los 7 genes escogidos como candidatos, se diseñaron partidores específicos para cada uno de ellos usando el programa de acceso público Primer3 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Con el fin de amplificar la secuencia completa de cada gen, los partidores fueron diseñados dividiendo los genes en fragmentos de 600-700 pb y así obtener sus secuencias parciales.

La amplificación específica de los genes candidatos se realizó por PCR

mediante el uso de la mezcla *pfu* DNA polimerasa/*Taq* DNA polimerasa en la proporción de 1:9. Las condiciones de PCR usadas en la amplificación de los genes *prdm4*, *tspan33*, *cax1* y *klhdc10* fueron las siguientes: 94 °C por 3 min; 39 ciclos de 94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, 70 °C por 1 min y una extensión final por 10 min. Para los genes *psmc2*, *slc26a5* y *smo*, la temperatura usada para el “annealing” fue de 50 °C por 30 s. Los resultados obtenidos de cada reacción fueron visualizados en geles de agarosa al 1%.

Cada uno de los fragmentos de los genes amplificados fueron purificados utilizando el kit “QIAquick PCR Purification”, de acuerdo a instrucciones del fabricante. Posteriormente, fueron enviados a secuenciar (“DNA Sequencing Facility” de la Universidad de Pensilvania, Filadelfia, Estados Unidos). Una vez identificada la mutación en uno de los genes secuenciados, ésta se confirmó mediante la secuenciación de los productos de PCR provenientes del DNA genómico de hembras mutantes y silvestres, como así también del macho mutagenizado del cuál deriva el cromosoma mutante. Posteriormente, se amplificó la región codificante completa de *emn* y se clonó dentro de un vector de expresión TOPO® y así obtener el vector pC2.1-TOPO-cax1 para la síntesis de la sonda de RNA antisentido.

Para indagar sobre en la naturaleza de la proteína codificada por *emn*, se realizó una predicción de su estructura usando el programa en línea TMHMM Server v.2.0. Esta simulación consistió en predecir, por medio del análisis de la secuencia amoniocídica perteneciente al gen *emn*, los dominios α -hélices de transmembrana de la proteína Emn presentes en la condición silvestre y ausentes en el mutante por causa de la mutación.

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de la segregación ovoplásmica en el cigoto y embrión temprano del pez cebra

5.1.a. La segregación ovoplásmica en el cigoto del pez cebra ocurre en 3 estados relacionados con cambios nucleares que caracterizan el primer ciclo celular

Mediante video microscopía de "time lapse" y en base a los numerosos cambios morfológicos observados en huevos y cigotos del pez cebra (n=65), el período preclivaje (estado 1) se subdividió en 3 estados denominados 1a, 1b y 1c. El estado 1a (término de la meiosis) se extiende desde la descarga del ovocito hasta la liberación del segundo polocito. Durante este período el huevo adquiere turgencia y una forma esférica. Además, el preblastodisco crece levemente para formar el blastodisco (datos no mostrados). El estado 1b (primera interfase) se extiende desde la liberación del polocito II hasta la primera señal de contracción del anillo de actina presente en el margen del blastodisco. El blastodisco adopta una forma biconvexa como consecuencia de un deslizamiento del piso del blastodisco hacia la región vegetal (Figuras 4A-C) y crece moderadamente. En este estado, el cigoto muestra movimientos de alargamiento/acortamiento de su eje animal/vegetal que constituyen intermitentes deformaciones llamadas pulsaciones, que serán discutidas más adelante. El estado 1c (primera división de clivaje) comienza con la contracción del anillo de actina y termina con la formación de los dos primeros blastómeros. Durante el estado 1c temprano, se observa la formación de canales ó "streamers" axiales en la esfera de vitelo y un considerable crecimiento del blastodisco como consecuencia de la acumulación de ovoplasma y algunos pequeños glóbulos de vitelo (Figuras 4D-E). Durante el estado 1c tardío el anillo de actina se relaja, los "streamers" axiales se

hacen cada vez menos visibles y el blastodisco completa su primera división de clivaje (Figura 4F). Este fenómeno de contracción/relajación del anillo de actina continúa ocurriendo durante las primeras divisiones de clivaje.

El tiempo ocupado por cada estado en función de la temperatura, se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Tiempos de desarrollo del cigoto, expresado en minutos, en función de la temperatura.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)		
	Estado 1a	Estado 1b	Estado 1c
20-22	10-15	45-60	60-75
25	5-10	25-35	40-45
28	5	25-30	30-35

Para correlacionar los estados del cigoto con las etapas del primer ciclo celular se tiñó el DNA nuclear de blastodiscos completos con DAPI (n=65). Durante el estado 1a se reanuda la meiosis detenida en la metafase II (Fernández y col., 2006). En el estado 1b los pronúcleos se aproximan (inserto en Figuras 4A, B) y fusionan para formar el núcleo del cigoto (inserto en Figura 4C). Finalmente, durante el estado 1c se completa la primera mitosis (inserto en Figuras 4D-F). Estos resultados confirman y complementan lo observado por Streisinger y col., (1981) y Dekens y col., (2003).

La liberación del segundo polocito, la segregación ovoplásmica, pulsaciones,

eventos de contracción/relajación del anillo de actina, crecimiento del blastodisco y pseudoclivaje también ocurrieron en el huevo no fecundado (Ver Kane y Kimmel, 1993). Estas observaciones indican que estos procesos no dependen de la formación del núcleo del cigoto, ni del establecimiento de un ciclo celular normal.

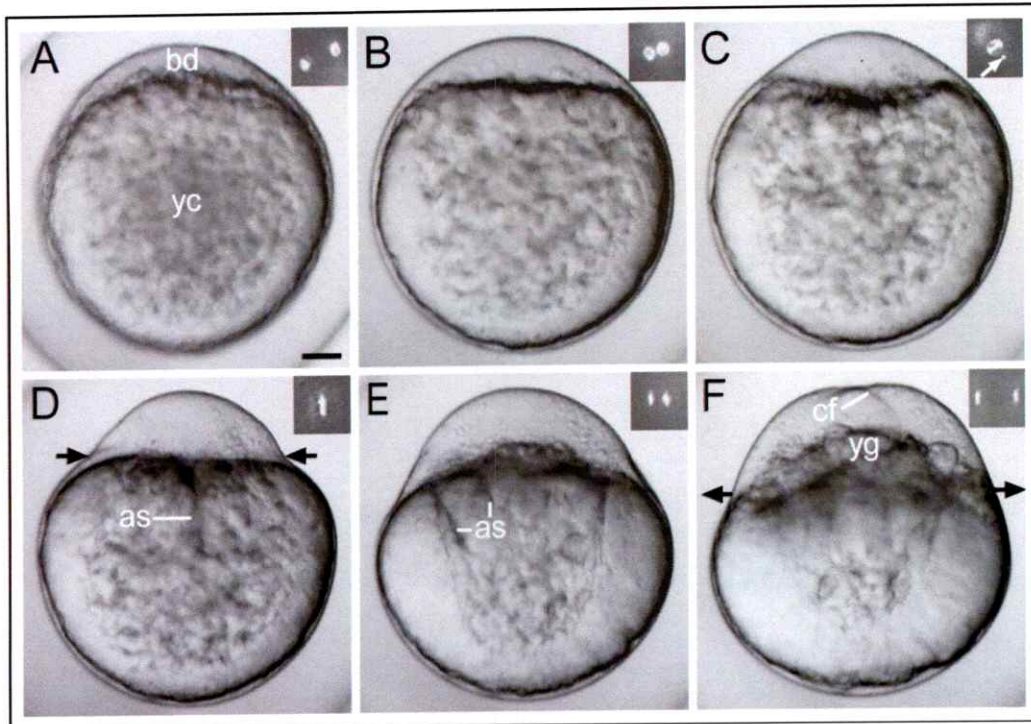


Figura 4. Estados del desarrollo en el cigoto del pez cebra. El desarrollo temprano del embrión se ha subdividido en 3 estados. El estado 1a (término de la meiosis), se extiende desde la postura del huevo hasta la liberación del polocito II. **A:** estado 1b temprano. **B:** estado 1b intermedio. **C:** estado 1b tardío. El estado 1b (A-C, primera interfase), se extiende desde la descarga del polocito II hasta la primera señal de contracción del anillo de actina (flechas en D). Los insertos (A, B) muestran la fusión de los pronúcleos y el núcleo del cigoto formado en un punto cercano teñido con DAPI (flecha blanca en el inserto de la figura C). **D, E:** estado 1c temprano. **F:** estado 1c tardío. El estado 1c (D-F, primera división celular) comienza con la contracción del anillo de actina y concluye con su relajación (flechas en F), coincidente con la primera división celular. Nótese en los insertos los cromosomas durante la primera división de clivaje: metafase (D), anafase (E) y telofase (F). bd, blastodisco; yc, esfera de vitelo; yg, glóbulos de vitelo; as, "streamers" axiales; cf, surco de clivaje. Desarrollo a 21 °C. Barra= 70 μ m.

5.1.b. La formación del blastodisco se asocia con la reorganización del endoplasma y su transporte hacia el polo animal del cigoto

La visualización de cigotos vivos mediante video microscopía mostró que durante el estado 1b el blastodisco crece como consecuencia del transporte de endoplasma hacia la región animal desde la esfera de vitelo.

Para estudiar los cambios en la organización del endoplasma y su relación con el crecimiento del blastodisco, numerosos huevos ($n=10$), cigotos ($n=50$) y embriones tempranos ($n=30$) fueron examinados después de una fijación ácida a diferentes intervalos de tiempo.

En el huevo recién ovopositado, las lagunas de endoplasma se extienden entre los glóbulos de vitelo. Estas lagunas se encuentran asociadas, entre sí, con el ectoplasma y el blastodisco, a través de finos canales. En el huevo activado, la reorganización del endoplasma comprende: 1) fusión de lagunas de endoplasma animales para formar canales ó "streamers" cortos que se conectan con el blastodisco (Figura 5A), 2) remodelamiento y coalescencia de lagunas animales, y algunas ecuatoriales, para formar "streamers" largos axiales conectados al blastodisco (Figura 5B), 3) remodelamiento y coalescencia de lagunas distribuidas por debajo de la empalizada de glóbulos de vitelo para formar "streamers" meridionales, que también se conectan con el blastodisco (Figura 5C). Estos dos tipos de "streamers" largos se formaron en sincronía con la contracción del anillo de actina. 4) Lagunas de endoplasma vegetales se desplazaron hacia el polo animal y se fusionaron con los "streamers" axiales. En algunos huevos, este desplazamiento de lagunas vegetales se inició inmediatamente después de la activación de éstos, pero generalmente este proceso comenzó durante la primera división de clivaje. En algunos cigotos (menos

del 1%), las lagunas vegetales se fusionaron en el centro de la esfera de vitelo para formar el denominado cuerpo fenestrado. A pesar de las diferencias observadas en el patrón de movimiento de lagunas vegetales hacia la región animal, la reorganización del endoplasma fue similar en diferentes embriones tempranos y el vaciamiento de lagunas en el blastodisco se completó después de varias divisiones de clivaje.

Para complementar las observaciones anteriores, se prepararon animaciones con contraste invertido de cigotos y embriones tempranos vivos (n=18). Si bien, las lagunas y "streamers" se visualizaron con menos resolución que en cigotos y embriones tempranos sometidos a una fijación ácida, ésta metodología permitió de igual manera estudiar la reorganización de endoplasma *in vivo*.

Los resultados obtenidos desde las animaciones confirmaron lo anteriormente descrito usando células fijadas y además proporcionaron la siguiente información adicional: 1) Durante la primera interfase, las lagunas vegetales sufrieron desplazamientos locales y permanecieron en la misma región de la esfera de vitelo. Al mismo tiempo, las lagunas más animales se unieron al blastodisco para formar "streamers" cortos (Figura 5D), 2) los "streamers" largos axiales y meridionales se formaron al comienzo de cada división celular, en sincronía con la contracción del anillo de actina y desplazando endoplasma hacia el polo animal (ver Video 1 y 2). Las lagunas vegetales vaciaron su contenido endoplásmico dentro de los "streamers" axiales de manera secuencial y ordenada (desde animal a vegetal), comenzando con las lagunas localizadas ecuatorialmente en la esfera de vitelo (Figura 5E) y terminando con aquellas lagunas localizadas cerca del polo vegetal (Figura 5F) y 3) durante la relajación del anillo de actina, los "streamers" fueron menos visibles (Figura 5G) y las lagunas endoplásmicas permanecieron en la esfera de vitelo, pero

aún en movimiento hacia el polo animal. Durante las primeras divisiones de clivaje, las lagunas de endoplasma disminuyeron gradualmente en número y los "streamers" se observaron cada vez más delgados (Figuras 5H, I). Comenzando la cuarta ó quinta división de clivaje, muchos de los embriones mostraron la ausencia de lagunas de endoplasma en la esfera de vitelo.

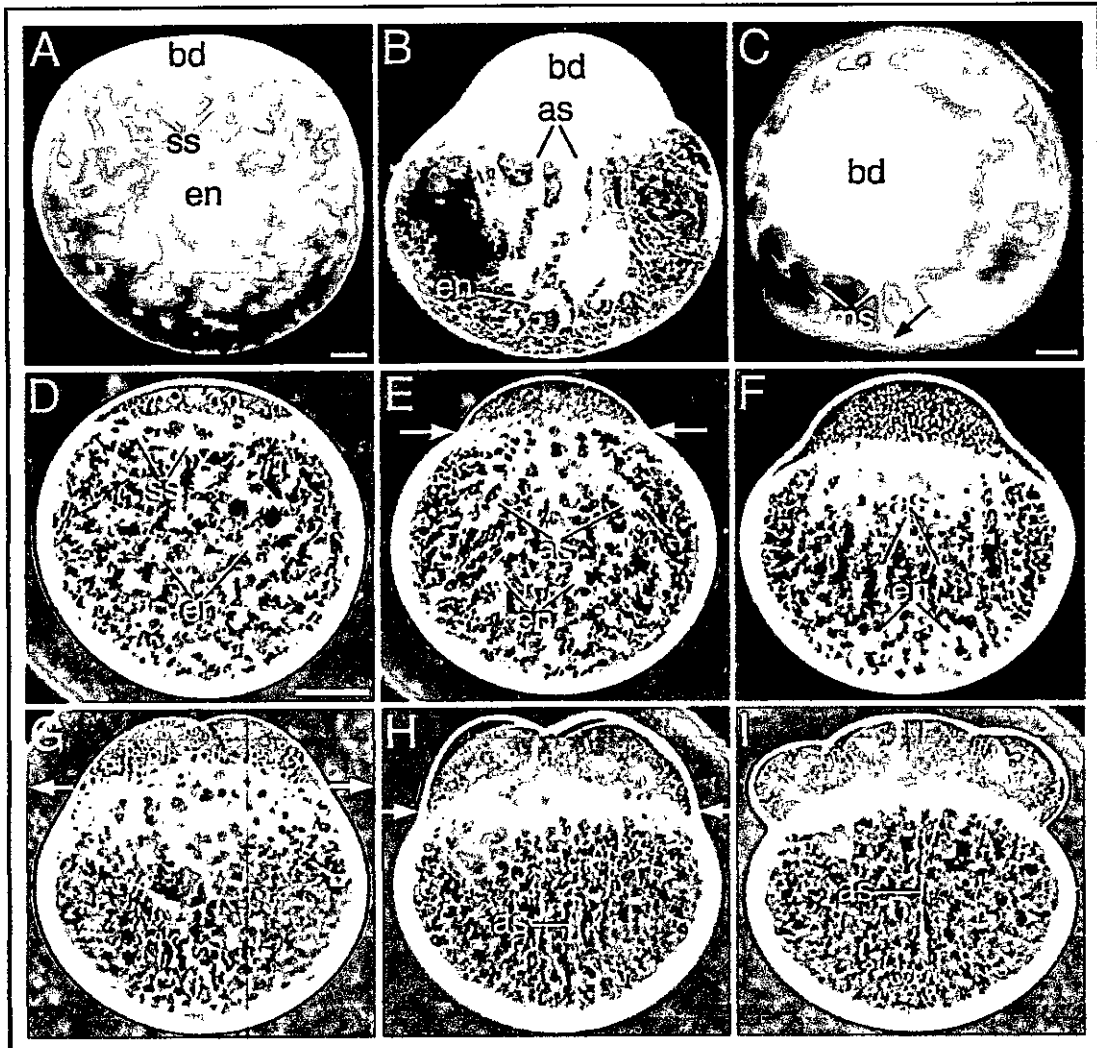


Figura 5. Reorganización del endoplasma durante la segregación ovoplásmica. Zigotos y embriones tempranos visualizados con inversión de contraste, después de una fijación ácida (A-C) y en montajes completos vivos (D-I). **A:** primera interfase; **B:** primera división de clivaje (ambas vista lateral) y **C:** primera división de clivaje (vista animal). La flecha en C apunta a un "streamer" meridional (ms) localizado en la periferia. Vista lateral de: **D:** primera interfase; **E** y **F:** primera división de clivaje; **G:** embrión de 2 células; **H:** embrión de 4 células e **I:** embrión de 8 células. as, "streamer" axial, bd, blastodisco; en, endoplasma; ss, "streamer" corto. Barra= 80 μ m (A- C), 160 μ m (D- I).

5.1.c. El flujo ovoplásmico ocurre a distintas velocidades: lento, rápido y ultrarápido

Los complejos movimientos citoplasmáticos fueron estudiados durante el desarrollo del cigoto del pez cebra utilizando animaciones preparadas por video microscopía (a intervalos de 10-30 s). Esto fue posible gracias a la transparencia que tiene el cigoto vivo, lo que otorga una ventaja para las observaciones microscópicas. Además, ésta visualización fue complementada mediante el uso de sondas ó trazadores fluorescentes.

5.1.c.1. Movimiento lento de endoplasma y ectoplasma durante la primera interfase (estado 1b)

El movimiento hacia el polo animal de marcadores endógenos o exógenos, a través del ecto y endoplasma, fue monitoreado durante el estado 1b temprano e intermedio por medio del estudio del comportamiento dinámico de inclusiones ectoplásmicas y endoplásmicas (n=25), microesferas fluorescentes microinyectadas (n=15) y dextrano marcado (n=5). Las inclusiones ovoplásmicas corresponden a cuerpos pequeños (1-3 μm de diámetro) o grandes (por sobre los 20 μm de diámetro), que probablemente corresponden a vacuolas o pequeños glóbulos de vitelo, respectivamente, ya antes descritos en el ovoplasma del huevo del pez cebra (Fernández y col., 2006). En el ectoplasma y endoplasma más animal, las inclusiones se movieron preferencialmente hacia el polo animal y frecuentemente entraron al blastodisco (Figuras 6A, B; ver Video 3). Las microesferas fluorescentes ingresaron al blastodisco desde lagunas de endoplasma animal (Figura 6C) o ectoplasma (Figuras 6D-F; ver Video 4). El movimiento de inclusiones ovoplásmicas y microesferas fluorescentes fue irregular con trayectorias zigzagueantes,

desplazamientos hacia adelante y atrás y pausas. Movimientos intermitentes ó saltatorios también fueron observados durante la primera interfase (Figuras 6G, H).

Las inclusiones ovoplásmicas se movieron lentamente a un promedio de $5,0 \pm 0,4 \mu\text{m}/\text{min}$ mientras las microesferas lo hacían a una velocidad promedio de $9,1 \pm 0,9 \mu\text{m}/\text{min}$. El análisis estadístico de estos movimientos es mostrado en las figuras 6I y 6J. Tanto en el resto del endoplasma, como también en el ectoplasma, se observaron movimientos lentos de objetos y en varias direcciones. El uso de dextrano fluorescente, confirmó las observaciones descritas anteriormente, mostrando que lagunas de endoplasma ubicadas en la región animal se movían lentamente, vaciando su contenido dentro del blastodisco (Figuras 7A-D). El resto de las lagunas de endoplasma mostraron un desplazamiento local y parecen permanecer en el mismo lugar. Similares resultados se obtuvieron en huevos no fecundados.

El movimiento hacia el polo vegetal de los marcadores endógenos y exógenos, a través del ecto y endoplasma, fue estudiado durante el estado 1b tardío. Durante éste estado las inclusiones ovoplásmicas y las microesferas fluorescentes se movieron con las mismas velocidades promedio que lo hacían hacia el polo animal ($5,0 \mu\text{m}/\text{min}$ y $9,1 \mu\text{m}/\text{min}$, respectivamente). Esto se estudió monitoreando el movimiento de inclusiones y fluoroesferas desde el blastodisco y regiones adyacentes del ectoplasma al mismo tiempo en que el blastodisco adopta una forma biconvexa. Este cambio de forma fue producido por el desplazamiento hacia el polo vegetal del piso del blastodisco, presumiblemente gatillado por el inicio de la contracción del anillo de actina (Figura 4C).

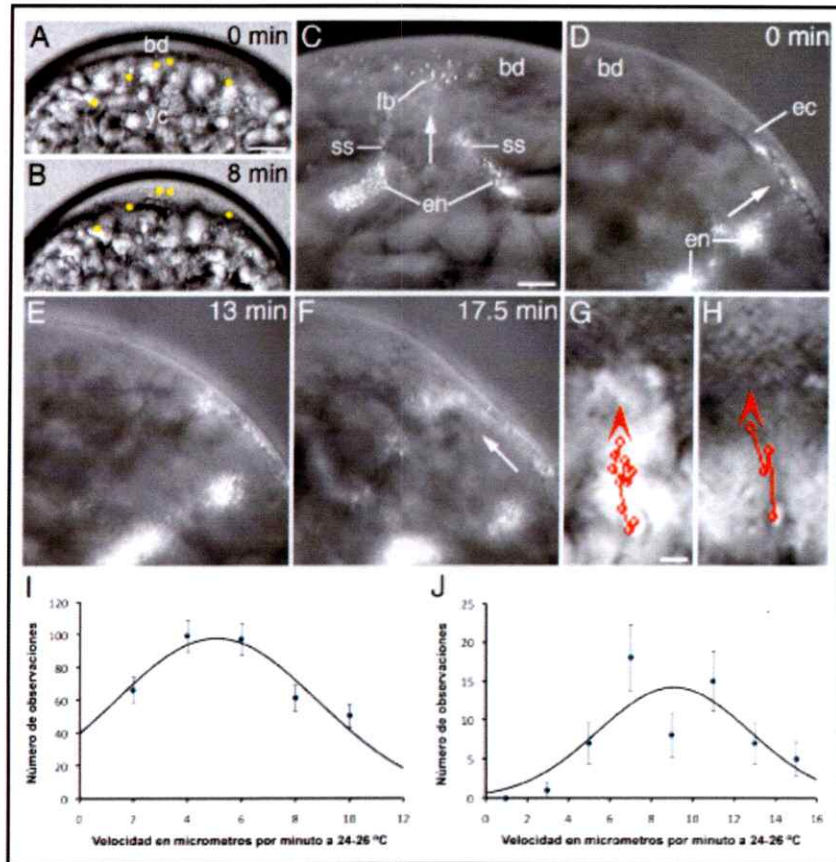


Figura 6. Movimiento lento de inclusiones ovoplásmicas y microesferas fluorescentes. **A, B:** imágenes seleccionadas de una secuencia, capturada a intervalos de 10 s, de una animación de video microscopía de un cigoto en estado 1b que muestra el crecimiento del blastodisco (bd) acompañado de la incorporación de inclusiones endoplásmicas (puntos amarillos). Desarrollo a 24 °C. **C-F:** imágenes seleccionadas de una secuencia, capturadas a intervalos de 10 s, de una animación de video microscopía de un cigoto en estado 1b intermedio (C) y 1b tardío (D-F) microinyectado con bolitas marcadas con rodamina. Transporte lento (flecha en C) de bolitas fluorescentes (fb) desde lagunas de endoplasma (en) hacia el blastodisco (bd) a través de “streamers” cortos (ss). Transporte lento de microesferas fluorescentes (D-F) desde el endoplasma al ectoplasma (ec) (flecha en D) y desde éste último hacia el blastodisco (flecha en F). Desarrollo a 20 °C. **G, H:** estado 1b intermedio del cigoto que muestra la trayectoria irregular de inclusiones ovoplásmicas hacia la región animal a través del endo (G) y ectoplasma (H). La posición de la inclusión, a intervalos de 30 s, fue marcada con un círculo rojo y su trayectoria con una línea continua unida a cada círculo. Las cabezas de flecha indican la dirección del movimiento. Desarrollo a 24-25 °C. **I, J:** gráficos que muestran la distribución de velocidades durante el movimiento lento de inclusiones ovoplásmicas (I) y bolitas fluorescentes (J) en montajes completos de cigotos durante el estado 1b. La línea negra es una curva Gaussiana ajustada a los datos experimentales. yc, esfera de vitelo; min, minutos. Barra= 55 μ m (A, B); 40 μ m (C-F); 8 μ m (G, H).

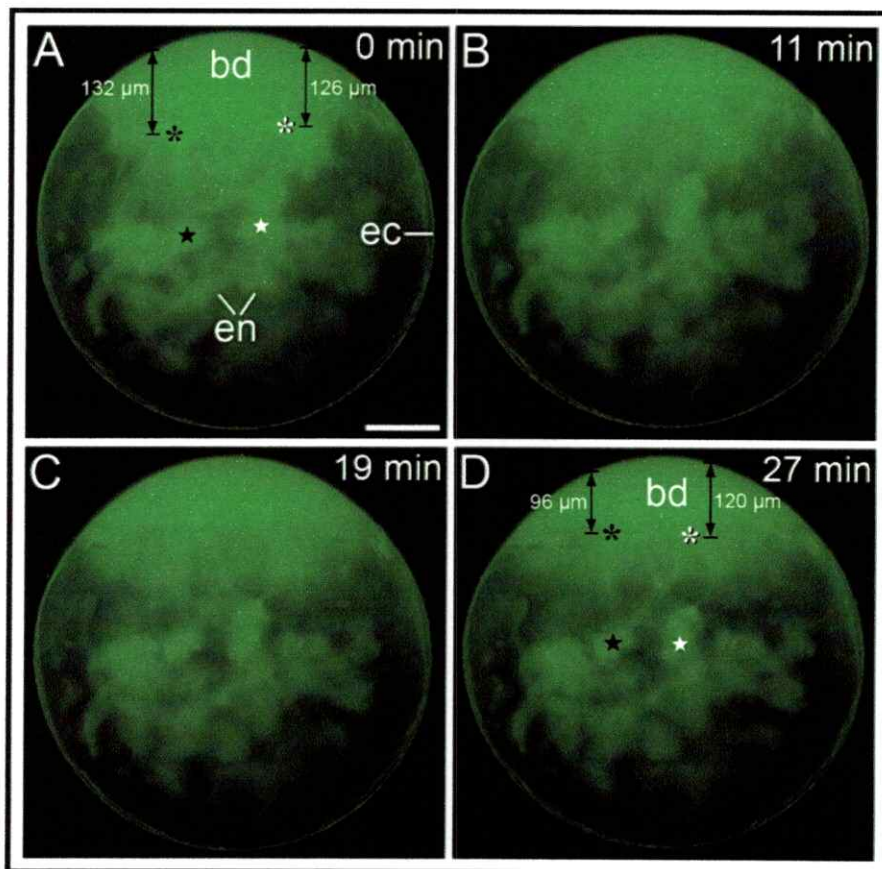


Figura 7. Video imágenes seleccionadas de una animación de un cigoto en el estado 1b intermedio microinyectado con dextrano fluorescente de 10 kDa. La sonda marcada invade rápidamente todos los dominios de ovoplasma: ectoplasma (ec), endoplasma (en) y blastodisco (bd). **A-D:** nótese que la organización de las lagunas de endoplasma permanece sin modificación, con excepción de aquellas que se encuentran cercanas al blastodisco. Es posible observar lagunas endoplásmicas, marcadas con asteriscos blancos y negros, moviéndose hacia la región animal para incorporar su contenido al blastodisco. La diferencia de distancias entre los asteriscos y el borde del blastodisco en dos tiempos distintos, evidencian ésta situación. El resto de las lagunas de endoplasma, como por ejemplo aquellas marcadas con estrellas negras y blancas, no se mueven. Al término de la animación, las lagunas de endoplasma vegetal sufren un desplazamiento centrípeto y coalescen en el centro de la esfera de vitelo. Desarrollo a 21 °C. Se indica el tiempo de desarrollo transcurrido durante el desarrollo del cigoto. min, minutos postfecundación. Barra= 120 μm.

5.1.c.2. Crecimiento del blastodisco durante el flujo lento de ovoplasma (estado 1b)

El volumen del blastodisco, durante su crecimiento, fue cuantificado en cigotos vivos en estado 1b temprano y tardío (n=10). La tabla 4 y la figura 8 muestran que durante la primera interfase el blastodisco aumentó en volumen, mientras que el volumen de la esfera de vitelo disminuye. Esto confirma que el flujo lento de ectoplasma y endoplasma, hacia el polo animal, contribuye al crecimiento del blastodisco. Como muestra la tabla 4, existieron diferencias entre el volumen inicial y final del blastodisco, como así también, en el porcentaje de crecimiento de los blastodiscos individuales (en promedio 63,6%). Situación similar puede ser observada en el volumen inicial y final de la esfera de vitelo, el cuál disminuye en este estado (en promedio 8%). Estas diferencias pueden ser atribuídas a: 1) variaciones en la velocidad a la cuál cada cigoto se desarrolló y a la que el ovoplasma se desplazó hacia el blastodisco y 2) a la probabilidad de comenzar los experimentos con cigotos en diferentes estadios del desarrollo.

Tabla 4. Cambios en el volumen del blastodisco y la esfera de vitelo, expresado en nanolitros (nl), durante la primera interfase (estado 1b).

Zigoto	Blastodisco			Esfera de Vitelo		
	V _i (nl)	V _r (nl)	% de aumento de volumen	V _i (nl)	V _r (nl)	% de disminución de volumen
1	6,4	13,6	110,6	138,9	116,1	16,5
2	10,7	17,7	66,4	122,7	120,6	1,7
3	6,9	16,8	143,3	145,2	124,8	14,1
4	7,6	10,0	31,6	141,2	133,4	5,5
5	7,5	13,2	76,1	139,5	130,6	6,3
6	6,2	8,8	41,5	142,4	128,5	9,7
7	5,6	11,6	108,3	134,5	123,2	8,4
8	8,2	9,9	20,4	136,7	126,4	7,6
9	8,1	12,2	50,9	130,6	128,5	1,6
10	8,0	9,2	15,2	136,1	126,9	6,8
% promedio del cambio de volumen			+63,6	-8,0		

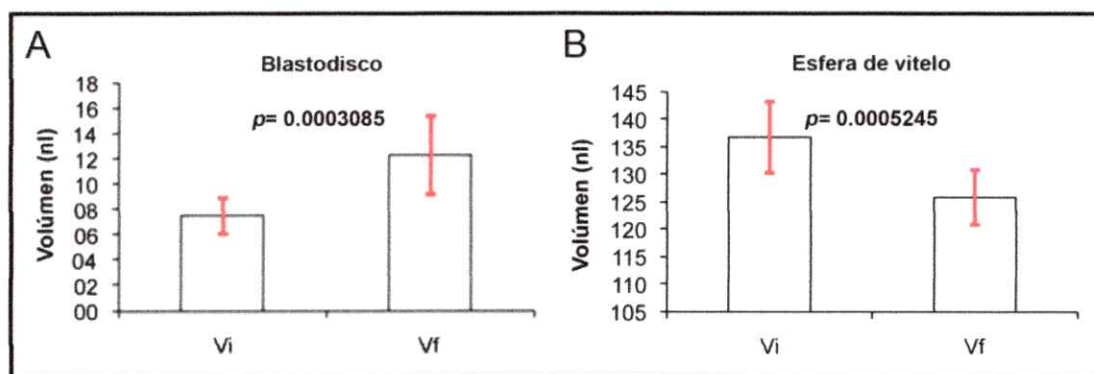


Figura 8. Gráficos que representan los cambios ocurridos en el volumen del blastodisco y la esfera de vitelo durante el flujo lento. A: crecimiento del blastodisco y B: disminución del volumen de la esfera de vitelo durante el estado 1b del cigoto. El volumen inicial (V_i) y final (V_f) del blastodisco y de la esfera de vitelo fue determinado por mediciones realizadas en imágenes obtenidas de cigotos vivos. El aumento en el volumen final del blastodisco y la disminución de éste en la esfera de vitelo fue variable, pero significativo con un valor de $p < 0,05$. Lo anterior indica que el flujo lento de ecto y endoplasma contribuyeron al crecimiento del blastodisco. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

5.1.c.3. Movimiento rápido de endoplasma y ectoplasma durante la primera división de clivaje (estado 1c temprano)

El movimiento hacia el polo animal de marcadores endógenos y exógenos, a través del endoplasma fue analizado en animaciones iniciadas antes o al mismo tiempo en que comenzó la contracción del anillo de actina. La contracción de este anillo se acompañó de movimiento rápido, hacia el polo animal, de inclusiones endoplásmicas animales y algunas vegetales como así también de glóbulos de vitelo hacia el blastodisco (Figuras 9A, B. n=35). Las inclusiones endoplásmicas se movieron a lo largo de "streamers" axiales y meridionales, mientras que los glóbulos de vitelo lo hicieron a lo largo de su superficie. Para determinar la existencia de rutas secundarias para el transporte de endoplasma, se realizó un seguimiento de microesferas fluorescentes (n=20), microinyectadas en diferentes regiones de la esfera de vitelo. El patrón de movimiento rápido de inclusiones y microesferas fue similar durante el estado 1c temprano (comienzo del primer clivaje), observándose el traslado de éstos marcadores hacia el blastodisco a lo largo de "streamers" axiales y lagunas del hemisferio animal, como así también de lagunas del hemisferio vegetal (Figuras 9C-E). Estos resultados confirman lo anteriormente descrito por video microscopía, en relación a un desplazamiento ordenado de endoplasma hacia el blastodisco. Durante el estado 1c tardío, ovoplasma proveniente de lagunas periféricas fue transportado a través de "streamers" meridionales, los cuáles formaron conexiones transitorias con el ectoplasma vecino (Figuras 9F, G; ver Video 5).

En el estado 1c temprano, las inclusiones citoplásmicas y lagunas vegetales de endoplasma se movieron hacia el blastodisco a altas velocidades ($9,6 \pm 3,3$

$\mu\text{m}/\text{min}$ en promedio) a través de "streamers" axiales, siguiendo trayectorias rectas (Figura 9H). El movimiento de las microesferas fluorescentes sigue una trayectoria similar (Figura 10I), pero a mayor velocidad ($39 \pm 1,3 \mu\text{m}/\text{min}$ en promedio). Durante éste estado las inclusiones citoplasmáticas y fluoroesferas, se mueven también hacia el blastodisco a lo largo de "streamers" meridionales y a una velocidad mucho más alta, alcanzando velocidades promedio de $40 \pm 2,8$ y $73 \pm 3,9 \mu\text{m}/\text{min}$, respectivamente. Así, los "streamers" meridionales constituirían rutas de transporte de endoplasma ultrarápidas hacia el polo animal. La representación estadística de velocidades obtenidas durante éste análisis son mostradas en las figuras 9J y 9K.

De lo anteriormente descrito se puede concluir que durante las fases de movimiento lento y rápido de endoplasma el contenido de las lagunas ubicadas en el hemisferio animal y parte de las ubicadas en el hemisferio vegetal, son incorporadas al blastodisco durante el primer ciclo celular.

Durante el estado 1c temprano, el movimiento hacia el blastodisco de inclusiones citoplasmáticas y de microesferas fluorescentes, ($n=7$), a lo largo del ectoplasma animal y vegetal fue preferencialmente lento ($5,0 \mu\text{m}/\text{min}$ en promedio para las inclusiones) y a una mayor velocidad ($9,1 \mu\text{m}/\text{min}$ en promedio para las fluoroesferas). Las inclusiones en el resto del ectoplasma vegetal se movieron hacia el polo vegetal, se desplazaron hacia adelante y hacia atrás en diferentes direcciones ó permanecieron estacionarias (no mostrado). No se visualizó un flujo constante de ectoplasma vegetal hacia el polo animal.

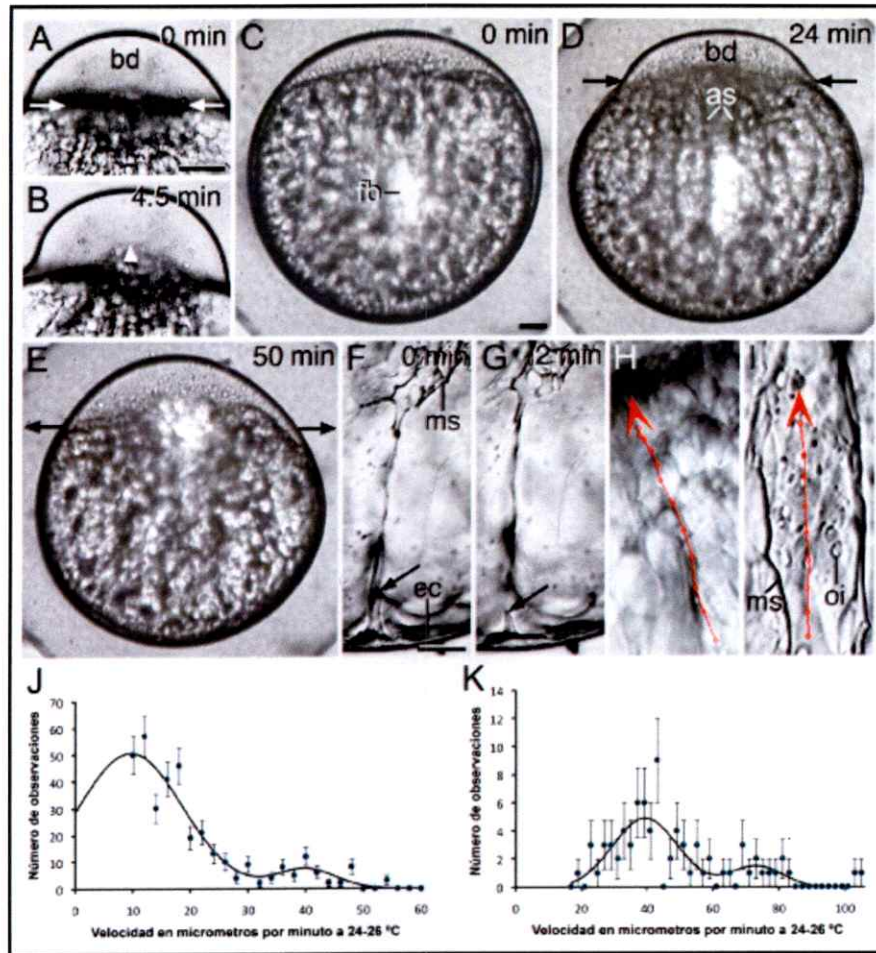


Figura 9. Movimiento rápido de inclusiones ovoplásmicas y microesferas fluorescentes. Vista lateral de un montaje completo de zigotos en el estado 1c que ilustran el movimiento rápido de endoplasma durante la primera división de clivaje. A-E, imágenes seleccionadas de una animación, capturadas a intervalos de 10 s. **A:** inicio de la contracción del anillo de actina (flechas hacia adentro). **B:** movimiento rápido de endoplasma y glóbulos de vitelo (yg) hacia el blastodisco (bd). **C-E:** imágenes seleccionadas de una animación de un zigoto microinyectado en el centro de la esfera de vitelo con microesferas marcadas con rodamina. Durante el estado 1c (D, E) el endoplasma junto a las fluoroesferas (fb) se mueven rápidamente hacia el blastodisco (bd) a través de “streamers” axiales (as). Durante el estado 1c tardío (D) éstas se acumulan en la interfase blastodisco/vitelo, lugar donde se está relajando el anillo de actina (flechas hacia fuera en E). Desarrollo a 20 °C. Se indica el tiempo en minutos entre cada imagen. **F-I:** imágenes detenidas de un “time lapse” de dos zigotos que muestran una conexión transitoria (flechas) entre un “streamer” meridional (ms) y el ectoplasma (ec) vegetal. Las imágenes fueron capturadas a intervalos de 10 s. Desarrollo a 24 °C. **H, I:** trayectoria recta de inclusiones ovoplásmicas (H) a lo largo de un “streamer” axial y de esferas fluorescentes (I) a lo largo de un “streamer” meridional. La posición de la inclusión o microesfera, a intervalos de 30 s, fue marcada con un círculo rojo y su trayectoria con una línea continua unida a cada círculo. Las cabezas de flecha indican la dirección del movimiento. Desarrollo a 24-25 °C. **J, K:** gráficos que muestran la distribución

de las velocidades del movimiento rápido de inclusiones ovoplásmicas (J) y microesferas fluorescentes (K) en montajes de cigotos completos durante el estado 1c. Las líneas negras son la suma de dos curvas Gaussianas ajustadas a los datos experimentales. oi; inclusión ovoplásmica. Barra= 120 μm (A-C), 60 μm (D-G), 20 μm (H-J), 20 μm (K-L).

5.1.c.4. Movimiento lento de ovoplasma durante el término de la primera división de clivaje (estado 1c tardío)

Con el fin de conocer el comportamiento del ovoplasma durante el término del primer ciclo celular, animaciones de embriones tempranos (n=11) fueron preparadas mediante video microscopía (Figuras 10A-I). La relajación del anillo de actina durante éste período se acompañó de un movimiento hacia la región vegetal, de: 1) inclusiones animales ecto y endoplasmáticas, incluyendo muchas que ya habían sido incorporadas al blastodisco y 2) glóbulos de vitelo, que invadieron el blastodisco durante el flujo rápido, reincorporándose a la esfera de vitelo (Figuras 10F, G). Estos objetos se movieron con una velocidad promedio lenta de 5,0 $\mu\text{m}/\text{min}$, mientras que las inclusiones del ecto y endoplasma vegetal se movieron en diferentes direcciones ó permanecieron estacionarias.

5.1.c.5. Movimiento de ovoplasma en el huevo no fecundado y durante el transcurso del clivaje

El traslado lento y rápido de ecto y endoplasma, la formación de "streamers" y el pseudoclivaje del blastodisco, ocurrieron en el huevo no fecundado (n=25, no mostrado). Durante los sucesivos ciclos de contracción/relajación del anillo de actina en embriones tempranos (n=22), las inclusiones citoplasmáticas y los glóbulos de vitelo mostraron el mismo desplazamiento de retroceso hacia la esfera de vitelo durante la fase de relajación, mientras que durante la fase de contracción del anillo entraron rápidamente al blastodermo (Figuras 10H, I). Después de varios eventos de clivaje, el endoplasma comenzó a hacerse menos visible en la esfera de vitelo. Al mismo tiempo, "streamers" cada vez más finos fueron visualizados con el transcurso

de ciclos de contracción/relajación. El movimiento de inclusiones a través del ectoplasma del embrión temprano en clivaje, no fue determinado.

Lo anterior confirmó y complementó la observación de otros investigadores en relación a las propiedades del huevo no fecundado activado (Kane y Kimmel, 1993; Webb et al., 1997).

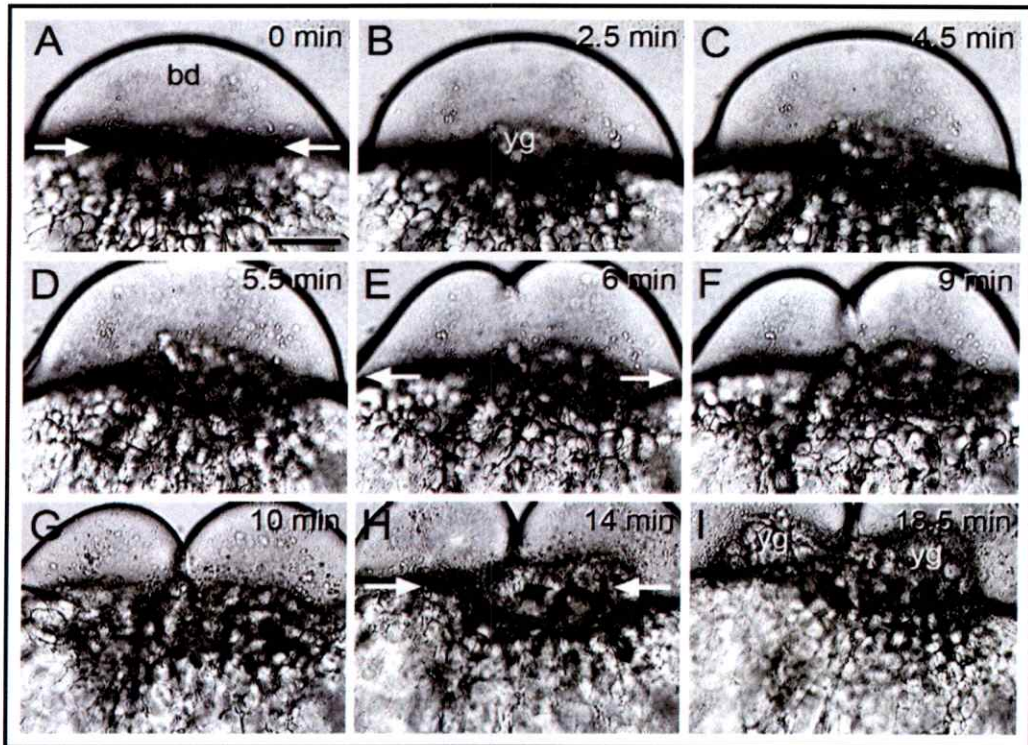


Figura 10. Movimiento de endoplasma y glóbulos de vitelo durante el clivaje en el embrión temprano del pez cebra. Imágenes seleccionadas de una animación obtenida por video microscopía del mismo cigoto de la Figura 9A y B, que muestra el crecimiento del blastodisco (bd) durante el estado 1c (A-E) y el clivaje temprano (F-I). Nótese que la primera contracción del anillo de actina (flechas dirigidas hacia adentro en A) provocó la entrada de una gran cantidad de endoplasma y glóbulos de vitelo (yg) al blastodisco (A-D). La relajación del anillo de actina (flechas dirigidas hacia afuera en E), por el contrario, se acompañó del retorno de endoplasma y glóbulos de vitelo a la esfera de vitelo (E-G). Una segunda contracción del anillo de actina (flechas dirigidas hacia adentro en H) durante el clivaje, provocó otro episodio de entrada de citoplasma y glóbulos de vitelo al blastodermo (H, I). Se indica el tiempo transcurrido entre las imágenes. Desarrollo a 25 °C. Barra= 100 μ m.

5.1.c.6. El fenómeno de las pulsaciones

Durante el estado 1b, el cigoto mostró intermitentes deformaciones a lo largo del eje animal/vegetal denominadas pulsaciones (ver Video 6). Las pulsaciones continúan durante el estado 1c, junto con la contracción/relajación del anillo de actina y también durante el clivaje, cuando el número y extensión de las pulsaciones fue variable de cigoto a cigoto. Entre los 22-25 °C, se observaron pulsaciones de alta frecuencia (2-3 min de duración) y pulsaciones de baja frecuencia (que se extendieron por varios minutos). Hasta 19 episodios de pulsación fueron detectados en un cigoto. Entre los 25-28 °C, también se observaron pulsaciones de alta frecuencia. Además, el número y extensión de las pulsaciones aumentó con el transcurso del desarrollo del embrión.

5.2. Análisis de la organización y propiedades dinámicas del citoesqueleto durante la segregación ovoplásmica

5.2.a. Organización del citoesqueleto en lagunas de endoplasma y canales de transporte o “streamers”

La organización del citoesqueleto fue estudiada mediante inmunofluorescencia, en montajes de cigotos completos ó fragmentados, y examinados bajo microscopía confocal (n=16) y de fluorescencia (n=27). Lagunas de endoplasma fueron visualizadas, a bajo aumento, entre los glóbulos de vitelo en la esfera de vitelo. Cortes ópticos mostraron que el endoplasma incluye un citoesqueleto de filamentos de actina (Figura 11A) y microtúbulos (Figura 11B). Las lagunas eran irregulares, interconectadas y ricas en citoesqueleto. Microtúbulos y filamentos de actina, visualizados a mayor aumento, se distribuyeron formando una

compleja red tridimensional que ocupa todo el volúmen de la laguna (Figuras 11C-E). Manojos paralelos de microtúbulos ó microfilamentos, como los descritos en el polo vegetal del cigoto temprano (Jesuthasan y Strähle, 1997), no se visualizaron a través del endoplasma.

Imágenes de video microscopía de fluorescencia mostraron que algunos manojos de citoesqueleto se encuentran desorganizados (Figura 11F, G) o formando una red (Figuras 11K-M). Estos resultados indican que el citoesqueleto presente en lagunas de endoplasma muestran diferentes tipos de organización, probablemente asociados al estado funcional del citoesqueleto ó a su preservación durante la fijación.

Mediante microscopía confocal se examinó, con mayor resolución, la distribución de microtúbulos y filamentos de actina en el endoplasma. Imágenes desconvolucionadas de inmunofluorescencias dobles tomadas desde cortes ópticos, mostraron que los microfilamentos y microtúbulos codistribuyen (Figuras 11H, I). Sin embargo, la superposición de imágenes (Figura 11J) indica que microtúbulos y filamentos de actina forman manojos que se encuentran separados ó codistribuyendo. Imágenes, capturadas a mayor aumento, revelaron que microfilamentos y microtúbulos forman manojos separados de 0,5-1,5 μm de espesor. Por otro lado, en algunos lugares los microtúbulos y filamentos de actina codistribuían dentro del mismo manajo (Figuras 11K-M). Estos resultados sugieren que el citoesqueleto en las lagunas de endoplasma incluye manojos de microtúbulos y actina individuales ó mezclados.

Una malla ectoplásmica de microtúbulos y microfilamentos (Figura 11N) ha sido reportada en la corteza del pez cebra (Hart y col., 1992; Becker y Hart, 1996,

1999) y otros peces teleósteos (Hart y Fluck, 1995). En zigotos control, incubados sólo con el segundo anticuerpo, no se detectó la presencia de microtúbulos ni de filamentos de actina (Figura 11O). En ocasiones, zigotos en el estado 1b temprano presentan un arreglo de manojos de microtúbulos en el ectoplasma vegetal (Figura 11P), similar a lo descrito por Jesuthasan y Strähle (1997). Una red de microtúbulos fue también visualizada en lagunas de endoplasma (Figura 11Q), en inmunofluorescencias de zigotos fragmentados y sometidos al mismo procedimiento utilizado por Jesuthasan y Strähle (1997). Finalmente, perfiles filamentosos, sugiriendo la presencia de componentes del citoesqueleto, no fueron detectados en zigotos control microinyectados con dextrano fluorescente (Figura 11R).

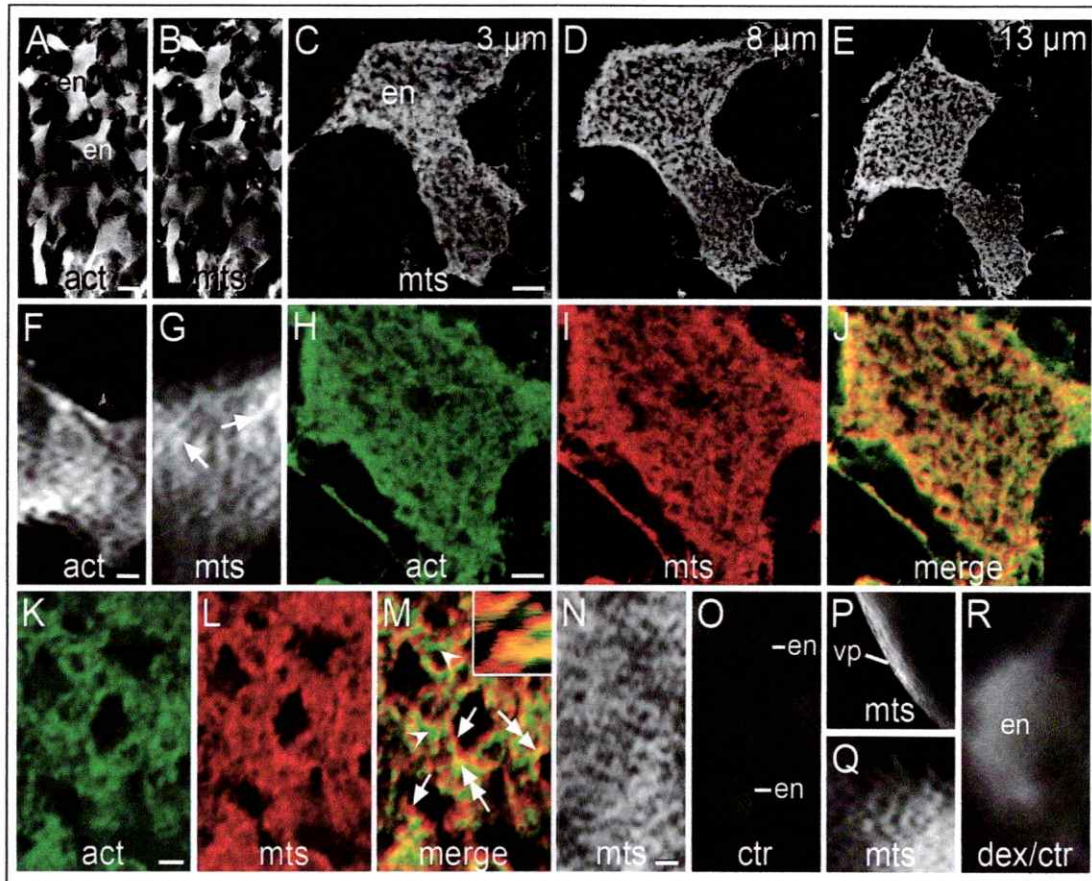


Figura 11. Organización del citoesqueleto en lagunas de endoplasma y “streamers”. Inmunofluorescencias visualizadas bajo microscopía confocal (A-E, H-J, K-M) y de fluorescencia (F, G, N-R). **A, B:** imágenes de bajo aumento de lagunas de endoplasma (en) teñidas para filamentos de actina (act) y microtúbulos (mts). **C-E:** imágenes desconvolucionadas y seleccionadas desde secciones ópticas ($15 \times 1 \mu\text{m}$ de espesor) a través de una laguna de endoplasma teñida para microtúbulos. Se indica la posición de la sección dentro del stack. **F, G:** manojos de microtúbulos (flechas en G) dispersos en una laguna de endoplasma. **H-J:** imágenes desconvolucionadas de una inmunotinción doble en una laguna de endoplasma y seleccionadas desde secciones ópticas ($15 \times 1 \mu\text{m}$ de espesor). Se muestra la red de manojos de microfilamentos (H), microtúbulos (I) y la superposición de éstos (J). **K-M:** imágenes desconvolucionadas de alto aumento de una inmunotinción doble en una laguna de endoplasma, tomadas de secciones ópticas ($18 \times 1 \mu\text{m}$ de espesor). Se muestra una red formada por manojos de filamentos de actina (cabezas de flecha), manojos de microtúbulos (flechas) y manojos mezclados de filamentos de actina y de microtúbulos (flechas de cabeza doble). El corte óptico a lo largo del eje X, mostrado en el inserto de la figura M, muestra lo anterior. **N:** red de microtúbulos en el ectoplasma. **O:** control incubado solo en el segundo anticuerpo. **P:** manojos de microtúbulos en el ectoplasma del polo vegetal (vp). **Q:** microtúbulos debilmente teñidos en una laguna de endoplasma de acuerdo a Jesuthasan y Strähle (1997). **R:** control que muestra una laguna de endoplasma de un cigoto microinyectado con dextrano marcado con rodamina. Barra= $10 \mu\text{m}$ (A-E), $6 \mu\text{m}$ (F), $5,5 \mu\text{m}$ (G), $5 \mu\text{m}$ (H-J), $2 \mu\text{m}$ (K-M), $5,6 \mu\text{m}$ (N), $10,5$ (O), $15 \mu\text{m}$ (P), $4 \mu\text{m}$ (Q), $2 \mu\text{m}$ (R).

5.2.b. Efecto de venenos del citoesqueleto

5.2.b.1. Las pulsaciones y la organización del ovoplasma son dependientes del citoesqueleto de actina

Para conocer el papel del citoesqueleto en el transporte de ovoplasma durante la segregación ovoplásmica, huevos y cigotos fueron microinyectados y/o incubados en drogas que desestabilizan sus componentes. Para evaluar el papel de los microtúbulos durante este proceso, cigotos en estado 1b fueron tratados con Colchicina ó Colcemida (n=15). El papel de los filamentos de actina, fue evaluado incubando los huevos y cigotos en Citochalasin B ó Latrunculina B (n=22).

Video microscopía de tiempo interrumpido del seguimiento de inclusiones citoplasmáticas (n=12), microesferas fluorescentes o dextrano (n=8) en cigotos vivos mostró que durante la pulsaciones el endoplasma se mueve al blastodisco o se aleja de este a lo largo del eje/animal vegetal. Así, el endoplasma más animal entró y salió del blastodisco después de cada pulsación en la mitad superior del cigoto.

Durante la fase de movimiento lento y rápido ovoplasma se observaron dos tipos de pulsaciones: a) unas de baja frecuencia, en que las inclusiones citoplasmáticas se movieron lentamente hacia adelante y hacia atrás, y unas de alta frecuencia, en que las inclusiones se movieron más rápido. En algunos casos, la aparición de pulsaciones de alta frecuencia fue acompañada de cambios en la dirección del ovoplasma.

Además, se observó que durante cada pulsación, la fase de acortamiento del eje animal/vegetal es de mayor duración que la fase de alargamiento, por lo que más endoplasma entró al blastodisco del que salió (Figura 12A).

Las pulsaciones fueron bloqueadas después de la incubación de los cigotos en

venenos de actina como Citochalasin B ó Latrunculina B, pero no después de la incubación en inhibidores de microtúbulos como Colchicina o Colcemida (Figuras 12B, C). Esto sugiere que las pulsaciones son movimientos de deformación dependientes de actina. Al mismo tiempo, se observó que los cigotos incubados en estas drogas adquirieron una forma aplanada, no se formaron "streamers" ni ocurrió contracción del anillo de actina (ver también Leung y col., 2000), el blastodisco formado era más pequeño y algunas lagunas de endoplasma eran más grandes que en el control (Figura 12D). Mediante fijación ácida de varios cigotos (n=25) se visualizó la formación de grandes lagunas de endoplasma desconectadas unas de otras en la esfera de vitelo (Figura 12E). Los cigotos controles incubados en DMSO al 2% se desarrollaron normalmente (Figura 12F).

Para analizar la distribución del citoesqueleto de actina en los cigotos tratados con drogas (n=18) se realizaron inmunofluorescencias. La red de actina presente en las lagunas de endoplasma (Figuras 12G, H) y en el ectoplasma (Figuras 12J, K) formaron numerosos agregados esféricos o irregulares de 1-5 μm de diámetro, considerados como fragmentos de actina. Estos fragmentos corresponderían a los descritos por Katow (1983) en huevos del pez cebra tratados con Citochalasin B. El estudio de éstos fragmentos por microscopía electrónica de transmisión reveló que la droga provocó una drástica desorganización del citoesqueleto de actina endoplásmico (interno) y ectoplásmico (periférico). Cigotos control incubados en DMSO al 2% mostraron que la red de actina permaneció inalterada, tanto en el endoplasma (Figura 12I) como en el ectoplasma (Figura 12L).

De estos resultados se puede concluir que los filamentos de actina asociados al endoplasma probablemente contribuyen a la generación de las pulsaciones y al

mantenimiento de la organización de las lagunas de endoplasma.¹

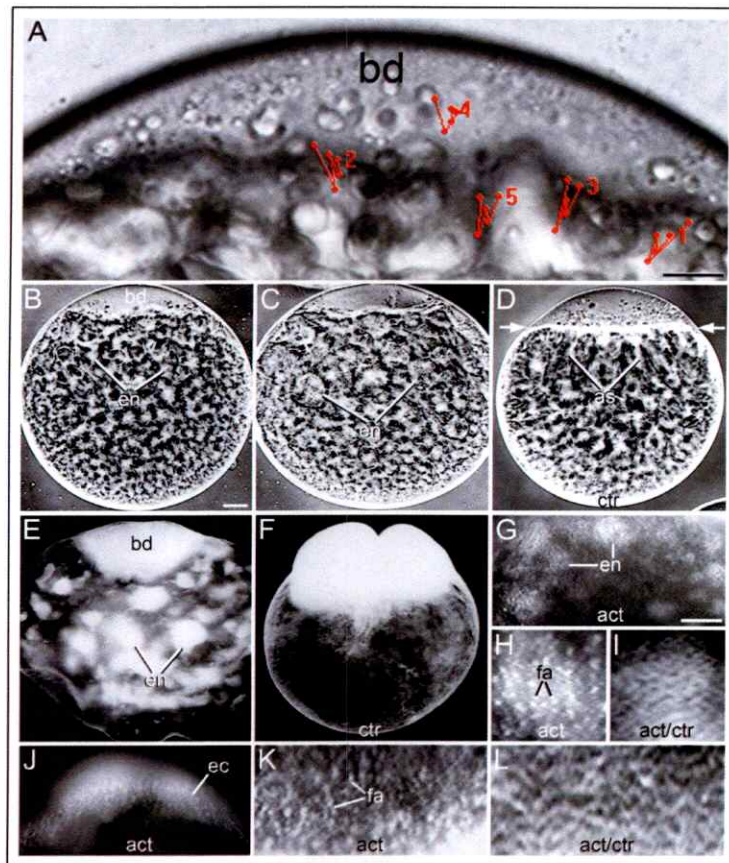


Figura 12. Efecto de drogas que afectan el citoesqueleto en la generación de pulsaciones y en la organización del endoplasma. Vista lateral de montajes completos de zigotos que muestran el movimiento de inclusiones durante las pulsaciones y el efecto de drogas que afectan a la actina. **A:** movimiento de 5 inclusiones ovoplásmicas durante una pulsación de alta frecuencia en el estado 1b del zigoto. Cada inclusión fue seguida de manera independiente en intervalos de 10 s, a partir de una animación realizada por video microscopía. El número indica la posición inicial de la inclusión. **B:** incubación en Citochalasin B por 45 min. **C:** incubación en Latrunculina B por 2 h. **D:** control incubado por 45 min en agua de acuario con DMSO. Se observa la contracción del anillo de actina y la formación de “streamers” axiales (as). **E:** zigoto tratado con Latrunculina B que muestra la desorganización de las lagunas de endoplasma después de 80 min de incubación en la droga. **F:** zigoto control incubado por la misma cantidad de tiempo en DMSO al 2%. **G-H:** imágenes de bajo y alto aumento de actina fragmentada (fa) en lagunas de endoplasma de un zigoto incubado en Citochalasin B por 80 min. **I:** red de actina (act) en una laguna de un zigoto control incubado en DMSO al 2% por la misma cantidad de tiempo. **J, K:** imágenes de bajo y alto aumento de actina fragmentada en el ectoplasma (ec) de un zigoto incubado en Latrunculina B por 1 h. **L:** red de actina de un zigoto control incubado por la misma cantidad de tiempo en DMSO al 2%. Desarrollo a 25 °C. bd, blastodisco; ctr, control. Barra= 16 μm (A), 60 μm (B-F), 45 μm (G), 25 μm (H), 7 μm (I), 12 μm (J), 20 μm (K), 7 μm (L).

5.2.c. Identificación y distribución de motores moleculares y proteínas asociadas al citoesqueleto

La presencia de una red tridimensional citoesquelética de microtúbulos y filamentos de actina en las lagunas de endoplasma y el movimiento de este último sugieren fuertemente la participación de motores moleculares y proteínas asociadas al citoesqueleto en el transporte de ovoplasma en el cigoto y embrión temprano del pez cebra. De esta manera, fue interesante explorar la presencia y distribución de motores moleculares, como así también, de algunas proteínas involucradas en la nucleación de microtúbulos y microfilamentos.

Para la identificación y posterior inmunodetección de éstas proteínas, a partir de extractos de cigotos colectados durante el "peak" de la segregación ovoplásmica, ($n > 500$), se desarrolló un protocolo para aislar proteínas asociadas a microtúbulos (modificado de Paschal y col., 1987) y uno para aislar proteínas asociadas a filamentos de actina (modificado de Becker y Hart, 1996). Para más detalle ver la sección Materiales y Métodos.

El análisis de geles de acrilamida al 10% en condiciones desnaturantes teñidos, mostraron patrones de bandeo que sugirieron estar en presencia de proteínas del citoesqueleto de acuerdo a los distintos tamaños relativos observados en los geles. Por ejemplo, para el caso de proteínas asociadas al citoesqueleto de microtúbulos se observaron bandas entre los 45-55 kD, rango en que se interpretó como perteneciente a proteínas como las tubulinas y la dinamitina o proteína p50, bandas entre 70-80 kD rango en que se esperaba encontrar, por ejemplo, a la cadena liviana de la dineína citoplasmática y bandas de tamaño superior pertenecientes a la kinesina y a alguna de las MAPs ("Microtubule-Associated Proteins"). Por otro lado,

también se observaron bandas de tamaños relativos que se interpretaron como proteínas del citoesqueleto de actina con un peso molecular en el rango de los 20-30 kD, lo que sugirió estar en presencia de proteínas como Cdc42, cofilina y profilina; entre los 40-60 kD, rango perteneciente a proteínas como la actina, Arp2, Wasp y tamaños sobre los 200 kD en donde uno puede encontrar, por ejemplo, a la cabeza pesada de la miosina II.

El siguiente paso fue identificar, mediante inmunodetección con anticuerpos específicos, las proteínas asociadas al citoesqueleto presentes en las fracciones analizadas en geles de poliacrilamida. Los resultados de los inmunoblots confirmaron la presencia de α -tubulina y de motores moleculares asociados a microtúbulos como la dineína citoplasmática y una proteína de interacción con esta última, la proteína p50 (Figura 13A). De igual manera, se encontró actina y algunas proteínas involucradas en su nucleación, como la proteína Arp2, cofilina y profilina (Figura 13B). Otras proteínas inmunodetectadas fueron la γ -tubulina y la miosina II (no mostrado). Proteínas como la kinesina, Arp3 y Wasp mostraron más de una banda inmunoreactiva en los inmunoblots, resultado probablemente asociado a inespecificidad de los anticuerpos (no mostrado).

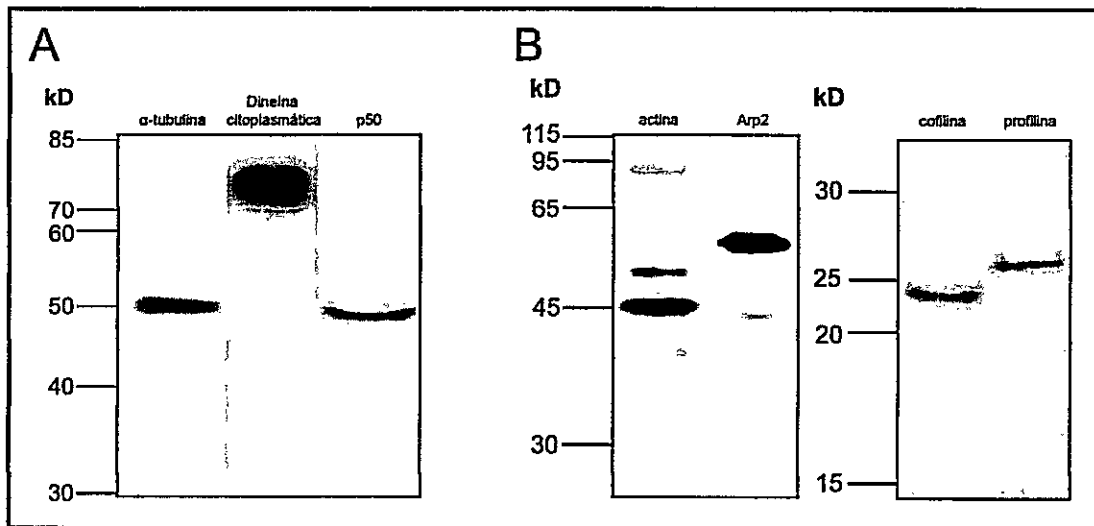


Figura 13. Identificación de proteínas asociadas a microtúbulos y filamentos de actina en zigotos del pez cebra. A: los inmunoblots muestran la presencia de proteínas solubles asociadas a microtúbulos en la última fracción sobrenadante (S5), visualizado como bandas de inmunoreactividad positiva alrededor de los 50 kD, peso que corresponde a la α -tubulina y a la proteína p50 y de aproximadamente 72 kD, correspondiente a la cadena intermedia de la dineína citoplasmática. B: Inmunodetección de actina, alrededor de los 45 kD y de proteínas asociadas a su nucleación como la proteína Arp2, cofilina y profilina, con pesos de aproximadamente 53 kD, 23 kD y 26 kD, respectivamente.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia confirmaron la presencia de algunas de éstas proteínas y mostraron además, su distribución en el cigoto y embrión temprano. Imágenes de video microscopía de fluorescencia mostraron que la dineína citoplasmática (n=8) y la kinesina (n=6) se encontraron distribuidas uniformemente a través de lagunas de endoplasma y canales de transporte (no mostrado). Por otro lado, la miosina II (n=10) mostró un patrón de distribución puntiforme a través del ectoplasma, lagunas de endoplasma y "streamers" (Figuras 14A-C), consistente con la distribución reportada para ésta proteína en el ectoplasma del huevo del pez cebra recién activado (Becker y col., 1996; 1999). Se realizó además la inmunodetección de proteínas asociadas a la actina como la cofilina (n=8), la cuál fue encontrada, en el cigoto y embrión temprano, con la misma distribución de la miosina II (Figuras 14D-F). Este patrón de distribución, descrito por primera en el cigoto del pez cebra, podría indicar la presencia de múltiples sitios de nucleación de la proteína presente en un dinámico citoesqueleto de actina en constante recambio. Un patrón de distribución similar de esta proteína, ha sido reportada en el citoplasma del ovocito y embrión temprano de *Drosophila* (Chen y col., 2001; Blair y col., 2006).

De esta manera, la presencia de motores moleculares y proteínas asociadas al citoesqueleto sugieren que éstos podrían encargarse, junto al citoesqueleto, de la segregación ovoplásmica.

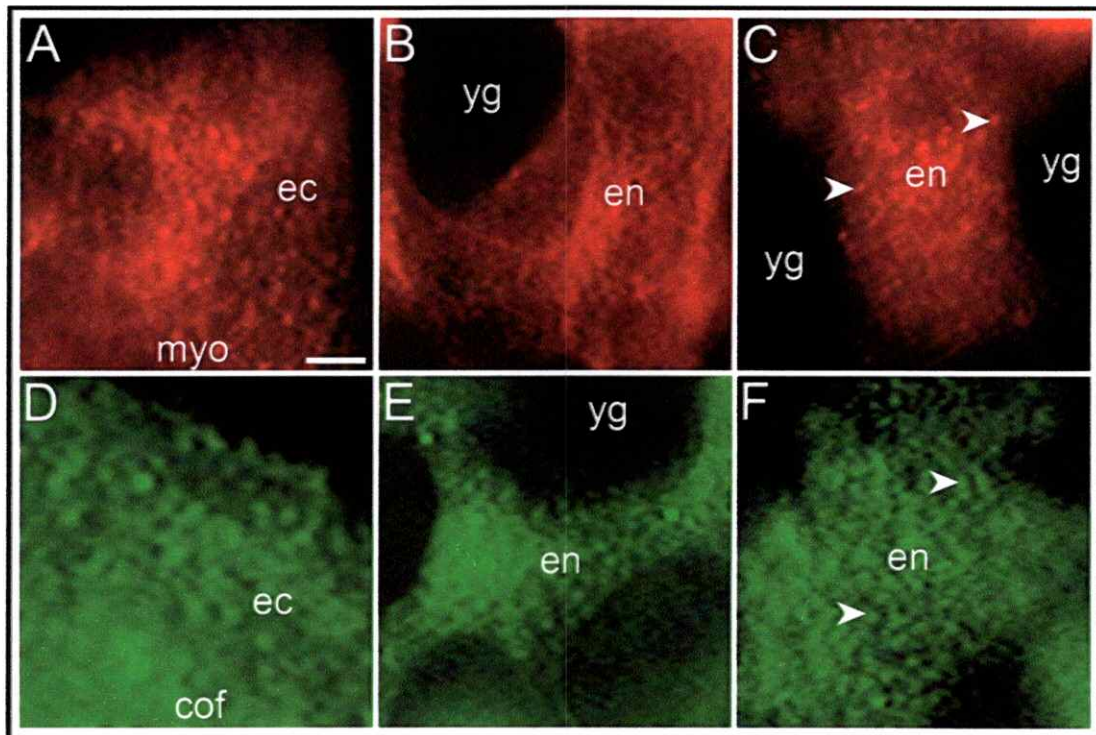


Figura 14. Distribución de motores moleculares y proteínas nucleadoras del citoesqueleto en el cigoto del pez cebra. A-C: inmunolocalización de miosina II (myo) a través del ectoplasma (A) y endoplasma (B) determinada por el uso del anticuerpo específico contra la cadena pesada de la miosina II no muscular. Nótese el patrón de distribución puntiforme de la proteína en los dominios de ovoplasma visualizada en una imagen a alto aumento (cabezas de flecha en C). D-F: inmunotinción de cofilina (cof) ectoplásmica (D) y endoplásmica (E) en el cigoto del pez cebra. La distribución de esta proteína muestra un patrón similar al observado para la miosina II a través del ovoplasma (cabezas de flecha en F). ec, ectoplasma; en, endoplasma; yg, glóbulos de vitelo. Barra= 11,4 μm (A, E), 22,8 μm (B, C y F), 9 μm (D).

5.2.d. Análisis del papel de motores moleculares en el flujo ovoplásmico

La presencia de un ubicuo citoesqueleto de microtúbulos y microfilamentos, además de sus proteínas asociadas, permite inferir que éste funcionaría junto a motores moleculares durante el flujo de ovoplasma, debido a que es sabido que el transporte de los diversos componentes celulares, entre ellos determinantes maternos, es dependiente de la actividad de estos motores (Januschke y col., 2002).

Para evaluar el posible papel de proteínas motoras, asociadas a microtúbulos y filamentos de actina, en el flujo masivo de ovoplasma hacia la región del blastodisco, se realizaron ensayos de funcionalidad bloqueando la actividad de motores moleculares mediante la microinyección de anticuerpos ó de reconocidos inhibidores de ATPasas como *N*-etilmaleimida (NEM) y de la actividad de la miosina II como la blebbistatina.

Resultados preliminares mostraron que fijaciones ácidas de zigotos microinyectados con anticuerpos contra motores asociados a microtúbulos, como la dineína citoplasmática (n=25) y kinesína (n=20), la formación de "streamers" y el flujo ovoplásmico fueron alterados (Figura 15). Esto se visualizó por la presencia de una gran cantidad de ovoplasma remanente entre los glóbulos de vitelo (Figuras 15A-H). El bloqueo de la actividad de la dineína citoplasmática fue evidenciada también, como una ausencia de divisiones celulares en el blastodisco, evento que junto a la formación de "streamers" no se observaron alterados en los zigotos microinyectados con anti-kinesína (Figuras 15F, H).

Zigotos microinyectados con el inhibidor de la actividad ATPasa de la dineína citoplasmática (n=32), que a concentraciones adecuadas tiene este efecto, mostraron resultados similares a los obtenidos con la microinyección del anticuerpo

(Figuras 16C, D). Por otro lado, el uso de un inhibidor específico de la actividad de la miosina II, como lo es la blebbistatina, mostró un efecto en la organización de las lagunas, en la formación de “streamers” y en el transporte de ovoplasma hacia el blastodisco (Figura 16E, F). Resultados similares fueron observados en zigotos tratados con drogas del citoesqueleto de actina y que fueron descritos anteriormente.

Alteraciones en la formación de “streamers” y del surco de clivaje, retención de ovoplasma en la esfera de vitelo y ausencia de divisiones celulares, no fueron observadas en embriones tempranos control (n=33) microinyectados con agua (Figuras 15A, B), azida de sodio (Figuras 15C, D) o DMSO (Figuras 16A, B).

El resultado de éstos ensayos funcionales muestran que probablemente el flujo de ovoplasma, durante la segregación ovoplásmica, se debe a la actividad de motores moleculares presentes en el cigoto.

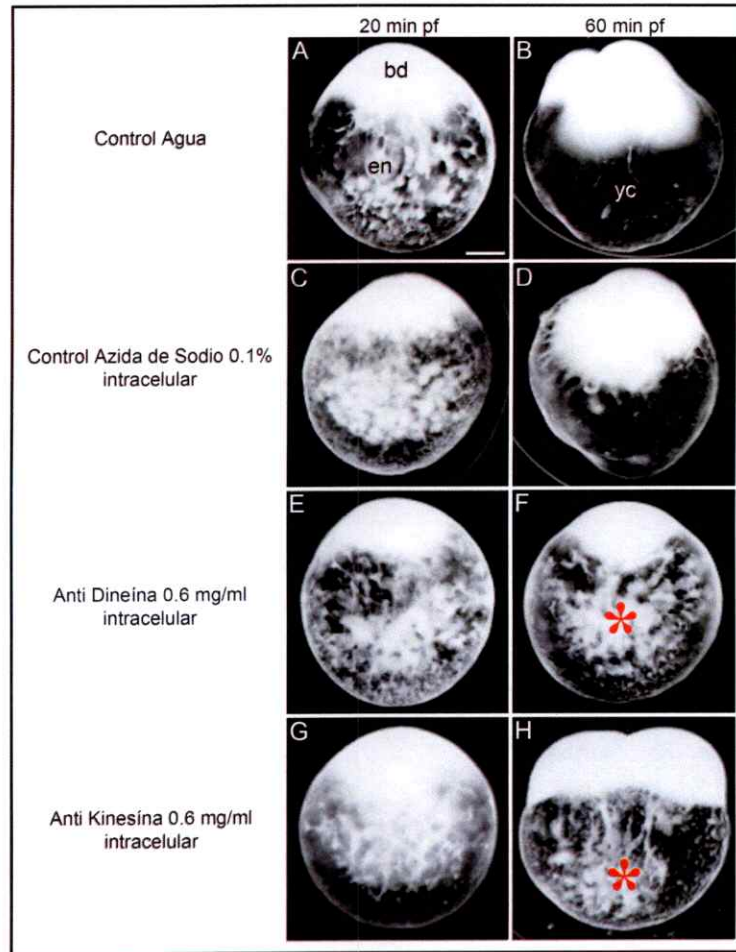


Figura 15. Efecto de anticuerpos anti-motores moleculares asociados a microtúbulos en el desarrollo temprano del pez cebra. Los zigotos fueron microinyectados con el mismo anticuerpo con el que se identificó la dineína citoplasmática y la kinesína en extractos de zigotos del pez cebra. Un tiempo después de la inyección las células fueron fijadas en formaldehído-ácido acético y estudiadas por video microscopía. Las imágenes muestran el efecto de los anticuerpos, que se traduce en la retención de una cantidad significativa de ovoplasma (asterisco rojo) en la esfera de vitelo como resultado de la acción del anticuerpo (**G-H**). Nótese que tanto la microinyección de agua (**A, B**), como la de azida de sodio (**C, D**) no afectaron el normal desarrollo de los zigotos. Desarrollo a 25 °C. bd, blastodisco; en, endoplasma; yc, esfera de vitelo; min pf, minutos postfecundación. Barra= 140 µm.

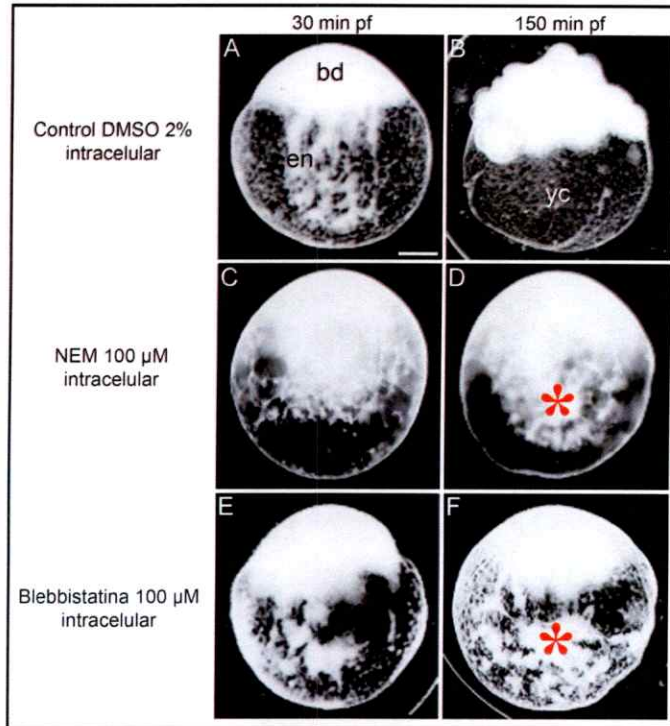


Figura 16. Efecto de *N*-etilmaleimida (NEM) y Blebbistatina en el desarrollo temprano del pez cebra. Zigotos vivos fueron microinyectados con el inhibidor de ATPasas *N*-etilmaleimida (NEM) y el inhibidor específico de la miosina II, blebbistatina. Posteriormente fueron fijados en formaldehído-ácido acético. La distribución del ovoplasma (en blanco) y de los glóbulos de vitelo (en negro) muestra el efecto de los inhibidores en los zigotos tratados (C-F), que se manifiesta con la retención de ovoplasma en la esfera de vitelo (asterisco rojo). En contraste, los zigotos microinyectados con DMSO (A y B) muestran un desarrollo normal. Desarrollo a 25 °C. bd, blastodisco; en, endoplasma; yc, esfera de vitelo; min pf, minutos postfecundación. Barra= 140 μ m.

5.2.e. Localización y distribución temporal de transcritos maternos durante la segregación ovoplásmica

Con el fin de conocer la localización y distribución del producto de ciertos genes maternos y su relación con las vías de transporte de ovoplasma, se realizaron hibridaciones *in situ* de montajes completos de cigotos y embriones tempranos. Para esto, se eligió la detección del RNA mensajero de *gooseoid* (*gsc*), *squint* (*sqt*) y *vasa* (*vas*). Los referidos transcritos maternos adquieren una cierta localización durante la ovogénesis y el flujo ovoplásmico, provoca su relocalización y acumulación en el blastodisco. Así, los dos primeros mensajeros se mueven junto al endoplasma (Bally-Cuif y col., 1998; Howley y Ho, 2000; Gore y Sampath, 2002) mientras que *vas* lo hace por el ectoplasma del cigoto (Howley y Ho; Knaut y col., 2000; Pelegri, 2003).

5.2.e.1. Distribución de *gsc*, *sqt* y *vas*

Durante la primera interfase temprana del cigoto, el mRNA de *gsc* (n=42) y *sqt* (n=60) se localizan con en el blastodisco, “streamers” cortos y lagunas de endoplasma animales y vegetales (Figuras 17A, D). Comenzando la primera división de clivaje, *gsc* y *sqt* se observaron a lo largo de los “streamers” axiales (Figuras 17B, E). En el estadio de 2 células el transcrito de *sqt*, pero no el de *gsc*, se observó distribuido en la segunda generación de “streamers” axiales (Figuras 17C, F). Esto último sugiere que probablemente el mRNA de *gsc* se mueve hacia la región animal durante el primer ciclo celular, mientras que el de *sqt* lo estaría aún haciendo durante el segundo ciclo celular.

Por otro lado, en la primera interfase del cigoto (Figura 17G), *vas* (n=48) fue encontrado distribuido a lo largo del ectoplasma y el blastodisco, mientras que

durante la primera división de clivaje (Figuras 17H, I) fue visualizado a lo largo de “streamers” meridionales. En el estadio de 4 células (no mostrado), *vas* fue encontrado en los extremos distales de los surcos de clivaje, consistente con la distribución descrita para los componentes del plasma germinal (ver también Pelegri y col, 1999).

Juntos, estos resultados muestran la distribución del producto de ciertos genes maternos en los dominios de ovoplasma y diferentes rutas de transporte, sugiriendo la manera cómo estos podrían ser transportados hacia el blastodisco.

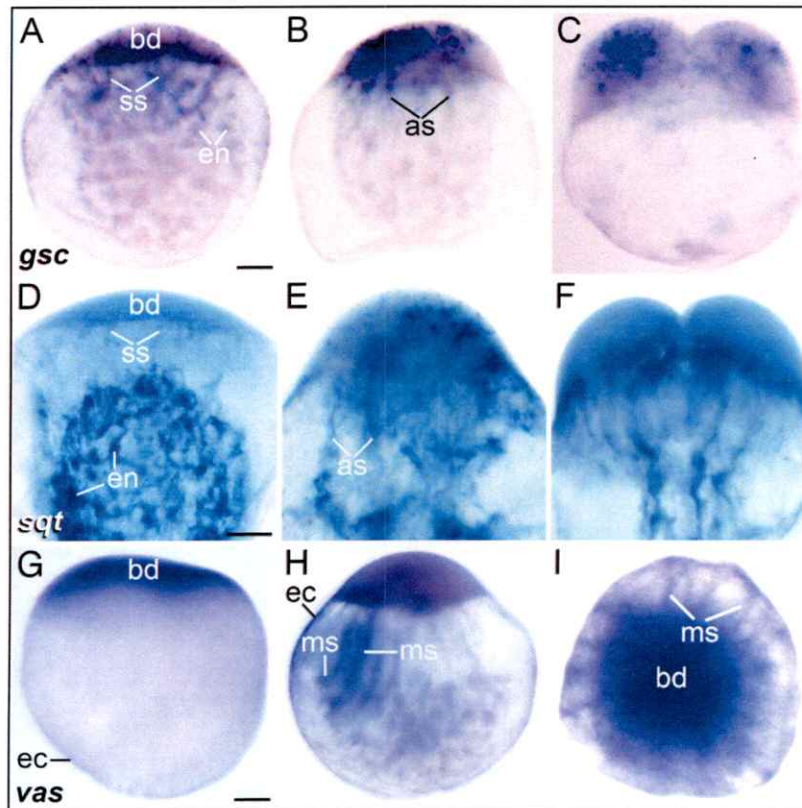


Figura 17. Distribución de transcritos maternos en los dominios de ovoplasma del cigoto y embrión temprano del pez cebra. Hibridaciones *in situ* que muestran la distribución espacio temporal de los mRNAs de *gsc*, *sqt* y *vas* a través del ectoplasma (ec), endoplasma (en) y en las distintas rutas de transporte ó “streamers”: cortos (ss), axiales (as) y meridionales (ms). Vista lateral (A-H) y animal (I) de montajes completos de cigotos en estado 1b (A, D, G), estado 1c (B, E, H, I) y embrión temprano de 2 células (C, F). Los estados del desarrollo fueron determinados por el tamaño del blastodisco (bd), la distribución de lagunas de endoplasma, presencia de “streamers” y contracción del anillo de actina. Sustratos cromogénicos: BM purple (A-C y G-I) ó NBT/BCIP (D-F). Barra = 90 μ m (A-C, G-I), 70 μ m (D-F).

5.3. Análisis de las alteraciones de la segregación ovoplásmica provocadas por mutaciones de efecto materno

El control genético del desarrollo ha sido intensamente estudiado en modelos de invertebrados y vertebrados tales como *Drosophila melanogaster* (revisado por St Johnston y Nüsslein-Volhard, 1992), *Caenorhabditis elegans* (Kemphues y Strome, 1997), *Xenopus laevis* (Wylie y Haesman, 1997) y más recientemente en *Danio rerio* (revisado por Lindeman y Pelegri, 2009). La aplicación en estos organismos de una variedad de técnicas genéticas y moleculares ha permitido la identificación de mutantes de efecto materno y del producto de éstos genes que juegan un importante papel en el control de los procesos tempranos del desarrollo.

La disponibilidad de estos mutantes, gracias a la colaboración existente entre nuestro laboratorio y el de la Dra. Mary Mullins (Universidad de Pensilvania en Filadelfia), nos permitió ahondar en el análisis de dos mutaciones: *bucky ball* y *emulsion*, que presentan defectos en el proceso de segregación ovoplásmica.

5.3.a. El mutante de efecto materno *bucky ball* (*buc*)

En una búsqueda ó “screening” de mutantes de efecto materno en el pez cebra, se identificaron 68 mutantes que muestran severos defectos en el desarrollo temprano y que incluso llegan a detenerlo (Dosch y col.; Wagner y col., 2004). Entre ellos, el mutante *bucky ball* (*buc*), que mostró marcadas alteraciones en la localización de transcritos maternos a lo largo del eje animal/vegetal, los cuáles finalmente se localizaron en la periferia del cigoto (Dosch y col., 2004; Marlow y Mullins, 2008). Por lo tanto, un análisis más detallado de éste mutante podría mostrar la manera cómo el gen *buc* regularía la segregación de determinantes

maternos en etapas tempranas del desarrollo.

5.3.a.1. El mutante *buc* muestra una pérdida de la polaridad animal/vegetal y la formación de numerosos dominios de ovoplasma (blastodiscos) alrededor del cigoto y embrión temprano

Para conocer el fenotipo del mutante *buc*, cigotos (n=48) y embriones tempranos (n=32) provenientes de hembras homocigotas para la mutación, fueron examinados después de una fijación ácida ó por video microscopía de “time lapse” en diferentes períodos del desarrollo.

Video imágenes tomadas a intervalos de 30 s mostraron que el cigoto mutante *buc* presenta un fenotipo distinto al observado en el cigoto silvestre. Durante el estado 1b temprano se observó una distribución aparentemente normal del ectoplasma y de las lagunas de endoplasma en la esfera de vitelo (Figura 18A). No se observó la presencia de un blastodisco, dominio que junto al ecto y endoplasma se forma en el ovocito V durante la ovogénesis (Fernández y col., 2006). Un engrosamiento del ectoplasma fue visualizado durante el estado 1b tardío (Figura 18B) junto a la aparición, durante el estado 1c, de dominios de ovoplasma alrededor de la esfera de vitelo, denominados pseudoblastodiscos.

Movimientos de deformación fueron también observados durante el estado 1c, así como ciclos de contracción/relajación en la base de cada pseudoblastodisco (Figuras 18C, D), probablemente como consecuencia del ensamblaje de un anillo de actina similar al descrito en el margen del blastodisco del cigoto silvestre. Pulsaciones, en general de alta frecuencia, fueron también observadas a lo largo del eje radial de cada pseudoblastodisco (no mostrado). Numerosos pseudoblastodiscos

continuaron formándose en distintas regiones del embrión temprano, alrededor de la esfera de vitelo. Además, surcos de clivaje se formaron en algunos de éstos dominios, llevando a la generación de blastómeros a partir de cada pseudoblastodisco en división (Figuras 18E, F. Ver video 7).

En embriones tempranos mutantes (n=10) que no se dividieron, se observó la aparición de voluminosos “blebs” de ovoplasma proyectados desde la superficie celular. Embriones mutantes incubados en DAPI revelaron que estas estructuras carecían de núcleo, lo que sugirió que probablemente estábamos en presencia de huevos no fecundados (no mostrado).

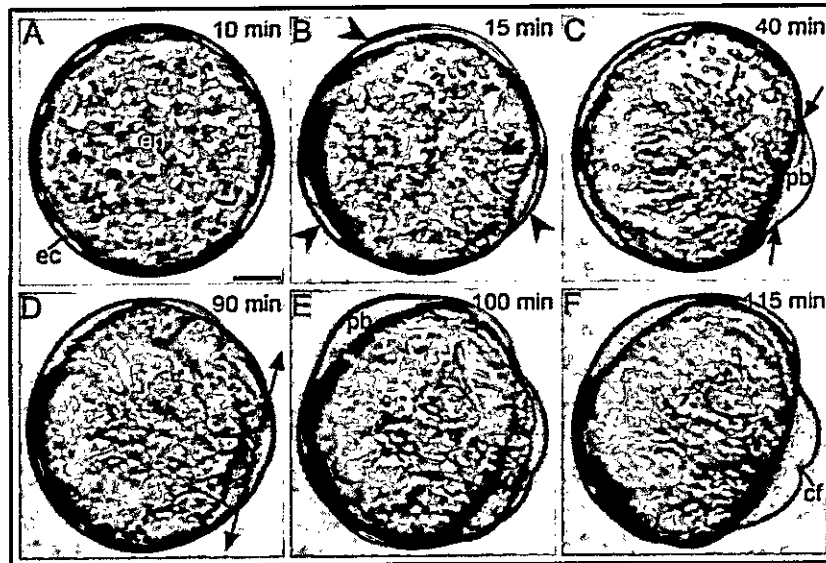


Figura 18. Fenotipo del mutante de efecto materno *bucky ball* (*buc*) observado *in vivo*. Imágenes seleccionadas de una animación, obtenida por video microscopía, que muestra el desarrollo temprano del mutante. El desarrollo del cigoto mutante fue subdividido en estados como en el cigoto silvestre. **A-C:** estado 1b, **D-F:** estado 1c. **A:** el estado 1b temprano se caracteriza por la distribución aparentemente normal del ectoplasma (ec), lagunas de endoplasma (en) y por la ausencia de un blastodisco. **B:** durante el estado 1b intermedio se observó un engrosamiento del ectoplasma alrededor de la esfera de vitelo (cabezas de flecha), presumiblemente como consecuencia de la acumulación de ovoplasma en ese lugar. **C:** término del estado 1b tardío y comienzo del estado 1c temprano. Este último se inició con la contracción de un anillo de actina (flechas) en el margen de un pseudoblastodisco (pb). **D y E:** la relajación del anillo de actina (flechas en D) confirma el establecimiento de ciclos de contracción/relajación en la base de los pseudoblastodiscos formados (E). **F:** durante el estado 1c tardío es posible apreciar la aparición de surcos de clivaje (cf) que generan blastómeros a partir de cada pseudoblastodisco. Se muestra el tiempo de desarrollo a 22 °C. min, minutos postfecundación. Barra= 120 μ m.

Para visualizar con mejor resolución la distribución de los distintos dominios de ovoplasma durante la embriogénesis temprana del mutante, cigotos y embriones tempranos fueron sometidos a una fijación ácida a distintos tiempos de desarrollo (Figura 19). Los resultados mostraron que durante el estado 1b temprano, el cigoto mutante *buc* presenta dos marcados dominios de endoplasma: (a) un dominio periférico, ó ectoplasma y (b) un dominio central, ó endoplasma, formado por lagunas de ovoplasma entre los glóbulos de vitelo (Figura 19E). Un dominio polar ó blastodisco, en el hemisferio animal, no fue observado en el cigoto mutante mediante el uso de ésta metodología.

En el estado 1c temprano se observó la presencia de conexiones que se extienden radialmente desde un foco central de endoplasma hacia el ectoplasma del cigoto mutante (Figura 19F). Estas conexiones, que podrían constituir rutas de transporte, fueron denominadas en este trabajo como "streamers" radiales. Durante el estado 1c tardío, se confirmó la presencia de varios pseudoblastodiscos. Estos dominios ovoplásmicos mostraron diferencias en número y tamaño y en la mayoría de los casos sufrieron clivaje (Figura 19G). En el estado de blástula, los pseudoblastodiscos se transformaron en pseudoblastodermos, como resultado de las sucesivas divisiones celulares que formaron nidos de blastómeros cada vez más pequeños (Figura 19H).

Estas son claras manifestaciones que el mutante *buc* ha sufrido una importante modificación en el establecimiento del eje de polaridad animal/vegetal, sustituyéndolo por varios ejes radiales. De esta manera se origina un cigoto multipolar.

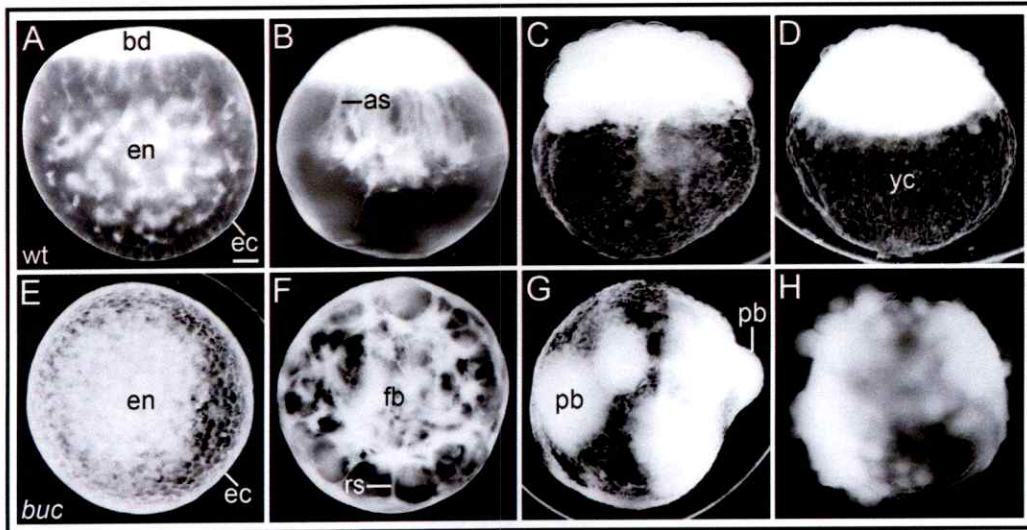


Figura 19. Organización de ovoplasma durante la embriogénesis temprana del mutante *buc* después de la fijación ácida. Se visualiza la distribución del ovoplasma (brillante) y de los glóbulos de vitelo (oscuro). **A-D:** segregación ovoplásmica en el cigoto silvestre (wt). Se observa la presencia de los 3 dominios ovoplásmicos: endoplasma (en), ectoplasma (ec) y blastodisco (bd) (A). Posteriormente, el ovoplasma es trasladado hacia la región del blastodisco a través de canales o “streamers” axiales (B) hasta que el ovoplasma y vitelo se han separado físicamente (C, D). **E-H:** segregación ovoplásmica en el mutante *bucky ball*. La organización del ovoplasma muestra un patrón distinto de distribución en comparación con el cigoto silvestre y la presencia de un blastodisco no fue observada (E). La acumulación de endoplasma en la periferia del cigoto es consecuencia de la formación de “streamers” que se extienden radialmente (F) desde el cuerpo fenestrado (fb). Los pseudoblastodiscos (pb) periféricos en división se proyectan desde la superficie (G) formando pseudoblastodermis (H). as, “streamers” axiales; rs, “streamers” radiales; yc, esfera de vitelo. Barra= 80 μ m.

5.3.a.2. Organización del endoplasma y del citoesqueleto durante el desarrollo temprano del mutante *buc*

Como se describió en el cigoto silvestre, el blastodisco crece a expensas del transporte de ovoplasma hacia la región animal, tanto desde la esfera de vitelo como desde el ectoplasma durante los estados 1b y 1c.

Video imágenes de tiempo interrumpido y fijaciones ácidas de cigotos *buc* (n=17) mostraron que, durante el estado 1b temprano, la reorganización del endoplasma lleva a la formación de “streamers” radiales cortos, conectados con el ectoplasma (Figura 20A-C). Durante el estado 1b intermedio, los “streamers” radiales cortos comenzaron a desorganizarse y las lagunas de endoplasma se acumularon en el centro de la esfera de vitelo para formar un foco central de ovoplasma ó cuerpo fenestrado (Figuras 20D-F). Esta estructura puede formarse también en el cigoto silvestre (Fuentes y Fernández, 2010). En el estado 1b tardío y 1c temprano, las lagunas de ovoplasma se fusionaron para formar gruesos canales de transporte ó “streamers” radiales que se extienden entre el cuerpo fenestrado y el ectoplasma (Figura 20G). Imágenes de cortes ópticos en el eje Z, obtenidas a mayor aumento, de cigotos *buc* mostraron que los “streamers” radiales conectan el ectoplasma con el cuerpo fenestrado (Figuras 20H, I). Esta organización radial del endoplasma en el mutante *buc* provocaría la acumulación de ovoplasma en varios sitios periféricos, que constituyeron los ya denominados pseudoblastodiscos (Figuras 20J-L). Cabe destacar que en este trabajo no se intentó la búsqueda de “streamers” meridionales en el mutante.

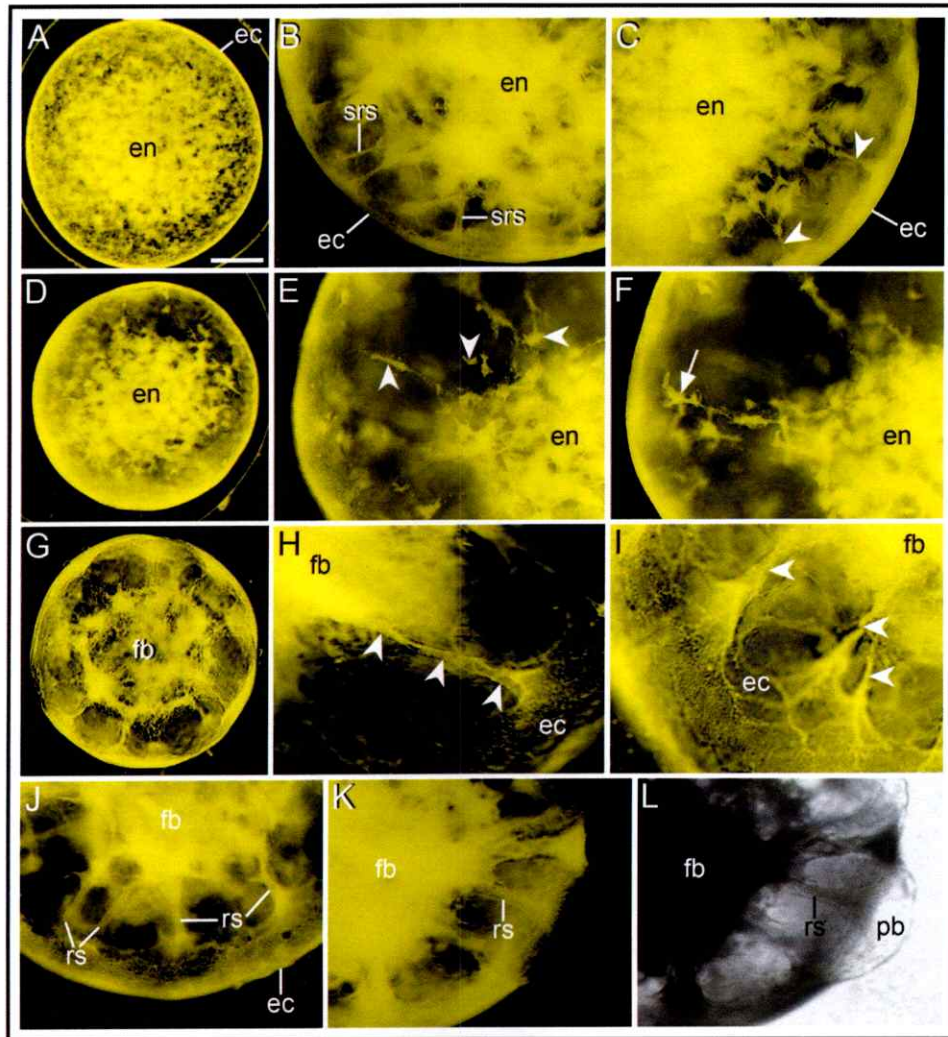


Figura 20. Reorganización del endoplasma para la formación de rutas de transporte radiales en el mutante *buc*. Video imágenes pseudocoloreadas de zigotos mutantes sometidos a fijaciones ácidas capturadas con (A-K) y sin (L) inversión de contraste. **A-C:** estado 1b temprano del zigoto *buc* que muestra la organización de endoplasma (en) y ectoplasma (ec) en el mutante (A). Se observa la formación de “streamers” radiales cortos (srs) que se conectan con el ectoplasma (B y cabezas de flecha en C). **D-F:** estado 1c temprano del zigoto *buc* que muestra la acumulación del endoplasma en el centro del zigoto (D) y la formación de “streamers” radiales largos (E, F). Imágenes seleccionadas desde secciones ópticas (5 μm de espesor) a través del zigoto evidenciaron que durante éste período ocurre la fusión de lagunas de endoplasma (cabezas de flecha en E) para el reestablecimiento de conexiones con la periferia (flecha en F). **G-I:** estado 1c tardío del zigoto mutante que muestra la organización radial de los “streamers” (cabezas de flecha en H e I). **J-L:** acumulación de ovoplasma en la periferia del zigoto es consecuencia del transporte endoplasma desde el cuerpo fenestrado al ectoplasma (J, K) formando los pseudoblastodiscos (L). fb, cuerpo fenestrado; rs, “streamers” radiales. Barra= 145 μm (A, D, G), 55 μm (B, C, E, F), 45 μm (H, I), 80 μm (J-L).

Imágenes de bajo aumento del citoesqueleto revelado por inmunofluorescencia (n=18) y/o incubación con faloidina-rodamina (n=16), mostraron que durante el estado 1b del cigoto mutante, las lagunas de endoplasma y el ectoplasma incluyen microtúbulos y filamentos de actina. Posteriormente, el citoesqueleto se organiza para formar el cuerpo fenestrado y los "streamers" radiales durante el estado 1c (Figuras 21A-C). Un análisis a mayor aumento mostró que en las lagunas de endoplasma y a lo largo de los "streamers" radiales, manojos de microtúbulos y filamentos de actina forman una red citoesquelética similar a la descrita en el cigoto silvestre (Figura 21D).

La expansión de las divisiones celulares alrededor de la esfera de vitelo observadas en el mutante, fenómeno contrario a lo que ocurre en la condición silvestre, fue analizada mediante inmunofluorescencias del citoesqueleto de microtúbulos realizadas en cigotos (n=12) y embriones tempranos (n=10), acompañadas de una incubación con DAPI. Estas inmunotinciones revelaron el establecimiento de ciclos celulares, en general sincrónicos, en la mayoría de los pseudoblastodiscos formados, ya que se observó la presencia de figuras mitóticas y de un huso mitótico en las células en división (Figuras 21E-H). Si bien, la mayoría de los blastómeros observados mostraron la presencia de DNA, en algunos de ellos se encontró la total ausencia de un material DAPI positivo (Figura 21H). Esto último sugiere, la presencia de dominios de ovoplasma que presumiblemente sólo han heredado el centrosoma proveniente del espermatozoide (ver discusión). Numerosas divisiones celulares en los pseudoblastodiscos fueron también observadas en embriones más avanzados (Figuras 21I-J).

De esta manera, la organización y distribución de las lagunas de endoplasma

y de su citoesqueleto, en el mutante *buc*, sugieren fuertemente que el transporte de ovoplasma ocurriría en dirección centrifuga hacia la periferia del cigoto para formar pseudoblastodiscos capaces de clivar de manera aparentemente no convencional.

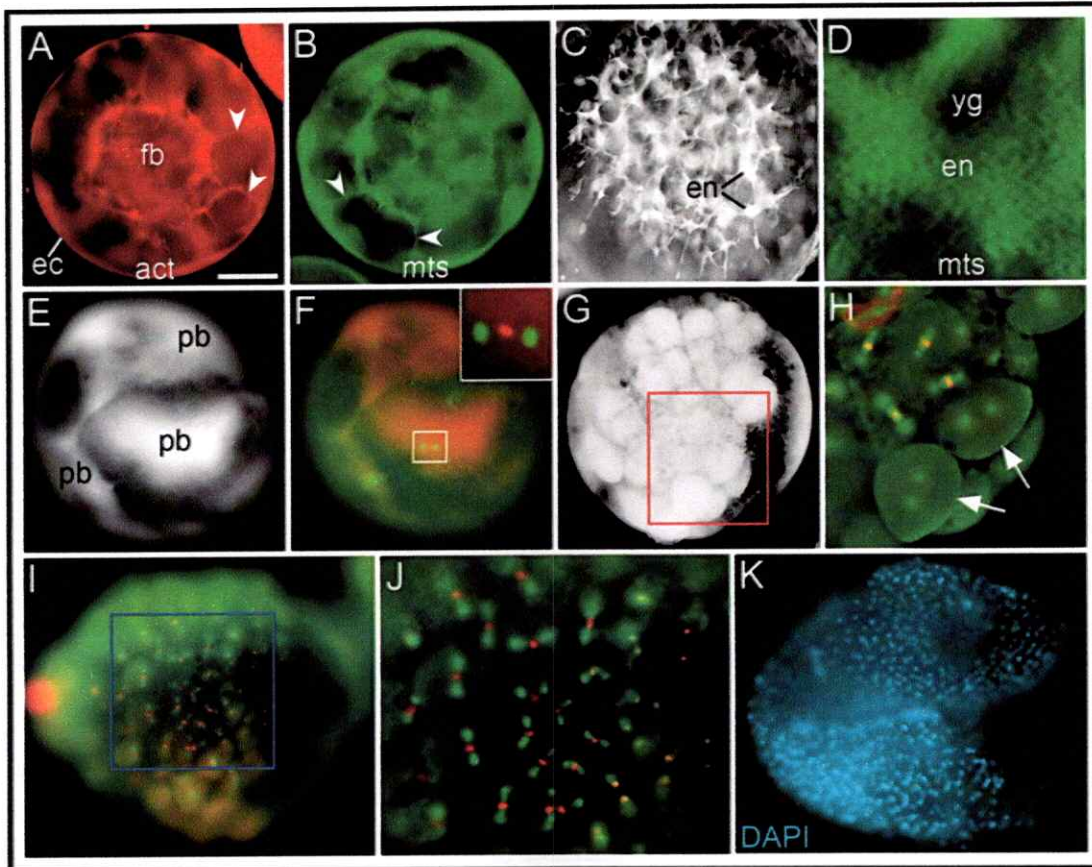


Figura 21. Organización del citoesqueleto y establecimiento de ciclos celulares durante el desarrollo temprano del mutante de efecto materno *buc*. **A, B:** video imágenes de inmunofluorescencia que muestran la distribución de actina (A) y microtúbulos (B) en el cuerpo fenestrado (fb), “streamers” axiales (cabezas de flecha) y ectoplasma (ec). **C, D:** cuerpo fenestrado del mutante *buc* que incluyen un citoesqueleto de microtúbulos organizado como una red similar a la observada en el cigoto silvestre (D). **E-H:** inicio de divisiones celulares en los pseudoblastodiscos (E, F) y formación de pseudoblastodermos (G, H) en el mutante *buc*. Pseudoblastodiscos visualizados por fijación ácida (E) mostraron la presencia de figuras mitóticas (inserto aumentado de cuadrado blanco en F), reveladas por inmunofluorescencia para microtúbulos (en verde) y DNA (en rojo). El color anaranjado del fondo del inserto podría deberse a la tinción del DNA de la gran cantidad de mitocondrias presentes en el ovoplasma. El embrión temprano del mutante muestra la formación de pseudoblastodermos (G). Imágenes a mayor aumento desconvolucionadas, del cuadrado rojo en la figura G, mostraron numerosos husos mitóticos y cromosomas presentes en la mayoría de los blastómeros (H), sin embargo, otros mostraron la ausencia de material DAPI positivo (flechas en H). **I-K:** embrión mutante que presenta numerosos blastómeros en división alrededor de la esfera de vitelo (I). Una amplificación del recuadro en azul de la figura I muestra la presencia de husos mitóticos evidenciando la sincronía de las divisiones celulares (I). La tinción con DAPI de un embrión mutante de 6 h revela que las mitosis continúan con el transcurso del desarrollo (K). pb, pseudoblastodisco; yg, glóbulo de vitelo. en, endoplasma. Barra: 160 μ m (A, B, E, F, G, I, K), 95 μ m (C), 25 μ m (D), 75 μ m (H, J).

5.3.a.3. El transporte de ovoplasma y de transcritos maternos en el mutante *buc* es multidireccional

Para determinar si los defectos observados en la organización del ovoplasma en el mutante *buc* afectan la localización de determinantes maternos en el cigoto, se realizó un estudio del flujo ovoplásmico en cigotos silvestres (n=22) y mutantes *buc* (n=10) después de micoinyectar con dextrano fluorescente de 10 kD. Además, se estudió la distribución de mRNAs como el de *gsc* (n=40) y *sqt* (n=48), mediante hibridación *in situ*.

Video imágenes de fluorescencia a bajo aumento, tomadas a distintos tiempos de desarrollo, no mostraron claramente la existencia de un flujo lento de ovoplasma en el cigoto mutante. Como se esperaba, el flujo rápido de ovoplasma es multidireccional a lo largo de los "streamers" radiales que conectan el cuerpo fenestrado con los pseudoblastodiscos (Figuras 22D-F). En el huevo no fecundado se formaron voluminosos "blebs" a partir de cada pseudoblastodisco, lo que evidencia y confirma la existencia de un flujo de ovoplasma hacia la periferia en el mutante *buc* (no mostrado).

Video imágenes de fluorescencia óptica adquiridas a mayor aumento, sugieren un flujo lento y multidireccional de ovoplasma en el mutante *buc*, esto evidenciado por la presencia de "streamers" radiales cortos conectando lagunas de endoplasma con el ectoplasma (Figuras 22G-I). La existencia de un flujo lento centrífugo de ovoplasma fue revelado por la generación de pseudoblastodiscos en la periferia del cigoto (Figura 22I). Por otro lado, el flujo rápido y multidireccional de ovoplasma, fue confirmado por la presencia de numerosos "streamers" radiales que emanaron desde el cuerpo fenestrado para conectarse con el ectoplasma y formar los

pseudoblastodiscos (Figuras 22J-L). Estos fueron cada vez más delgados y evidentes después de transcurrido el estado 1c del cigoto (Figuras 22K, L).

Medidas de velocidad de inclusiones citoplasmáticas o microesferas fluorescentes, no fueron realizadas en el cigoto mutante.

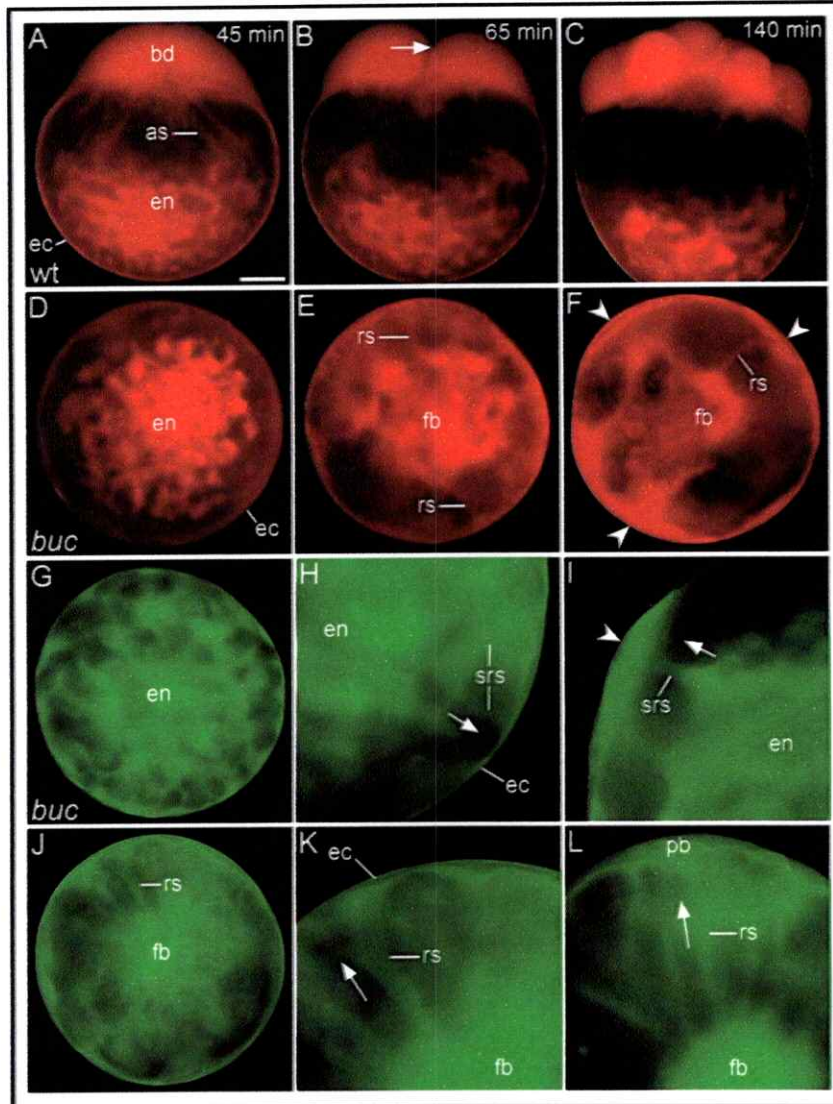


Figura 22. Imágenes de una animación que muestran el flujo ovoplásmico en el cigoto silvestre (A-C) y mutante *bucky ball* (D-L) microinyectados con dextrano fluorescente. En el cigoto silvestre (A-C) el flujo de ovoplasma hacia el polo animal ocurre a lo largo de “streamers” axiales (as) que se conectan con el blastodisco (bd). La primera división de clivaje (flecha en B) genera los dos primeros blastómeros. En el cigoto mutante (D-F), en cambio, el flujo ovoplásmico es multidireccional a lo largo de los “streamers” radiales (rs) que conectan el cuerpo fenestrado (fb) con los pseudoblastodiscos (pb) en crecimiento formados en la periferia del cigoto (cabezas de flecha en F). Video imágenes de fluorescencia capturadas a mayor aumento mostraron que durante el estado 1b (G-I), el flujo lento de ovoplasma ocurriría hacia la periferia (flechas cortas en H e I) a lo largo de “streamers” radiales cortos (srs) para formar los pseudoblastiscos (cabeza de flecha en I). Durante el estado 1c intermedio (J) se observa el cuerpo fenestrado conectado con la periferia del cigoto a través de “streamers” radiales largos (rs) y la formación de pseudoblastodiscos como consecuencia del flujo rápido de ovoplasma (flechas largas en K y L). en, endoplasma; ec, ectoplasma; min, minutos de desarrollo postfecundación. Se indica el tiempo de desarrollo (A-F). Barra: 130 μ m (A-G, J), 55 μ m (H, I, K, L).

Finalmente, el análisis de hibridaciones *in situ* realizadas en el cigoto mutante (Figura 23) mostraron que durante el estado 1b, los mRNAs de *gsc* y *sqt* fueron encontrados a través de lagunas de endoplasma entre los glóbulos de vitelo y en las lagunas de endoplasma del cuerpo fenestrado (comparar Figuras 17A, D y 23A, B), mientras que, los mismos transcritos se encontraron distribuidos en focos periféricos (pseudoblastodiscos) durante el estado 1c tardío (comparar Figuras 17B, C y 23C). El embrión temprano de 2 h de desarrollo del mutante *buc* mostró la localización de transcritos maternos en algunos de sus blastómeros (Figura 23D). Esta situación sugiere una distribución de transcritos maternos en pseudoblastodiscos con células en división y además confirmó lo visualizado por inmunofluorescencias, respecto a la existencia de blastómeros provenientes de cada uno de ellos.

De estos resultados se puede concluir que el flujo bidireccional de ovoplasma en el cigoto silvestre se convierte en un flujo multidireccional en el mutante, provocando la acumulación de ovoplasma y mRNAs en los pseudoblastodiscos.

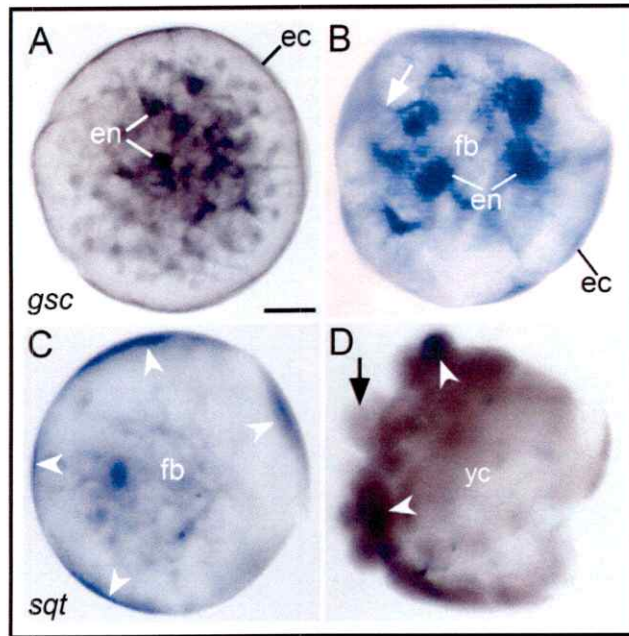


Figura 23. Localización y distribución de transcritos maternos en dominios de ovoplasma del cigoto y embrión temprano del mutante *buc*. **A, B:** hibridaciones *in situ* que muestran la localización del mRNA de *goosecoid* (*gsc*) a través de lagunas de endoplasma (en) del cuerpo fenestrado (fb) y el ectoplasma (ec) del cigoto mutante durante el estado 1b (A) y 1c (B). La flecha blanca en B indica la distribución del mRNA en un “streamer” radial corto, conectando lagunas de endoplasma con la periferia del cigoto. **C:** localización del mRNA de *squint* (*sqt*) en lagunas de endoplasma del cuerpo fenestrado y en los pseudoblastodiscos (cabezas de flecha) durante el estado 1c tardío del cigoto *buc*. **D:** en el embrión de 4 h de desarrollo se observa la señal de *sqt* localizada en algunos de los blastómeros (cabezas de flecha), provenientes de pseudoblastodiscos que heredaron el transcrito. Sustratos cromogénicos: BM purple (A y D) ó NBT/BCIP (B y C). yc, esfera de vitelo. Barra: 120 μ m.

5.3.b. El mutante de efecto materno *emulsion* (*emn*)

En el mismo “screening” de mutantes de efecto materno en el pez cebra realizado por el grupo de Dosch y col. (2004), se encontró el fenotipo *emulsion* (*emn*) que muestra anormalidades en la segregación ovoplásmica (Dosch y col, 2004; Lindeman y Pelegri, 2009).

5.3.b.1. El fenotipo *emn* muestra defectos en el transporte de ovoplasma y en la formación del eje dorsal

El análisis del fenotipo mutante *emn* antes y después de la activación/fecundación del huevo proveniente de hembras homocigotas para la mutación, se realizó por video microscopía de “time lapse” a diferentes intervalos de tiempo ó después de una fijación ácida de ovocitos V no activados (n=10), cigotos (n=73) y embriones tempranos (n=50).

El ovocito V (no mostrado), huevo y cigoto *emn* se caracterizó por ser más opaco que el silvestre pero presentaba los mismos 3 dominios de ovoplasma antes descritos por Fernández y col. (2006) en ovocitos y huevos silvestres. Una diferencia importante fue la formación de un preblastodisco más pequeño que lo normal, en el hemisferio animal del ovocito mutante. Resultados preliminares de la observación de cortes histológicos realizados a través del ovario de hembras mutantes, mostraron que al menos los estados I y II de la ovogénesis no parecen estar alterados como consecuencia de la mutación (n=3, no mostrado). Queda por demostrar, sin embargo, si estadíos posteriores de la ovogénesis han sido afectados por la mutación.

Animaciones realizadas durante el desarrollo temprano del mutante *emn*, revelaron serias alteraciones en el flujo de ovoplasma hacia el polo animal y

concomitantemente en la formación del blastodisco. Al contrario de lo ocurrido en el cigoto silvestre, una cantidad significativa de ovoplasma quedó retenida en la esfera de vitelo, la que disminuyó gradualmente en el transcurso del desarrollo (Figura 24A-F. Ver video 8). Además, la dinámica de las pulsaciones observadas en el cigoto silvestre, fueron reemplazados por ondas peristálticas a lo largo del eje animal/vegetal del mutante.

A diferencia de lo que ocurrió en el huevo y cigoto silvestre, durante el estado 1b, el fenotipo del cigoto mutante confirmó la formación de un blastodisco más pequeño (Figura 24A, B). Las lagunas de endoplasma estaban presentes entre los glóbulos de vitelo. Cabe destacar que no fue posible visualizar con un mayor detalle la organización y presencia de interconexiones entre lagunas de endoplasma, como así también la formación de "streamers" cortos mediante video microscopía, debido a la opacidad que presentó el huevo y cigoto mutante. Sin embargo, éste problema fue resuelto mediante fijación ácida de éstos, las cuales serán mostradas más adelante.

En la mayoría de los cigotos mutantes estudiados, el estado 1c se caracterizó por la presencia de ciclos de contracción/relajación del anillo de actina en la base del blastodisco y la aparición del primer surco de clivaje (Figura 24C, D). Además, la intermitencia de los ciclos de contracción/relajación del anillo de actina no mostró diferencias al ser comparado con el cigoto silvestre.

En el transcurso del desarrollo algunos embriones mutantes no clivaron o lo hicieron de manera anormal muriendo tempranamente (no mostrado). Los mutantes cuyo blastodisco clivó sobrevivieron mas allá del estado de blástula y sus blastómeros fueron más pequeños que los normales (Figura 24E, F). El tamaño del

embrión formado fue más reducido y ventralizado, muriendo un día después de la fecundación (Figura 24G, H).

Así, las anomalías observadas en el mutante *emn*, además de las observaciones originales de Dosch y col. (2004), sugieren que el transporte de ovoplasma hacia la región animal del cigoto estaría retardado, resultando la formación de un blastodisco más pequeño y un embrión de tamaño reducido.

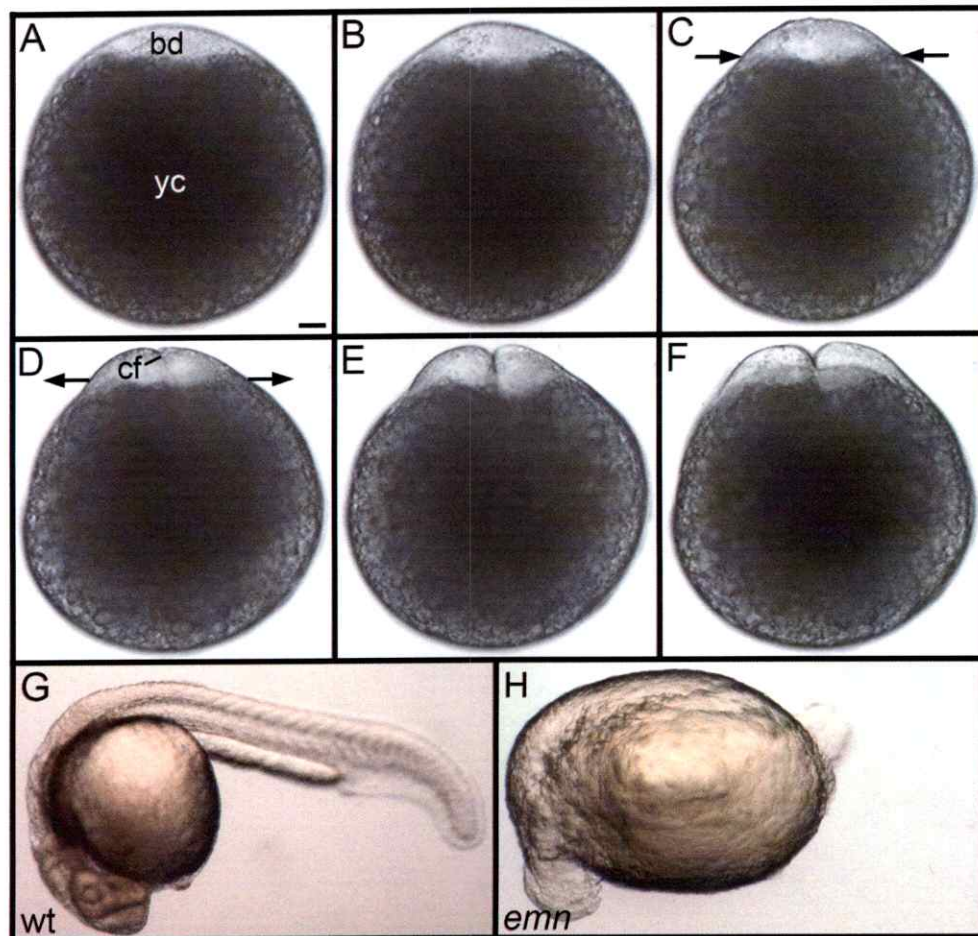


Figura 24. Desarrollo embrionario temprano del mutante de efecto materno *emulsion* (*emn*). Imágenes seleccionadas de una animación, realizada a intervalos de 10 s, que muestran un montaje completo *in vivo* durante el desarrollo temprano de un cigoto *emn* (A-F) y de un embrión silvestre de 1 día postfecundación (G) y mutante (H). El desarrollo del cigoto en el mutante fue subdividido en estados al igual que en el cigoto silvestre. A-C: estado 1 b. D: estado 1c tardío. Las flechas con dirección hacia fuera y hacia adentro indican contracción y relajación del anillo de actina, respectivamente. Nótese la opacidad del embrión y el blastodisco (bd) más pequeño. Aquellos embriones que clivan de manera normal (E, F), forman un embrión con el eje corporal reducido (compare G y H). Desarrollo a 22 °C. cf, surco de clivaje; s, segundos. Barra = 70 μ m.

Dos eventos demuestran que el huevo del pez cebra ha sido activado: (a) la elevación del corion como consecuencia de la exocitosis de los gránulos corticales, fenómeno que ocurre dentro de los primeros 5 min después de la activación y (b) la reanudación del proceso de segregación ovoplásmica. Para evaluar si el mutante *emn* presentaba defectos en alguno de éstos procesos, ovocitos V, huevos y cigotos fueron fijados de acuerdo a Becker y col, 1996 para la detección de gránulos. Los resultados en el ovocito mutante (n=5) se muestran en la figura 25A, B y los realizados en huevos activados (n=6) en la figura 25C. En huevos y cigotos mutantes la organización del citoesqueleto de actina cortical era normal alrededor de los gránulos corticales (Figura 25D, E). Estos migraron hacia la periferia para su exocitosis (Figura 25F, G). Evidencia de exocitosis de los gránulos corticales en el mutante se reflejó en la normal expansión de su corion (Figura 25H-K).

Estos resultados permiten inferir que la mutación generó un serio defecto en la segregación ovoplásmica pero no en procesos asociados a la activación del huevo.

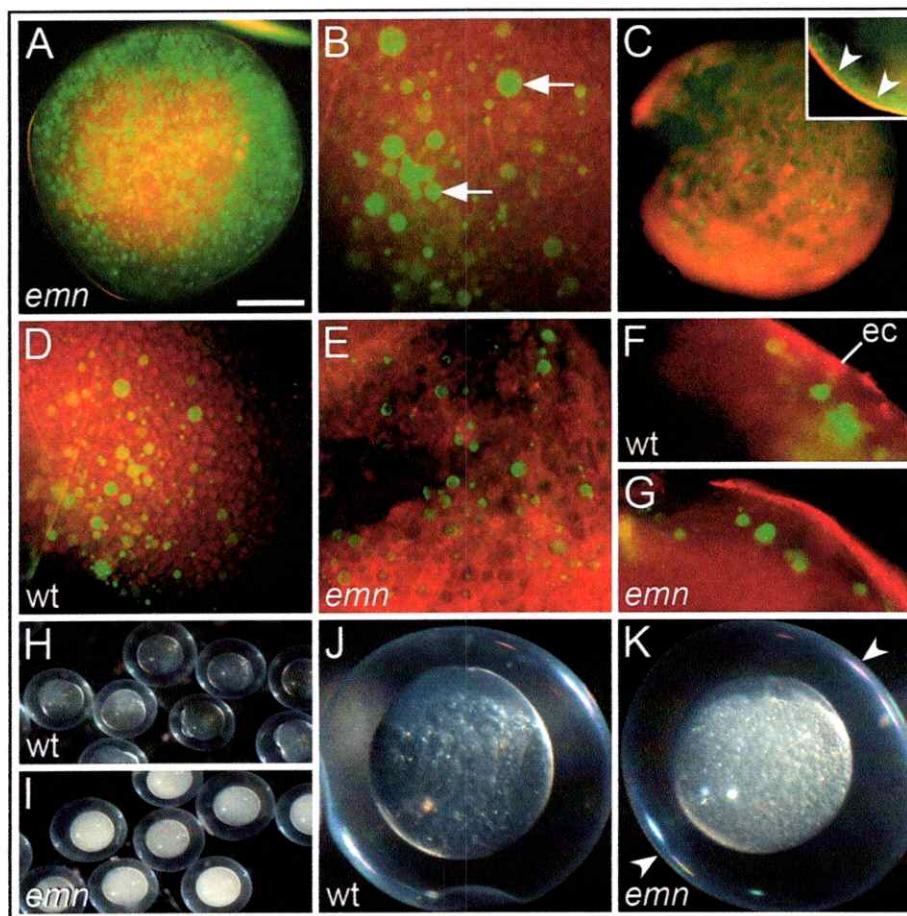


Figura 25. El huevo del mutante *emn* no muestra defectos en la exocitosis de los gránulos corticales durante su activación. La exocitosis de los gránulos corticales, teñidos con MPA (marcador de su contenido, en verde), resulta ser la primera respuesta celular a la activación del huevo. Durante este proceso, que incluye una serie de pasos, el contenido de los gránulos corticales, a través de un proceso dependiente de actina (en rojo), es secretado hacia el exterior del huevo, provocando la expansión del corion. **A:** ovocito V obtenido por laparotomía de una hembra mutante, que muestra la presencia de numerosos gránulos corticales antes de la activación del huevo. **B:** gránulos corticales (flechas) de un huevo mutante 2 min después de la activación. **C:** huevo mutante 5 min post-activación que muestra un menor número de gránulos corticales, ya que estos han sido transportados hacia la periferia para su exocitosis (cabezas de flecha en el inserto). **D-G:** exocitosis de gránulos corticales en un huevo silvestre (D y F) y mutante (E y G) visualizada a los 6 min post-activación, donde no se observan diferencias. **H-K:** expansión del corion durante el desarrollo temprano de huevos y cigotos silvestres (H) y mutantes (I). Vista lateral de un embrión silvestre (J) y mutante (K) de 2 células que muestran la normal expansión del corion como consecuencia de la exocitosis de los gránulos corticales (cabezas de flecha en K). Barra= 210 μm (A, C), 20 μm (B, D, E-G), 1,35 mm (H, I), 250 μm (J, K).

5.3.b.2. Organización del endoplasma y de rutas de transporte durante el desarrollo temprano del mutante *emn*

Era posible que un mutante en el que el transporte de ovoplasma hacia el blastodisco se encontrara alterado, mostrara modificaciones en la organización de los canales de transporte y concomitantemente en la organización del citoesqueleto. Para dilucidar lo anterior, se analizaron fijaciones ácidas de zigotos *emn* (n=24) e inmunotinciones del citoesqueleto en zigotos (n=15) y embriones tempranos (n=12) del mutante.

El estudio de la organización de ovoplasma durante el desarrollo temprano del mutante *emn* (Figura 26A-D) fracasó en mostrar la fusión de lagunas de endoplasma para formar "streamers" cortos conectados al blastodisco (Figura 26A). Durante el estado 1c temprano, las lagunas de endoplasma comenzaron a reunirse hacia el centro de la esfera de vitelo, mostrando la empalizada de glóbulos de vitelo por debajo del ectoplasma. Un análisis a mayor aumento de cortes ópticos a través del endoplasma del zigoto mutante mostró la formación de pequeñas interconexiones entre éste último y el endoplasma más animal, situación que explicaría el engrosamiento observado en el ectoplasma en esta región como consecuencia del flujo de ovoplasma hacia la periferia del zigoto en su camino hacia el blastodisco (Figura 26B). La formación de "streamers" axiales y meridionales no fue visualizada durante este período.

A pesar del avance del clivaje en el mutante de 16-32 células, lagunas de endoplasma estaban aún presentes en la esfera de vitelo. Más tarde estas se fusionaron para formar gruesos "streamers" axiales, que se conectaron con el blastodermo (Figura 26C). Estos canales de transporte tardíamente formados

continuaron visibles, pero más delgados, durante el período de blástula (no mostrado).

5.3.b.3. El transporte de ovoplasma y mRNAs en el mutante *emn* ocurre más lento y probablemente por rutas alternativas

Era factible que en un embrión con problemas en la formación de rutas de transporte del ovoplasma presentara alteraciones en la distribución de transcritos maternos. Para evaluar esta situación se realizaron hibridaciones *in situ* de cigotos (n=48) y embriones tempranos (n=36) mutantes. La distribución de los siguientes mRNAs fueron estudiados: *gsc*, *sqt* y *ventrally expressed dharma/bozozok antagonist (ved)*.

La significativa retención de ovoplasma en la esfera de vitelo del mutante *emn*, se interpretó como una consecuencia del transporte más lento de éste hacia la región animal del cigoto y un aumento de su transporte en períodos más tardíos del desarrollo (Figura 26D). Esto sugiere que el transporte de ovoplasma no cesa sino que se mueve más lento y así sus componentes llegan más tarde al blastodermo.

Para apoyar esto último, se estudió la distribución de reconocidos mRNAs como *sqt*, *gsc* y *ved*. Los resultados obtenidos para los transcritos maternos *gsc* (no mostrado) y *sqt* (Figura 26E-J) mostraron que durante el estado 1b del mutante, los transcritos se distribuyeron en el endoplasma vegetal (Figura 26E). Una distribución en la periferia del cigoto y embrión temprano sugiere un traslado alternativo del transcrito en ausencia de rutas específicas de transporte (Figuras 26E, F, I, J). Dichas rutas alternativas fueron visualizadas como pequeñas interconexiones entre el endoplasma y ectoplasma del mutante que explicarían el engrosamiento del

ectoplasma animal observado en la mayoría de los cigotos y embriones tempranos mutantes (Figuras 26K, L). Durante el período de blástula, transcritos fueron observados en lagunas de ovoplasma aún presentes en la esfera de vitelo, lo que potenció aún más la hipótesis de que el transporte de determinantes citoplasmáticos hacia el blastodermo, aún estaba ocurriendo (Figuras 26G, H).

Otro aspecto importante en el mutante fue que al generar un embrión centralizado, era posible que el mensajero del determinante dorsal *sqt*, pero no el de uno de los determinantes ventrales, *ved*, sufriera alguna alteración en su distribución. En embriones *emn* medianamente avanzados, el mRNA de *ved* se encontró localizado en el blastodermo, mientras que el mRNA de *sqt* fue detectado en lagunas de endoplasma entre los glóbulos de vitelo, indicando que probablemente aún se está movilizando hacia el blastodermo (no mostrado). Esto también fue confirmado en embriones *emn* en el estado de gástrula, donde la distribución de *gsc* (n=10), en el margen del escudo embrionario, fue también detectada en la esfera de vitelo (Figuras 26M-P).

Estos resultados sugieren que el mutante *emn* es capaz de transportar a tiempo ciertos transcritos maternos hacia el blastodisco ó blastodermo, pero no otros y esto podría explicar porque el desarrollo embrionario se detiene 1 día después de la fecundación.

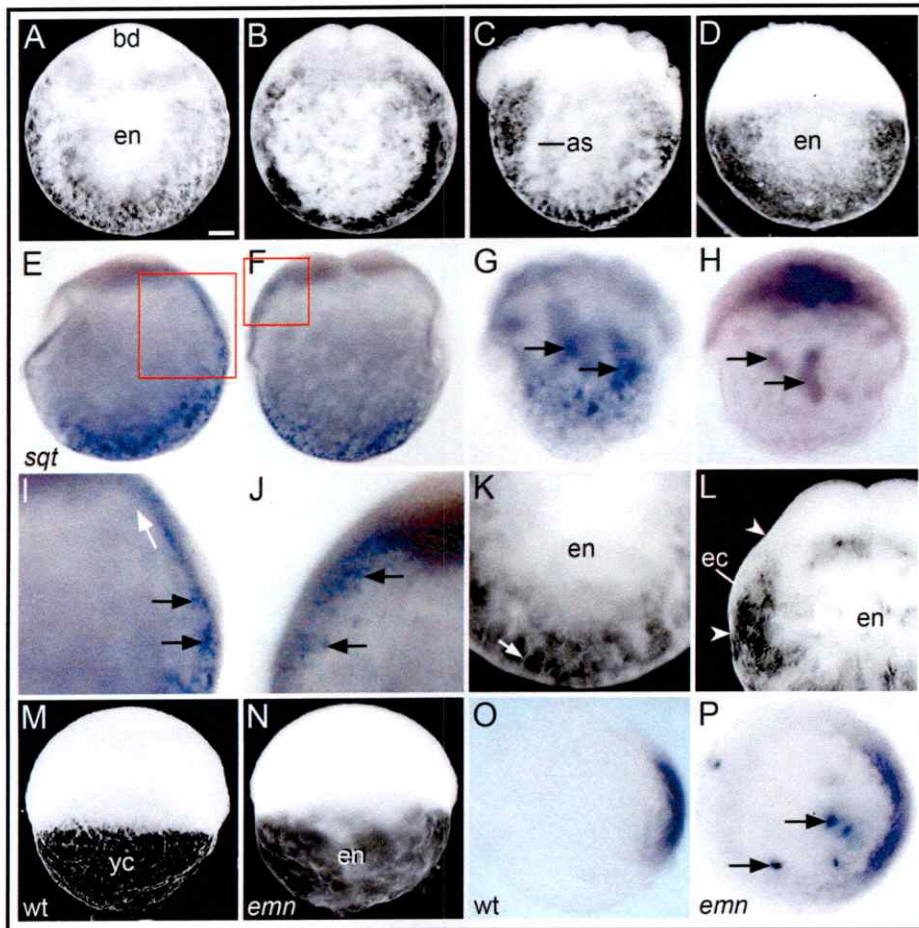


Figura 26. El transporte hacia el polo animal de endoplasma y mRNAs maternos está severamente retardado en el mutante *emn*. Vista lateral de fijaciones ácidas de un cigoto (A) y embrión temprano (B-D) que muestra una significativa retención de endoplasma (en) en la esfera de vitelo. Hibridaciones *in situ* de embriones comparables (E-H) demuestra la retención del transcrito materno *sqt* (flechas en G y H). Imágenes a mayor aumento de los recuadros de las figuras E y F, muestran que probablemente el transcrito materno de *sqt* (flechas negras) se movería por la periferia (flecha blanca en I) en ausencia de rutas específicas de transporte (I, J). Las rutas alternativas de transporte están constituidas por pequeñas interconexiones entre lagunas de endoplasma vegetales (flecha en K) y animales (L) con el ectoplasma (ec). Estas últimas contribuyendo a un mayor engrosamiento del ectoplasma en esa región (cabezas de flecha en L) y en donde codistribuyen ectoplasma y la señal del transcrito. En fijaciones ácidas de gástrulas se aprecia claramente la ausencia (M) y presencia (N) de ovoplasma en la esfera de vitelo (yc) del embrión silvestre y mutante, respectivamente. Una vista vegetal de la localización de *sqt* sólo en el escudo embrionario en la condición silvestre (O) y no en la esfera de vitelo como se visualiza en el mutante (P), confirman dicha retención, sugiriendo un retardo en la segregación del mensajero (flechas negras en P). Sustratos cromogénicos: BM purple (H) ó NBT/BCIP (E-G, I, J, O y P). Barra= 120 μ m (A-H, M-P), 65 μ m (I, J), 80 μ m (K), 100 μ m (L).

5.3.b.4. Organización del citoesqueleto durante el desarrollo temprano del mutante *emn*

Los resultados de inmunofluorescencias obtenidos en zigotos y embriones tempranos del mutante *emn*, revelaron que durante el estado 1b temprano, microtúbulos y filamentos de actina se encuentran organizados a través de los 3 dominios de ovoplasma: ectoplasma, endoplasma y blastodisco (Figura 27A, B). Durante el estado 1b tardío, los microtúbulos se organizaron preferentemente a través del ectoplasma del zigoto y en el huso mitótico (Figura 27C, D). Imágenes a mayor aumento mostraron que microtúbulos y filamentos de actina fueron encontrados incluidos en lagunas de endoplasma (Figura 27E) y organizado en manojos distribuidos a través del ectoplasma (Figura 27F). Esta situación persistió en el embrión tardío, en donde el citoesqueleto estuvo presente formando parte del endoplasma remanente en la esfera de vitelo y en los "streamers" axiales (Figura 27G, H). Un análisis más detallado de la organización del citoesqueleto, no fue realizado.

Otro aspecto importante es que en un alto número de zigotos y embriones tempranos del mutante *emn* (n=43) que lograron clivar, no había diferencias en términos de las divisiones celulares. Sin embargo, algunos embriones tempranos mutantes (n=22) mostraron divisiones celulares irregulares y los blastómeros resultantes presentaban problemas de adhesividad. Es factible que la mutación genere alteraciones en la organización de componentes del citoesqueleto relacionados con la división celular, provocando anomalías en la posición y orientación de los planos de clivaje. Por esto se estudió la organización del citoesqueleto de los mutantes mediante inmunofluorescencia (n=10). En el embrión

silvestre y mutante de 2 células la estructura y orientación del huso mitótico eran normales (Figura 27I, J). Sin embargo, en algunos embriones mutantes (n=8) se encontró la presencia de un huso mitótico orientado correctamente de acuerdo al segundo plano de clivaje en uno de los blastómeros, mientras que en el otro blastómero el huso mitótico estaba orientado en el plano del tercer surco de clivaje y perpendicular al anterior (Figura 27K). Este defecto encontrado en la orientación del huso mitótico en blastómeros del mutante, podría explicar el desprendimiento de blastómeros durante la celularización del blastodermo (Figura 27L) junto a alteraciones de componentes celulares implicados en la adhesión celular.

Todo lo anteriormente descrito sugiere que el producto del gen *emn* participaría de alguna manera en la organización y función del citoesqueleto durante el desarrollo embrionario temprano.

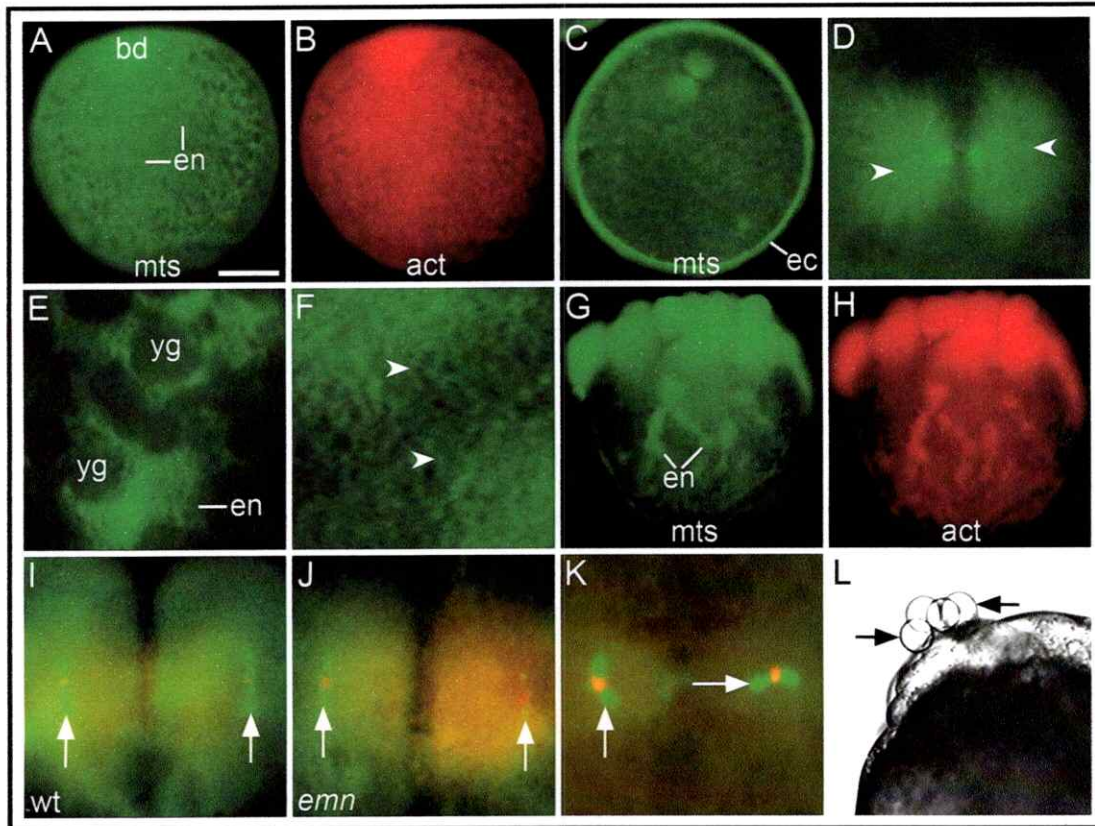


Figura 27. Organización del citoesqueleto en el cigoto y embrión temprano del mutante *emn*. A, B: Video imágenes de inmunofluorescencia (A-K) que muestra la distribución de microtúbulos (A) y actina (B) en el blastodisco (bd) y lagunas de endoplasma (en) del cigoto *emn*. C, D: distribución periférica y en el huso mitótico de microtúbulos tiosinados en el cigoto mutante durante el estado 1b (C). El huso mitótico visualizado a mayor aumento muestra la organización de los microtúbulos en el áster del huso (cabezas de flecha en D). E, F: distribución de microtúbulos en lagunas de endoplasma entre los glóbulos de vitelo (yg) y de manojos distribuidos a través del ectoplasma del cigoto *emn* (cabezas de flecha en F). G, H: retención del citoesqueleto de microtúbulos (G) y de microfilamentos (H) incluido en lagunas de endoplasma en el embrión de 16 células del mutante *emn*. I-L: orientación de los husos mitóticos (flechas blancas) en el embrión de 2 células silvestre (I) y mutante (J y K). Nótese que en la condición mutante, los husos mitóticos (verde) y los cromosomas (rojo) pueden encontrarse correctamente orientados para el segundo plano de clivaje (J), mientras que en ocasiones se observó un defecto en su orientación respecto al plano correcto de clivaje en uno de los blastómeros (flecha blanca horizontal en K). Esta última condición, probablemente está asociada al desprendimiento de blastómeros desde el blastodermo del mutante (L). Barra= 180 μ m (A-C, G, H), 40 μ m (D), 30 μ m (E), 10 μ m (F), 70 μ m (I-K), 120 μ m (L).

5.3.b.5. Identificación molecular del gen *emn*

Los resultados del estudio del fenotipo *emn*, indicaron que éste gen podría estar regulando la segregación ovoplásmica, incluido el transporte de determinantes maternos. Por lo tanto, la identificación molecular del gen *emn* suministraría información sobre la naturaleza de éste gen y permitiría el diseño de nuevas estrategias destinadas a descifrar como la pérdida o ganancia de la función del gen afectaría la organización y función del citoesqueleto.

5.3.b.5.1. El gen *emn* codifica para un transportador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ de tipo II

El gen *emn* fue mapeado a 58,4 cM en el cromosoma 4 entre los marcadores z9247 a 56,6 cM y z7496 a 59 cM, intervalo de 2,4 cM (1,5 Mb) que contenía 49 genes. Para estrechar éste intervalo se comenzó con un mapeo fino de la mutación mediante el análisis de recombinaciones meióticas a partir de un cruce entre hembras heterocigotas y machos homocigotas para la mutación (Figura 28A). El objetivo principal de éste mapeo fino fue determinar la frecuencia de recombinación de los marcadores que flanquean la mutación y encontrar nuevos marcadores cada vez más cercanos al locus mutante. Para ello, se identificaron individuos heterocigotos, homocigotos y recombinantes para la mutación *emn* mediante genotipificaciones usando los marcadores polimórficos z9247 y z7496. El uso de éste tipo de marcadores permite identificar fácilmente el genotipo de los individuos de acuerdo al patrón de bandeo que presentan en geles de agarosa (Figura 28B), ya que al ser polimórficos uno puede distinguir, en geles de agarosa, una diferencia en la movilidad de sus productos de PCR. Los resultados obtenidos de una genotipificación pueden ser observados en la Figura 28C.

Así, mediante el análisis de numerosas recombinaciones meióticas se intentó estrechar el intervalo de 2,5 cM y de esta manera acercarnos al locus *emn*. En total, 1.037 eventos meióticos fueron analizados encontrándose un total de 42 hembras recombinantes cuya descendencia mostró un fenotipo mutante. Estas fueron aisladas para un posterior análisis de nuevos marcadores polimórficos y ligados a la mutación.

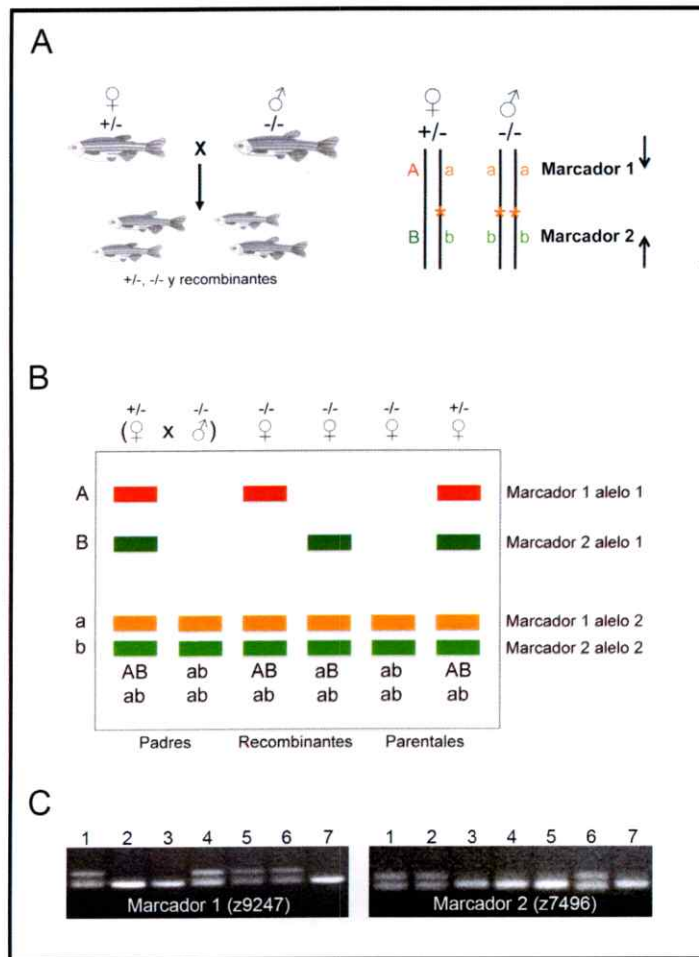


Figura 28. Cruces para el mapeo fino y propagación de individuos de la línea mutante *emn*. **A:** ilustración del cruce realizado para el mapeo fino y propagación de los mutantes de efecto materno (dibujo de la izquierda). Esta estrategia permite obtener una descendencia que incluye individuos homocigotos, heterocigotos y recombinantes. El diagrama de la izquierda muestra una representación del cromosoma 4 de una hembra heterocigota y un macho homocigoto, la presencia de la mutación (asterisco anaranjado) y los marcadores polimórficos cercanos a la mutación utilizados para el mapeo. Las flechas indican la dirección de acercamiento a la mutación. **B:** Diagrama que ilustra los posibles resultados a obtener después de una genotipificación para aislar hembras recombinantes para el mapeo de la mutación. Los rectángulos en rojo (A) y verde oscuro (B) representan a marcadores polimórficos 1 y 2 con un tamaño de aproximadamente 200 pb, mientras que los rectángulos anaranjados (a) y verde claro (b) a los mismos marcadores pero cuyo tamaño es de aproximadamente 100 pb. **C:** Productos de PCR obtenidos desde DNA genómico de la progenie del cruce representado en la figura A visualizados en gels de agarosa al 3%. Se muestra el resultado obtenido para el marcador 1 o z9247 (gel de la izquierda) y para el marcador 2 o z7496 (gel de la derecha). De acuerdo a lo observado en cada gel los individuos 1 y 6 son heterocigotos (2 bandas de distinto tamaño amplificadas desde los marcadores 1 y 2); 3 y 7 son homocigotos (2 bandas de igual tamaño amplificadas del marcador 1 y 2) y 2, 4 y 5 son recombinantes.

Con esta información a mano, se continuó con el mapeo fino para estrechar el intervalo genético y físico de la mutación, probando nuevos marcadores SSLP presentes en el cromosoma 4 de cada uno de los genomas recombinantes. De 11 marcadores analizados, sólo el marcador z28278 a 57,8 cM resultó ser polimórfico y ligado al gen *emn* y además dividió el intervalo en dos regiones, un intervalo “a” y un intervalo “b” (ver Figura 29 y Materiales y Métodos). Los datos del mapeo inicial de la mutación mostraron que ésta debía encontrarse cerca del marcador z7496 (1 recombinante/48 meiosis) y no al marcador z9247 (3 recombinantes/48 meiosis). Por lo tanto, se definió un nuevo intervalo para la mutación de aproximadamente 1,2 cM (0,75 Mb) entre los marcadores z28278 (8 recombinantes/1037 meiosis) y z7496 (6 recombinantes/1037 meiosis) (Figura 29A).

Una vez definido este nuevo intervalo, se diseñaron partidores para nuevos marcadores polimórficos, basados en repeticiones CA presentes entre los marcadores z28278 y z7496. Para esto, los “contigs” escogidos fueron: BX649347, BX571796 y AL590150. Un total de 17 nuevos marcadores, presentes en estos “contigs”, fueron probados en los recombinantes y sólo 5 de ellos en el intervalo “b” (CAN₁₂-CAN₁₅) resultaron ser polimórficos y ligados a la mutación.

La figura 29B muestra el mapa físico de la mutación y un resumen de los resultados obtenidos con los nuevos marcadores ensayados en cada uno de los recombinantes, en función de los eventos meióticos analizados (número de recombinantes/meiosis analizadas).

Según los resultados obtenidos, el locus *emn* se encontró presente entre los marcadores CAN₁₄ y CAN₁₅, nuevo intervalo con un tamaño de 0,2 cM (aproximadamente 125 kb). Este intervalo genético estuvo completamente cubierto

por al menos un clon BAC (Bacterial Artificial Chromosome), el clon DKEY-180P18.

Así, se indagó en la base de datos Ensembl con el fin de analizar los genes presentes en el nuevo intervalo. Se encontraron 7 genes presentes en el intervalo, los cuáles fueron elegidos como potenciales candidatos para ser el gen *emn*. Los genes escogidos fueron: *prdm4*, *psmc2*, *slc26a5*, *tspan33*, *cax1*, *smo* y *klhdc10* (Figura 29C).

Para averiguar si la mutación *emn* se encontraba en alguno de los genes elegidos como potenciales candidatos, cDNA fue sintetizado previa extracción de RNA total a partir de ovarios completos provenientes de hembras silvestres y mutantes *emn*. Cada uno de los genes candidatos fueron amplificados a partir del cDNA obtenido por retrotranscripción. Posteriormente, los productos de PCR obtenidos fueron purificados y enviados a secuenciar.

Con los resultados de la secuenciación se procedió a comparar los Marcos de Lectura Abiertos u ORFs (Open Reading Frames) de cada uno de los genes. Una sola mutación puntual fue identificada en el exón 11 del gen *cax1*, como una sustitución de la base T (timina) por una A (adenina) a 1.355 pb desde el sitio de inicio de la transcripción, lo que generó un codón de término ("STOP codon") prematuro (Figura 29D). Este cambio de base fue consistente al inducido en otros genes mediante el uso de ENU y de ésta manera fue posible determinar que el mutante *emulsion* tiene un defecto en el gen *cax1*. La confirmación de la mutación se realizó mediante el análisis del DNA genómico proveniente del macho G₀ mutagenizado y del cuál proviene el cromosoma con el gen *emn* mutado. Este mostró la presencia del mismo cambio de base nitrogenada anteriormente mencionado.

Un análisis más detallado del producto del gen *emn/cax1* en la base de datos Ensembl mostró que su transcrito tiene una longitud de 2.610 pb y consiste de 20 exones y 19 intrones. Este gen, codifica para una proteína de aproximadamente 85 kD, compuesta de 764 residuos aminoacídicos y que corresponde a un intercambiador catión/protón de Tipo II (CAtion/proton eXchanger ó CAX), transportador que ha sido descrito en variados organismos como levaduras (Cagnac y col, 2007), plantas (Hirschi, 1996; Cheng y col, 2003) y recientemente en el pez cebra (Manohar y col., 2010).

Esta mutación puntual en el gen *emn* convirtió el aminoácido Tyr452 (Tirosina 452), en un codón de término prematuro (Figura 29D). Los resultados de la predicción de segmentos de transmembrana en base a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen *cax1* mostraron que, a nivel estructural, la proteína Cax1 está constituida por 13 segmentos de transmembrana y enlazada por 12 regiones o “loops” interdominios. Su extensión amino terminal contiene la señal de translocación en la membrana SecY. De esta manera, el transcrito mutante produciría una proteína estructuralmente incompleta ó truncada, incluyendo sólo 5 de los 13 segmentos de transmembrana junto con la porción amino-terminal de la proteína (Figura 29E). La proteína Cax1 mostró una alta identidad con otros CAXs de tipo II. 66% identidad (77% similitud) con otro CAX de tipo II en el pez cebra (Cax2), 62% identidad (76% similitud) a CAX tipo II de *Xenopus* y 64% identidad (77% similitud) a CAX de tipo II de *Fugu rubripes*.

Un análisis de expresión del gen *emn* no fue realizado durante el desarrollo de esta tesis.

Finalmente, la identificación molecular del gen *emn* mostró que este codifica

para el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ presente en el sistema de endomembranas de vertebrados. El reconocido papel de este sistema en la regulación de la concentración citosólica de los iones Ca^{2+} y H^+ y su relación con eventos tempranos del desarrollo sugiere fuertemente que el gen *emn/cax1* podría controlar la segregación ovoplásmica. Una aproximación a la manera cómo participaría el producto del gen en éste proceso, será discutida más adelante.

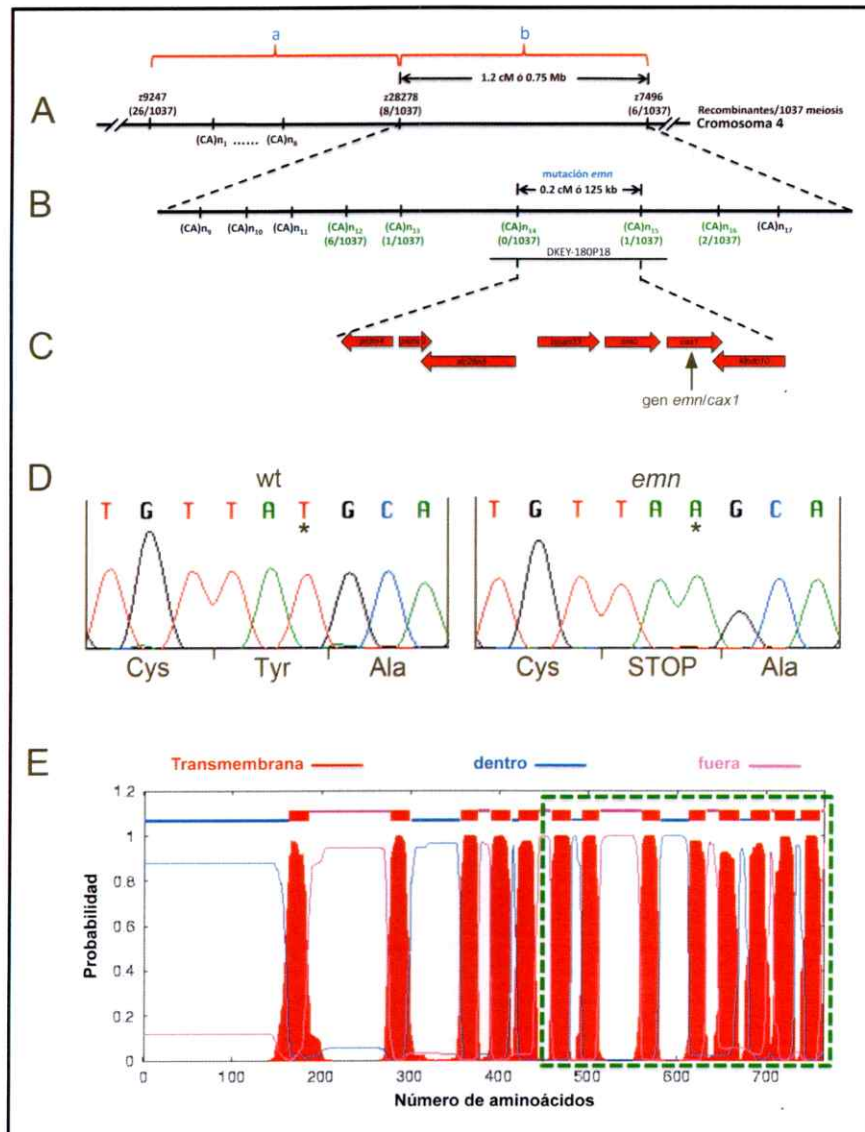


Figura 29. El gen *emulsion* codifica para *cax1*, un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ de tipo II. **A-C:** mapa físico y genético del intervalo *emulsion* en el cromosoma 4 del pez cebra. Basado en el fenotipo mutante y en el análisis de la secuencia del clon BAC (DKEY-180P18) entre los marcadores ligados y polimórficos CAN_{14} y CAN_{15} (B) del intervalo “b” (en verde). 7 genes fueron elegidos como potenciales candidatos para el gen *emn* (C). Las flechas rojas horizontales indican la localización y tamaño de éstos genes en relación al clon BAC. **D:** Secuencias de DNA silvestre y del alelo mutado *emn*. El cambio de base nitrogenada (asteriscos negros), genera una pérdida del aminoácido 452 (Tyr452) y la aparición de un codón de término prematuro en el mutante. **E:** predicción de segmentos de transmembrana de la proteína Cax1 de acuerdo a su secuencia de aminoácidos. La proteína consta de 13 segmentos de transmembrana (en rojo) unidos por lazos localizados en la cara interna (líneas en azul) y externa (líneas en rosado) de la membrana. Los segmentos encerrados (cuadrado verde de líneas discontinuas) muestran a aquellos que probablemente están ausentes en la proteína traducida en el mutante.

6. DISCUSION

La segregación ovoplásmica es un proceso dependiente del citoesqueleto por el cual organelos y ribonucleoproteínas se separan de los glóbulos los de vitelo y son ordenadamente transportados para formar dominios de citoplasma que posteriormente contribuirán al desarrollo y diferenciación del embrión. Sin embargo, el (los) mecanismo(s) y las bases genéticas por las cuales éste proceso es ejecutado, continúan hasta hoy siendo un misterio.

En el desarrollo de ésta tesis, se obtuvo nueva y valiosa información sobre los eventos de la segregación ovoplásmica que tienen lugar en el cigoto y embrión temprano del pez cebra, entregando una descripción detallada del patrón de los movimientos citoplasmáticos y de la organización de las rutas para el transporte de determinantes citoplasmáticos (Fuentes y Fernández, 2010). De esta manera, se complementan las observaciones de los primeros pasos de éste proceso en el ovocito V y huevo (Fernández y col, 2006). Además, el análisis de mutantes de efecto materno, en que la segregación ovoplásmica esta afectada, constituye una ventajosa herramienta para descifrar la manera como el producto de factores maternos controlan el tránsito citoplasmático durante el desarrollo temprano de los vertebrados.

6.a. Una red de citoesqueleto junto a motores moleculares están probablemente involucrados en el transporte de ovoplasma hacia el blastodisco

La redistribución y transporte de ovoplasma para formar el blastodisco ocurre a lo largo de lagunas interconectadas y canales ó “streamers” (ver también Roosen-Runge, 1938; Lewis y Roosen-Runge, 1943; Hisaoka y Battle, 1958; Hisaoka y

Firlit, 1960; Beams y col., 1985; Abraham y col., 1993; Leung y col., 2000). Estos últimos corresponden al compartimiento situado entre los glóbulos de vitelo y está enriquecido en inclusiones citoplasmáticas, organelos y ribonucleoproteínas (Hisaoaka y Firlit, 1960; Fernández y col., 2006). Además, el ovoplasma incluye un ubicuo citoesqueleto involucrado en el transporte de éstos componentes (Leung y col., 2000; Fernández y col., 2006; Fuentes y Fernández, 2010). Este citoesqueleto endoplásmico muestra diferentes tipos de organización, probablemente asociados a su estado funcional o al resultado de su preservación durante la fijación (Fuentes y Fernández, 2010). Esta diferencia en la estructura del citoesqueleto podría explicar la existencia de diferentes tipos de lagunas encontradas en el huevo del pez cebra (Fernández y col., 2006).

Los “streamers” axiales en el cigoto del pez cebra fueron descritos por primera vez por Roosen-Runge (1938) y más tarde fueron considerados por otros autores como la principal ruta para el transporte masivo de endoplasma (Beams y col., 1985; Leung y col., 2000). Los “streamers” meridionales constituyen las rutas de mayor velocidad para el transporte de marcadores endógenos y exógenos y fueron descritos por primera vez en nuestro trabajo (Fuentes y Fernández, 2010). En éste, se muestra que el mRNA de *vas* alcanzaría también el blastodisco a lo largo de éstos “streamers” meridionales y que las velocidades alcanzadas por microesferas fluorescentes a través de ellos, son comparables a las alcanzadas durante el flujo axoplásmico rápido (Grafstein y Forman, 1980).

El papel de los filamentos de actina en el movimiento de ovoplasma ha sido estudiado mediante video microscopía de seguimiento de inclusiones, microesferas fluorescentes o dextrano en cigotos incubados con drogas que alteran la dinámica del

citoesqueleto. Resultados preliminares han mostrado que el movimiento de ovoplasma hacia el blastodisco, en zigotos incubados en citochalasina B, es detenido durante la fase de movimiento rápido y ultrarápido, lo que sugiere probablemente que el flujo de ovoplasma durante el estado 1c es dependiente del citoesqueleto de actina. Además, el vaciamiento secuencial de endoplasma en la dirección animal/vegetal de lagunas de endoplasma, por medio de un flujo lento ó rápido, sugiere la existencia de un sistema de compuertas basado en actina y que controlaría el avance ordenado de endoplasma. La detección de antígenos de la cadena de nucleación de actina a través de los dominios de ovoplasma y la incorporación continua de actina en el zigoto indican que hay un continuo recambio de actina durante la segregación ovoplásmica. Esto incluiría eventos de polimerización/despolimerización y nucleación/fragmentación. Esta conclusión es sustentada por trabajos realizados a principios de los 90's en *Drosophila*. En este organismo el gen materno *chikadee*, cuyo producto es la proteína Profilina, regula el transporte citoplasmático durante la ovogénesis por medio de su capacidad de unirse a actina y aumentar la capacidad de ésta para hacer crecer el polímero (Cooley y col., 1993; Verheyen y Cooley, 1994). Este análisis en un organismo multicelular de la profilina, reveló que la pérdida de función del gen impide un constante recambio de actina monomérica y por ende la polimerización de filamentos de actina en células nodrizas, confiriendo a la actina un papel estructural durante el flujo de citoplasma.

Aunque se cree que la función de los microtúbulos no es importante en el transporte masivo de ovoplasma en zigoto del pez cebra (Leung y col., 2000), nuestros resultados mediante inmunodetección y el de otros usando drogas que estabilizan y despolimerizan los microtúbulos, sugieren que éstos participan en el

transporte de componentes citoplasmáticos (Jesuthasan y Strähle, 1997; Gore y Sampath, 2002; Nojima y col, 2010). Adicionalmente, se ha reportado la participación de microtúbulos en el movimiento rápido de pequeñas inclusiones en el huevo activado del pez Medaka (Webb y col., 1995). Por tanto hay buenas razones para proponer que la segregación ovoplásmica en el cigoto del pez cebra depende de la translocación de una red de microtúbulos y filamentos de actina en la cuál los organelos y determinantes maternos se encuentran anclados (Fuentes y Fernández, 2010). Queda por demostrar de que manera los microtúbulos estarían involucrados en el movimiento de ovoplasma.

Un flujo rápido de endoplasma hacia la región animal y el lento de ectoplasma hacia la región vegetal fueron descritos en el pez cebra por Leung y col. (2000). Sin embargo, nuestros hallazgos en las mismas regiones del cigoto y en los mismos períodos de desarrollo, muestran dos importantes diferencias: 1) un flujo lento y rápido ocurre tanto a lo largo del ecto y endoplasma y 2) el movimiento de ectoplasma animal ocurre preferencialmente hacia el polo animal. La diferencia entre las velocidades de transporte reportadas por Leung y col. (2000) y las nuestras, pueden deberse a que en sus estudios ellos usaron temperaturas más altas y que en el caso del endoplasma, monitorearon el movimiento de fluoroesferas, en vez de inclusiones citoplasmáticas. Un movimiento lento y rápido de inclusiones ovoplásmicas también ha sido reportado por Abraham y col. (1993) en el huevo del pez Medaka. Un mejor conocimiento de cómo microtúbulos y filamentos de actina participan en el transporte de diferentes organelos y mRNAs durante la embriogénesis temprana requiere explorar a más alta resolución el movimiento conjugado de organelos, componentes del citoesqueleto y mRNAs marcados en

forma diferencial.

Una característica importante del ovoplasma del cigoto de la sanguijuela (Fernández y col., 1998) y del pez cebra (Fernández y col., 2006; Nojima y col., 2010) es la presencia de numerosas mitocondrias. Muchas de ellas se han generado durante la ovogénesis, pero en la sanguijuela hay evidencia que estos organelos siguen proliferando en el huevo y cigoto. Resultados preliminares en nuestro laboratorio han mostrado flujo de mitocondrias, marcadas con un "mitotracker", desde el ectoplasma al disco embrionario en el cigoto del pez cebra, lo que hace sospechar que estos organelos siguen proliferando, al menos en el ectoplasma. Así, el movimiento de mitocondrias marcadas con sondas fluorescentes representa una herramienta valiosísima para el estudio del flujo ovoplásmico y sus relaciones con el citoesqueleto, el cuál podría ser visualizado, junto a mitocondrias, mediante la incorporación de sus precursores marcados de manera fluorescente.

El hecho que durante diferentes períodos del desarrollo inclusiones citoplasmáticas y marcadores exógenos se mueven a diferentes velocidades sugieren la participación de motores moleculares asociados a microtúbulos y filamentos de actina en el transporte de organelos y mRNAs. No parecen existir diferencias importantes en la estructura del citoesqueleto en las diferentes rutas de transporte como lagunas de endoplasma y "streamers". Las diferencias de velocidad podrían depender de motores moleculares disponibles para el transporte, en un tiempo determinado. Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia de rutas de transporte e inmunoblots de extractos de cigotos, junto a lo reportado por Becker y Hart (1999), indican la existencia de motores moleculares asociados al citoesqueleto en el pez cebra, pero no dan cuenta de su funcionalidad. Los resultados obtenidos en

los ensayos de funcionalidad realizados durante el desarrollo de ésta tesis sólo dan cuenta que motores moleculares como la dineína citoplasmática, kinesína y miosina II están presentes y podrían jugar un papel relevante en el movimiento del citoesqueleto, transporte de organelos y determinantes maternos durante la segregación ovoplásmica. Sin embargo, la función de cada uno de éstas moléculas en el flujo de ovoplasma requiere de información adicional. Conocer la polaridad de microtúbulos y filamentos de actina y ensayos de motilidad *in vitro* ayudarían a dilucidar lo anterior.

6.b. El transporte rápido de endoplasma está asociado a la contracción de actina y a la formación de “streamers” largos

La incubación de cigotos en citochalasin B bloquea la contracción del anillo de actina, formación de “streamers” largos axiales y el flujo rápido de ovoplasma (Katow, 1983; Leung y col., 2000; Fuentes y Fernández, 2010). Basado en sus resultados, Leung y col. (2000) propusieron que la contracción de un anillo cortical de actina sería el motor que dirige el flujo rápido de endoplasma y por ende la segregación ovoplásmica. Sin embargo, la droga puede tener también afectada la integridad de los filamentos de actina endoplásmicos provocando que la formación de “streamers” no se lleve a cabo y esto contribuiría al bloqueo del flujo rápido de endoplasma. Esta conclusión es avalada por los resultados obtenidos en este trabajo, donde se muestra que la organización de las lagunas de endoplasma es un proceso dependiente de actina.

La contracción del anillo de actina está asociada con el aumento de calcio libre citosólico ó intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en la base del blastodisco, fenómeno que es

iniciado en el sitio de entrada del espermatozoide y que posteriormente se propaga hacia el polo vegetal (Lee y col., 1999; Sharma y Kinsey, 2008), presumiblemente activando a la cadena liviana de la miosina II (Leung y col., 2000). Un mecanismo similar puede estar involucrado en la contracción de un citoesqueleto de actina interno, propuesta que es avalada por recientes hallazgos que indican que una onda de calcio libre se mueve lentamente hacia el polo vegetal a través del endoplasma del cigoto después de la activación (Sharma y Kinsey, 2008) y por la presencia de miosina II en lagunas de endoplasma y “streamers” reportada en este trabajo. Hoy sabemos que el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ mediado por IP_3 es regulado por el gen *brb/hmrnp I*, el cuál es requerido para una correcta activación del huevo que incluye a la segregación de ovoplasma (Mei y col., 2009). Futuros estudios revelarán la manera cómo éste gen regula el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ a través de él o de sus blancos durante la segregación ovoplásmica.

En conclusión, filamentos de actina ectoplásmicos y endoplásmicos pueden participar en el movimiento rápido de ovoplasma. Aunque se ha reportado que el movimiento de fluoroesferas y determinantes maternos dorsales a lo largo del ectoplasma depende de microtúbulos y kinesina I (Jesuthasan y Strähle, 1997; Nojima y col, 2010), la función y propiedades de éste componente del citoesqueleto y sus proteínas asociadas en el cigoto del pez cebra, permanecen ignoradas.

6.c. Movimiento de ectoplasma animal, pero no vegetal, hacia el blastodisco

La existencia de un flujo de ectoplasma en la dirección animal/vegetal durante la fase rápida de la segregación ovoplásmica en el cigoto del pez cebra fue propuesta por primera vez por Leung y col. (2000). De acuerdo a éstos autores, el

ectoplasma que se mueve hacia el polo vegetal retornaría al blastodisco vía “streamers” axiales. Los experimentos reportados en esta tesis, no suministran evidencia de éste circuito ovoplásmico. Por el contrario, se encontró que había un movimiento de microesferas fluorescentes ó inclusiones citoplasmáticas desde lagunas de endoplasma hacia el ectoplasma animal o desde el ectoplasma vegetal hacia “streamers” meridionales. Esto, se puede tomar como evidencia de que el movimiento cortical hacia el polo animal de microesferas fluorescentes (ver también Jesuthasan y Strähle, 1997), inclusiones ovoplásmicas y determinantes maternos, como *vas* (Howley y Ho, 2000; Knaut y col., 2000; Pelegri, 2003) ocurre a lo largo de “streamers” meridionales.

La existencia de un movimiento de ectoplasma animal sugiere que éste debe ser mantenido durante etapas tempranas y tardías de la segregación ovoplásmica por transferencia de endoplasma desde la esfera de vitelo. Esto puede ser demostrado por la presencia de interconexiones transitorias entre el ecto y endoplasma, las que permitirían a organelos y ribonucleoproteínas cambiar de rutas durante su movimiento (Fernández y col., 2006; Fuentes y Fernández, 2010). La intermitencia de éstas interconexiones sugiere la existencia de mecanismos que regulan el flujo de ovoplasma entre rutas que transportan a diferentes velocidades.

Futuros estudios sobre esta materia serán de gran importancia para conocer como mRNAs maternos y organelos alcanzan el blastodisco ó blastodermo en un lugar y tiempo determinado.

6.d. Los “streamers” como rutas de transporte de mRNAs hacia el blastodisco

La nueva metodología para hibridación *in situ* de mRNAs aplicada en este trabajo en comparación al procedimiento utilizado por otros, mostró ventajas, en términos de obtener una mejor preservación de la estructura del cigoto y resolución de la señal. Así, los resultados de la distribución de *gsc* sugieren que este transcrito no sólo se mueve al polo animal en el estado V del ovocito (Bally-Cuif y col., 1998) sino que también lo haría en el cigoto temprano a lo largo de “streamers” cortos y en el tardío a lo largo de “streamers” axiales. La distribución del mRNA de *sqt* es similar a la de *gsc* y por lo tanto los “streamers” cortos y axiales pueden también constituir su principal ruta de transporte hacia el blastodisco. Por lo tanto, los mRNAs de *gsc* y *sqt* probablemente alcanzan el blastodisco a lo largo de “streamers” cortos y largos axiales usando los mecanismos de transporte lento y rápido.

Mediante el tratamiento de cigotos con drogas que afectan el citoesqueleto, Gore y Sampath (2002) mostraron que *sqt* es trasladado después de la activación del huevo en un proceso dependiente de microtúbulos y no de filamentos de actina. Cigotos tratados con latrunculina ó citochalasin B no forman “streamers” axiales y además muestran un endoplasma desorganizado. Por lo tanto, *sqt* se movería hacia el polo animal por microtúbulos presentes a lo largo de desorganizadas y menos eficientes lagunas de endoplasma. Esto explicaría la reducida acumulación de *sqt* en el blastodisco de cigotos tratados con latrunculina A (Gore y Sampath, 2002).

La distribución de *vas* sugiere que este transcrito se mueve hacia el blastodisco no solo por el ectoplasma (Howley y Ho; Knaut y col., 2000; Pelegri, 2003) sino que también a lo largo de “streamers” meridionales. Durante el transporte lento *vas* se distribuye y mueve al blastodisco a lo largo del ectoplasma. Sin

embargo, durante el transporte rápido nuestros resultados sugieren que la localización del transcrito a lo largo del ectoplasma y “streamers” meridionales puede ser un indicador que *vas* puede ser transportado simultáneamente a lo largo de dos diferentes rutas de transporte y a velocidades distintas. Esto también sería posible para otros transcritos componentes del plasma germinal como *dead end* (*dnd*), *nanos1* (*nos1*) y *daz-like* (*dzl*), que al igual que *vas* serían transportados al blastodisco por una ruta cortical (Theusch y col., 2006).

Un mayor conocimiento de las rutas para el transporte de transcritos maternos podría ser abordable con el uso *in vivo* de mRNAs marcados (Gore y col., 2005; Clark y col., 2007).

6.e. Pulsaciones en el cigoto y embrión temprano del pez cebra

Pulsaciones han sido por primera vez reportadas en el cigoto y embrión temprano del pez cebra por Fuentes y Fernández (2010). La gran mayoría de las pulsaciones son rápidas, de alta frecuencia y bloqueadas por la incubación de cigotos en citochalasina B o latrunculina B, sugiriendo la participación de filamentos de actina en este fenómeno. El hecho de que las pulsaciones pueden ocurrir antes del ensamblaje y contracción del anillo de actina o durante la fase de relajación del mismo, indican que el anillo de actina no participa en su dinámica y que el citoesqueleto de actina endoplásmico podría estar involucrado. Adicionalmente, la asimetría de las pulsaciones con respecto al eje animal/vegetal fuertemente sugiere que éstas podrían ser generadas por la alternada contracción de “sets” opuestos de filamentos de actina que corren a lo largo de las lagunas de endoplasma y “streamers”. Aunque las pulsaciones constituyen un interesante y llamativo

fenómeno de deformación celular, su función en la segregación ovoplásmica es incierto. Por un lado, es posible que las pulsaciones permitan la entrada de muy pequeños componentes ovoplásmicos, como ribonucleoproteínas al blastodisco o que participen en la redistribución de dominios ovoplásmicos. Por otro lado, las pulsaciones podrían estar involucradas en el cierre y apertura de las interconexiones entre lagunas y “streamers” con el ectoplasma y podrían ser gatilladas por débiles ondas de $[Ca^{2+}]_i$, las cuáles ya han sido detectadas en el endoplasma del pez cebra (Sharma y Kinsey, 2008).

6.f. Mutantes de efecto materno para el estudio de la segregación ovoplásmica

Muchos laboratorios, alrededor del mundo han elegido al pez cebra como organismo modelo para el estudio de un gran variedad de procesos biológicos (Driever y col., 1994), lo que lo posiciona como un excelente sistema para el estudio de la biología reproductiva en vertebrados.

Durante estados más tempranos del desarrollo de vertebrados e invertebrados ocurren numerosos procesos dependientes de factores codificados por genes maternos y depositados en el ovocito durante la ovogénesis. En mutantes de efecto materno, éstos genes están alterados y su utilización para el estudio de los procesos tempranos del desarrollo, resulta ser una valiosa herramienta para dilucidar las bases genéticas y moleculares que gobiernan la embriogénesis temprana. De interés para éste trabajo fue el de contar con una clase de mutantes de efecto materno en el pez cebra que exhiben alteraciones en el proceso de segregación ovoplásmica.

6.f.1. El gen *bucky ball* y el establecimiento de la identidad animal en el ovocito

En el año 2008, Marlow y Mullins describieron las anomalías provocadas por la mutación de efecto materno *bucky ball* (*buc*) durante la ovogénesis y embriogénesis temprana. Mediante ensayos de hibridación *in situ*, examinaron la localización de mRNAs marcadores del polo animal y vegetal durante la ovogénesis del mutante. Por ejemplo, un marcador del polo animal como *pou2* se encuentra inicialmente distribuido a través del citoplasma del ovocito I, tanto silvestre como mutante. En el ovocito II silvestre, *pou2* comienza a distribuirse asimétricamente para finalmente localizarse en el polo animal, en el ovocito III. En ovocitos II y III del mutante *buc*, *pou2* se localiza en múltiples dominios a través de la corteza. Resultados similares se obtuvieron al analizar transcritos que se localizan en el polo vegetal del ovocito. De estos resultados concluyeron que existía un claro defecto en la polaridad del ovocito y en la localización animal de mRNAs durante la ovogénesis. De esta manera, no se generaría un eje animal/vegetal y ocurriría una expansión radial de la identidad animal (Dosch y col, 2004; Marlow y Mullins, 2008).

Estos hallazgos demostraron que el gen *bucky ball* actúa durante la ovogénesis temprana regulando la polaridad del ovocito y que la proteína Bucky ball (Buc) es requerida durante la ovogénesis para la localización de transcritos maternos en los dominios animal/vegetal del ovocito, por medio de un mecanismo interdependiente. Buc especificaría la identidad vegetal localizando transcritos “vegetales” en el polo vegetal y restringiría la identidad animal excluyendo a transcritos “animales” en el polo animal. Así, se generaría polaridad en el ovocito temprano (Marlow y Mullins, 2008).

Otro aspecto importante es, que en ausencia del gen *bucky ball* no se forma una estructura determinante de la polaridad denominada cuerpo de Balbiani. Este corresponde a un agregado de mitocondrias, retículo endoplásmico y plasma germinal que se encuentra adyacente a la vesícula germinal, en el estado I de la ovogénesis (Marlow y Mullins, 2008; Bontems y col., 2009; Gupta y col., 2010). Posteriormente, el cuerpo de Balbiani se mueve hacia el polo vegetal del ovocito, localizando mRNAs de la línea germinal en dicho lugar. Ovocitos mutantes *buc* muestran ausencia del cuerpo de Balbiani, por lo tanto, se requiere de la proteína Buc para su formación. Hoy conocemos la naturaleza del gen *bucky ball* (Bontems y col., 2009), cuya secuencia se encuentra localizada en el cromosoma 2, y codifica para un producto de 1.917 pb que presenta un motivo muy conservado de secuencia amonoacídica que no tiene homología con otros dominios de proteínas conocidas. Futuros estudios de la estructura de la proteína Buc, podrían dar cuenta de su funcionalidad.

En resumen, la proteína Buc juega un importante papel en la organización del plasma germinal durante la ovogénesis. Durante este período, la proteína Buc se localiza en el cuerpo de Balbiani, donde actúa río arriba: 1) reclutando los componentes del plasma germinal como *vas*, *nos1* y *dazl* en el polo vegetal y 2) inhibiendo la localización temprana de su propio mRNA y el de otros como *foxH1*, *vgIRBP* en el polo animal del ovocito III (Marlow y Mullins, 2008; Bontems y col., 2009). No sabemos si después de este estadio el mRNA de *buc* es redistribuido en el cigoto, sólo sabemos que éste transcrito se encuentra distribuido uniformemente en los blastómeros del embrión de 4 células y que la proteína Buc se localiza en los extremos distales de los surcos de clivaje, convirtiéndose en otro marcador del

plasma germinal (Bontems y col., 2009; Nojima y col., 2010).

Por lo tanto, un estudio del transporte del mRNA de *buc* durante el desarrollo temprano completaría nuestro conocimiento sobre la distribución de éste producto génico entre la ovogénesis y la embriogénesis temprana.

6.f.2. Una expansión de la identidad animal en el mutante *buc* tiene como consecuencia un cambio en la dirección del flujo de ovoplasma

Del análisis realizado durante el desarrollo temprano del mutante *buc* se puede concluir que: a) durante la fase de flujo rápido de ovoplasma los canales de transporte se organizan radialmente en vez de axialmente, provocando la acumulación de ovoplasma en varios sitios periféricos que constituyen los pseudoblastodiscos, b) que los “streamers” se extienden centrífugamente desde un foco central de ovoplasma que corresponde al cuerpo fenestrado, y c) durante las primeras horas de desarrollo, el pronúcleo masculino incluido en cada pseudoblastodisco sufre sucesivas divisiones celulares, situación que sugiere el establecimiento de ciclos celulares haploides. El cambio en la simetría y dirección del flujo de ovoplasma es otro defecto causado por la mutación. Así, la simetría bilateral y el flujo bidireccional de ovoplasma en el cigoto silvestre se convierten en simetría radial y flujo multidireccional de ovoplasma en el mutante *buc*.

El hecho que en el cigoto *buc* el ovoplasma se segrega radialmente, guarda relación con la expansión de la polaridad animal observada en el ovocito *buc* (Marlow y Mullins, 2008). Es posible que la mutación afecte de manera indirecta la dirección en que se organiza la red citoesquelética (Becker y Hart, 1996; 1999; Leung y col., 2000; Mei y col., 2009; Fuentes y Fernández, 2010).

La reciente identificación molecular del gen *magellan (mgn)*, que codifica en el pez cebra para un “*microtubule actin crosslinking factor 1 (macf1)*”, proteína de la familia de las espectroplaquinas que permiten la interacción entre microtúbulos y filamentos de actina, ha dado los primeros indicios del papel del citoesqueleto en el establecimiento del eje animal/vegetal en el ovocito durante la ovogénesis (Gupta y col., 2010). La delección provocada por la mutación del gen *mgn/macf1* genera una proteína trunca que ha perdido su dominio de unión a microtúbulos, pero no su dominio de unión a filamentos de actina. El mecanismo por el cuál la proteína Macf1 participa en el transporte de organelos y mRNAs permanece desconocido, pero la presencia de una red interconectada de microtúbulos y microfilamentos en el citoesqueleto interno del ovocito, huevo y cigoto (Fuentes y Fernández; Gupta y col., 2010), sugiere un papel del gen *mgn*, río abajo de *buc*, en la regulación de una interacción entre microtúbulos y filamentos de actina requerida para la segregación ovoplásmica en el ovocito y posteriormente en el cigoto. Esta idea es sustentada por nuestro reciente hallazgo (Fuentes y Fernández, 2010), sobre la íntima interacción entre microtúbulos y microfilamentos en la red citoesquelética del cigoto.

Otra manifestación de que el mutante *buc* ha sufrido una importante modificación en el establecimiento de ejes de polaridad se relaciona con las características de las pulsaciones en el cigoto y embrión mutantes. Sí, mientras en el cigoto y embrión temprano silvestre las pulsaciones ocurren a lo largo del eje animal/vegetal y en general son de alta frecuencia, en el mutante son radiales y el cuerpo fenestrado se deforma en la misma dirección. Concomitantemente, los pseudoblastodiscos, repartidos en la periferia del cigoto, pulsan con las mismas características. Estos movimientos de deformación observados en el mutante a lo

largo de “streamers” radiales, junto con la misma dirección del flujo de ovoplasma hacia la periferia, hacen suponer la existencia de señales presentes alrededor del cigoto en puntos ectópicos generados a causa de la mutación que dirigen la organización del citoesqueleto hacia dichos puntos. Un efecto directo de la mutación *buc* en la polaridad del ovocito se relaciona con la formación de la micropila, sitio de entrada del espermatozoide (Hart y Donovan, 1983; Wong y Wessel, 2006). La mutación del gen *buc* genera numerosas micropilas ectópicas alrededor del huevo (Marlow y Mullins, 2008) y esto produce poliespermia. Esta es otra importante manifestación de la expansión de la identidad animal en el ovocito mutante.

No se pueden descartar funciones adicionales (o efectos indirectos) del producto de éste gen que aún no han sido descubiertas y que probablemente guardan relación con mecanismos de transducción de señales asociados a la micropila y que ocurren después de la fecundación y activación del huevo. Los referidos mecanismos incluirían la participación de moléculas de la familia de la fosfolipasa C (PLC), así como tirosinas-quinasas de la familia de las Src, que actúan río arriba de la PLC. La actividad de éstas proteínas ha sido observada en muchos organismos, incluyendo al pez cebra (Wu y Kinsey, 2002; Kinsey y col., 2003; Sharma y Kinsey, 2006). La distribución de las proteínas Src está polarizada en la corteza del huevo, específicamente en el sitio de entrada del espermatozoide y su actividad es gatillada por la fecundación (Sharma y Kinsey, 2006; 2008). Por lo tanto, una cascada de señalización mediada por estas proteínas que tienen dentro de sus efectores al citoesqueleto de actina y la regulación de la liberación de $[Ca^{2+}]_i$, podría ser activada en cada una de las micropilas presentes en la periferia del cigoto. Esto provocaría una reorganización del endoplasma y la formación de canales de transporte ó

“streamers” hacia cada micropila. Un análisis de la propagación de ondas de $[Ca^{2+}]_i$ en el cigoto mutante *buc*, avalaría ésta hipótesis y contribuiría a comprender este proceso.

6.f.3. El gen *emn* y su papel en el transporte de ovoplasma y en la determinación del eje dorsal

El mutante de efecto materno *emulsion* (*emn*) fue aislado y mapeado en una búsqueda de factores maternos involucrados en el control génico materno de los procesos tempranos del desarrollo. De acuerdo al fenotipo observado, *emn* fue clasificado inicialmente como un mutante deficiente en la activación del huevo y en la segregación de citoplasma (Dosch y col., 2004). El resultado del análisis del fenotipo de este mutante muestra que la mutación aparentemente no genera defectos en la activación del huevo, pero sí en la segregación ovoplásmica. Una primera respuesta a la activación del huevo del pez cebra es la exocitosis de gránulos corticales. Esto favorece a la expansión del corion, como consecuencia de la entrada de agua. Por otro lado, la organización y dinámica del citoesqueleto de actina cortical permite la fusión de gránulos corticales a la membrana plasmática y la posterior recuperación de la membrana de los gránulos por endocitosis (Becker y Hart, 1996). La organización del citoesqueleto de actina cortical en el mutante no mostró diferencias con la del cigoto silvestre.

Durante el desarrollo temprano del mutante *emn*, se encontró una marcada alteración en el transporte de citoplasma (ovoplasma), hacia la región animal del cigoto, proceso que es dependiente del citoesqueleto y que forma parte del fenómeno de segregación ovoplásmica. Transporte de endoplasma hacia el polo animal durante

el estado 1b pareciera no ocurrir en el mutante pero sí parece posible un transporte a lo largo del ectoplasma animal como lo indican hibridaciones *in situ*. Dos interpretaciones se desprenden de lo anterior: 1) la opacidad probablemente no permite la visualización de “streamers” en el cigoto mutante y 2) el establecimiento de mecanismos alternativos para el transporte de determinantes citoplasmáticos hacia el blastodisco, ya que en ausencia de rutas para el transporte de endoplasma hacia la región animal, permanecerían activas rutas de transporte a través del ectoplasma (Fuentes y Fernández, 2010). Esto es avalado por el hallazgo de una gran cantidad de microtúbulos en el ectoplasma, alrededor de la esfera de vitelo y la presencia de mRNA de *sqt* en el ectoplasma animal, probablemente moviéndose hacia el blastodisco. Durante el estado 1c, la reorganización del endoplasma y citoesqueleto permiten una tardía formación de “streamers” para el traslado de ovoplasma. Estas rutas de transporte persisten durante la embriogénesis temprana, por lo que el ovoplasma continúa siendo transportado en éste período. Estos defectos en el mutante conllevan a la formación de un blastodisco y blastómeros de reducido tamaño, originándose un embrión ventralizado cuyo desarrollo se detiene un día después de la fecundación.

La determinación del eje dorso/ventral en el pez cebra depende de la translocación de una señal dorsal localizada en la región del polo vegetal del embrión temprano (Mizuno y col., 1996; Ober y Schulte-Merker, 1999). Gore y col. (2005) reportaron que el mRNA materno de *sqt* es requerido como determinante de la identidad dorsal en el pez cebra. Además, es conocido que este mRNA es transportado hacia el blastodisco a lo largo de microtúbulos, lo que fue confirmado con la identificación molecular del gen *tokkaebi* (*tkk*) que codifica para Sintabulina,

proteína que interactúa con la cadena pesada de la kinesina I materna ó Kif5b en el pez cebra. Esta proteína junto a los microtúbulos, serían los responsables del transporte de *sqt* y otros mRNAs, para la determinación de la identidad dorsal del embrión (Gore y Sampath, 2001; Nojima y col., 2010).

Del análisis espacio-temporal de los mRNAs de *gsc*, *sqt* y *ved* en el mutante *emn* se puede concluir que en embriones medianamente avanzados, los mRNAs son detectados en lagunas de endoplasma indicando que están detenidos o movilizándose hacia el blastodermo, mientras que transcritos maternos determinantes del eje ventral del embrión probablemente lo hacen antes, ya que se encuentran localizados más cercanos al blastodisco. Esto corrobora la retención de ovoplasma, en un sistema en que la segregación ovoplásmica ha sido afectada.

En conclusión, un arreglo lineal de microtúbulos ectoplásmicos en la esfera de vitelo (Jesuthasan y Strähle, 1997; Nojima y col., 2010), junto con una red de microtúbulos en las lagunas de endoplasma (Fuentes y Fernández, 2010) y la participación de motores moleculares (Gupta y col.; Nojima y col., 2010) serían requeridos para el transporte de determinantes maternos indispensables para la formación de un eje dorsal, desde la esfera de vitelo hacia la presuntiva región dorsal del embrión en el blastodisco o blastodermo. Así, nuestro análisis de las anomalías en el mutante *emn* sugiere que este gen controlaría la segregación ovoplásmica a través del citoesqueleto.

6.f.4. Posible papel del gen *emn/cax1* en el control de la segregación ovoplásmica

En esta tesis se ha caracterizado el fenotipo del mutante de efecto materno *emulsion (emn)*. De acuerdo a esto, la mutación fue agrupada dentro de aquellas que afectan genes maternos que regulan la segregación ovoplásmica y no la activación del huevo mediada por la excitosis de gránulos corticales como se había originalmente reportado (Dosch y col., 2004).

Mediante clonamiento posicional se logró identificar el locus *emn* y de esta manera se pudo conocer la naturaleza molecular del gen. La alteración causada por la mutación afectó el gen *cax1*, un intercambiador catión/protón de tipo II (CA_{ion}/H⁺ eXchanger ó CAX) ya caracterizado en otros organismos, entre ellos el pez cebra (Manohar y col., 2010). De acuerdo a lo descrito por Manohar y col. (2010), *cax1* es requerido para el desarrollo de la cresta neural. En este caso la pérdida de función del gen mediante el uso de oligomorfolinos provoca alteraciones en la pigmentación, desarrollo de la mandíbula y reducción de la expresión de marcadores de cresta neural en los embriones microinyectados. Sólo un CAX de tipo II ha sido funcionalmente caracterizado en eucariontes, el transportador Vnx1 en *Saccharomyces cerevisiae* (Cagnac y col., 2007). Estudios del papel de Vnx1 y la localización subcelular del transportador en levaduras indican: a) una contribución en procesos de señalización de Ca²⁺ que está dentro de un compartimiento endomembranoso distinto a la vacuola, el retículo endoplásmico y b) regulación del pH intracelular (pH_i) (Cagnac y col., 2007; Manohar y col., 2010).

Aunque se creía que este tipo de transportador no estaba presente en animales, un análisis de secuencias genómicas identificó a miembros del subgrupo de CAX del tipo II en un amplio rango de animales que incluyen al erizo de mar,

algunas especies de peces y *Xenopus laevis*, pero excluye a los mamíferos (Shigaki y col., 2006). Hay escasa información sobre la bioquímica y fisiología de las proteínas CAX de tipo II en animales.

Sabemos que muchos de los procesos del desarrollo, desde la fecundación hasta el “patterning” embrionario y la organogénesis involucran señalización mediada por Ca^{2+} (Webb y Miller, 2006; Whitaker, 2006). Si bien, muchos de éstos procesos han sido bastante estudiados, la manera como el transporte y la regulación de la concentración intracelular de éste ión por sus transportadores, es grandemente ignorada. Así, el mutante *emn* resulta ser una valiosa herramienta para estudiar la función de los transportadores CAX en el desarrollo temprano de vertebrados.

Una primera aproximación basada en los estudios realizados con el mutante *emn* sugieren que la alteración del gen provocaría dramáticos cambios en la homeostasis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que influiría en la frecuencia de los eventos de deformación del cigoto, como las pulsaciones y una deficiencia en la formación de “streamers”, procesos dependientes del citoesqueleto de actina (Fuentes y Fernández, 2010). Por otro lado, y en base a la naturaleza del gen *emn/cax1*, no se puede obviar el papel que tendrían cambios en la regulación del pH; por causa de la mutación. La regulación de éstos iones ha sido estudiada en un número reducido de especies y se ha encontrado que juntos controlan muchos de los procesos metabólicos que tienen lugar después de la fecundación y activación del huevo. Por ejemplo, tanto en huevos de erizo de mar como de *Xenopus*, se ha demostrado que una respuesta inmediata después del contacto del huevo con el espermatozoide, es un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, fenómeno que es seguido por una alcalinización del citoplasma del huevo. Esto sugiere una interdependencia entre Ca^{2+} y H^+ para el control de la síntesis de DNA y

proteínas, así como de los movimientos citoplasmáticos (Winkler y col., 1980; Rees y col., 1995; Carroll y col., 2000). Por lo tanto, una pérdida de la función del transportador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ tendría como consecuencia un desbalance iónico desfavorable al metabolismo del huevo durante la embriogénesis y probablemente también durante la ovogénesis.

De lo anteriormente discutido surge la siguiente pregunta: ¿Cuál es la relación existente entre la homeostasis de Ca^{2+} y la regulación del pH intracelular durante la segregación ovoplásmica? Es posible que al igual a lo observado en otras especies, exista ésta interdependencia entre los iones Ca^{2+} y H^+ y que la mutación del gen *emn/cax1* genere alteraciones en el metabolismo del huevo y cigoto, produciendo por ejemplo, una disminución de la traducción de proteínas del citoesqueleto, encargadas del transporte de ovoplasma hacia el blastodisco. Otra posibilidad es que la pérdida de actividad intercambiadora de la proteína no permita la restauración de Ca^{2+} después de un evento de señalización, ni la generación de un gradiente de H^+ a través de la membrana del retículo endoplásmico, fuerza protón-motriz requerida para el transporte del catión. Futuros experimentos de expresión y funcionalidad permitirán descifrar la manera de como el gen regula los movimientos de citoplasma, la cinética de *Cax1* para el transporte de los iones y el mantenimiento de la homeostasis durante la embriogénesis temprana.

Finalmente, y en base a lo anteriormente expuesto, se puede afirmar lo siguiente:

1. El blastodisco crece a expensas de la acumulación de ovoplasma en la región animal del cigoto.

2. El ovoplasma es transportado hacia el blastodisco desde el ecto y endoplasma a distintas velocidades y en diferentes períodos del desarrollo, a lo largo de rutas específicas de transporte o “streamers”.
3. El transporte lento de ovoplasma ocurre durante la primera interfase, a lo largo de “streamers” cortos.
4. El transporte rápido de ovoplasma ocurre durante la primera división de clivaje, a lo largo de “streamers” axiales y meridionales.
5. Una red de microtúbulos y filamentos de actina, presente en el ecto y endoplasma, estaría involucrada en el transporte de inclusiones, organelos y mRNAs.
6. Pulsaciones intermitentes del cigoto y embrión temprano podrían participar en la redistribución del ovoplasma durante su segregación.
7. La identificación de proteínas asociadas al citoesqueleto, como motores moleculares, y ensayos sobre su funcionalidad, sugieren que estos participan en la segregación ovoplásmica.
8. La utilización de mutantes de efecto materno, es una valiosa herramienta para dilucidar las bases genéticas y moleculares del proceso de segregación ovoplásmica.
9. La identificación molecular del gen *emn* y los futuros análisis de su funcionalidad, permitirán: a) conocer cómo su proteína regula los movimientos citoplasmáticos y b) comprender el control de la homeostasis iónica durante el desarrollo temprano.

7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

La información obtenida en esta tesis, revela la existencia de procesos que hacen posible la segregación ovoplásmica en el cigoto y embrión temprano del pez cebra. El citoesqueleto, y proteínas asociadas a este, participan en estos procesos transportando vectorialmente organelos y determinantes citoplasmáticos de origen materno hacia el blastodisco, región que dará origen al embrión. Así, estos hallazgos complementan las observaciones realizadas en el ovocito V y huevo del mismo animal (Fernández et al., 2006; Fuentes y Fernández, 2010) y juntos constituyen un significativo avance en el conocimiento de cómo se prepara el cigoto de vertebrados para iniciar la embriogénesis.

El fenómeno de segregación ovoplásmica aparece controlado por el producto de genes maternos cuya función permanece ignorada. Por esto, la identificación molecular y clonamiento de estos genes, en particular el gen *emn*, abrirá nuevos horizontes para dilucidar las bases genéticas y moleculares de la segregación ovoplásmica.

Si bien durante el desarrollo de esta tesis no se alcanzó a explorar sobre la expresión del gen *emn/cax1*, experimentos futuros de pérdida y ganancia de función permitirán resolver nuevas interrogantes como: 1) naturaleza de los mecanismos de regulación de los movimientos citoplasmáticos y 2) control de la homeostasis iónica durante el desarrollo temprano. Responder lo anterior, será el siguiente paso de esta investigación.

8. ANEXO I

8.1. Material Suplementario

Video 1: Animación realizada por video microscopía de "time lapse" de un cigoto pseudocoloreado durante la primera división de clivaje (estado 1c temprano) que muestra el movimiento rápido del endoplasma (coloreado de azul a púrpura) a lo largo de "streamers" axiales. Una reorganización de la zona ubicada en el margen del blastodisco probablemente contribuye a la entrada de grandes glóbulos de vitelo (coloreados verde a amarillo) al blastodisco. Desarrollo a 23.5 °C. Animación de 4 minutos con imágenes capturadas en intervalos de 10 segundos. Microscopía de campo claro.

Video 2: Animación realizada por video microscopía de "time lapse" de un cigoto pseudocoloreado durante la primera división de clivaje (estado 1c temprano) que muestra el movimiento ultrarápido del endoplasma (coloreado de azul a púrpura) a lo largo de "streamers" meridionales. Estos "streamers" se forman por debajo de la empalizada periférica de vitelo (coloreado verde a amarillo). Es posible apreciar también, el movimiento de inclusiones ectoplásmicas. Desarrollo a 25 °C. Animación de 3 minutos y 30 segundos con imágenes capturadas en intervalos de 10 segundos. Microscopía de campo claro.

Video 3: Animación realizada por video microscopía de "time lapse" de un cigoto durante la primera interfase (estado 1b) que muestra el movimiento lento de inclusiones desde lagunas de endoplasma más animales hacia el blastodisco. Desarrollo a 24 °C. Animación de 5 minutos con imágenes capturadas en intervalos de 10 segundos. Microscopía de campo claro.

Video 4: Animación realizada por video microscopía de "time lapse" de un cigoto durante la media/tardía primera interfase (estado 1b) que muestra el transporte de bolitas fluorescentes desde una laguna de endoplasma hacia el ectoplasma. Nótese que al final de la animación, las pulsaciones que muestra el cigoto son coincidentes con un cambio en la dirección de las bolitas en movimiento. Desarrollo a 22 °C. Animación de 7 minutos y 30 segundos con imágenes capturadas en intervalos de 30 segundos. Microscopía de fluorescencia.

Video 5: Animación realizada por video microscopía de "time lapse" de un cigoto durante la primera división de clivaje (estado 1c temprano) que muestra una conexión transitoria entre un "streamer" meridional (a la izquierda) y el ectoplasma vegetal (a la derecha). La conexión es interrumpida cercana a la periferia del cigoto. Desarrollo a 23 °C. Animación de 3 minutos y 30 segundos con imágenes capturadas en intervalos de 10 segundos. Microscopía de campo claro.

Video 6: Animación realizada por video microscopía de “time lapse” de un cigoto durante la primera interfase (estado 1b) que muestra las rápidas e intermitentes pulsaciones a lo largo del eje animal-vegetal de la célula. Desarrollo a 25 °C. Animación de 8 minutos de animación con imágenes capturadas en intervalos de 10 segundos. Microscopía de campo claro.

Video 7: Animación realizada por video microscopía de “time lapse” que muestra el desarrollo embrionario temprano del mutante de efecto materno *bucky ball (buc)*. Se observa una distribución aparentemente normal del ectoplasma, lagunas de endoplasma y la ausencia de un blastodisco. Nótese el engrosamiento del ectoplasma alrededor de la esfera de vitelo, presumiblemente como consecuencia de la acumulación de ovoplasma en ese lugar dando origen a los pseudoblastodiscos y las pulsaciones a lo largo del eje radial de cada uno de ellos, junto con el inicio de ciclos de contracción/relajación de un anillo de actina en el margen de los pseudoblastodiscos durante el clivaje. Desarrollo a 22 °C. Animación de 5 horas con imágenes capturadas en intervalos de 30 segundos. Microscopía de campo claro.

Video 8: Animación realizada por video microscopía de “time lapse” que muestra el desarrollo embrionario temprano del mutante de efecto materno *emulsion (emn)*. El cigoto *emn* se caracteriza por su opacidad y por la presencia de un blastodisco más pequeño. Las alteraciones en el flujo de ovoplasma hacia el polo animal y en la formación de “streamers” conllevan a la retención de ovoplasma en la esfera de vitelo. Nótese además, la dinámica de las ondas peristálticas a lo largo del eje animal/vegetal del mutante. Los mutantes cuyo blastodisco cliva, sobrevivieron mas allá del estado de blástula y el tamaño del embrión formado fue más reducido y ventralizado. Desarrollo a 22 °C. Animación de 2 horas con imágenes capturadas en intervalos de 30 segundos. Microscopía de campo claro.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abraham, V. C., Gupta, S. y Fluck, R. A. (1993). Ooplasmic segregation in the medaka (*Oryzias latipes*) egg. *Biol. Bull.* 184: 115-124.
- Abrams, E. W. y Mullins, M. C. (2009). Early zebrafish development: It's in the maternal genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19: 396-403.
- Alexander, J., Rothenberg, M., Henry, G.L. y Stainier, D.Y. (1999a). *casanova* plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish. *Dev. Biol.* 215: 343-357.
- Alexander, J. y Stainier, D.Y. (1999b). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Curr. Biol.* 9: 1147-1157.
- Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun Z. (1999). A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev.* 13: 2713-2724.
- Bally-Cuif L., Schatz W.J. y Ho, R. K. (1998). Characterization of the zebrafish Orb/CPEB-related RNA-binding protein and localization of maternal components in the zebrafish oocyte. *Mech. Dev.* 77: 31-47.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R. L. y Lipshitz H. D. (1998). RNA localization in development. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 335-394.
- Beams, H. W., Kessel, R.G., Shih, C.Y. y Tung, H.N. (1985). Scanning electron microscopy studies on blastodisc formation in the zebrafish, *Brachidanio rerio*. *J. Morphol.* 184: 41-39.
- Becker, K.A. y Hart, N.H. (1996). The cortical actin cytoskeleton of unactivated eggs: spatial organization and distribution of filamentous actin, nonfilamentous actin and myosin-II. *Mol. Reprod. Dev.* 43: 536-547.
- Becker, K.A. y Hart, N.H. (1999). Reorganization of filamentous actin and myosin II in zebrafish eggs correlates temporally and spatially with cortical granule exocytosis. *J. Cell Sci.* 112: 97-110.
- Blair, A., Tomlinson, A., Pham, H., Gunsalus, K.C., Goldberg, M.L. y Laski, F. A. (2006). Twinstar, the *Drosophila* homolog of cofilin/ADF, is required for planar cell polarity patterning. *Development* 133: 1789-1797.
- Bontems, F., Stein, A., Marlow, F., Lyautey, J., Gupta, T., Mullins, M.C. y Dosch, R. (2009). Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish. *Curr. Biol.* 19: 1-9.
- Bowerman, B. (1999). The maternal control of polarity and patterning during embryogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. En Moody, S. A. (ed), *Cell Lineage and Fate Determination*. pp 97-117. Academic Press. San Diego.

- Bullock, S. y Ish-Horowicz, D. (2001). Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embriogenesis. *Nature* 414: 611-616.
- Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T. y Vallee, R. B. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell Biol.* 139: 469-484.
- Cagnac, O., Leterrier, M., Yeager, M. y Blumwald, E. (2007). Identification and characterization of Vpx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H⁺ antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282: 24284-24293.
- Carroll, D. J., Albay, D. T., Hoang, K. M., O'Neill, F. J., Kumano, M. y Foltz, K. R. (2000). The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. *Dev. Biol.* 217: 179-191.
- Chen, J., Godt, D., Gunsalus, K., Goldberg, M. y Laski, F. A. (2001). Cofilin/ADF is required for cell motility during *Drosophila* ovary development and oogenesis. *Nat. Cell Biol.* 3: 204-209.
- Cheng, N. -H., Pittman, J. K., Barkia, B. J., Shigaki, T. y Hirschi, K. D. (2003). The *Arabidopsis cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *The Plant Cell* 15: 347-364.
- Clark, A., Meignin, C. y Davis, I. (2007). A dynein-dependent shortcut rapidly delivers axis determination transcripts into the *Drosophila* oocyte. *Development* 134: 1955-1965.
- Conklin, E. G. (1905). The orientation and cell lineage of the ascidian egg. *J. Acad. Nat. Sci. Phila.* 13: 5-119.
- Cooley, L., Verheyen, E. y Ayers, K. (1993). *chickadee* encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell* 69: 173-184.
- Danilchick, M. V. y Denegre, J. M. (1991). Deep cytoplasmic rearrangements during early development in *Xenopus laevis*. *Development* 111: 845-856.
- Dekens, M. P. S., Pelegri, F. J., Maischein, H. y Nüsslein-Volhard, C. (2003). The maternal-effect gene *futile cycle* is essential for pronuclear congression and mitotic spindle assembly in the zebrafish zygote. *Development* 130: 3907-3916.
- Dondua, A. K., Kostyuchenko, R. P. y Fedorova, Z. E. (1997). Effects of some cytoskeleton inhibitors on ooplasmic segregation in the *Nereis virens* egg. *Int. J. Dev. Biol.* 41: 853-858.
- Dosch, R., Wagner, D. S., Mintzer, K. A., Runke, G., Wiemelt, A. P. y Mullins, M. C. (2004). Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: Mutants from the zebrafish I. *Dev. Cell* 6: 771-780.

- Driever, W., Stemple, D., Schier, A. y Solnica-Krezel, L. (1994). Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet.* 10: 152-159.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Malicki, J., Stemple, D.L., Stainier, D.Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J. y Boggs, C. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123: 37-46.
- Dumont, S y Mitchison, T, J. (2009). Force and length in the mitotic spindle. *Curr. Biol.* 19: R749-R761.
- Fernández, J. y Olea, N. (1982). Embryonic development of glossiphoniid leeches. En: F. W. Harrison, R. R. Cowden (eds), *Developmental biology of freshwater invertebrates*. pp 317-366. Alan R. Liss, New York.
- Fernández, J. y Olea, N. (1995). Formation of the female pronucleus and reorganization and disassembly of the first interphase cytoskeleton in the egg of the glossiphoniid leech *Theromyzon rude*. *Dev. Biol.* 171: 541-553.
- Fernández, J., Olea, N. Ubilla, A. y Cantillana, V. (1998). Formation of polar cytoplasmic domains (teloplasms) in the leech egg is a three-step segregation process. *Intl. J. Dev. Biol.* 42: 149-162.
- Fernández, J., Toro, J. y Ubilla, A. (2004). Confocal and video imaging of cytoskeleton dynamics in the leech zygote. *Dev Biol.* 271: 59-74.
- Fernández, J., Valladares, M., Fuentes, R. y Ubilla, A. (2006). Reorganization of cytoplasm in the zebrafish oocyte and egg during early steps of ooplasmic segregation. *Dev. Dyn.* 235: 656-671.
- Fuentes, R. y Fernández, J. (2010). Ooplasmic segregation in the zebrafish zygote and early embryo: Pattern of ooplasmic movements and transport pathways. *Dev. Dyn.* 239: 2172-2189.
- Gardner, M. K., Pearson, C. G., Sprague, B. L., Zarzar, T. R., Bloom, K., Salmon, E. D. y Odde, D.J. (2005). Tension-dependent regulation of microtubule dynamics at kinetochores can explain metaphase congression in yeast. *Mol. Biol. Cell* 16: 3764-3775.
- Glotzer, J. B. y Ephrussi, A. (1996). mRNA localization and the cytoskeleton. En Karsenti, E. (ed). *Seminars in Developmental Biology*. pp 357-365. Academic Press, San Diego.
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, Farrington, Lin, S.-Y., Nissen, R. M. y Hopkins, N. (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat. Genet.* 31: 135-140.

Gore, A. V. y Sampath, K. (2002). Localization of transcripts of the zebrafish morphogen Squint is dependent on egg activation and the microtubule cytoskeleton. *Mech. Dev.* 112: 153-156.

Gore, A. V., Maegawa, S., Cheong, A., Gilligan, P. C., Weinberg, E. S. y Sampath, K. (2005). The zebrafish dorsal axis is apparent at the four-cell stage. *Nature* 438: 1030-1035.

Grafstein, B. y Forman, D.S. (1980). Intracellular transport in neurons. *Physiol. Rev.* 60: 1167-1283.

Gupta, T., Marlow, F. L., Ferriola, D., Mackiewicz, K., Dapprich, J., Monos, D. y Mullins, M. C. (2010). Microtubule actin crosslinking factor 1 regulates the Balbiani body and animal-vegetal polarity of the zebrafish oocyte. *PLoS Genet.* 6: e1001073.

Hammerschmidt, M., Pelegri, F., Mullins, M. C., Kane, D. A., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., Kelsh, R. N., Odenthal, J., Warga, R. M. y Nüsslein-Volhard, C. (1996). Mutations affecting morphogenesis during gastrulation and tail formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123: 143-151.

Hart, N. H. y Donovan, M. (1983). Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*. *J. Exp. Zool.* 227: 277-296.

Hart, N. H. y Fluck, R. A. (1995). Cytoskeleton in teleost eggs and early embryos: contributions to cytoarchitecture and motile events. En Capco, E. D. (ed). *Curr. Top. in Dev. Biol.* pp 343-381. Academic Press, Orlando.

Hart, N. H., Becker, K. A. y Wollenski, J. S. (1992). The sperm entry site during fertilization of the zebrafish egg: localization of actin. *Mol. Reprod. Dev.* 32: 217-228.

Higgs, H. N. y Pollard, T. D. (2001). Regulation of actin filament network formation through Arp2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 649-676.

Hirschi, K. D., Zhen, R. -G., Cunningham, K. W., Rea, P. A. y Fink, G. R. (1996) CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8782-8786.

Hisaoka, K. K. y Battle, H. I. (1958). The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachidanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Morphol.* 102: 311-328.

Hisaoka, K. K. y Firlit, C. F. (1960). Further studies on the embryonic development of the zebrafish, *Brachidanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Morphol.* 197: 205-255.

Ho, R. K. (1992). Axis formation in the embryo of the zebrafish, *Brachidanio rerio*. *Dev. Biol.* 3: 53-64.

- Holloway, B. A., Gomez de la Torre Canny, S., Ye, Y., Slusarski, D. C., Freisinger, C. M., Dosch, R., Chou, M. M., Wagner, D. S. y Mullins, M. C. (2009). A novel role for MAPKAPK2 in morphogenesis during zebrafish development. *PLoS Genet.* 5: e1000413.
- Howard, J. y Hyman, A. A. (2007). Microtubule polymerases and depolymerases *Curr. Op. Cell Biol.* 19:31-35.
- Howley, C. y Ho, R. K. (2000). mRNA localization patterns in zebrafish oocytes. *Mech. Dev.* 92: 305-309.
- Houliston, E y Elinson, R. P. (1991). Patterns of microtubule polymerization relating to cortical rotation in *Xenopus laevis* eggs. *Development* 112: 107-117.
- Hyman, E., Drechsel, D., Kellog, D., Salser, S., Sawin, K., Steffen, P., Wordeman, L. y Mitchison, T. (1991). Preparation of modified tubulins. *Methods Enzymol.* 196: 478-485.
- Iwamatzu, T. (2004). Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes* *Mech. Dev.* 121: 605-618.
- Januschke, J., Gervais, L., Dass, S., Kaltschmidt, J. A., Lopez-Schier, H., St Johnston, D., Brand, A. H., Roth, S. y Guichet, A. (2002). Polar transport in the *Drosophila* oocyte requires Dynein and Kinesin I cooperation. *Curr. Biol.* 12: 1971-1981.
- Jeffery, W. R. (1982). Calcium ionophore polarizes ooplasmic segregation in ascidian eggs. *Science* 216: 545-547.
- Jeffery, W. R. y Meier, S. (1983). A yellow crescent cytoskeletal domain in ascidian eggs and its role in early development. *Dev. Biol.* 96: 125-143.
- Jeffery, W. R. (1984). Pattern formation by ooplasmic segregation in ascidian eggs. *Biol. Bull.* 166: 277-298.
- Jesuthasan, S. y Strähle, U. (1997). Dynamic microtubules and specification of the zebrafish embryonic axis. *Curr. Biol.* 7:31-42.
- Kane, D. A. y Kimmel, C. B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development* 119: 447-456.
- Katow, H. (1983). Obstruction of blastodisc formation by cytochalasin B in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Dev. Growth Diff.* 25: 477-484.
- Kemphues, K. J., Priess, J.R., Morton, D.G. y Cheng, N.S. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52: 311-320.

- Kemphues, K. J. y Strome, S. (1997). Fertilization and establishment of polarity in the embryo. En: Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J. y Priess, J. R. (eds). *C. elegans* II. pp 335-360. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. y Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development in the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
- Kinsey, W. H., Wu, W. y Macgregor, E. (2003). Activation of Src-family PTK activity at fertilization: role of the SH2 domain. *Dev. Biol.* 264, 255-262.
- Kloc, M. y Etkin, L. D. (2005). RNA localization mechanisms in oocytes. *J. Cell Sci.* 118: 269-282.
- Knapick, E. W. -(2000). ENU mutagenesis in zebrafish-from genes to complex diseases. *Mammalian Genome* 11: 511-519.
- Knaut, H., Pelegri, F., Bohmann, K., Schwarz, H. y Nüsslein-Volhard, C. (2000). Zebrafish vasa RNA not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J. Cell. Biol.* 149: 875-888.
- Kostyuchenko, R. P. y Dondua, A. K. (2000). Ooplasmic segregation and axis formation in the polychaete *Nereis virens* embryo. *Russ. J. Dev. Biol.* 31: 95-105.
- Kotani, T. y Kawakami, K. (2008). *misty somites*, a maternal effect gene identified by transposon-mediated insertional mutagenesis in zebrafish that is essential for the somite boundary maintenance. *Dev. Biol.* 316: 383-396.
- Kovács, M., Tóth, J., Hetényi, C., Málnási-Csizmadia, A. y Sellers, J. R. (2004). Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* 279: 35557-35563.
- Lee, K. W., Baker, R., Galione, A., Gilland, E. H., Hanlon, R. T. y Miller, A. L. (1996). Ionophore-induced calcium waves activate unfertilized zebrafish (*Danio rerio*) eggs. *Biol. Bull.* 191: 265-267.
- Lee, K. W., Webb, S. E. y Miller, A. L. (1999). A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation. *Dev. Biol.* 214: 168-180.
- Lessman, C. A. (2009). Oocyte maturation: Converting the zebrafish oocyte to the fertilizable egg. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161: 53-57.
- Leung, C.F., Webb, S.E. y Miller, A.L. (2000). On the mechanism of ooplasmic segregation *Dev. Growth Diff.* 42: 29-40.
- Lewis, W. H. y Roosen-Runge, E. C. (1943). The formation of the blastodisc in the egg of the zebrafish, *Brachidanio rerio*. *Anat Rec.* 85: 326.
- Lillie, R. S. (1906). Observations and experiments concerning the elementary phenomena of embryonic development in *Chaetopterus*. *J. Exp. Zool.* 3: 153-268.

- Lindeman, R. E. y Pelegri, F. (2009). Vertebrate maternal-effect genes: Insights into fertilization, early cleavage divisions, and germ cell determinant localization from studies in the zebrafish. *Mol. Reprod. Dev.* 77(4): 299-313.
- Liu, J. y Lessmann, C. A. (2008). Changes of γ -tubulin expression and distribution in the zebrafish (*Danio rerio*) ovary, oocyte and embryo. *Gene Exp. Patt.* 8: 237-247.
- Lyman-Gingerich, J. y Pelegri, F. (2007). Maternal factors in fish oogenesis and embryonic development. En Babin, P., Cerdà, J. y Lubzens, E. (eds). *The Fish Oocyte. From Basic Studies to Biotechnological Applications*. pp 141-174. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Mahajan-Miklos, S. y Cooley, L. (1994). Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* 165: 336-351.
- Mahowald, A. P. (1962). Finer structure of pole cells and polar granules in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 228: 91-97.
- Manohar, M., Mei, H., Franklin, A. J., Sweet, E. M., Shigaki, T., Riley, B. B. MacDiarmid, C. W. y Hirschi, K. (2010). Zebrafish (*Danio rerio*) endomembrane antiporter similar to a yeast cation/H⁺ transporter is required for neural crest development. *Biochemistry* 49: 6557-6566.
- Marlow, F. L. y Mullins, M. C. (2008). Bucky ball functions in Balbiani body assembly and animal-vegetal polarity in the oocyte and follicle cell layer in zebrafish. *Dev. Biol.* 321: 40-50.
- Mei, W. M., Lee, K. W., Marlow, F. L., Miller, A. L. y Mullins, M. C. (2009). hnRNP I is required to generate the Ca²⁺ signal that causes egg activation in zebrafish. *Development* 136: 3007-3017.
- Mitchison, T. J. y Kirschner, M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237-242.
- Mizuno, T., Yamaha, E., Wakahara, M., Kuroiwa, A. y Takeda, H. (1996) Mesoderm induction in zebrafish. *Nature* 383: 131-132.
- Mizuno, T., Yamaha, E., Kuroiwa, A. y Takeda, H. (1999). Removal of vegetal yolk causes dorsal deficiencies and impairs dorsal-inducing ability of the yolk cell in zebrafish. *Mech. Dev.* 81: 51-63.
- Moody, S. A. (1999). A historical perspective on the study of cell lineages and fate determination. En Moody, S. A. (ed). *Cell Lineage and Fate Determination*. pp xvii-xxii. Academic Press, San Diego.

- Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Heisenberg, C.-P., Jiang, Y.-J., Kelsh, R. N. y Nüsslein-Volhard, C. (1996). Genes establishing dorsoventral pattern formation in the zebrafish embryo: the ventral specifying genes. *Development* 123: 81-93.
- Mullins, M. C. (2002). Building-blocks of embryogenesis. *Nature Genetics* 31: 125-126.
- Nelsen, O. E. (1953). Comparative embryology of the vertebrates. pp 982. Blakiston Co, New York.
- Neuhaus, J.-M., Wanger, M., Keiser, T. y Wegner, A. (1983). Treadmilling of actin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 4: 507-527.
- Nojima, H., Rothhämel, S., Shimizu, T., Kim, Ch. -H., Yonemura, S., Marlow, F. L. y Hibi, M. (2010). Syntabulin, a motor protein linker, controls dorsal determination. *Development* 137: 923-933.
- Nüsslein-Volhard, C. (1992). Coming to life. How genes drive development. En: Maderspacher, F. (ed). Kales Press, United States.
- Ober, E. A. y Schulte-Merker, S. (1999). Signals from the yolk cell induce mesoderm, neuroectoderm, the trunk organizer and the notochord in zebrafish. *Dev. Biol.* 215: 167-181.
- Orokos, D.D., Cole, R.W. y Travis, J.L. (2000). Organelles are transported on sliding microtubules in *Reticulomyxa*. *Cell Motil. Cytosk.* 47: 296-306.
- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P. y Carlier, M.F. (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat. Cell Biol.* 7:385-91.
- Paschal, B. M., Shpetner, H. S. y Vallee, R. B. (1987). MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J. Cell Biol.* 105: 1273-1282.
- Pelegri, F., Knaut, H., Maischein, H.M., Schulte-Merker, S. y Nüsslein-Volhard, C. (1999). A mutation in the zebrafish maternal-effect gene *nebel* affects furrow formation and *vasa* RNA localization. *Curr. Biol.* 9: 1431-1440.
- Pelegri, F. (2003). Maternal factors in zebrafish. *Dev. Dyn.* 228: 535-554.
- Pelegri, F., Dekens, M. P. S., Schulte-Merker, S., Maischein, H. -M., Weiler, C. y Nüsslein-Volhard, C. (2004). Identification of recessive maternal-effect mutations in the zebrafish using a gynogenesis-based method. *Dev. Dyn.* 231: 324-335.
- Phelps, K. K. y Walker, R. A. (1999). *N*-Ethylameimide inhibits Ncd motor function by modification of a cysteine in the stalk domain. *Biochemistry* 38: 10750-10757.

- Rees, B. B., Patton, C., Grainger, J. L y Epel, D. (1995). Protein synthesis after fertilization of sea urchin eggs in the absence of an increase in intracellular pH. *Dev. Biol.* 169: 683-698.
- Reverberi, G. (1971). Ascidians. En: Reverberi, G. (ed). *Experimental embryology of marine and fresh-water invertebrates*. pp 507-549. North-Holland Publ. Co. Amsterdam.
- Rieder, C. L. (1999). Mitosis and Meiosis. En Wilson, L. y Matsudaira, P. (eds). *Methods in Cell Biology*. Academic Press, San Diego.
- Roll-Mecak, A. y McNally, F. J. (2010). Microtubule severing enzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22: 96-103.
- Roosen-Runge, E. C. (1938). On the early development-bipolar differentiation and cleavage of the zebrafish, *Brachidanio rerio*. *Biol. Bull.* 75:119-133.
- Roy, A. y Matzuk, M. M. (2006). Deconstructing mammalian reproduction: Using knockouts to define fertility pathways. *Reproduction* 131:207-219
- Schnorrer, F., Bohmann, K. y Nüsslein-Volhard, C. (2000). The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nat. Cell. Biol.* 2: 185-190.
- Scholey, J. M. (1998). Functions of motor proteins in echinoderm embryos: An Argument in support of antibody inhibition experiments. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 39: 257-260.
- Selman, K., Wallace, R.A., Sarka, A. y Qi, X. (1993). Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachidanio rerio*. *J. Morphol.* 218: 203-224.
- Sharma, D. y Kinsey, W. H. (2006). Fertilization triggers localized activation of Src-family protein kinases in the zebrafish egg. *Dev. Biol.* 295: 604-614.
- Sharma, D. y Kinsey, W. H. (2008). Regionalized calcium signaling in zebrafish fertilization. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 561-570.
- Shigaki, T., Rees, I., Nakhleh, L. y Hirschi, K. D. (2006). Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters. *J. Mol. Evol.* 63: 815-825.
- Shimizu, T. (1982). Ooplasmic segregation in the *Tubifex* egg: mode of pole plasm accumulation and possible involvement of microfilaments. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 191: 246-256.
- Shimizu, T. (1999). Cytoskeletal mechanisms of ooplasmic segregation in annelid eggs. *Int. J. Dev. Biol.* 43: 011-018.

- Shimoda, N., Knapik, E. W., Ziniti, J., Sim, C., Yamada, E., Kaplan, S., Jackson, D., de Sauvage, F., Jacob, H. y Fishman, M. C. (1999). Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics* 58: 219-232.
- St Johnston, D. y Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68: 201-219.
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat. Mol. Cell Biol.* 8: 363-375.
- Stephenson, E. C., Chao, Y. y Fackenthal, J. D. (1988). Molecular analysis of the *swallow* gene of *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 2: 1655-1665.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. y Songer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291: 293-296.
- Strome, S. y Wood, W. B. (1983). Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos. *Cell* 35, 15-25.
- Sun, Q. -Y., Liu, K. y Kikuchi, K. (2008). Oocyte-specific knockout: A novel in vivo approach for studying gene functions during folliculogenesis, oocyte maturation, fertilization, and embryogenesis. *Biol. Reprod.* 79: 1014-1020.
- Talbot, W. S. y Schier, A. F. (1999). Positional cloning of mutated zebrafish genes. *Methods Cell Biol.* 60, 259-286.
- Theusch, E. V., Brown, K. J. y Pelegri, F. 2006. Separate pathways of RNA recruitment lead to the compartmentalization of the zebrafish germ plasm. *Dev. Biol.* 292: 129-141.
- Uehara, R. y Goshima, G. (2010). Functional central spindle assembly requires de novo microtubule generation in the interchromosomal region during anaphase. *J. Cell Biol.* 191: 259-267.
- Urven L. E., Yabe, T. y Pelegri, F. (2006). A role for non-muscle myosin II function in furrow maturation in the early zebrafish embryo. *J. Cell Sci.* 119: 4342-4352.
- Vallee R. B. y Bloom G. S. (1991). Mechanisms of fast and slow axonal transport. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 59-92.
- Verheyen, E. M y Cooley. L. (1994). Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development* 120: 717-728.
- Wagner, D. S., Dosch, R., Mintzer, K. A., Wiemelt, A. P. y Mullins, M. C. (2004). Maternal control of development at the midblastula transition and beyond: Mutants from the zebrafish II. *Dev. Cell* 6: 781-790.

- Watanabe, N. y Mitchison, T. J. (2002). Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* 295: 1083-1086.
- Webb, S. E, Lee, K. W., Karplus, E. y Miller, A. L. (1997). Localized calcium transients accompany furrow positioning, propagation, and deepening during the early cleavage period of zebrafish embryos. *Dev. Biol.* 192: 78-92.
- Webb, S. E. y Miller, A. L. (2006). Ca²⁺ signaling and early embryonic patterning during the blastula and gastrula periods of zebrafish and *Xenopus* development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 1192-1208.
- Westerfield, M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
- Whitaker, M. (2006). Calcium at fertilization and in early development. *Physiol. Rev.* 86: 25-88.
- Wilson, E. B. (1904). Experimental studies on germinal localization. I. The germ regions of the egg of *Dentalium*. II. Experiments on the cleavage-mosaic in *Patella* and *Dentalium*. *J. Exp. Zool.* 1: 172.
- Winkelmann, D. A.; Kinose, F. y Chung, A. L. (1993). Inhibition of actin filament movement by monoclonal antibodies against the motor domain of myosin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 14: 452-467.
- Winkler, M. M., Steinhardt, R. A. Grainger, J. L. y Minning, L. (1980). Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. *Nature* 287: 558-560.
- Wong, J. L. y Wessel, G. M. (2006). Defending the zygote: Search for the ancestral animal block to polyspermy. *Curr. Top. Dev. Biol.* 72: 1-153.
- Wu, W. y Kinsey, W. H. (2002). Role of PTPase(s) in regulating Fyn kinase at fertilization of the zebrafish egg. *Dev. Biol.* 247: 286-294.
- Wylie, C. C. y Haesman, J. (1997). What my mother told me: Examining the roles of maternal gene products in a vertebrate. *Trends Cell Biol.* 7:459-461.
- Yabe, T., Ge, X. y Pelegri, F. (2007). The zebrafish maternal-effect gene *cellular atoll* encodes the centriolar component sas-6 and defects in its paternal function promote whole genome duplication. *Dev. Biol.* 312: 44-60.