

UCH-FC
DOC - BMCN ↓
G 934
C.1

**DESARROLLO DE CONECTIVIDAD NEURONAL
ASOCIADA A LA HABÉNULA DE PEZ CEBRA Y
SU REGULACIÓN POR QUIMIOQUINAS**

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

Néstor Alfonso Guerrero Toro

Mayo, 2009

Director de Tesis Dr:

Miguel Concha

Co-Director de Tesis Dr:

Miguel Allende



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

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

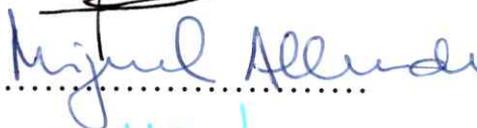
NÉSTOR GUERRERO TORO

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 15 de Enero de 2009.

Director de Tesis:
Dr. Miguel Concha

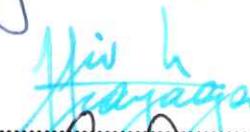

.....

Co-Director de Tesis:
Dr. Miguel Allende


.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Julio Alcayaga


.....

Dr. Christian González


.....

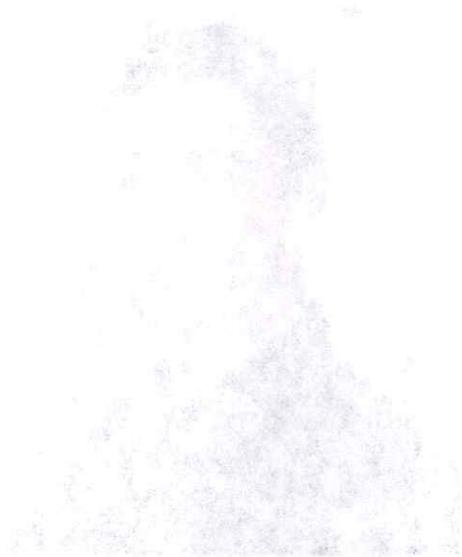
Dr. Manuel Kukuljan


.....

Dr. Jorge Mpodozis


.....





***A mi Hija, Catalina,
y a la Chispa que Iluminó mis Pasos...***





AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos aquellos que durante la realización de esta Tesis han estado presentes con su apoyo, consejos y amistad. En primer lugar al Dr. Miguel Concha por permitirme participar en su laboratorio desde sus inicios, lo que para mí es un motivo de orgullo muy especial. Su dirección y apoyo constantes han sido el eje central para la realización de esta Tesis. De igual forma, la Comisión de Doctorado ha sido fundamental, y me siento afortunado al contar en ella con nombres tan relevantes no sólo en el ámbito académico, sino que también en mis apreciaciones personales. Al Dr. Steven Wilson y a Isaac Bianco quienes amablemente guiaron mis primeros pasos experimentales en esta Tesis durante mi estadía en la University College London. Agradezco también al Dr. Steffen Härtel por aportar sus conocimientos en el manejo de imágenes y, en particular, por su amistad e interés en el desarrollo de mi trabajo.

Son de vital importancia en este proceso mis padres, hermanos y, especialmente, mis compañeros de laboratorio, que diariamente crean un grato ambiente durante la jornada laboral. En este sentido quisiera agradecer a algunos de ellos en forma particular, basándome en el peso de la historia y la profundidad de su presencia:

Ailen, mi primera gran compañera, que por designios superiores, se reunió conmigo para discutir el primer *paper* previo a nuestro primer seminario de laboratorio, convirtiéndose desde ese momento en mi única referencia incondicional en las sinuosidades de este camino.

Alicia, cuya admirable fortaleza en lo profesional es equivalente a la gran amistad que a lo largo de estos años hemos formado, haciendo que la eficiencia en el trabajo sea nuestro mejor aliado.

Germán, quien activamente ha contribuido con sus conocimientos al desarrollo científico de esta Tesis, y que por su integridad en el ámbito profesional y personal representa un ejemplo digno de imitar. Su amistad ha sido muy valiosa en este tiempo.

Eugenia, quien con su profesionalismo y calidez ha incentivado y alentado mi trabajo, inspirando en mí confianza y seguridad en los momentos de dudas.

Luisa, por su gentileza en compartir conmigo su visión con respecto a las luchas que debemos enfrentar en el quehacer científico.

Alejandra, por su asistencia técnica, generosidad y paciencia.

Por último, Karina, que en este último periodo ha llegado a ser una grata sorpresa por su lealtad, amistad y confianza.

Quisiera agradecer a la distancia a las personas que compartieron gran parte de este periodo conmigo y que ya marcharon, en especial a Daniela Galleguillos y Dina Silva. Asimismo a todos los que diariamente comparten hasta hoy su amistad y compañerismo: Carmen Gloria, Aldo, Pablo, Leo, Mauricio, Daniela, Nohema, Felipe, y a los integrantes del acuario: Alejandro, Luis, Lorena, Johnny y Carolina.

Finalmente, no puedo dejar de mencionar a aquellos que se transformaron en figuras centrales de esta Tesis: los peces cebra.

A todos ustedes muchas gracias.

ÍNDICE DE MATERIAS



Introducción.....	1
Quimioquinas y migración celular durante la embriogénesis.....	4
Quimioquinas y procesos de guía axonal.....	7
Hipótesis, objetivo general y específicos.....	11
Materiales y métodos.....	12
Líneas de peces.....	12
Identificación de mutantes <i>odysseus</i>	12
Fijación.....	13
Hibridación <i>in situ</i> de embrión completo.....	13
Inmunotinción e inmunofluorescencia indirecta de larvas completas.....	14
Marcación de proyecciones eferentes habenulares.....	15
Foto-conversión de DiI.....	16
Morfolinos.....	16
Adquisición de imágenes, procesamiento y reconstrucción en 3 dimensiones...	16
Resultados.....	18
1. Las quimioquinas <i>sdf1a</i> y <i>sdf1b</i> y su receptor <i>cxcr4b</i> se expresan en componentes del circuito T-H-IP.....	18
1.1. Localización del NIP.....	21
1.2 <i>sdf1b</i> se expresa en la región del NIP.....	23
1.3 <i>sdf1a</i> está ausente de la región del NIP.....	25
2. Pérdida de función del receptor de quimioquina <i>Cxcr4b</i> : criterios de identificación de mutantes <i>odysseus</i>	26
2.1. Desarrollo de la LLP.....	26
2.2. Migración de las células germinales.....	29
3. Desarrollo alterado del tracto H-IP en mutantes <i>ody</i> ^{-/-}	35
3.1. Análisis de conectividad de los núcleos habenulares en mutantes <i>ody</i> ^{-/-}	35
3.2 Desarrollo normal del epítalamo en mutantes <i>ody</i> ^{-/-}	41

3.3. Segregación de los eferentes habenulares en el NIP de mutantes	
<i>ody</i> ^{-/-}	44
4. Efectos de la pérdida de función de <i>sdf1a</i> y <i>sdf1b</i> en el desarrollo del	
tracto H-IP.....	48
4.1. Bloqueo de la función de <i>sdf1a</i> y <i>sdf1b</i> en peces cebra silvestres.....	48
4.2. Bloqueo de la función de <i>sdf1a</i> en peces cebra transgénicos ET16: <i>gfp</i>	51
4.3. Estudios de conectividad habenular en mutantes de <i>sdf1a</i>	53
5. Origen de las alteraciones de conectividad habenular en mutantes <i>ody</i> ^{-/-}	56
5.1. <i>ody</i> ^(-/-) / <i>brn3a:gfp</i>	57
5.2. <i>ody</i> ^(-/-) /ET16: <i>gfp</i>	59
Discusión.....	61
Patrones de expresión de quimioquinas y su posible función en guía axonal.....	61
Penetrancia de la mutación de <i>cxc4b</i>	62
Efectos de la mutación de <i>cxc4b</i> : proyecciones ectópicas habenulares.....	65
Efectos de la mutación de <i>cxc4b</i> : pérdida de conectividad H-IP.....	69
Estudios funcionales de guía axonal por quimioquinas: eficiencia de morfolidos	
versus mutantes.....	71
Identificación de las proyecciones ectópicas habenulares en mutantes <i>ody</i> ^{-/-}	75
Conclusión.....	78
Referencias.....	80



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Selección de parejas portadoras de la mutación de <i>cxcr4b</i>	29
Tabla 2. Inyección de mRNA de <i>vasa</i> 3'UTR-GFP.....	31
Tabla 3. Clasificación de mutantes <i>ody</i> ^{-/-}	34
Tabla 4. Distribución de fenotipos <i>ody</i> ^{-/-} en larvas obtenidas de padres <i>ody</i> ^{+/-}	34
Tabla 5. Distribución de fenotipos <i>ody</i> ^{-/-} en larvas obtenidas de padres <i>ody</i> ^{-/-}	34
Tabla 6. Inyección de morfolinós para <i>sdf1a</i>	49

LISTA DE FIGURAS

Figuras de antecedentes

Figura A1. Diagrama esquemático del sistema habenular embrionario.....	3
Figura A2. Migración de células germinales.....	6
Figura A3. Migración del primordio de la LLP.....	7
Figura A4. Hibridación in situ de <i>sdf1a</i> , <i>sdf1b</i> y <i>cxcr4b</i>	8
Figura A5: Errores en la guía de los axones retinales al reducirse la señalización Sdf1a/Cxcr4b por bloqueos con morfolinós.....	8
Figura A6. Patrones de expresión de <i>cxcr4b</i> en la placoda olfatoria.....	9
Figura A7. Defectos en las proyecciones axonales de las neuronas sensoriales olfatorias en mutantes <i>odysseus</i>	10

Figuras del trabajo experimental

Figura 1. Patrones de expresión de quimioquinas <i>sdf1a</i> y <i>sdf1b</i> , y de sus receptores <i>cxcr4a</i> y <i>cxcr4b</i>	20
Figura 2. Fluorescencia <i>in vivo</i> de GFP de peces ET16: <i>gfp</i> observado en lupa de fluorescencia.....	22
Figura 3. Inmunotinción de GFP en peces ET16: <i>gfp</i> de 5 dpf.....	23
Figura 4. Localización de la expresión de <i>sdf1b</i> en la región del NIP.....	24
Figura 5. Localización de la expresión de <i>sdf1b</i> en NIP y regiones de los fascículos retroflexos.....	24

Figura 6. Marcación de <i>sdf1a</i> por hibridación <i>in situ</i> y de GFP por inmunotinción en peces ET16: <i>gfp</i>	25
Figura 7. Identificación de mutantes <i>ody</i> ^{-/-} por tinción de neuromastos con DASPEL.....	28
Figura 8. Fluorescencia <i>in vivo</i> de GFP en las células germinales de embriones inyectados con <i>nanos</i> 3'UTR-GFP.....	31
Figura 9. Inmunotinción contra α -tubulina acetilada en larvas <i>ody</i> ^{-/-} obtenidas de peces <i>ody</i> ^{+/-}	36
Figura 10. Proporción de larvas <i>ody</i> ^{-/-} que desarrollan proyecciones habenuales ectópicas.....	37
Figura 11. Clasificación de las proyecciones habenuales ectópicas en larvas <i>ody</i> ^{-/-} obtenidas de peces <i>ody</i> ^{-/-}	39
Figura 12. Distribución de las tres clases de proyecciones habenuales ectópicas descritas en mutantes <i>ody</i> ^{-/-}	40
Figura 13. Desarrollo del órgano pineal en mutantes <i>ody</i> ^{-/-}	42
Figura 14. Hibridaciones <i>in situ</i> de marcadores moleculares de la región presuntiva de la habénula y de especificación habenuar.....	43
Figura 15. Marcación diferencial de los núcleos habenuales con DiD y DiA.....	46
Figura 16. Asociación entre la formación de proyecciones habenuales ectópicas y la pérdida de conectividad eferente con el NIP.....	46
Figura 17. Marcaciones unilaterales del tracto H-IP por fotoconversión de DiI.....	47
Figura 18. Fenocopias de proyecciones ectópicas habenuales en morfantes de <i>sdf1a</i> ..	50
Figura 19. Efecto de la inyección de MO <i>sdf1a</i> en mutantes <i>ody</i> ^{-/-}	51
Figura 20. Inmunofluorescencia doble para α -tubulina acetilada y GFP en peces ET16: <i>gfp</i> inyectados con MO <i>sdf1a</i>	52
Figura 21. Peces <i>medusas</i> analizados por inmunotinción anti α -tubulina acetilada.....	54
Figura 22. Análisis confocal de proyecciones habenuales en peces <i>medusa</i> ^{-/-}	55
Figura 23. Expresión <i>in vivo</i> de GFP en cerebro de larvas <i>ody</i> ^(+/-) / <i>brn3a:gfp</i> y <i>ody</i> ^(-/-) / <i>brn3a:gfp</i>	57
Figura 24. Análisis del carácter eferente de las proyecciones ectópicas habenuales	

en larvas <i>ody(-/-)/brn3a:gfp</i>	58
Figura 25. Análisis del carácter eferente de las proyecciones ectópicas habenulares en larvas <i>ody(-/-)/ET16:gfp</i>	60
Figura 26. Diagrama esquemático del cerebro de larvas de pez cebra que muestra el papel de las quimioquinas en el establecimiento de la conectividad habénulo-interpeduncular.....	79

ABREVIATURAS

CGR: células ganglionares de la retina
 dpf: días post fertilización
 hpf: horas post fertilización
 H-IP: habénulo-interpeduncular
 LLP: línea lateral posterior
 NIP: núcleo interpeduncular
 NSO: neuronas sensoriales olfatorias
 T-H-IP: telencéfalo-habénulo-interpeduncular



RESUMEN

Cxcr4b es un receptor de quimioquina involucrado en varios procesos de migración celular y guía axonal durante el desarrollo de pez cebra. En el sistema nervioso central embrionario, *cxcr4b* y sus ligandos *sdf1a* y *sdf1b* se expresan en diferentes componentes del sistema habébulo-interpeduncular, sugiriendo que la señalización de quimioquinas podría participar en el establecimiento de conectividad asociado a este circuito neuronal. Para investigar este punto, analizamos la conectividad neuronal en el sistema habénulo-interpeduncular de larvas mutantes que muestran pérdida de función de *cxcr4b* (*odysseus*^{-/-}). Se realizó inmunotinción contra α -tubulina acetilada y la implantación local de trazadores lipofílicos para revelar el esqueleto axonal, lo que fue visualizado a través de microscopía confocal. Larvas mutantes *odysseus*^{-/-} exhibieron defasciculación del tracto habénulo-interpeduncular, desorganización de la conectividad eferente habenular dentro del núcleo interpeduncular, y proyecciones axonales ectópicas que conectan los núcleos habenulares izquierdo y derecho. La inyección de oligonucleótidos antisentido de tipo morfolino contra *sdf1a* en peces cebra silvestres y el análisis de mutantes de *sdf1a* *medusa*^{-/-} reveló una fenocopia de los defectos axonales observados en el tracto habénulo-interpeduncular de mutantes *odysseus*^{-/-}. Estudios en mutantes GFP-transgénicos demostraron que las proyecciones ectópicas corresponden a conectividad eferente habenular que exhibe errores de guía axonal. En resumen, concluimos que el señalamiento Sdf1a/Cxcr4b participa en la guía axonal del sistema habénulo-interpeduncular de pez cebra.

ABSTRACT

Cxcr4b is a chemokine receptor involved in several processes of cell migration and axonal guidance during zebrafish development. In the embryonic central nervous system, *cxcr4b* and its ligands *sdf1a* and *sdf1b* are expressed in different components of the habenular-interpeduncular system, suggesting that chemokine signalling could participate in the establishment of connectivity associated to this neuronal circuit. To address this question, we analyzed neuronal connectivity in the habenular-interpeduncular system of mutant larvae showing *cxcr4b* loss-of-function (*odysseus*^{-/-}). Immunostaining against α -acetylated tubulin and local implantation of lipophilic tracers (DiD, DiA) were performed to reveal the axonal scaffold, which was visualised through confocal microscopy. *odysseus*^{-/-} mutant larvae exhibited defasciculation of the habenular-interpeduncular tract, disorganisation of habenular efferent connectivity within the interpeduncular nucleus, and ectopic axonal projections connecting left and right habenular nuclei. Injection of morpholino antisense oligonucleotides against *sdf1a* in wild type zebrafish and analysis of the *sdf1a* mutant *medusa*^{-/-} revealed a phenocopy of the axonal defects observed in the habenular-interpeduncular tract of *odysseus*^{-/-} mutants. Studies in GFP-transgenic mutants showed that ectopic projections correspond to habenular efferent connectivity exhibiting axonal pathfinding errors. In summary, we conclude that Sdf1a/Cxcr4b signalling participate in axonal guidance of the habenular-interpeduncular system of zebrafish.

INTRODUCCIÓN

El epitálamo es una subdivisión principal del diencefalo que está constituido por la habénula, un núcleo par bilateral, y por el complejo pineal. Los núcleos habenulares izquierdo y derecho presentan asimetrías estructurales en diversos vertebrados en cuanto a diferencias de tamaño, organización neuronal, neuroquímica y conectividad. El complejo pineal está formado por el órgano pineal, localizado en la línea media del diencefalo dorsal, y por el órgano parapineal, una estructura que en algunas especies se localiza a la izquierda de la línea media dorsal y que proyecta axones únicamente hacia la habénula izquierda, el núcleo habenular que desarrolla mayor contenido de neuropila en pez cebra (Concha y cols., 2000; Concha y Wilson, 2001).

Por mecanismos genéticos aún no conocidos, los núcleos habenulares desarrollan una red de conectividad axonal aferente y eferente que comunica regiones del telencefalo basal con el mesencefalo ventral. En este sistema la habénula actúa como una estación de relevo que integra funciones relacionadas al sistema límbico. Estudios en diversas especies de vertebrados adultos han definido los núcleos aferentes y eferentes de la habénula y su alto grado de conservación (Sutherland, 1982). En general, las aferencias habenulares provienen de núcleos del telencefalo mientras que las eferencias que nacen de ambos núcleos habenulares forman los fascículos retroflexos izquierdo y derecho que se extienden hacia el mesencefalo ventral para conectar predominantemente con los núcleos interpeduncular (NIP) y del rafe, formándose así el tracto habénulo-interpeduncular, (H-IP). Estudios en peces cebra muestran que las eferencias de la habénula izquierda y derecha no se distribuyen en forma homogénea ni tampoco presentan una organización bilateral simétrica en el NIP; por el contrario, la habénula izquierda proyecta diferencialmente a la región dorsal mientras que la habénula derecha lo hace a la región ventral del NIP. Esta proyección asimétrica responde a una diferencia izquierda-derecha prominente en la razón de tamaños de los subnúcleos habenulares laterales y mediales que proyectan en forma específica a regiones dorsales o ventrales del NIP, respectivamente (Aizawa y cols., 2005).

Estudios recientes de morfología y conectividad de neuronas individuales de cada núcleo habenular indican que las neuronas de las proyecciones habenulares tienen en común una morfología unipolar estereotipada y forman notables arborizaciones terminales en forma de espiral dentro del NIP, una morfología diferente a cualquier otra clase de neuronas descritas a la fecha (Bianco y cols., 2008). Se describen dos subtipos de arborizaciones terminales que difieren en la morfología de la ramificación y en su localización dentro del NIP. Ambos subtipos son elaborados por las neuronas de los núcleos habenulares izquierdo y derecho, pero con frecuencias muy diferentes: un 83,8% de las neuronas de la habénula izquierda elaboran arborizaciones terminales en forma de cúpula que abarcan extensas regiones dorso-ventrales, mientras que un 90,5% de las neuronas de la habénula derecha elaboran arborizaciones terminales más planas que se extienden en el eje antero-posterior. Estas diferencias dan cuenta de las asimetrías de conectividad más evidentes que muestran la habénula izquierda y derecha.

Los núcleos que dan origen a las aferencias habenulares han sido descritos recientemente en larvas de pez cebra (Hendricks y Jesuthasan, 2007). Las aferencias habenulares corresponden principalmente a axones que provienen de una región del diencéfalo lateral que contiene neuronas de la eminencia talámica. Estas proyecciones neuronales terminan en la neuropila habenular ipsilateral y contralateral y, junto con los axones que derivan de neuronas del tubérculo posterior y palio, cruzan la línea media vía la comisura habenular. Otras aferencias que provienen del telencéfalo dorsal llegan a la habénula lateral a través de la estría medular. Un grupo de neuronas del palio terminan solamente en la habénula derecha medial independiente del lado del cerebro de donde se originan estos axones, y esto lo hacen a través de las comisuras anterior y habenular (Fig. antecedente A1).

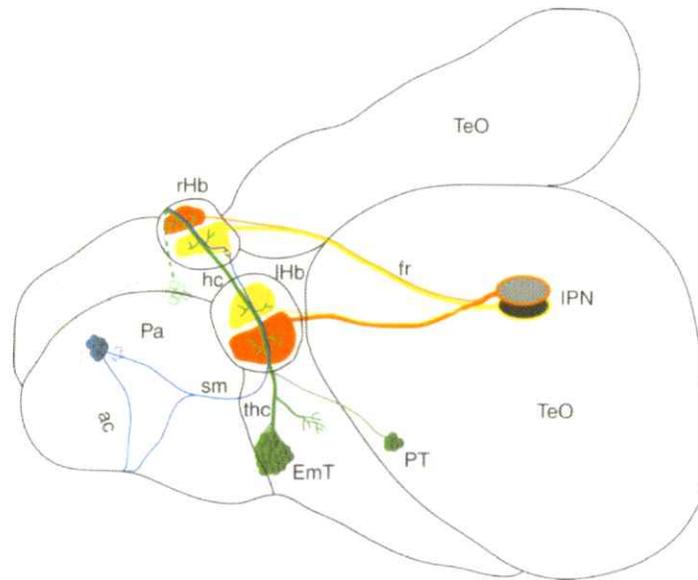


Figura A1. Diagrama esquemático del sistema habenular embrionario (Hendricks y Jesuthasan, 2007). En azul se muestran las aferencias que provienen del palio (Pa) y en verde aquellas de la eminencia talámica (EmT) y tubérculo posterior (PT). Los eferentes habenulares que forman los fascículos retroflexos (fr) se muestran en amarillo y naranja en relación al subnúcleo habenular medial o lateral donde se originan. También se muestra la segregación dorso-ventral en el núcleo interpeduncular (IPN) de los fascículos retroflexos. ac, comisura anterior; IHb, habénula izquierda; rHb, habénula derecha; hc, comisura habenular; sm, estría medular; TeO, tectum óptico; thc, tracto de la comisura habenular.

El establecimiento de este complejo circuito de conexiones neuronales durante el desarrollo embrionario debe involucrar la acción coordinada de múltiples factores, y entre ellos las moléculas de guía axonal juegan un papel importante al proveer la información necesaria para que los conos de crecimiento neuronales se extiendan a lo largo de vías discretas y estereotipadas hasta alcanzar sus núcleos blanco. En el estudio de estos procesos, el pez cebra surge como un modelo que presenta claras ventajas para la determinación de las bases moleculares involucradas en el desarrollo de sistemas de conectividad neuronal del cerebro. Algunos de estos trabajos describen la participación de un miembro de la familia de receptores de moléculas de guía axonal denominado Roundabout 2, ROBO2, y sus ligandos Slit1 y Slit2 en la formación del tracto retino-tectal (Fricke y cols., 2001; Hutson y Chien, 2002), y en el desarrollo del sistema olfatorio (Nguyen-Ba-Charvet y cols., 2002; Miyasaka y cols., 2005). Se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en la formación del circuito H-IP y las posibles

moléculas de guía axonal que participan. Recientemente se publicó un trabajo que indica que neuropilina1a, un receptor de semaforinas clase III, que se expresa únicamente en la habénula izquierda, permite la distribución dorsal en el NIP de las eferencias habenulares (Kuan y cols., 2007). En una revisión inicial en la literatura de genes con posibles funciones en la formación del tracto H-IP de pez cebra, basado en patrones de expresión, se encontró *cxcr4b*, un gen que codifica un receptor de quimioquina y que muestra dominios de expresión en la región epitalámica de los embriones (Chong y cols., 2001). Una posterior hibridación *in situ* muestra que *cxcr4b* se expresa específicamente en los núcleos habenulares en estadio de 2 días post-fertilización (dpf), etapa previa al desarrollo del circuito H-IP.

Quimioquinas y migración celular durante la embriogénesis

Las quimioquinas son pequeñas proteínas de unión a heparina descritas inicialmente como factores que dirigen el movimiento de los leucocitos circulantes a los sitios de inflamación o daño (revisado en Charo y Ransohoff, 2006). Posteriormente, se describió la importancia de las quimioquinas y sus receptores en varios procesos celulares durante el desarrollo del sistema nervioso de ratón (revisado en Tran y Miller, 2003), en particular la participación del receptor *Cxcr4* y su ligando *Sdf1* (factor derivado de célula estromal 1, también conocido como *Cxcl12*) en el desarrollo normal del cerebelo y el giro dentado del hipocampo durante la embriogénesis, realizando funciones quimiotácticas y proliferativas. En los últimos años las quimioquinas han adquirido una importancia relevante por su participación en diversos procesos del desarrollo temprano del pez cebra y la descripción de nuevas funciones para estas moléculas.

En pez cebra se clonaron dos genes relacionados a *Cxcr4* de mamíferos denominados *cxcr4a* y *cxcr4b*, que presentan patrones de expresión mutuamente exclusivos, coexpresión en algunas regiones, y diferencias temporales de expresión en tejidos durante el desarrollo (Chong y cols., 2001). En ese trabajo se postula que *cxcr4a* y *cxcr4b* derivan probablemente del evento de duplicación del genoma que ocurrió

durante la evolución de los teleósteos (Force y cols., 1999), conservando *cxcr4a* la mayor parte de la expresión espacio-temporal de *Cxcr4* de mamífero, como también sus funciones, mientras que *cxcr4b* adquirió algunas funciones nuevas en el desarrollo temprano de pez cebra.

Para el ligando SDF1 se identificaron en pez cebra dos genes denominados *sdf1a* y *sdf1b*, que a nivel de secuencia aminoacídica son 44% idénticos al Sdf1 humano, y 73% idénticos entre ellos (David y cols., 2002). En un estudio posterior se identificaron dos cDNA, *sdf1a* y *sdf1b*, que parecen ser homólogos al *sdf1* humano. Los dos cDNAs, excluyendo las secuencias que codifican el péptido señal, muestran 91% de similitud con Sdf1a, 63% similitud con Sdf1 humano, y 64% de similitud con Sdf1b (Li y cols., 2005). Nuevamente, al igual que los receptores *Cxcr4a* y *Cxcr4b*, la alta homología entre Sdf1a y Sdf1b, y la idéntica homología entre ellos y Sdf1 humano sugiere que Sdf1a y Sdf1b son productos de genes duplicados en pez cebra. Los territorios de expresión de *sdf1a* y *sdf1b* son específicos y dinámicos con poca superposición y al parecer realizan funciones diferentes (Li y cols., 2004).

Las primeras funciones de *cxcr4b* descritas en pez cebra tienen relación con dos procesos fundamentales: migración de las células germinales (Doitsidou y cols., 2002) y migración del primordio de la línea lateral posterior (LLP) (David y cols., 2002). En el primer proceso, las células primordiales germinales se originan en posiciones al azar con respecto al eje del cuerpo. A las 14 horas post fertilización (hpf) estas células se alinean en el mesodermo presomítico para luego migrar caudalmente hacia la futura región gonadal ubicada en la extensión anterior del vitelo. Se vio que embriones mutantes del gen *cxcr4b*, denominado *odysseus*, muestran una migración al azar de las células germinales, fenómeno que también se observa mediante el uso de oligonucleótidos morfolidos antisentido para *sdf1a* que bloquean la función del ligando de *Cxcr4b* (Knaut y cols., 2003). Las células germinales en migración expresan *cxcr4b* mientras que *sdf1a*, el gen homólogo a *Sdf1* de ratón clonado en pez cebra, se expresa en las regiones hacia donde migran estas células, es decir, el borde del mesodermo del tronco, durante la somitogénesis, y en la región gonadal (Doitsidou y cols., 2002, Fig. A2).

El segundo proceso tiene relación con la formación de la LLP, el sistema mecanosensorial de los peces. Este sistema está compuesto de 7-8 órganos sensoriales llamados neuromastos que están alineados lateralmente desde la cabeza a la punta de la cola por ambos lados del pez. Estos se forman a partir de un primordio originado en la placoda cefálica que migra hasta la punta de la cola a lo largo de una vía estereotipada depositando en su camino grupos de células que llegan a formar los neuromastos. Durante este proceso, *sdf1a* se expresa en la vía de migración del primordio, el miosepto horizontal, mientras que *cxr4b* se expresa en las células en migración del primordio de la LLP (Fig. A3). Cuando se inactiva el ligando o su receptor mediante morfolinis antisentido se bloquea la migración del primordio de la LLP (David y cols., 2002), resultado que también se observa en los embriones mutantes de *cxr4b*, *odysseus* (Li y cols., 2004).

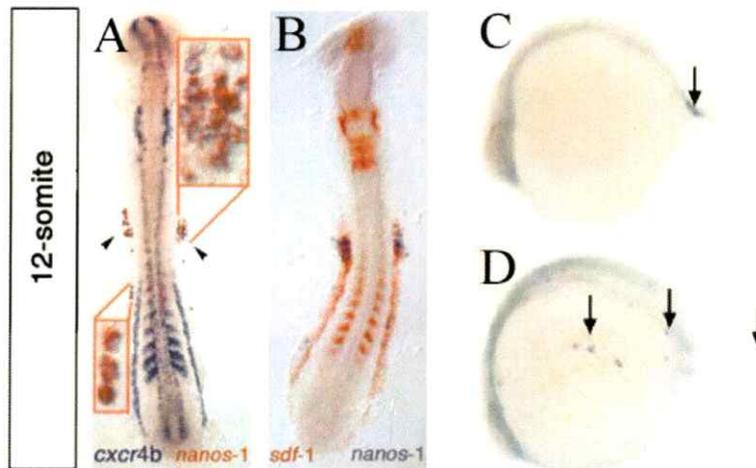


Figura A2. Migración de células germinales. En **A** se muestra la expresión de *cxr4b* en las células germinales que expresan el marcador molecular Nanos-1, y en **B** la expresión de *sdf1a* en la región gonadal (modificado de Doitsidou y cols., 2002). En **C** la flecha señala la posición de las células germinales que expresan *cxr4b* en la región gonadal de un embrión normal, y en **D** la localización ectópica de estas células en mutantes *odysseus* (modificado de Knaut y cols., 2003).

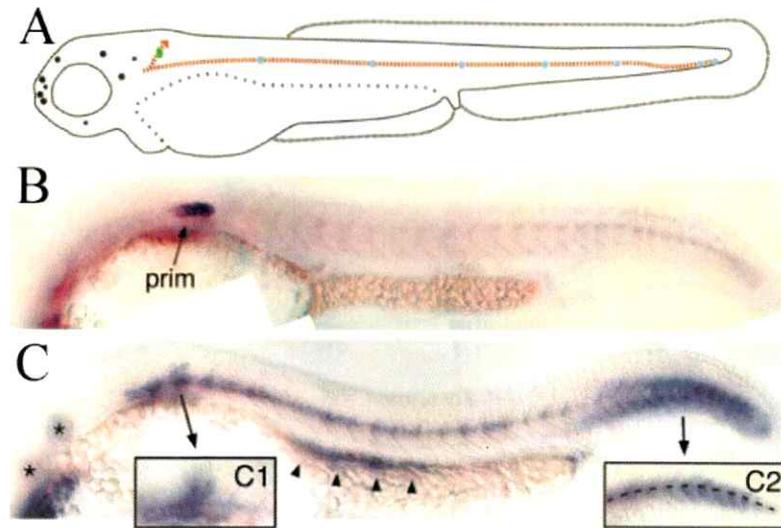


Figura A3. Migración del primordio de la LLP. **A**, en un embrión de 2 dpf los neuromastos de la LLP (puntos azules) son depositados por un primordio que migra a lo largo de un paso estereotipado (línea roja). **B**, a las 24 hpf *cxcr4b* se expresa en el primordio en migración. **C**, al mismo tiempo *sdf1a* se expresa en una banda de células que marcan el camino que seguirá el primordio (David y cols., 2002).

Funciones específicas de Cxcr4a, el otro receptor de quimioquinas identificado inicialmente en pez cebra, se han descrito recientemente. Durante el proceso de gastrulación las células del mesodermo que expresan *sdf1a* y *sdf1b* controlan el movimiento de las células endodermales que expresan *cxcr4a*. Ambos ligandos actuarían como quimioattractantes durante la migración direccional de las células endodermales activando el receptor Cxcr4a, aunque al parecer en esta propiedad Sdf1b tiene un mayor efecto que Sdf1a (Mizoguchi y cols., 2008).

Quimioquinas y procesos de guía axonal

Durante la embriogénesis del cerebro de pez cebra se encontró que Sdf1a y su receptor Cxcr4b cumplen funciones de guía axonal que permiten que los axones de las células ganglionares de la retina (CGR) se dirijan hacia el punto de salida en dirección al tallo óptico. Durante este proceso *cxcr4b* se expresa en la capa de CGR de la retina y *sdf1a* en el tallo óptico adyacente a la retina. Cuando se bloquea la función de *cxcr4b* o

sdfla se producen proyecciones anormales de los axones retinales dentro del ojo, y en algunos casos no se forma el nervio óptico. Estos errores de guía axonal también se observan en los mutantes *odysseus* (Li y cols., 2005, Fig. A4 y A5).

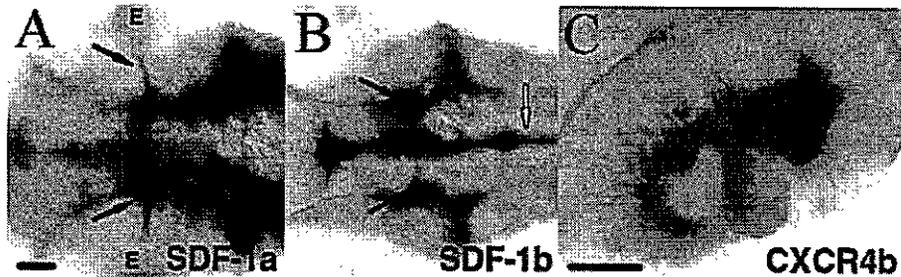


Figura A4. Hibridación in situ de *sdfla*, *sdflb* y *cxcr4b* en embriones de 48 hpf. **A**, vista ventral de la expresión de *sdfla* en el tallo óptico adyacente a la retina (flechas). **B**, expresión de *sdflb* en tallo óptico más distante del ojo (flechas negras) y en la placa del piso del mesencéfalo (flecha blanca). **C**, expresión de *cxcr4b* en la capa de células ganglionares de la retina. E señala el ojo (Li y cols., 2005).

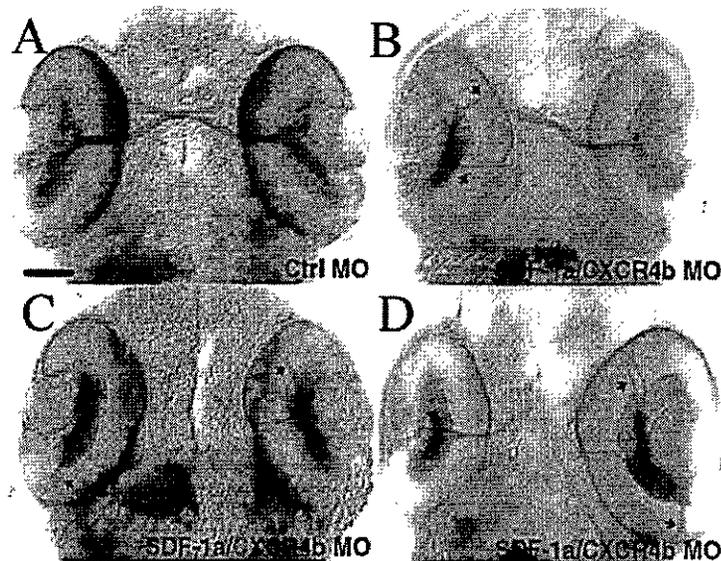


Figura A5. Errores en la guía de los axones retinales al reducirse la señalización Sdf1a/Cxcr4b por bloqueos con morfolidos. Las fotos son vistas ventrales de embriones de 48 hpf marcados con MAb Zn5 que tiñe los cuerpos neuronales y los axones retinales. **A**, marcación del nervio óptico y células ganglionares de la retina en embrión inyectado con morfolido control. **B-D**, proyecciones aberrantes (flechas) en embriones inyectados con morfolidos contra *sdfla* y *cxcr4b*. En algunos casos no se forma el nervio óptico y los axones retinales quedan dentro del ojo (Li y cols., 2005).

Recientemente se determinó que la vía de señalización Sdf1a/Cxcr4b está involucrada en dos procesos del desarrollo que conducen a la formación del sistema olfatorio de pez cebra: primero en el ensamble de la placoda olfatoria y subsecuentemente en la guía de los axones de las neuronas sensoriales olfatorias (NSO) hacia el bulbo olfatorio presuntivo. Durante el primer proceso *cxcr4b* se expresa en los precursores placodales olfatorios en migración y *sdf1a* en la placa neural anterior contigua. Luego, la expresión de *cxcr4b* persiste en la placoda olfatoria en las fases iniciales de la guía axonal de las NSO, mientras que *sdf1a* se expresa a lo largo del borde placoda-telencéfalo y en la punta anterior del telencéfalo, marcando la ruta y el blanco de los axones de las NSO, respectivamente. Cuando se interfiere la vía de señalización Sdf1a/Cxcr4b mediante morfolinosis se perturba el ensamble de la placoda olfatoria, mientras que en los mutantes *odysseus* se puede observar además que los axones de las NSO no salen de la placoda y se acumulan cerca del borde placoda-telencéfalo (Miyasaka y cols., 2007, Fig.A6 y A7).

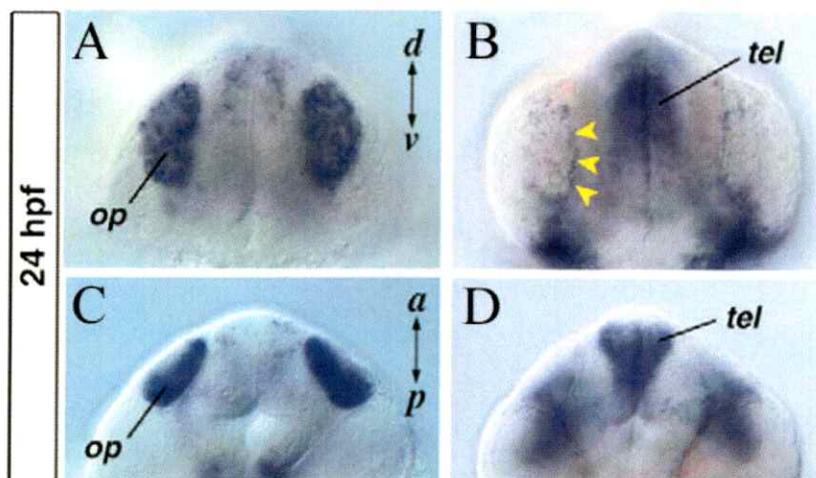


Figura A6. Patrones de expresión de *cxcr4b* en la placoda olfatoria (A, C) y *sdf1a* en el borde placoda-telencéfalo (cabezas de flecha) y en el borde anterior del telencéfalo, tel, (B, D) en etapas iniciales de la guía de los axones de las neuronas sensoriales olfatorias. Vista dorso-ventral (d-v) en A, B, y antero-posterior (a-p) en C, D. (modificado de Miyasaka y cols., 2007).

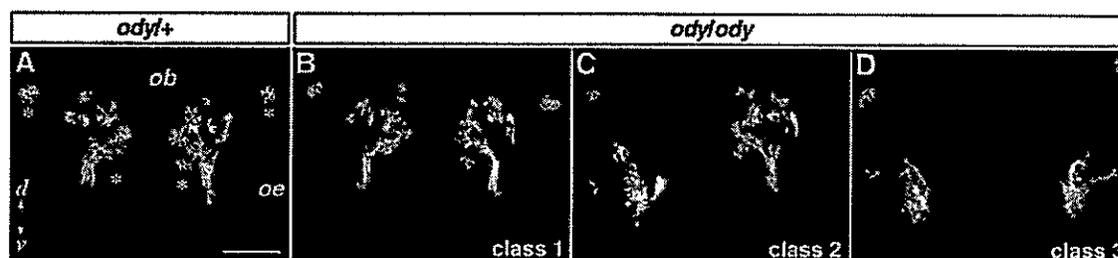


Figura A7. Defectos en las proyecciones axonales de las neuronas sensoriales olfatorias en mutantes *odysseus*. A-D muestra las trayectorias axonales por inmunotinción anti-PCAM. Los mutantes se clasifican de acuerdo a la severidad de los defectos de guía axonal. B-D, clase 1 tiene un patrón normal; clase 2, defectos unilaterales; clase 3, defectos bilaterales. ob, bulbo olfatorio; oe, epitelio olfatorio; d, dorsal; v, ventral (Miyasaka y cols., 2007).

En resumen, las funciones del receptor de quimioquinas *Cxcr4b* descritas en pez cebra involucran procesos de migración celular y guía axonal con la participación de *Sdf1a* como ligando para este receptor. Considerando estos antecedentes y en base a la expresión localizada de *cxcr4b* en los núcleos habenules en etapas previas a la formación del tracto H-IP proponemos como hipótesis de trabajo que este receptor de quimioquinas y sus posibles ligandos participan en establecer el patrón de conectividad asociado al circuito de conexiones telencéfalo-habénulo-interpeduncular (T-H-IP) durante el desarrollo embrionario de pez cebra. El objetivo general de este trabajo es, por lo tanto, investigar el papel que cumplen las quimioquinas en el establecimiento del patrón de conectividad del circuito de conexiones aferentes y eferentes relacionados a la habénula en pez cebra.

HIPÓTESIS

El receptor de quimioquinas *Cxcr4b* y sus posibles ligandos *Sdf1a* y *Sdf1b* participan en el establecimiento del patrón de conectividad asociado al circuito de conexiones telencéfalo-habénulo-interpeduncular (T-H-IP) durante el desarrollo embrionario de pez cebra.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el papel que cumplen las quimioquinas en el establecimiento del patrón de conectividad del circuito de conexiones aferentes y eferentes relacionados a la habénula en pez cebra.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el patrón de expresión de las quimioquinas *sdf1a* y *sdf1b* y de sus receptores *cxcr4a* y *cxcr4b* en componentes del circuito T-H-IP.
2. Analizar la formación del circuito T-H-IP tras la pérdida de función del receptor de quimioquina *Cxcr4b* en mutantes *odysseus*.
3. Estudiar los efectos del bloqueo de la función de ligandos *Sdf1a* y *Sdf1b* en la formación del circuito T-H-IP.
4. Investigar el origen de posibles alteraciones de conectividad en el tracto T-H-IP en mutantes *odysseus* GFP-transgénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas de peces

Peces cebra (*Danio rerio*) silvestres del tipo Tuebingen, y las líneas transgénicas que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) en el complejo pineal *foxD3:gfp* (Gilmour y cols., 2002), *flh:gfp* (Gamse y cols., 2003) ó en el tracto habénulo-interpeduncular *brn3a:gfp* (Aizawa y cols., 2007) y *ET16:gfp* (Bianco y cols., 2008).

Líneas de peces mutantes de *cxcr4b* (*odysseus*) identificados inicialmente en screening de mutantes con migración incorrecta de las células germinales (Knaut y cols., 2003) y mutantes de *sdf1a* (*medusa*) determinado en screening a gran escala de reguladores de la morfogénesis de la línea lateral posterior (Valentin y cols., 2007).

Los embriones y larvas se obtienen por cruces de peces y se crecen a 28 °C en medio embrionario estandar E3 (5 mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,33 mM CaCl₂•2H₂O; 0,33 mM MgSO₄•7H₂O). Los estadios se determinan de acuerdo a las horas post fertilización (hpf) (Kimmel y cols., 1995).

Los peces utilizados en esta tesis se desarrollaron y mantuvieron en el acuario del Laboratorio de Estudios Ontogénicos de la Universidad de Chile.

Identificación de mutantes *odysseus*

Larvas de 4-5 dpf se transfirieron a una solución de 1X de DASPEI (2-(4-(dimetilamino)estiril)-*N*-etilpiridinio yoduro, Molecular Probes D-426, stock 100X de 40mg/ml) en medio E3 por 20 min, para luego realizar tres lavados con E3. Las larvas se anestesiaron en tricaina para observar en lupa de fluorescencia los neuromastos marcados.

Embriones *odysseus* se identificaron mediante la microinyección del constructo *vasa* 3'UTR-GFP (Knaut y cols., 2002) ó de *nanos* 3'UTR-GFP (Köprunner y cols., 2001) en embriones en estadio de una célula para luego de 32-36 hpf observar en lupa de fluorescencia la expresión *in vivo* de GFP en las células germinales.

Fijación

Para las hibridaciones *in situ* los embriones y larvas se decorionaron mecánicamente y se fijaron en 4% de paraformaldehído (PFA) en buffer fosfato salino (PBS) (10 mM Na₂HPO₄, 1,75 mM KH₂ PO₄, 13,7 mM NaCl, and 2,65 mM KCl) a 4°C toda la noche, para luego ser almacenados en metanol (Merk) a -20°C.

En ensayos de inmunofluorescencia indirecta las larvas se fijaron en ácido tricloroacético (TCA) al 2% por 3 hrs. a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron y almacenaron en PBS con tritón X-100 al 0,5% a 4 °C hasta su uso.

Hibridación *in situ* de embrión completo

Se generaron sondas de RNA antisentido para detectar la expresión de los genes para los receptores de quimioquinas *cxcr4a*, *cxcr4b* (Chong y cols., 2001); las quimioquinas ligandos *sdf1a* y *sdf1b* (David y cols., 2002); marcadores moleculares de la región presuntiva habenular *fgf8*, *neuropilina* (Kim y cols., 1997), genes habenulares de expresión simétrica *f-spondin* (Higashijima y cols., 1997) y *cpd2* (Gamse y cols., 2003), y genes habenulares de expresión asimétrica *leftover* y *dexter* (Gamse y cols., 2005).

La transcripción *in vitro* de las sondas se realizó utilizando como templado DNA linearizado mediante digestión con enzimas de restricción de plasmidios disponibles en el laboratorio. La transcripción *in vitro* se realizó a 37°C por 2 hrs. con la RNA polimerasa correspondiente y UTP-digoxigenina. La sonda marcada con digoxigenina se purificó en microcolumnas, eluyendo con H₂O nanopura, y almacenando en formamida 50% v/v a -20°C.

La hibridación *in situ* se realizó de acuerdo a protocolos estándar para pez cebra (Westerfield, 2000). Los embriones se permeabilizaron con proteinasa K (10 µg/ml) y la hibridación con la sonda se realizó a 65 °C toda la noche. Se usó BM-Purple (Roche) como sustrato para la reacción de color de la fosfatasa alcalina.

Los embriones se montaron en glicerol y se fotografiaron en un Nikon Eclipse 80i con objetivo 20X.

Reactivos de transcripción *in vitro* e hibridación *in situ*.

Microcolumnas Probe Quant G-50	-- Amersham Bioscience	(cat nº 275335)
DIG-RNA Labeling Mix	-- Roche	(cat nº 11277073910)
Proteinasa K	-- Sigma	(cat nº P6556)
Reactivo de Bloqueo	-- Roche	(cat nº 11096176001)
Anticuerpo Anti-Dig-AP	-- Roche	(cat nº 11093274910)
substrato AP, BMP Purple	-- Roche	(cat nº 11442074001)

Soluciones de hybridación *in situ*.

PBT:	1x PBS; 0,1% Tween-20; pH 7,5
HYB- :	50% Formamida; 5xSSC 0,1%Tween-20; pH 6.0
HYB+ :	HYB-, 5 mg/mL RNA de tórula (levadura), 50 µg/mL de Heparina
SCC:	150 mM NaCl , 15 mM citrato de sodio, pH 7
MAB:	100 mM ácido málico; 150 mM NaCl; pH 7,5
BCL:	0,1 M TrisCl-pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂ ; 0,1% Tween-20

Inmunotinción e inmunofluorescencia indirecta de larvas completas

Las inmunotinciones se realizaron como se describe en Concha y cols., 2003. Las larvas fijadas en TCA se permeabilizaron en una solución de tripsina 0,25% en PBS por 8-10 min. en hielo, lavando luego en PBS con 0,5% tritón X-100 frío. Se hizo un bloqueo con solución IB (10% suero de cabra en PBS, 0,5% tritón X-100, 1% DMSO) por 2 hrs. para luego incubar con anticuerpo primario (dilución 1:1000) toda la noche. Al siguiente día se hicieron lavados y se bloqueó nuevamente con IB para incubar con el anticuerpo secundario (dilución 1:200) toda la noche. Para la inmunofluorescencia simple se incubó ya sea con anticuerpos primarios anti-GFP de conejo (policlonal, ABcam) o anti α -tubulina acetilada de ratón (monoclonal, Sigma) y con ambos simultáneamente en el caso de inmunofluorescencia doble, para luego incubar con los

anticuerpos secundarios alexa 488 anti-conejo IgG y alexa 647 anti-ratón IgG (Molecular Probes). La cabeza de las larvas se montan en agarosa 1% en PBS para su observación por microscopía confocal.

En el caso de las inmunotinciones los anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo están conjugados con peroxidasa de rabanito (HRP) y se reveló con solución de diaminobenzidina (DAB, Sigma D5637; alícuota de 25 mg/500 μ l dH₂O disuelta en 30 ml de PBS) incubando por 15-20 min e iniciando la reacción de color con 1 μ l de peróxido de hidrógeno al 3%. La reacción se detiene lavando con PBS y fijando con 4% PFA/PBS por 1 hr. a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C. Debido a la fragilidad mostrada por las larvas *odysseus* con este tratamiento generalmente las cabezas de estas larvas se montan en PBS usando cámaras hechas con porta y cubreobjetos para la toma de fotografías.

Marcación de proyecciones eferentes habenulares

El análisis de la conectividad eferente habenular a nivel del núcleo interpeduncular (NIP) se realizó marcando diferencialmente con trazadores de carbocianina lipofílicos. Larvas previamente fijadas en 4% PFA/PBS por 2 días se traspararon a una solución de 0,5% PFA/PBS para luego proceder a retirar los ojos y la piel que cubre el cerebro manualmente y exponer así los núcleos habenulares para su marcación. Para ello se recogieron cristales de los trazadores depositados sobre un portaobjeto por evaporación del solvente (cloroformo, etanol) mediante una aguja de tungsteno que luego se conecta a un micromanipulador (Aizawa y cols., 2005). DiD (dioctadecil tetrametilindodicarbocianina perclorato) se usó para el núcleo habenular izquierdo y DiA (dihexadecilamino estiril-N-metilpiridinio yoduro) o DiO (dioctadeciloxacarbocianina perclorato) para el núcleo derecho. Los cerebros marcados se mantuvieron en 0,5% PFA/PBS por un día a 4°C para permitir que los trazadores alcancen el NIP por difusión del trazador a través de los fascículos retroflexos. Los diferentes espectros de emisión de estos trazadores permitieron distinguir en el NIP las proyecciones que provienen de cada núcleo habenular por microscopía confocal.

Foto-conversión de DiI

Esta técnica ha sido descrita inicialmente por Steven Wilson (Westerfield, 2000). Cerebros de larvas fijadas en 4% PFA/PBS se preparan como se mencionó en el punto anterior, marcándose uno de los núcleos habenules con cristales del trazador lipofílico DiI (dioctadecil tetrametilindodicarbocianina perclorato). Luego de la difusión del trazador por un día a 4°C los cerebros se colocaron en una gota de DAB, en la concentración usada en las inmunotinciones, dentro una cámara hecha con porta y cubreobjeto. Bajo microscopio de fluorescencia se seleccionó el filtro de excitación para DiI y se hizo incidir sobre el cerebro sumergido en DAB usando objetivo 20X. Luego de 15-20 min, la fluorescencia del DiI decae apareciendo un precipitado café en las proyecciones marcadas con DiI. Los cerebros marcados se lavaron y se conservaron en PBS para ser fotografiados en microscopio Nikon Eclipse 80i con objetivo 20X.

Trazadores fluorescentes (Molecular Probes)

DiA verde, 456/590	(cat n° D3883)
DiO verde, 488/510	(cat n° D275)
DiD rojo, 644/665	(cat n° D307)
DiI rojo, 549/565	(cat n° D282)

Morfolinos

Se inyectaron oligonucleótidos antisentido de tipo morfolinos para *sdf1a* (5'-CTACTACGATCACTTTGAGATCCAT-3' (Doitsidou y cols., 2002) (Minina y cols., 2007) y *sdf1b* (5' – TTGCTATCCATGCCAAGAGCGAGTG - 3') en embriones en estadio de una célula. El volumen de inyección fue de 0,5 nl de morfolinos disueltos en Danieau 1X en concentraciones de 1 mM y 1,5 mM.

Adquisición de imágenes, procesamiento y reconstrucción en 3 dimensiones

Las muestras fluorescentes fueron observadas en microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal, o en UltraView RS spinning disk (Perkin Elmer) usando un objetivo de inmersión Achromat 40x/0.8 W o un objetivo Plan-Apochromat 40x/1.2 W. Algunas

imágenes fueron deconvolucionadas usando el software Huygens Professional and Scripting Deconvolution (SVI). Proyecciones de las imágenes en 3 dimensiones se obtuvieron mediante reconstrucciones usando el software Volocity (Improvision).

Microscopia y equipo de fotografía digital

Microscopio de zoom estereoscópico Nikon SMZ645.

Microscopio de zoom estereoscópico Nikon SMZ1500 con epi-fluorescencia

Microscopio Nikon Eclipse 80i DIC-Nomarski

Cámara digital Nikon Coolpix 4500

Microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal

Microscopio Perkin Helmer Ultraview RS Spinning disk

RESULTADOS

1. Las quimioquinas *sdf1a* y *sdf1b* y su receptor *cxcr4b* se expresan en componentes del circuito T-H-IP

Con el fin de determinar si los receptores de quimioquinas *cxcr4a* y *cxcr4b* se expresan en componentes del circuito T-H-IP, realizamos un análisis de los patrones de expresión mediante hibridación *in situ* en embriones de 2 dpf, previo al desarrollo de la conectividad eferente habenular. En este estadio observamos que las regiones del cerebro que expresan *cxcr4a* son principalmente vasculatura ocular y vasos en el límite del cerebro medio y posterior (Fig.1A), quedando excluido este receptor del sistema T-H-IP. Por su parte, observamos que *cxcr4b* se expresa en regiones discretas del cerebro: fuertemente en ambos núcleos habenulares, en una extensión que muestra el mayor tamaño de la habénula izquierda con respecto a la derecha; en el telencéfalo anterior, donde se forma la placoda olfatoria, y en las células ganglionares de la retina. Estas dos últimas regiones de expresión de *cxcr4b* ya han sido descritas previamente (Miyasaka y cols., 2007; Li y cols., 2005) (Fig.1C). De esta manera definimos la expresión de *cxcr4b* en los núcleos habenulares quedando como único receptor de quimioquina candidato con posibles funciones en el establecimiento del circuito T-H-IP.

En los procesos de migración del primordio de la LLP (David y cols., 2002) y ensamble de la placoda olfatoria (Miyasaka y cols., 2007), la quimioquina *Sdf1a* es el ligando que activa la vía de señalización a través del receptor *Cxcr4b*, mientras que el ligando *Sdf1b* no participa en estos procesos. Por otro lado, en la guía axonal de las células ganglionares de la retina, se ha visto que ambos ligandos podrían activar el receptor *Cxcr4b*, lo que estaría de acuerdo con los patrones de expresión de *sdf1a* y *sdf1b* descritos en el tallo óptico (Li y cols., 2005). En nuestro análisis de hibridación *in situ* hemos visto la expresión de *sdf1a* en regiones discretas del epítalamo y borde anterior del telencéfalo, y en regiones laterales del mesencéfalo ventral en larvas de 2 dpf (Fig.1E-F y 4A). Los dominios de expresión de *sdf1a* en el epítalamo corresponden a los bordes posteriores de los núcleos habenulares, región que abarca los puntos de salida de las eferencias habenulares, o fascículos retroflexos, en dirección al NIP. *sdf1b*

se expresa en la placa del piso del cerebro medio y posterior (Fig.1G-H y 4B), es decir, en regiones presuntivas del mesencéfalo ventral donde se forma el NIP. Este ligando también se expresa en el epítalamo, pero a diferencia de *sdf1a*, sus dominios de expresión corresponden a los bordes anteriores y laterales de los núcleos habenulares abarcando los puntos de entrada de las aferencias habenulares que llegan a través de la estría medular. En base a estos patrones de expresión, ambas quimioquinas, *Sdf1a* y *Sdf1b*, podrían interactuar con el receptor *Cxcr4b* presente en la habénula, ya sea dirigiendo la salida de las eferencias habenulares o la entrada de las aferencias hacia este núcleo, respectivamente.

Por su parte la expresión de *sdf1b* en la región del mesencéfalo ventral podría indicar posibles funciones de este factor en la entrada de las eferencias habenulares hacia el NIP. La ausencia de marcadores morfológicos que señalen la ubicación del NIP dentro del mesencéfalo ventral no permite establecer con exactitud la expresión de *sdf1b* dentro de este núcleo. Para resolver esto utilizamos la línea de peces transgénicos ET16:*gfp* (Bianco y cols., 2008), que tiene como característica principal la expresión de GFP en componentes del tracto habénulo-interpeduncular (H-IP), específicamente en los núcleos habenulares, los fascículos retroflexos y el NIP.

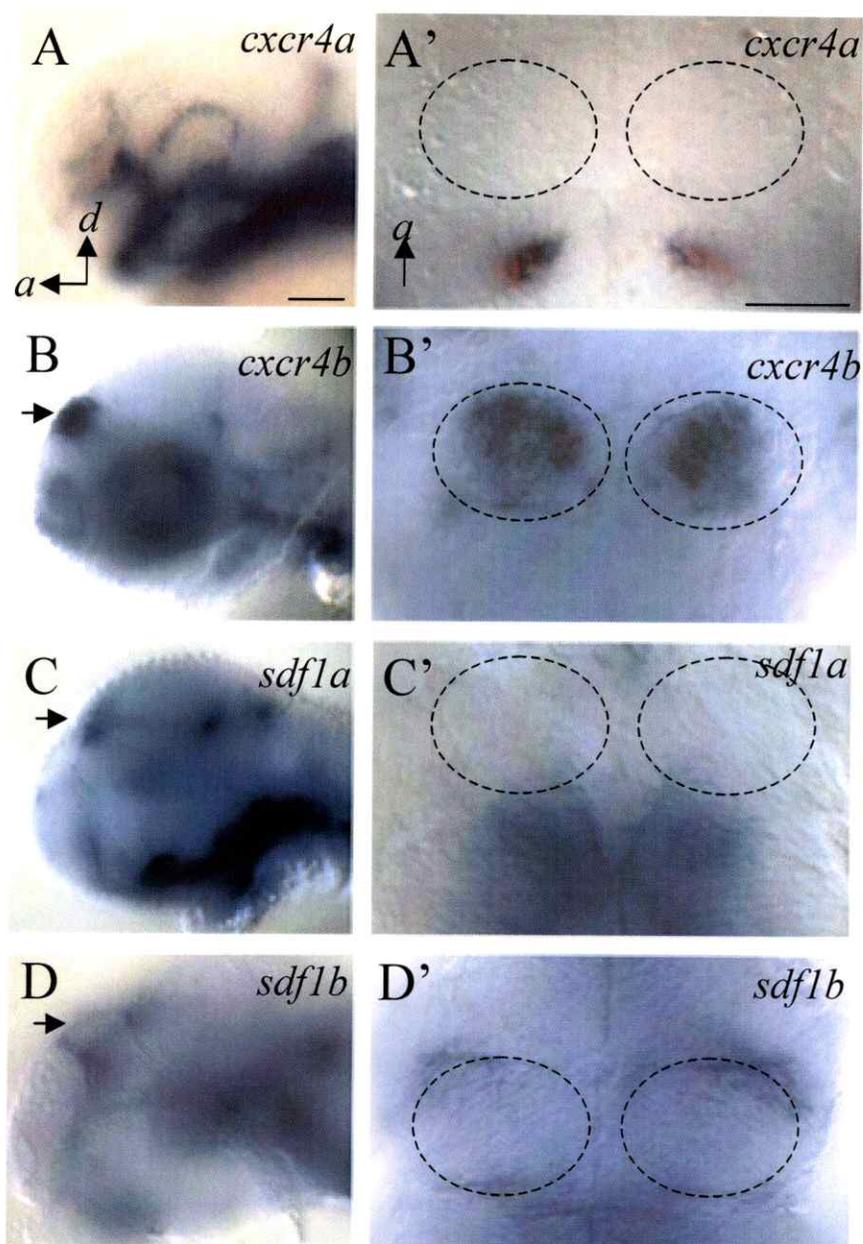


Figura 1. Patrones de expresión de quimioquinas *sdf1a* y *sdf1b*, y de sus receptores *cxcr4a* y *cxcr4b* en embriones de 2 dpf. **A-D**, vistas laterales de la cabeza de los embriones. La flecha indica la posición de la habénula izquierda. **A'-D'**, vistas dorsales de la cabeza. Los círculos de línea segmentada demarcan la región de los núcleos habenulares izquierdo y derecho. a, anterior; d, dorsal. Barra: 100 μm (A-D), 50 μm (A'-D').

1.1. Localización del NIP

La expresión de GFP en el tracto H-IP de peces ET16:*gfp* y en particular en el NIP se puede observar por fluorescencia *in vivo* del GFP durante el desarrollo embrionario de los peces transgénicos, o por inmunotinciones con anticuerpos anti-GFP en embriones fijados. GFP comienza a expresarse primero en los núcleos habenules alrededor de las 42 hpf, mientras que en el NIP su expresión se observa alrededor de las 72 hpf (Fig.2). Esta ventana temporal define el período de formación del circuito H-IP considerado en los siguientes estudios de expresión de *sdf1a* y *sdf1b* durante el desarrollo.

A las 72 hpf el NIP marcado con GFP se observa como un anillo localizado en la línea media ventral del mesencéfalo, equidistante a dos estructuras con alta expresión de GFP alineados en el eje izquierda-derecha y que se ubican lateralmente al NIP. Se encontró que estas estructuras GFP positivas están presentes desde estadios previos a la formación del NIP, lo que permite usarlos como regiones guía que señalan la posición presuntiva del NIP dentro del mesencéfalo ventral antes de que éste se forme. Definimos también algunas líneas guía que sirven como coordenadas para determinar la posición que ocupa el NIP dentro del cerebro de pez cebra. El NIP se localiza en el punto de intersección de la línea media, o eje antero-posterior, con una línea del eje izquierda-derecha que conecta los bordes posteriores de ambos ojos, a nivel del plano ventral del cerebro, y que es equivalente a la línea del eje izquierda-derecha que marca el máximo ancho del cerebro en la región del tectum óptico (Fig.2). A los 5 dpf la expresión de GFP en el tracto H-IP se hace más intensa en todos los componentes de este circuito, manteniéndose el NIP en una posición aproximadamente invariable con respecto a las coordenadas definidas para su localización (Fig.3).

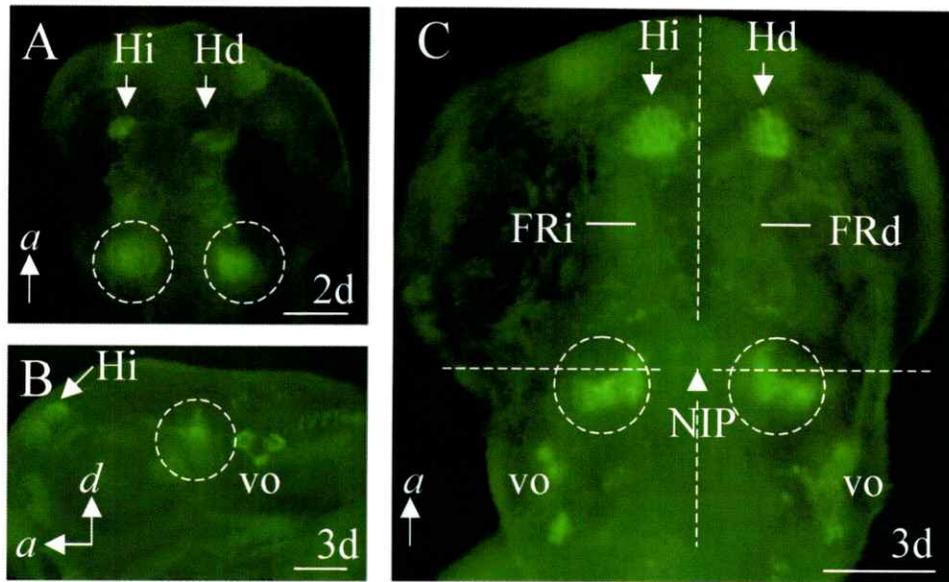


Figura 2. Fluorescencia *in vivo* de GFP de peces ET16:*gfp* observado en lupa de fluorescencia. **A**, localización de GFP en los núcleos habenulares izquierdo (Hi) y derecho (Hd) a los 2 dpf (flechas). Los dominios de expresión de GFP encerrados en círculos de línea segmentada sirven como puntos de referencia para localizar el NIP entre estas regiones en etapas previas a su formación. **B**, los dominios laterales de expresión de GFP ocupan una región dorso-ventral cercana a la posición del NIP que está adyacente al borde posterior del ojo. **C**, a los 3 dpf se observa el NIP en forma de anillo indicado por la cabeza de flecha. Las regiones GFP positivas que sirven como referencia se ubican laterales y equidistantes al NIP. La posición del NIP corresponde a la intersección de una línea que conecta los bordes posteriores de los ojos con la línea media ventral del cerebro. Se pueden observar también los fascículos retroflexos izquierdo (FRi) y derecho (FRd) marcados con GFP aunque con una baja intensidad de fluorescencia y la vesícula óptica (vo). **A** y **C** son vistas dorsales con anterior (a) hacia arriba. **B**, es una visión lateral con anterior a la derecha y dorsal (d) hacia arriba. Barra: 100 μ m.

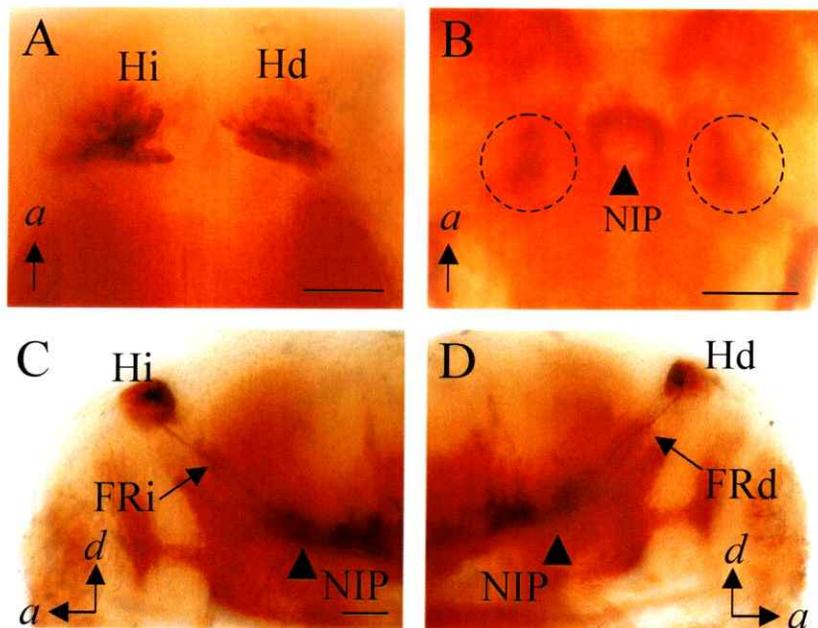


Figura 3. Inmunotinción de GFP en peces ET16:*gfp* de 5 dpf. **A**, vista dorsal que muestra los núcleos habenulares izquierdo (Hi) y derecho (Hd) marcados fuertemente con GFP. **B**, vista ventral del NIP (cabeza de flecha) localizado entre las regiones laterales con dominios de GFP (círculos de línea segmentada). **C, D**, vistas laterales izquierda (C) y derecha (D) que muestran los fascículos retroflexos respectivos (FRi, FRd) marcados con GFP. La posición del NIP es indicado por la cabeza de flecha. Barra: 50 μ m.

1.2 *sdf1b* se expresa en la región del NIP

Utilizando los marcadores de posición del NIP descritos anteriormente se comparó los dominios de expresión de *sdf1b* en el mesencéfalo ventral marcado por hibridación *in situ*, con la posición del NIP marcado por inmunotinción contra GFP usando larvas ET16:*gfp* de estadios equivalentes y obtenidas de un mismo cruce.

A las 48 hpf la expresión de *sdf1b* se localiza en dominios definidos dentro de la línea media ventral del mesencéfalo, abarcando la región donde se forma posteriormente el NIP (Fig.4). A las 60 hpf la expresión de *sdf1b* comienza a extenderse hacia regiones anteriores y dorsales del mesencéfalo que incluyen las zonas por donde llegan las eferencias habenulares hacia el NIP (Fig.5B). A las 72 hpf la expresión de *sdf1b* se extiende aun más hacia regiones dorsales en forma difusa, pero más intensamente en las regiones cercanas a los núcleos habenulares por donde pasan los fascículos retroflexos (Fig.5C). De esta manera la expresión de *sdf1b* en los núcleos blanco de las eferencias habenulares en etapas previas y durante el establecimiento inicial del circuito H-IP, indicaría que posiblemente Sdf1b actúa como una fuente de señales atractantes para los axones de los fascículos retroflexos que conectan con el NIP.

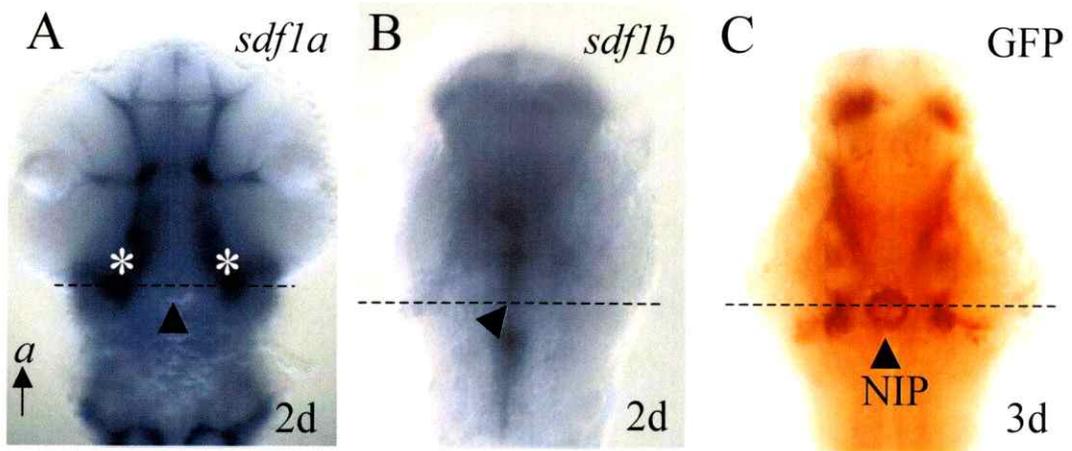


Figura 4. Localización de la expresión de *sdf1b* en la región del NIP. Vistas ventrales de la hibridación *in situ* de *sdf1a* (A) y *sdf1b* (B) en cerebros de 2 dpf, y de la inmunotinción contra GFP en 3 dpf (C). La localización del NIP (cabeza de flecha) se determina de acuerdo a la línea guía segmentada que conecta los bordes posteriores de los ojos o la línea que marca la región más ancha del tecto óptico. La expresión de *sdf1a* en regiones laterales del mesencéfalo ventral se indica con asteriscos. En B y C se extraen los ojos para facilitar la observación de la marca ventral.

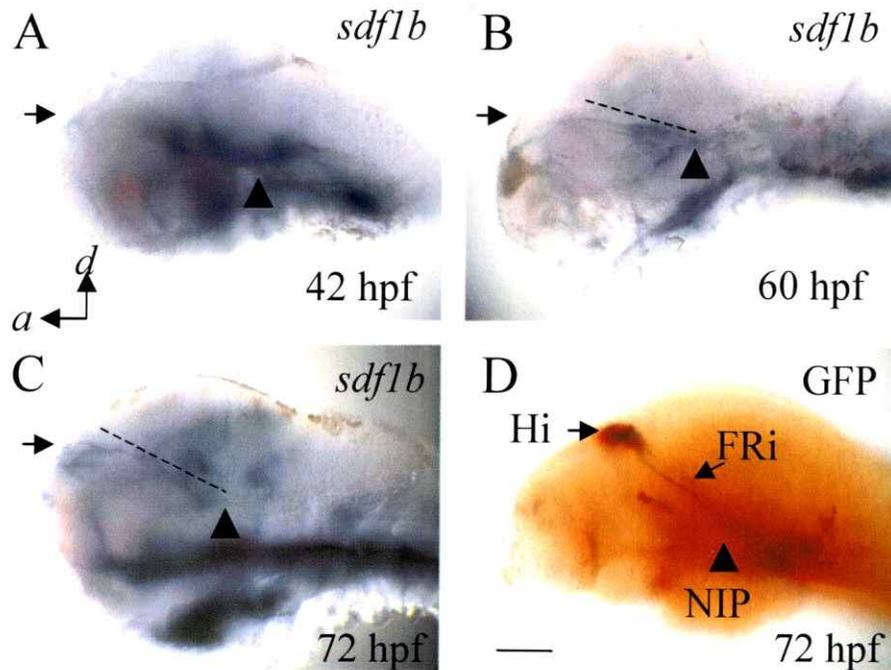


Figura 5. Localización de la expresión de *sdf1b* en NIP y regiones donde pasan los fascículos retroflexos definidos por la expresión de GFP en el tracto H-IP de peces ET16:*gfp*. Todos los paneles son vistas laterales izquierda de la cabeza de peces de 42, 60 y 72 hpf. La línea segmentada en B y C señala la expresión de *sdf1b* en dirección a la habénula (flecha) equivalente a la orientación del fascículo retroflexo izquierdo. La región del NIP en A (cabeza de flecha) está dentro del dominio de expresión ventral de *sdf1b*. Barra: 100 μ m.

1.3 *sdf1a* está ausente de la región del NIP

Como observamos anteriormente, *sdf1a* se expresa principalmente en regiones laterales del mesencéfalo ventral y no en la región medial donde se localiza el NIP. De todas maneras revisamos la expresión de *sdf1a* en la región del NIP realizando una doble tinción en peces ET16:*gfp*, mediante hibridación *in situ* para *sdf1a* primero, seguido por una inmunotinción contra GFP. A los 2 dpf la expresión de *sdf1a* se localiza en posiciones laterales y posteriores del mesencéfalo ventral, no observando su expresión en la línea media ventral donde se forma el NIP. A los 3 dpf *sdf1a* se localiza en forma difusa alrededor del NIP y es muy poca la expresión dentro del NIP como puede observarse en la Fig.6. Esto indica que probablemente Sdf1a no participa en los eventos de conectividad que permiten la entrada de eferentes habenulares al NIP, aunque tampoco se puede descartar que este ligando cumpla funciones posteriores en el mantenimiento de la conectividad del circuito H-IP en esta región.

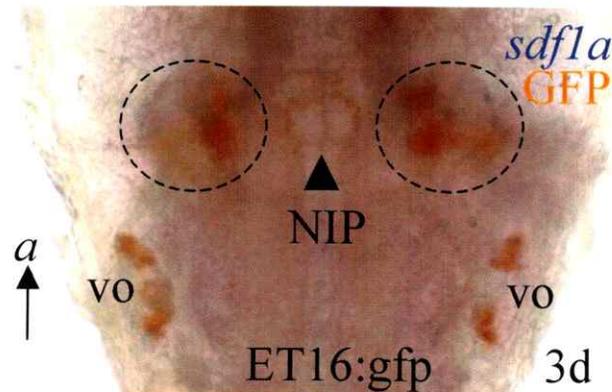


Figura 6. Marcación de *sdf1a* por hibridación *in situ* (azul) y de GFP por inmunotinción (café) en peces ET16:*gfp* de 3 dpf. La región donde se localiza el anillo axonal del NIP (cabeza de flecha) presenta una escasa expresión de *sdf1a*, distribuyéndose principalmente en las regiones laterales del mesencéfalo ventral.

2. Pérdida de función del receptor de quimioquina *Cxcr4b*: criterios de identificación de mutantes *odysseus*.

Los peces cebra *odysseus* homocigotos (*ody*^{-/-}) presentan una mutación sin sentido (lisina 239 pasa a ser un codón de término) del gen para el receptor acoplado a proteína-G, *cxcr4b* (Knaut y cols., 2003). Esta mutación produce una delección de la parte carboxilo terminal del tercer lazo intracelular y de los dos últimos dominios de transmembrana. Ya que estos dominios se requieren para la señalización intracelular a través de estos receptores (Minina y cols., 2007), esta mutación produciría una pérdida de función de la proteína *Cxcr4b*.

En el laboratorio se crecieron embriones obtenidos de un cruce de peces heterocigotos para la mutación de *cxcr4b* (*ody*^{+/-}). Al alcanzar etapas reproductivas (3-4 meses) se realizaron cruces para obtener embriones mutantes *ody*^{-/-}. Los embriones *ody*^{-/-} son morfológicamente semejantes a los silvestres, por lo tanto para su identificación se realizaron ensayos de selección basados en las funciones descritas para *cxcr4b* durante el desarrollo temprano de pez cebra, utilizando como criterios de identificación de embriones y larvas *ody*^{-/-} el análisis de los procesos de migración de las células germinales y la formación de la línea lateral posterior, respectivamente.

2.1. Desarrollo de la LLP

Como primer criterio de identificación de larvas *ody*^{-/-} se consideró los defectos en la formación de la LLP producidas por la ausencia de *cxcr4b*. Como vimos anteriormente, la pérdida de función de *cxcr4b* impide que el primordio de la LLP migre a lo largo del mioseptum depositando los 7-8 neuromastos que normalmente se encuentran a lo largo de la cola de las larvas (Li y cols., 2004). Mediante tinción *in vivo* de los neuromastos con el trazador fluorescente DASPEI en estadios de 4-5 dpf, después que el proceso de formación de la LLP es completo, analizamos el número de neuromastos presentes en la LLP. Los neuromastos que se forman anteriormente en la cabeza también se marcan con DASPEI, y como su desarrollo no está afectado en los mutantes *ody*^{-/-}, su tinción nos permite tener un control interno de la eficiencia de la marcación de neuromastos por DASPEI en la identificación de mutantes de *cxcr4b*.

Se realizaron diversos cruces entre peces adultos portadores de la mutación de *cxcr4b*, seleccionando en este proceso como peces adultos heterocigotos para la mutación de *cxcr4b* (*ody+/-*) aquellas parejas que producían por lo menos un 25% de larvas con pérdida de neuromastos de la LLP, un fenotipo asociado a mutantes *ody-/-*. De los primeros cruces realizados se encontraron parejas que producían un 100% de larvas con formación normal de neuromastos de la LLP; parejas que producían en cada cruce menos de un 25% de larvas con pérdida parcial o total de neuromastos, siendo en su mayoría normales, y parejas que producían un porcentaje igual o mayor a 25% de larvas con pérdida parcial o total de neuromastos de la LLP siendo el porcentaje restante normales (Fig.7). El porcentaje de mutantes obtenidos en este último grupo corresponde a la proporción mendeliana esperada para un cruce entre padres *ody+/-*, por tanto las larvas mutantes que se obtienen de ellos se clasifican como mutantes *ody-/-*, y el resto de las larvas que muestran fenotipos normales dentro del mismo cruce corresponden a *wild type sibling* (hermanos con fenotipo normal). El hecho de encontrar larvas con pérdida parcial o total de neuromastos de la LLP nos indica que la mutación de *cxcr4b* produce larvas *ody-/-* con fenotipos leves y severos, respectivamente. Los peces adultos que producen fenotipos mutantes en un 25% de las larvas se clasifican como *ody+/-* (Tabla 1). Designamos a las larvas con pérdida parcial de neuromastos de la LLP como *ody-/-* grado 1, y a las larvas con pérdida total de neuromastos de la LLP como *ody-/-* grado 2.

La pérdida de función de *cxcr4b* debiera afectar no sólo la formación de los neuromastos de la LLP, sino también el desarrollo del axón de la LLP (Li y cols., 2004). Para analizar este punto, larvas clasificadas como *ody-/-* por tinción *in vivo* de neuromastos con DASPEI se fijaron a los 5 dpf para realizar una inmunotinción contra α -tubulina acetilada con el fin de observar la formación del axón de la LLP en estas larvas. Mediante este ensayo pudimos comprobar que las larvas clasificadas como *ody-/-* grado 1 (menor número de neuromastos de la LLP) presentan el axón de la LLP incompleto, mientras que los *ody-/-* grado 2 (ausencia de neuromastos de la LLP) no presentan el axón de la LLP (Fig.7). En base a estos resultados podemos decir que la posición del último neuromasto depositado por el primordio en migración determina el punto de extensión del axón de la LLP. La asociación entre estos dos procesos ha sido

sugerido en trabajos previos que indican que al parecer la guía axonal de los conos de crecimiento de la LLP depende del primordio en migración (Li y cols., 2004). De acuerdo a esto clasificamos los fenotipos del axón de la LLP observados por inmunotinción contra α -tubulina acetilada como *ody*^{-/-} grado 1 cuando el axón de la LLP se desarrolla en forma parcial, y *ody*^{-/-} grado 2, cuando está ausente. Estos dos grupos se correlacionan con los *ody*^{-/-} grado 1 y grado 2 clasificados por tinción de neuromastos.

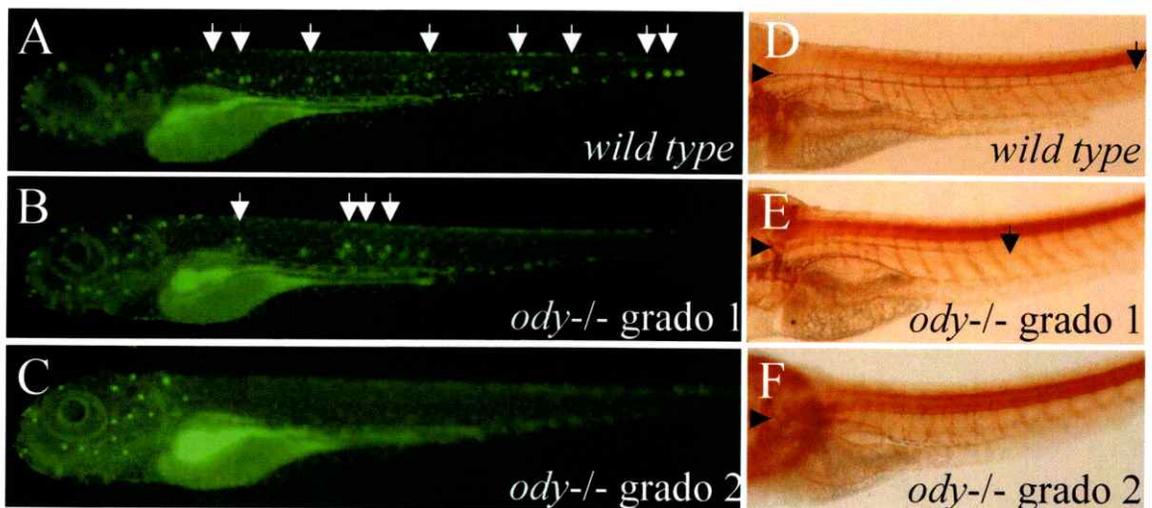


Figura 7. Identificación de mutantes *ody*^{-/-} por tinción de neuromastos con DASPEI en larvas de 5 dpf (A-C), y por inmunotinción anti α -tubulina acetilada del axón de la LLP (D-F). Los peces normales (A) forman entre 7-8 neuromastos en la LLP (flechas). Por la transparencia de las larvas también se observan los neuromastos de la LLP contralateral. Algunos mutantes *ody*^{-/-} muestran fenotipos con pérdida parcial de neuromastos de la LLP y se clasifican como mutantes *ody*^{-/-} grado 1 (B), o pérdida total de neuromastos de la LLP y son clasificados como mutantes *ody*^{-/-} grado 2 (C). El axón de la LLP se extiende desde la placoda cefálica (cabeza de flecha) hasta la punta de la cola (flecha) en peces normales (D), mientras que en mutantes *ody*^{-/-} grado 1 su extensión es parcial (E), o está ausente en mutantes *ody*^{-/-} grado 2 (F).

Parejas de peces odysseus P-ody# (n° del cruce)	Número total de larvas por cruce	Número de larvas <i>ody</i> -/-	% <i>ody</i> -/-
P-ody1 (1°)	66	14	21 ?
P-ody1 (2°)	62	21	33*
P-ody1 (3°)	97	25	25*
P-ody2	78	9	12
♂ de P-ody2 x ♀ nueva	23	10	43*
♀ de P-ody2 x ♂ nuevo	88	0	0
P-ody3	84	14	16
♀ de P-ody3 x ♂ nuevo	75	9	12
P-ody4 (1°)	26	2	7
P-ody4 (2°)	44	7	16
♀ de P-ody4 x ♂ nuevo	109	0	0
♀ de P-ody5 x ♂ nuevo	20	0	0
P-ody6 (1°)	16	3	18
P-ody6 (2°)	30	13	43*

Tabla 1. Selección de parejas portadoras de la mutación de *cxcr4b* que producen larvas *ody*-/- identificadas por tinción con DASPEI de neuromastos a los 5 dpf. Se asignó un número arbitrario a las distintas parejas de peces adultos y se mantuvieron aisladas hasta completar su análisis. En algunos casos se repitieron los cruces para una misma pareja, o se cruzaron con otros peces adultos. Se clasifican como peces *ody*+/- aquellos que producen larvas con fenotipos *ody*-/- en un porcentaje mayor al 25%.

* Seleccionados como parejas de peces *ody*+/-.

2.2. Migración de las células germinales

La selección de peces adultos *ody*+/- fue realizada principalmente por la aplicación de los ensayos que determinan la formación de los neuromastos y el axón de la LLP como vimos anteriormente. Estos peces adultos identificados como *ody*+/- se usaron para aplicar un segundo criterio de identificación de embriones mutantes de *cxcr4b* basado en las funciones conocidas de este receptor en la migración de las células germinales hacia la región gonadal durante el desarrollo (Knaut y cols., 2003). Este análisis nos permite identificar embriones mutantes *ody*-/- en estadíos tempranos de 32-36 hpf. En este estadio las células germinales normalmente se localizan en la región

gonadal de los embriones silvestres, mientras que en embriones *ody*^{-/-} estas células migran hacia regiones ectópicas del embrión distribuyéndose en forma aleatoria. Mediante la inyección del constructo *vasa* 3'UTR-GFP en embriones en estadio de una célula dirigimos la expresión de GFP específicamente a las células germinales siendo posible observar por fluorescencia *in vivo* de GFP la posición de estas células durante el proceso de migración. Cuando se inyectó este constructo en embriones obtenidos de padres adultos clasificados previamente como *ody*^{+/-} encontramos que una proporción de los embriones obtenidos de estos peces también presentan migración ectópica de las células germinales, fenotipo que también corresponde a mutantes *ody*^{-/-}. Con estos experimentos confirmamos que los peces adultos seleccionados efectivamente son portadores de la mutación de *cxcr4b*, es decir, son heterocigotos *ody*^{+/-} que en sus cruces producen fenotipos mutantes correspondientes a la pérdida de función de *cxcr4b* en embriones y larvas *ody*^{-/-}. Debido a que una fracción de los embriones inyectados con *vasa* 3'UTR-GFP probablemente no incorpora eficientemente este constructo en las células germinales, no fue posible determinar los porcentajes exactos de los fenotipos *ody*^{-/-} y *wild type sibling* para cada cruce, aunque en general la proporción de embriones *ody*^{-/-} con respecto a los embriones *wild type sibling* está por sobre el 25% mínimo esperado (Tabla 2). De esta manera utilizando la marcación de las células germinales con GFP y la marcación de los neuromastos con DASPEI podemos identificar mutantes *ody*^{-/-} en estadios tempranos y tardíos, respectivamente.

Parejas de peces odysseus P-ody# (n° cruce)	Wild type sibling		<i>odysseus</i>		Total (sin considerar indeterminado)	Expresión de GFP Indeterminado *
	N	%	N	%		
P-ody1	33	72	13	28	46	34
P-ody2 (1°)	28	65	15	35	43	21
P-ody2 (2°)	25	61	16	39	41	15
P-ody2 (3°)	38	60	25	40	63	37
P-ody2 (4°)	55	58	40	42	95	40
P-ody6 (1°)	25	68	12	32	37	18
P-ody6 (2°)	28	74	10	26	38	8
P-ody6 (3°)	28	60	19	40	47	23
P-ody7 (1°)	39	78	11	22	50	3
P-ody7 (2°)	40	74	14	26	54	17
P-ody7 (3°)	46	67	23	33	69	19

Tabla 2. Inyección de mRNA de *vasa* 3'UTR-GFP a embriones obtenidos de peces *ody*^{+/-}-seleccionados.
* Embriones que muestran una expresión difusa de GFP inespecífica o que no incorporan el constructo inyectado. Sin considerar este grupo el porcentaje de embriones *ody*^{-/-} obtenido en los cruces está por sobre el 25% esperado.

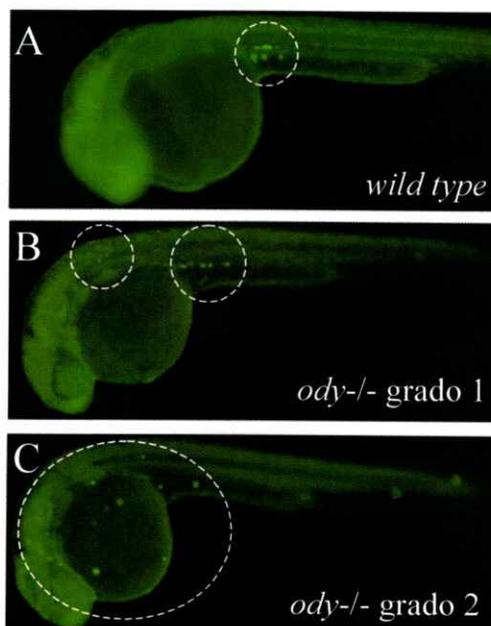


Figura 8. Fluorescencia *in vivo* de GFP en las células germinales de embriones inyectados con *nanos* 3'UTR-GFP observado a las 32 hpf. Los círculos de línea segmentada muestran la localización de las células germinales en la región gonadal de los embriones normales (A), en regiones ectópicas y gonadal de mutantes *ody*^{-/-} clasificado como fenotipo leve o grado 1 (B); y en regiones ectópicas que incluyen extensas áreas de la cabeza, cola y vitelo en mutantes *ody*^{-/-} y que corresponde a un fenotipo severo o grado 2 (C).

Así como definimos dos fenotipos principales para *ody*^{-/-} con respecto a la variabilidad en el número de neuromastos, también podemos distinguir dos fenotipos principales en estos mutantes en relación a la migración ectópica de las células germinales. Clasificamos como *ody*^{-/-} grado 1 (fenotipo leve) a embriones que presentan migración de células germinales hacia regiones de la cabeza y cola, además de la región gonadal; y *ody*^{-/-} grado 2 (fenotipo severo), aquellos que presentan migración ectópicas de las células germinales hacia regiones del embrión que no incluyen la región gonadal (Fig.8).

Comprobamos la proporción de *ody*^{-/-} grado 1 y 2 para cada criterio de selección (LLP, células germinales) en distintas parejas y encontramos que los porcentajes de mutantes con fenotipos leves y severos son aproximadamente semejantes indicando que el grado de severidad de la mutación de *cxcr4b* en cada mutante afecta en forma equivalente a ambos procesos (Tabla 3).

Las parejas de peces adultos seleccionados como *ody*^{+/-} que se habían mantenido aisladas durante el periodo de identificación, finalmente se juntan en un mismo acuario para luego realizar cruces entre ellos seleccionando parejas al azar. Las larvas obtenidas de estos peces se clasifican en *ody*^{-/-} grado 1 y 2 de acuerdo a los criterios de tinción de neuromastos con DASPEI que establecimos (Tabla 4). En estos cruces se pudo observar parejas que producían fenotipo *ody*^{-/-} (grados 1 + grado 2) en un 50% aproximadamente de las larvas obtenidas, lo que sería resultado de un cruce entre un pez con genotipo *ody*^{+/-} con un *ody*^{-/-}. Esto indicaba la presencia de peces mutantes *ody*^{-/-} entre los peces seleccionados; sin embargo, de todos los cruces realizados con este primer grupo de peces nunca obtuvimos de una pareja un 100% de larvas con fenotipo mutante *ody*^{-/-}, lo que sería esperado al cruzar dos peces *ody*^{-/-}. Considerando que este primer grupo de peces adultos provienen de un cruce de peces *ody*^{+/-} se espera que sólo un cuarto de ellos sean *ody*^{-/-} lo que disminuye las probabilidades de cruzar parejas mutantes recesivas, y aunque sólo logramos aislar un pez *ody*^{-/-} en este primer grupo de adultos seleccionados (posiblemente de la pareja 8 o 10 de la tabla 3), también era probable que algunos peces adultos *ody*^{-/-} tengan un potencial reproductivo menor al normal o que algunos de ellos sean estériles debido a defectos más severos en la línea germinal. Para

analizar la posibilidad de obtener cruces con un 100% de embriones homocigotos para la mutación de *cxcr4b* crecimos hasta etapas adultas larvas mutantes *ody*^{-/-}, identificadas por tinción de neuromastos con DASPEI, para así probar la viabilidad y capacidad reproductiva de estos peces.

Luego de 3-4 meses de desarrollo de mutantes *ody*^{-/-} seleccionados, observamos que estos peces son capaces de producir descendencia y que el 100% de las larvas obtenidas en cada cruce son mutantes *ody*^{-/-}, en base al fenotipo de pérdida de neuromastos de la LLP. En ninguno de estos cruces encontramos larvas con un número normal de neuromastos de la LLP, es decir, no se producen larvas con fenotipo silvestre, un resultado esperado para un cruce entre dos peces *ody*^{-/-}. Estos resultados confirman los criterios de identificación de mutantes de *cxcr4b* utilizados.

En cuanto a los fenotipos mutantes *ody*^{-/-} definidos como grado 1 y grado 2 según el número de neuromastos, encontramos que la proporción de ellos en cada cruce de peces *ody*^{-/-} se ajusta aproximadamente a dos grupos principales: cruces que producen entre 80-90% de *ody*^{-/-} grado 2, siendo el porcentaje restante *ody*^{-/-} grado 1; o cruces que producen *ody*^{-/-} grado 1 y grado 2 en un 50% cada uno (Tabla 5). Por lo tanto, los mutantes *ody*^{-/-} obtenidos en esta segunda generación, o F2, muestran en algunos cruces una proporción de fenotipos severos (*ody*^{-/-} grado 2) mayor a la observada entre los mutantes *ody*^{-/-} de la primera generación, o F1 (Tabla 3 y 4).

Posteriores ensayos de inmunotinción de α -tubulina acetilada para analizar la formación del axón de la LLP, y experimentos de inyección de *vasa* 3'UTR-GFP o *nanos* 3'UTR-GFP para determinar las alteraciones en la migración de las células germinales confirmaron el grado de homocigocidad en el 100% de los embriones obtenidos de parejas mutantes *ody*^{-/-}.

Parejas <i>ody</i> (criterio)	<i>Wild type sibling</i>		<i>ody</i> ^{-/-} grado 1		<i>ody</i> ^{-/-} grado 2	
	N	%	N	%	N	%
P- <i>ody</i> 2 (DASPEI)	47	68	12	17	10	15
P- <i>ody</i> 2 (vasa)	50	66	10	13	15	20
P-<i>ody</i> 8 (DASPEI)	39	36	24	22	45	42
P-<i>ody</i> 8 (vasa)	10	28	9	25	17	47
P- <i>ody</i> 9 (DASPEI)	31	76	5	12	5	12
P- <i>ody</i> 9 (DASPEI)	41	73	9	16	6	11
P-<i>ody</i>10 (DASPEI)	65	51	34	27	28	22
P- <i>ody</i> 11 (DASPEI)	150	75	29	14,5	21	10,5

Tabla 3. Clasificación de mutantes *ody*^{-/-} en grado 1 y 2 de acuerdo a la pérdida de neuromastos formados en LLP (DASPEI), y en algunos cruces, por migración ectópica de células germinales (vasa). En negrilla se marcan los cruces que producen fenotipos *ody*^{-/-} con incidencia mayor a 50% lo que indicaría que provienen de un cruce de peces con genotipo *ody*^{+/-} x *ody*^{-/-}.

Número total de larvas en cada cruce	<i>wild type sibling</i>		<i>ody</i> ^{-/-} grado 1		<i>ody</i> ^{-/-} grado 2	
	N	%	N	%	N	%
267	144	54	64	24	59	22
343	168	49	48	14	127	37
110	54	49	14	13	42	38
115	80	70	15	13	20	17

Tabla 4. Distribución de los fenotipos parciales y severos de larvas *ody*^{-/-} clasificadas por tinción de neuromastos con DASPEI y que se obtienen de cruces al azar de peces seleccionados como portadores de la mutación de *cxcr4b*. En negrilla se marcan los cruces que producen fenotipos *ody*^{-/-} en un 50% de las larvas aproximadamente, lo que indicaría que provienen de un cruce de peces con genotipo *ody*^{+/-} x *ody*^{-/-}.

Número total de <i>ody</i> ^{-/-} en cada cruce	<i>ody</i> ^{-/-} grado 1		<i>ody</i> ^{-/-} grado 2	
	N	%	N	%
78	9	12%	69	88%
65	12	18%	53	82%
47	20	43%	27	57%
47	6	13%	41	87%
241	122	51%	119	49%

Tabla 5. Distribución de los fenotipos parciales y severos de larvas *ody*^{-/-} clasificadas por tinción de neuromastos con DASPEI y que se obtienen de cruces entre peces *ody*^{-/-}.

3. Desarrollo alterado del tracto H-IP en mutantes *ody*^{-/-}

Los estudios del efecto de la pérdida de función del receptor *cxcr4b* en la formación del circuito axonal H-IP se centraron en dos aspectos principales del desarrollo de este sistema: la conectividad a nivel de los núcleos habenulares y la segregación de los eferentes habenulares en el NIP.

3.1. Análisis de conectividad de los núcleos habenulares en mutantes *ody*^{-/-}

Establecidos los criterios de identificación y clasificación de embriones mutantes *ody*^{-/-}, analizamos en primer lugar el efecto de la pérdida de función de *cxcr4b* en el desarrollo de la neuropila habenular y proyecciones axonales asociadas, como aferencias (estría medular) y comisura habenular. Mediante inmunotinción contra α -tubulina analizamos en primer lugar mutantes *ody*^{-/-} obtenidos de parejas *ody*^{+/-}, que corresponden a los mutantes de *cxcr4b* de primera generación o F1. Observamos que una proporción de larvas *ody*^{-/-} de 5 dpf presentan a nivel del diencéfalo dorsal proyecciones axonales ectópicas que conectan con los núcleos habenulares. Algunas de estas proyecciones se forman entre los núcleos habenulares extendiéndose levemente hacia regiones anteriores de la habénula y cruzando la línea media dorsal. En otros mutantes se forma una simple proyección axonal que generalmente llega hasta el borde anterior del telencéfalo (Fig.9). La neuropila habenular de las larvas controles, seleccionadas en cada cruce como *wild type sibling*, muestra los patrones normales de asimetría entre los núcleos habenulares izquierdo y derecho, mientras que en mutantes *ody*^{-/-} esta organización básica se ve alterada por las nuevas conexiones axonales formadas con las proyecciones ectópicas. La clasificación en grado 1 y 2 de los mutantes *ody*^{-/-} utilizados en estos experimentos mediante tinción de neuromastos *in vivo* fue verificado observando en estas larvas los defectos en la formación del axón de la LLP revelados en el mismo proceso de inmunotinción contra α -tubulina. Analizando estos subgrupos de mutantes *ody*^{-/-} encontramos que había una mayor incidencia de proyecciones axonales múltiples en mutantes *ody*^{-/-} grado 2 que pierden la LLP (Fig.10).

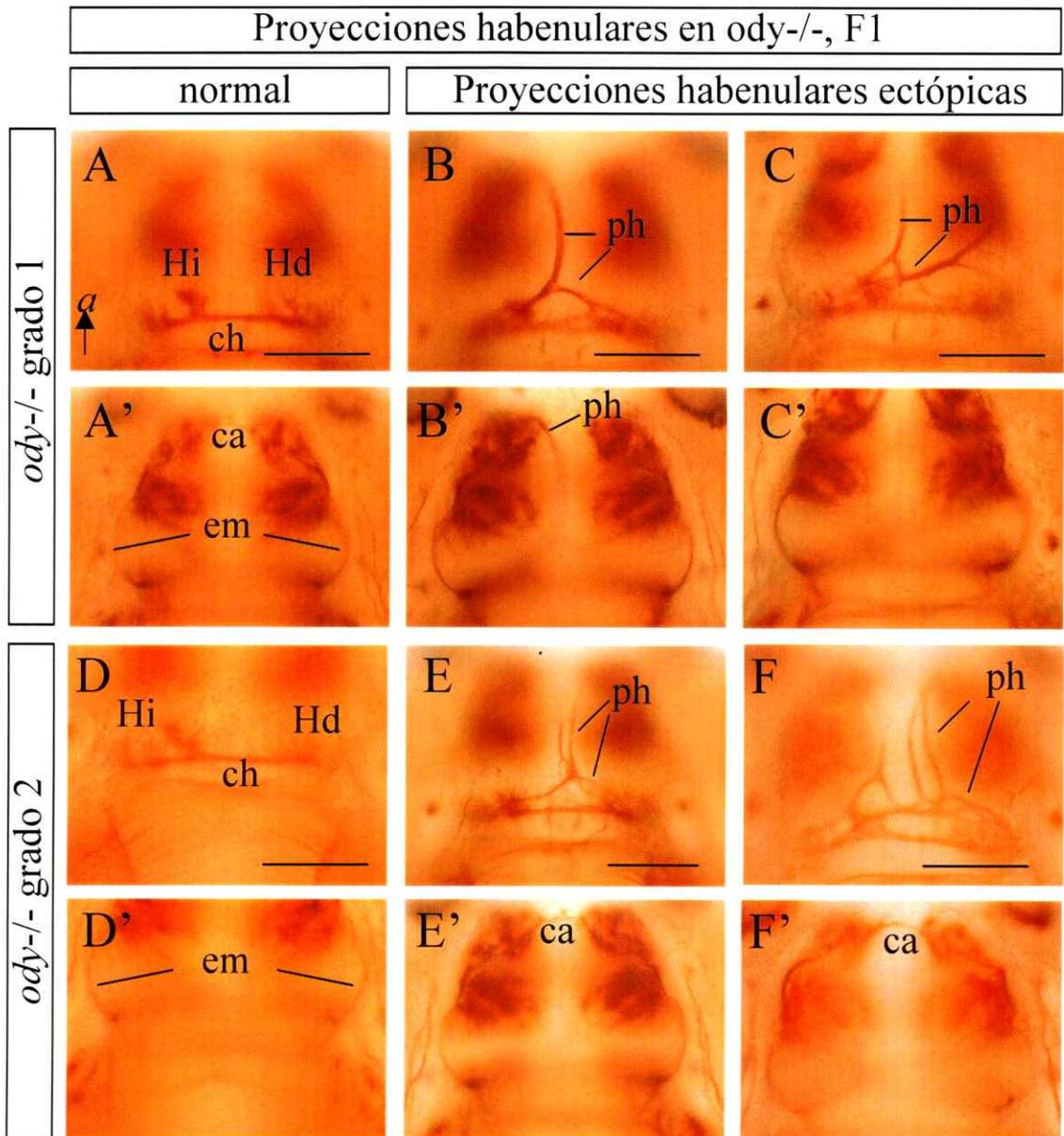


Figura 9. Inmunotinción contra α -tubulina acetilada en larvas *ody*^{-/-} de 5 dpf obtenidas de peces *ody*^{+/-}. Todos los paneles son vistas dorsales del diencefalo y cerebro anterior. **A, B, C** son tres ejemplos encontrados en mutantes clasificados como *ody*^{-/-} grado 1, dos de ellos mostrando proyecciones habenulares ectópicas (ph) que conectan con los núcleos habenulares. **A', B' y C'** son las imágenes correspondientes a estos cerebros enfocados a nivel de la estria medular. **D, E, F** y las correspondientes imágenes **D', E' y F'** muestran la conectividad axonal a nivel habenular y de estria medular respectivamente para tres larvas clasificadas como *ody*^{-/-} grado 2. ca, comisura anterior; ch, comisura habenular; em, estria medular; Hi, habénula izquierda; Hd, habénula derecha. Barra: 100 μ m.

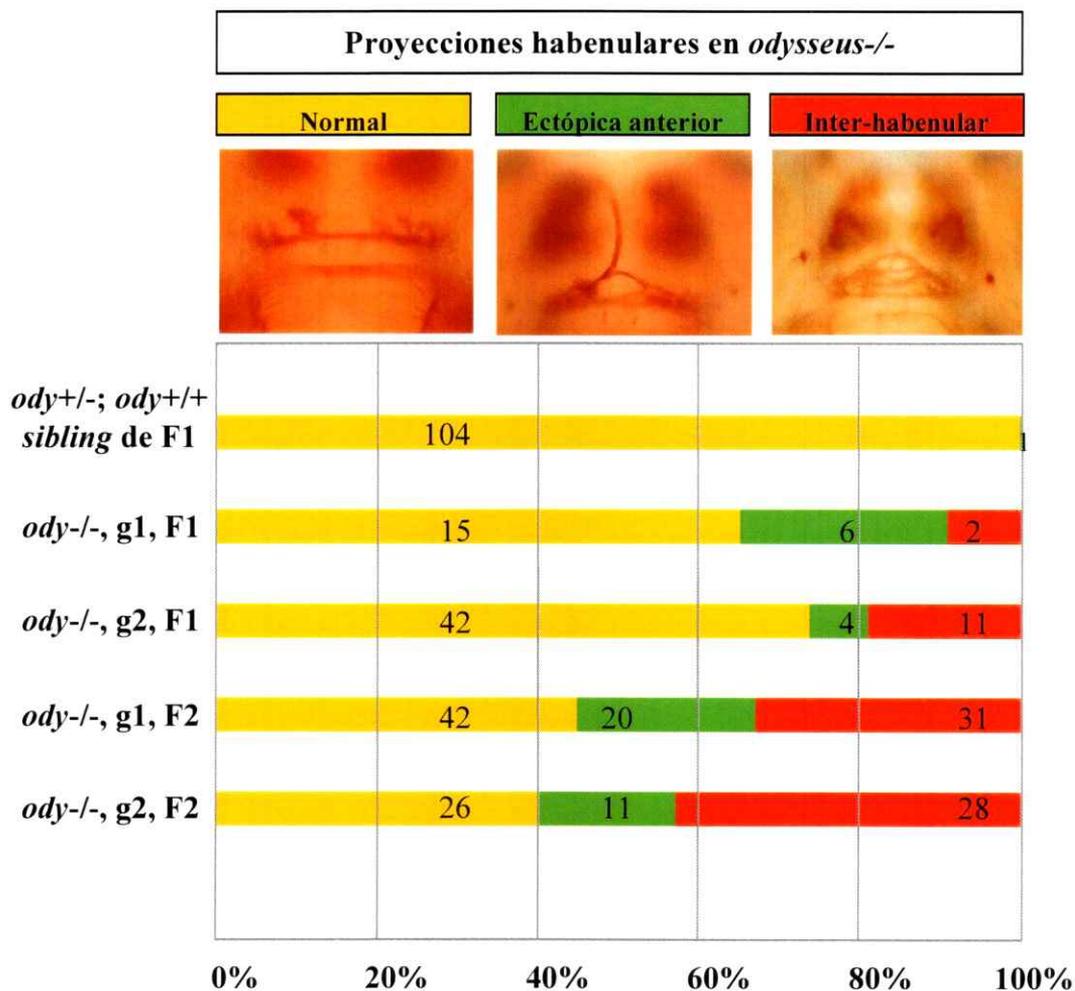


Figura 10. Proporción de larvas *ody*^{-/-} que desarrollan proyecciones habenuares ectópicas en relación a la severidad de los defectos de la LLP, definidos en grado 1 (g1) y grado 2 (g2), y la penetrancia de la mutación, cuando se comparan *ody*^{-/-} obtenidos de padres *ody*^{+/-} (F1) o padres *ody*^{-/-} (F2). Para cada grupo *ody*^{-/-} se cuantifica las larvas que presentan proyecciones habenuares normales, proyecciones ectópicas que se dirigen hacia regiones anteriores del cerebro (borde anterior del telencéfalo, palio) y proyecciones inter-habenuares marcadas por inmunotinción de α -tubulina acetilada. En cada subgrupo de larvas *ody*^{-/-} se contabiliza el total de larvas obtenidas de dos cruces de *ody* F1 y tres cruces de *ody* F2 subdivididas en g1 y g2. Como grupo control se analizan las larvas que tienen un desarrollo normal de la LLP y que se obtienen de los cruces de *ody* F1 (*ody*^{+/-} y *ody*^{+/+} *sibling*).

El análisis de conectividad habenular en larvas *ody*^{-/-} obtenidas de padres *ody*^{-/-}, (F2), muestra no sólo un mayor número de larvas por cruce con proyecciones habenulares ectópicas, sino también un aumento en la magnitud de estos fenotipos definida por múltiples proyecciones inter-habenulares y bifurcaciones axonales, sumándose en algunos casos a este conjunto de axones las proyecciones ectópicas que se extienden hacia el borde anterior del telencéfalo o del palio. En este grupo encontramos que la formación de proyecciones axonales múltiples inter-habenulares son predominantes en *ody*^{-/-} grado 1 y 2 con incidencias cercanas al 50% (Fig.10). A partir de un nuevo cruce de *ody*^{-/-} F2 diferenciamos las proyecciones habenulares que se extienden hasta el borde anterior del telencéfalo de aquellas que se dirigen diagonalmente hacia el palio, definiendo por lo tanto tres clases principales de proyecciones ectópicas: la clase I corresponde a las proyecciones habenulares que se extienden por la línea media dorsal hacia el borde anterior del telencéfalo, la clase II incluye proyecciones axonales inter-habenulares que se extienden desde un núcleo habenular hacia el núcleo contralateral cruzando la línea media dorsal, y la clase III corresponde a las proyecciones que se extienden hacia el palio (Fig.11). En base a esta nueva clasificación observamos que la presencia de una proyección extensa que llega hasta el borde anterior del telencéfalo se forma únicamente en los *ody*^{-/-} grado 1 (Fig.12), mientras que las proyecciones que se extienden hacia regiones mediales del palio se forman en los *ody*^{-/-} grado 2. Por su parte las proyecciones de clase II están presentes en ambos grupos (Fig.12). Al parecer esta restricción de fenotipos de acuerdo al grado de severidad de la mutación de *cxcr4b* ocurre sólo en *ody*^{-/-} obtenidos de una F2; sin embargo, se requiere el análisis de un mayor número de cruces para confirmar estas observaciones.

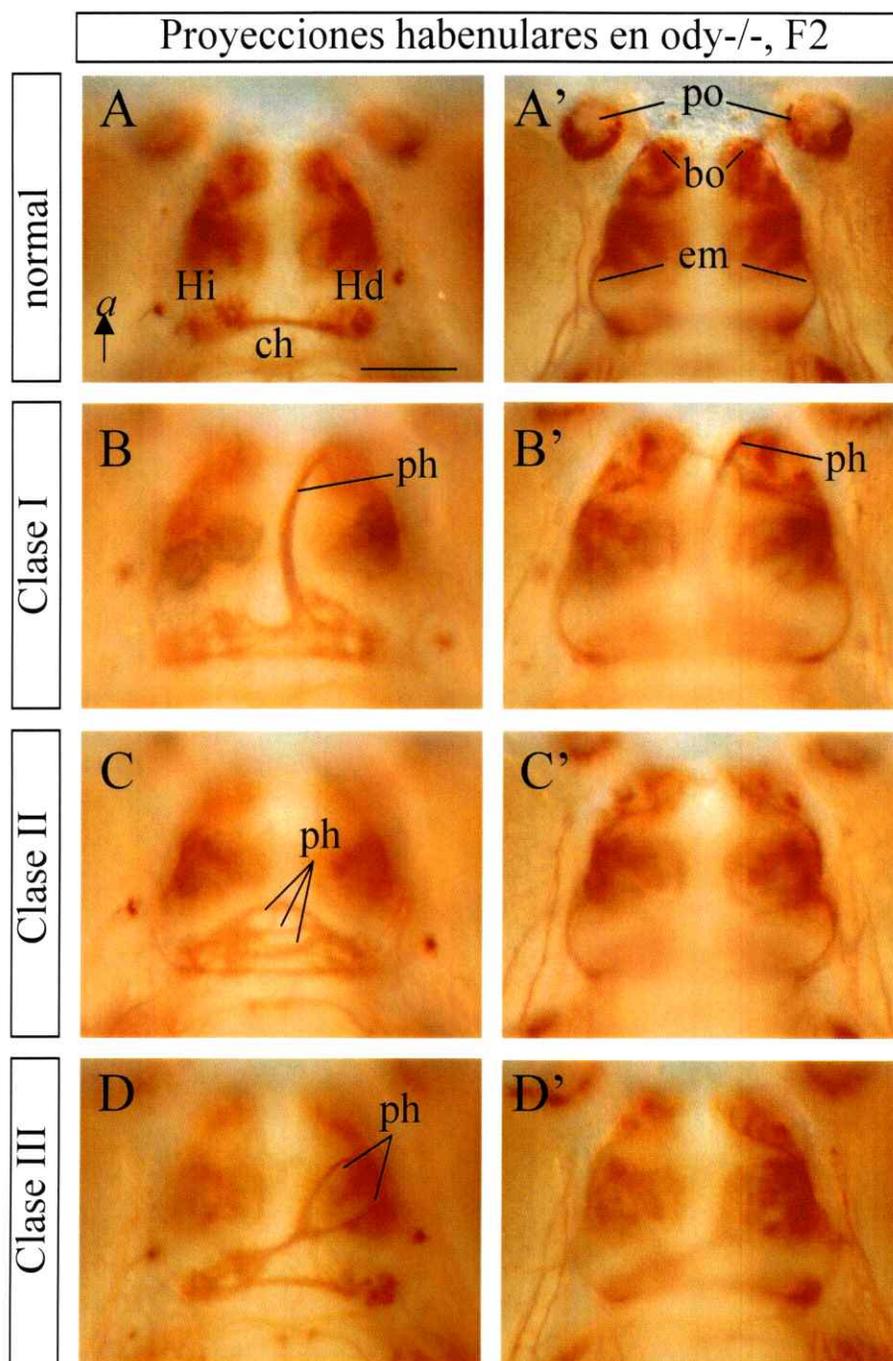


Figura 11. Clasificación de las proyecciones habenulares ectópicas en larvas *ody*^{-/-} de 5 dpf obtenidas de peces *ody*^{-/-} marcadas por inmunotinción contra α -tubulina acetilada. Todos los paneles son vistas dorsales del diencéfalo y cerebro anterior. **A-D** y las correspondientes imágenes **A'-D'** muestran la conectividad axonal a nivel habenular y de estría medular, respectivamente. bo, bulbo olfatorio; ch, comisura habenular; em, estría medular; Hi, habénula izquierda; Hd, habénula derecha; ph, proyección ectópica; po, placoda olfatoria. Barra: 100 μ m.

La formación de la comisura habenular y estría medular en mutantes *ody*^{-/-} de F1 y F2 es normal, mientras que la organización de la neuropila habenular básica se conserva, viéndose alterada únicamente por la presencia de conexiones axonales extras. La formación de estas proyecciones axonales que conectan con la habénula y que siguen direcciones anormales en mutantes *ody*^{-/-} nos permite postular que la pérdida de función del receptor *Cxcr4b* produce alteraciones de guía axonal dentro de la región habenular. La identidad de estas proyecciones anormales se analiza más adelante en este trabajo.

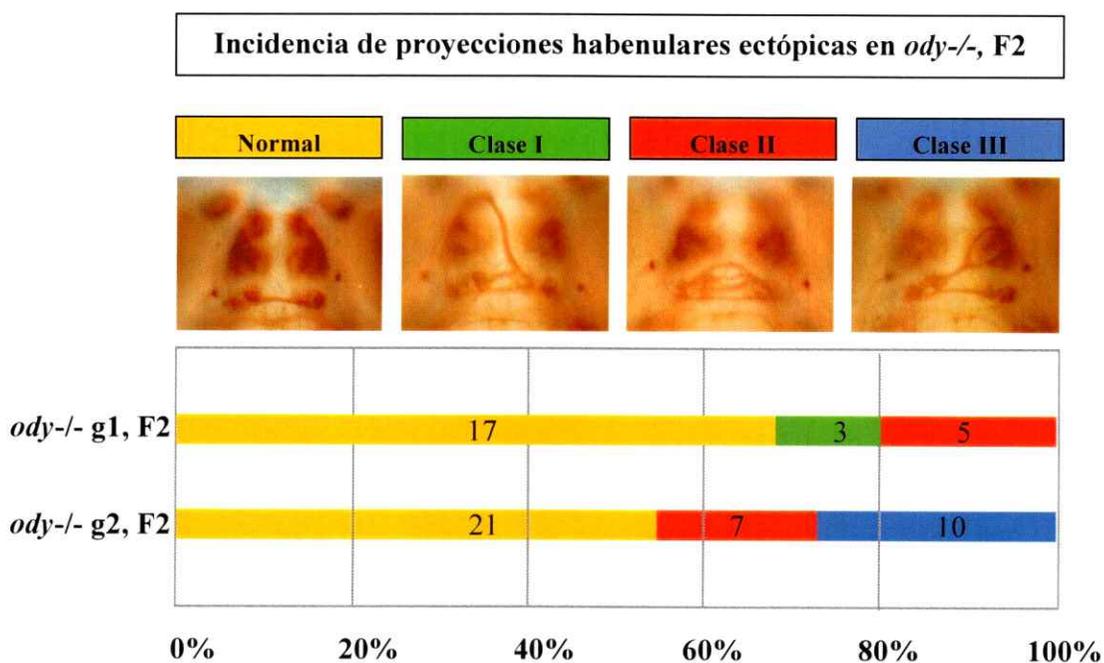


Figura 12. Distribución de las tres clases de proyecciones habenulares ectópicas descritas en mutantes *ody*^{-/-} que se obtienen de un cruce de padres *ody*^{-/-} (F2) y en relación a la severidad de los defectos de la LLP definidos en grado 1 (g1) y grado 2 (g2).

3.2 Desarrollo normal del epítalamo en mutantes *ody*^{-/-}

Dado la magnitud de las alteraciones axonales que observamos en la región epitalámica del cerebro de larvas *ody*^{-/-}, analizamos si el desarrollo de las estructuras de esta región estaba alterado en los mutantes *ody*^{-/-} para descartar que los fenotipos de conectividad habenular observados fueran un resultado indirecto de posibles efectos de la mutación de *cxcr4b* en el desarrollo de esta región. Para ello investigamos la formación del complejo pineal y la especificación molecular de la habénula en mutantes *ody*^{-/-}.

El desarrollo normal del complejo pineal en mutantes *ody*^{-/-} se analizó mediante la generación en el laboratorio de dos nuevas líneas de peces mutantes *odysseus* que expresan GFP en el complejo pineal. Estos peces se obtuvieron a partir de cruces entre mutantes *ody*^{-/-} con transgénicos *foxD3:gfp*, y entre mutantes *ody*^{-/-} y transgénicos *flh:gfp*, seleccionando luego por fluorescencia *in vivo* de GFP en el complejo pineal las larvas transgénicas y heterocigotas *ody*^{+/-}. Estas larvas se desarrollan hasta etapas reproductivas para obtener *ody*^{(-/-)/foxD3:gfp}, y *ody*^{(-/-)/flh:gfp}, respectivamente, en un 25% de los embriones obtenidos en cada cruce. Las larvas mutantes *ody*^{-/-} transgénicas se identificaron por tinción de neuromastos de la LLP y fluorescencia *in vivo* de GFP en el complejo pineal, y se analizaron por inmunofluorescencia doble contra α -tubulina acetilada y GFP usando microscopía confocal. Entre las larvas mutantes transgénicas encontramos un desarrollo normal del complejo pineal dentro de un contexto de conectividades axonales alterado por proyecciones ectópicas habenulares producidas por la pérdida de función de *cxcr4b* (Fig.13).

Para determinar que la habénula se especifica normalmente en mutantes *ody*^{-/-} se revisaron por hibridación *in situ* la expresión de distintos marcadores moleculares de la habénula. Estos corresponden a genes de expresión temprana en la región del diencéfalo dorsal donde se forma la habénula (*fgf8*, *neurogenina*); marcadores habenulares de expresión simétrica, es decir, genes con dominios de expresión equivalente en ambos núcleos habenulares (*f-spondin*, *cpd2*), y marcadores habenulares de expresión asimétricas con dominios de expresión mayor en la habénula derecha (*dexter*), o en la habénula izquierda (*leftover*). Los resultados muestran la expresión normal de los

distintos marcadores moleculares analizados en mutantes *ody*^{-/-} (Fig. 11), por lo tanto la especificación de la habénula es un proceso que no depende de la señalización por *cxc4b*. Por consiguiente, la pérdida de función de este gen en mutantes *ody*^{-/-} sólo produce a nivel del epitálamo alteraciones de conectividad axonal relacionados con la habénula sin afectar los procesos tempranos que llevan a su formación.

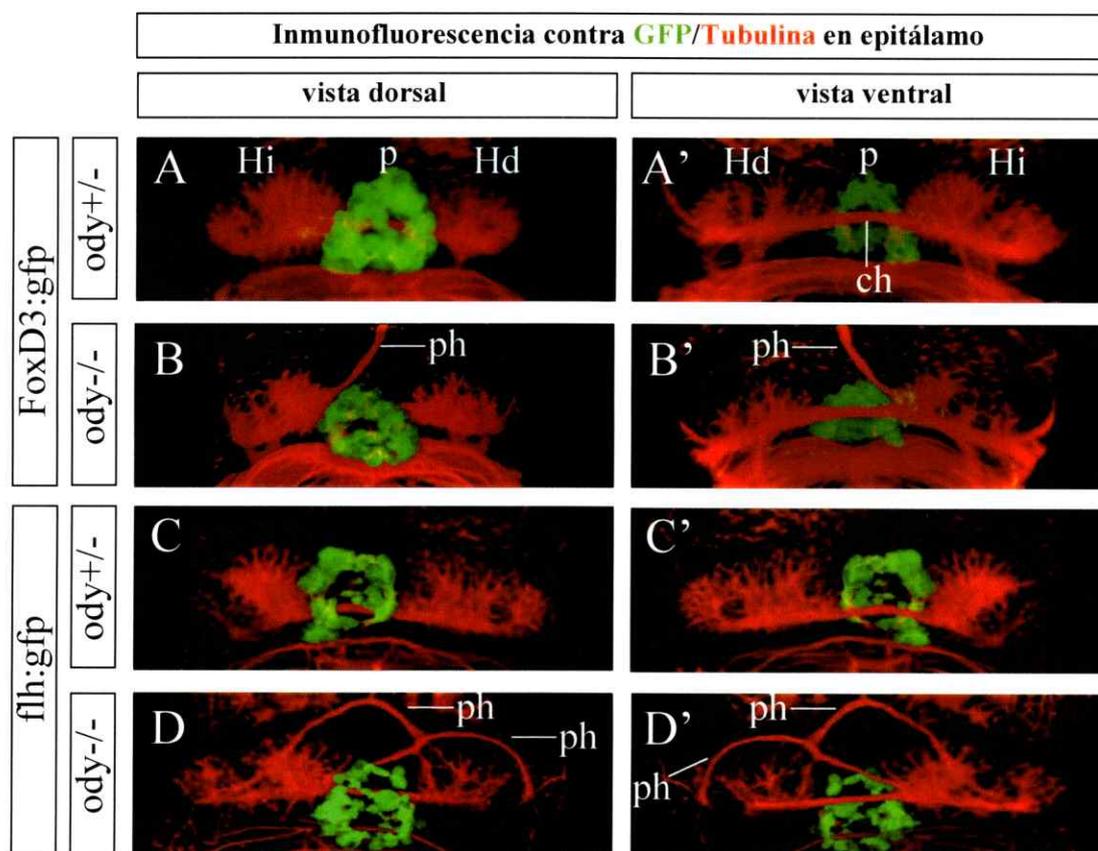


Figura 13. El desarrollo normal del órgano pineal (p) visto por la expresión de GFP en transgénicos *ody*^{+/-}*foxD3:gfp* (A, A') y *ody*^{+/-}*flh:gfp* (C, C') no está alterado en mutantes transgénicos *ody*^{-/-}*foxD3:gfp* (B, B') y *ody*^{-/-}*flh:gfp* (D, D') que muestran proyecciones habénulares ectópicas (ph).

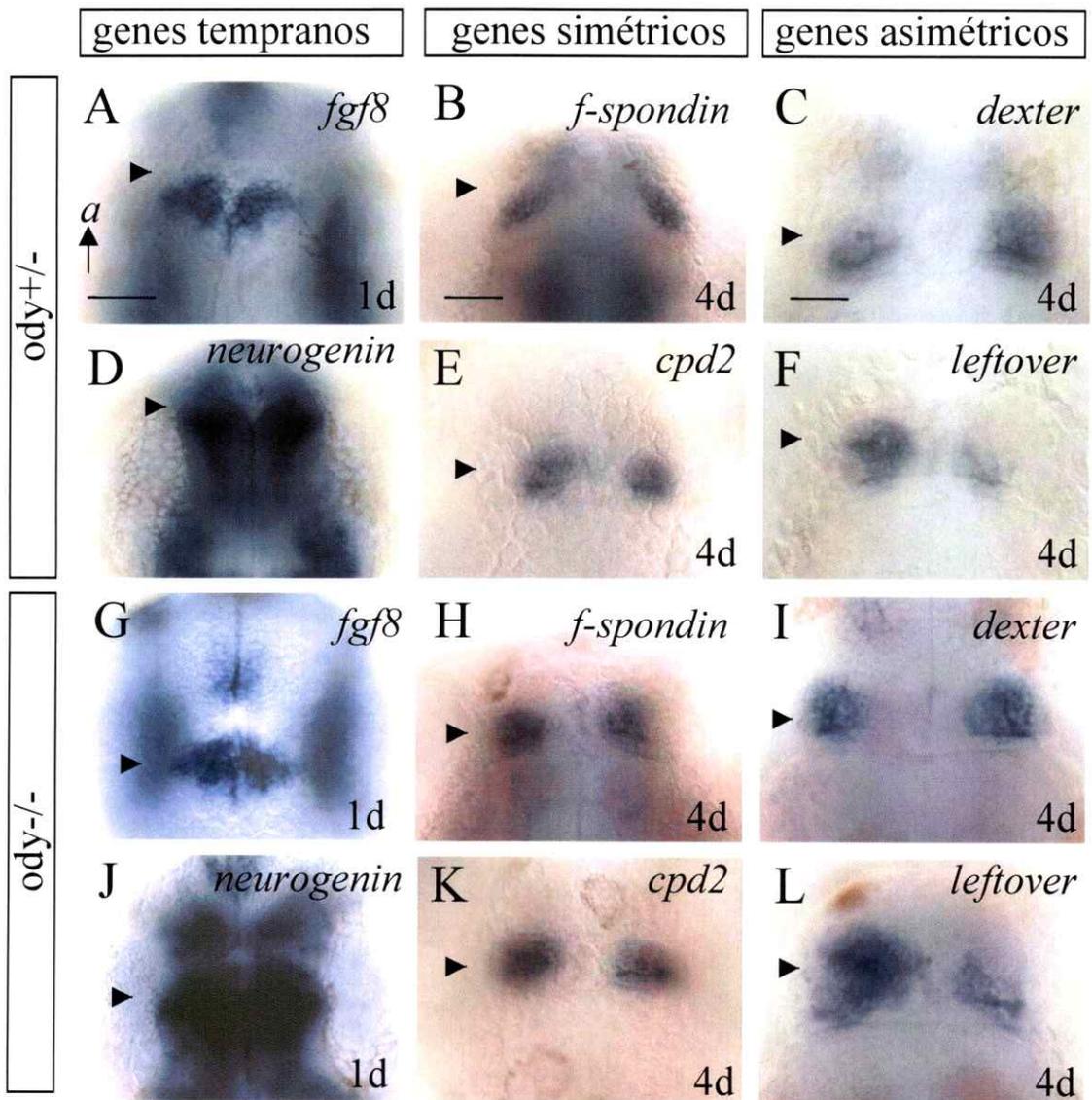


Figura 14. Hibridaciones *in situ* de marcadores moleculares de la región presuntiva de la habénula (*fgf8*, *neurogenina*), y de especificación habenular simétricos (*f-spondin*, *cpd2*) y asimétricos (*dexter*, *leftover*) en peces normales *ody*^{+/-} (A-F) y mutantes *ody*^{-/-} (G-L). La posición de los núcleos habenulares en el epítalamo dorsal de los peces cebra se indica por la cabeza de flecha.. Barra: 50 μ m.

3.3. Segregación de los eferentes habenulares en el NIP de mutantes *ody*^{-/-}

Las eferencias que se originan en los núcleos habenulares izquierdo y derecho se organizan formando los fascículos retroflexos respectivos. Estas dos proyecciones axonales se extienden hacia regiones posteriores del cerebro segregándose en el NIP con respecto al eje dorso-ventral, de tal manera que los axones del fascículo retroflexo izquierdo conectan principalmente las regiones dorsales del NIP y los del fascículo retroflexo derecho, las regiones ventrales de este núcleo (Aizawa y cols., 2005). Mediante la marcación diferencial de los núcleos habenulares izquierdo y derecho con cristales de los trazadores lipofílicos DiD y DiA, respectivamente, analizamos por microscopía confocal la segregación de los eferentes habenulares en el NIP de mutantes *ody*^{-/-}. Inicialmente estudiamos los efectos de la pérdida de función de *cxcr4b* en mutantes *ody*^{-/-} de 5 dpf obtenidos de padres *ody*^{+/-} (F1). En algunas de las larvas analizadas observamos una pérdida de conectividad axonal con el NIP, con menor compactación de la conectividad axonal tipo anillo característico de este núcleo y defasciculación de los eferentes habenulares (Fig.15). Dentro de los mutantes seleccionados también encontramos fenotipos normales de segregación de los eferentes habenulares, lo que significa que sólo una proporción de los mutantes *ody*^{-/-} muestra alteraciones de conectividad eferente, similarmente a lo observado en el análisis de conectividad habenular realizado por inmunotinción contra α -tubulina donde sólo una proporción de mutantes tiene proyecciones habenulares ectópicas, mientras que el grupo restante muestra fenotipos normales de conectividad. Sin embargo, por las características del análisis confocal de la marcación de eferencias habenulares, no fue posible cuantificar la proporción de mutantes *ody*^{-/-} que presentan pérdida de conectividad eferente.

Analizando los mutantes *ody*^{-/-} obtenidos de padres *ody*^{-/-} (F2), encontramos una pérdida de conectividad eferente más severa, con mayor grado de defasciculación de los eferentes habenulares previo a la llegada al NIP, y pérdida casi completa de los anillos axonales del NIP (Fig.15). Entre los mutantes *ody*^{-/-} analizados, también encontramos fenotipos normales de conectividad eferente indicando nuevamente que sólo una proporción de los mutantes presentan estos defectos. Al revisar algunos de los mutantes

que mostraban pérdida de conexión eferente habenular con el NIP encontramos a nivel habenular la marcación de proyecciones ectópicas que se originan precisamente de la habénula que pierde mayor conectividad con el NIP (Fig.16). Esto significaría que la pérdida de conectividad eferente y la formación de proyecciones ectópicas en mutantes *ody*^{-/-} serían fenotipos directamente relacionados y que la formación de proyecciones axonales extras a nivel habenular ocurre a expensas de los axones que forman los fascículos retroflexos. Para revisar este punto analizamos el tracto H-IP unilateral de mutantes *ody*^{-/-} mediante marcaciones con cristales del trazador DiI de uno de los núcleos habenulares. Luego de un día de difusión se fijó la marcación por fotoconversión de DiI, lo que permite revelar en un color café las proyecciones axonales y eferencias asociadas al núcleo habenular marcado. En un grupo de 10 larvas *ody*^{-/-} obtenidos de *ody*^{+/-} (F1) no se encontraron fenotipos de conectividad muy diferentes a los normales. Esto se debe principalmente a que la incidencia de estos defectos es menor en este grupo de mutantes que generalmente desarrollan proyecciones ectópicas conectadas únicamente a uno de los dos núcleos habenulares disminuyendo así las probabilidades de encontrar estos fenotipos por marcaciones unilaterales de la habénula. Sin embargo, el análisis de un grupo de larvas *ody*^{-/-} obtenidas de *ody*^{-/-} (F2) mostró la presencia de proyecciones axonales ectópicas asociadas a la habénula que pierde conectividad a través del fascículo retroflexo respectivo con el NIP, indicado por una menor densidad del anillo axonal de este núcleo, desfasciculación de los eferentes habenulares y disminución del grosor del fascículo retroflexo (Fig.17).

Estos resultados sugieren que en mutantes *ody*^{-/-} se producen errores de guía axonal que afectan la formación del tracto H-IP. Axones que debieran formar los fascículos retroflexos que se extienden hacia regiones posteriores del cerebro, siguen rutas anormales en direcciones opuestas formando las proyecciones ectópicas con la consiguiente pérdida de conectividad axonal con el NIP y defasciculaciones de los eferentes habenulares. Por lo tanto, *Cxcr4b* cumpliría un papel importante en funciones de guía axonal durante el establecimiento del circuito H-IP, y en esta función las quimioquinas *Sdf1a* y *Sf1b* serían los factores claves en la activación de la vía de señalización a través de este receptor.

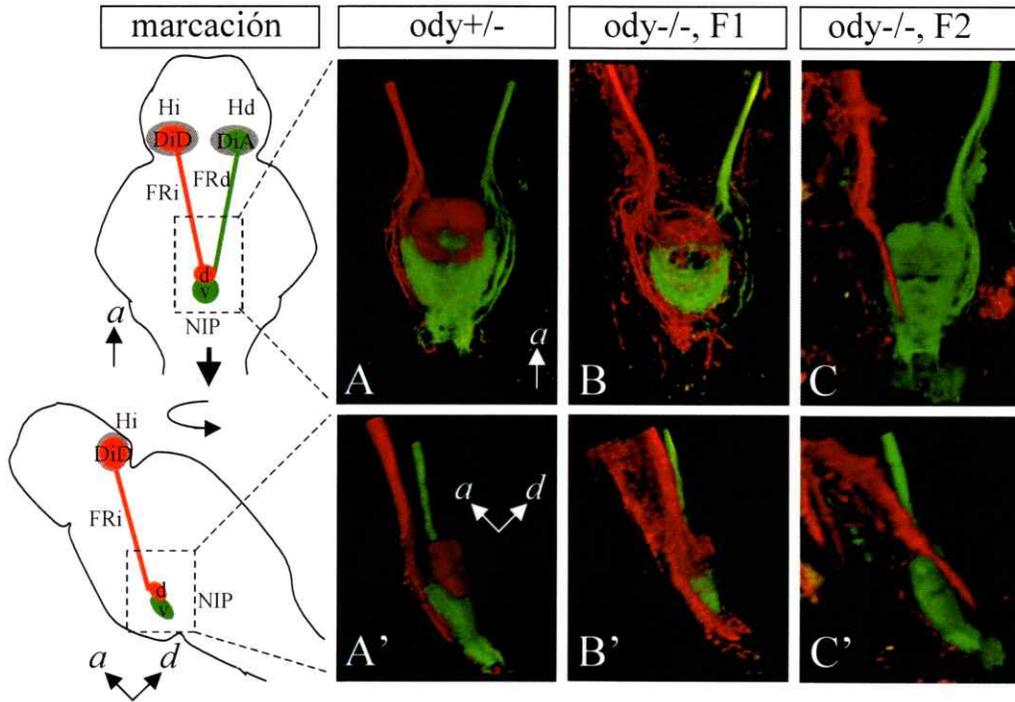
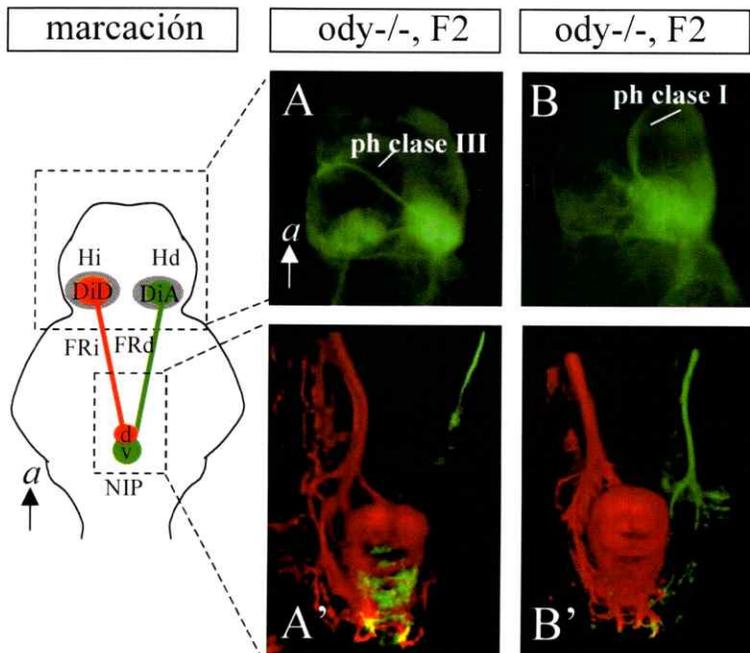


Figura 15. Marcación diferencial de los núcleos habenulares izquierdo (Hi) y derecho (Hd) con los trazadores DiD y DiA, respectivamente, en larvas *wild type sibling* (*ody+/-*) y mutantes *ody-/-* de primera y segunda generación (F1, F2). **A-C**, vista dorsal del núcleo interpeduncular (NIP) con la segregación dorso-ventral de los fascículos retroflexos izquierdo (FRi) y derecho (FRd). **A'-C'**, vista lateral izquierda del NIP. d, dorsal; v, ventral.

Figura 16. Asociación entre la formación de proyecciones habenulares ectópicas y la pérdida de conectividad eferente con el NIP determinada por marcación diferencial de los núcleos habenulares izquierdo (Hi) y derecho (Hd) con DiD y DiA, respectivamente. **A** y **B**, vista dorsal del cerebro anterior de mutantes *ody-/-* obtenidos de una F2, que presentan proyecciones ectópicas (ph) de clase I y clase III que conectan con la habénula derecha. **A'**, **B'**, vista dorsal del NIP de los *ody-/-* respectivos que muestran principalmente mayor pérdida de conexiones a través del fascículo retroflexo derecho (FRd) que del fascículo retroflexo izquierdo (FRi).



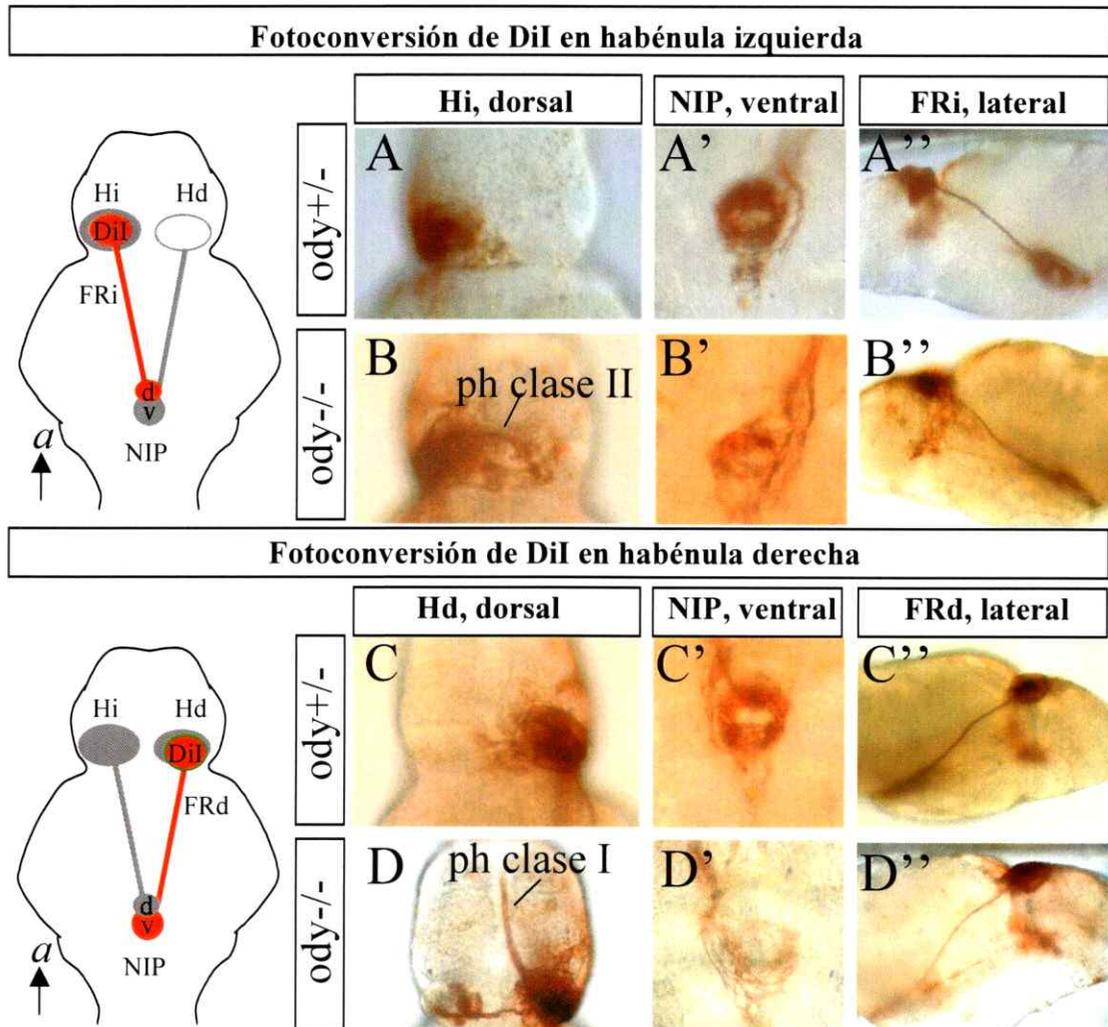


Figura 17. Marcaciones unilaterales del tracto H-IP por fotoconversión de DiI. El panel superior muestra los componentes del tracto H-IP izquierdo marcado con DiI de larvas normales y mutantes *ody*^{-/-} correspondientes a la habénula izquierda, Hi (A, B); núcleo interpeduncular, NIP (A', B'), y fascículo retroflexo izquierdo, FRi (A'', B''), respectivamente. El panel inferior muestra los componentes del tracto H-IP derecho marcados con DiI en larvas normales y mutantes *ody*^{-/-} correspondientes a la habénula derecha, Hd, (C, D); núcleo interpeduncular, NIP (C', D'), y fascículo retroflexo derecho, FRd (C'', D''), respectivamente. La formación de proyecciones ectópicas (ph) en el núcleo habenular marcado se asocia a un menor número de axones que llegan al NIP y desfasciculaciones de los eferentes habenulares respectivos.

4. Efectos de la pérdida de función de *sdf1a* y *sdf1b* en el desarrollo del tracto H-IP

Al eliminar la función de los posibles ligandos del receptor Cxcr4b se espera reproducir los fenotipos encontrados en mutantes *ody*^{-/-} y obtener fenocopias de los defectos vistos en el tracto H-IP de mutantes de *cxcr4b*. Esto demostraría la importancia de una vía de señalización Sdf1/Cxcr4b activa para la correcta formación de este circuito axonal.

4.1. Bloqueo de la función de *sdf1a* y *sdf1b* en peces cebra silvestres

La síntesis de Sdf1a y Sdf1b se bloqueó mediante la inyección de oligonucleótidos de tipo morfolino específicos para estos factores, *MOsdf1a* y *MOsdf1b*, en embriones de pez cebra silvestre recién fecundados. La eficiencia de los morfolinós usados en todas las inyecciones se determinó por los defectos que produce en la formación de la LLP, proceso que requiere la actividad de Sdf1a (David y cols., 2002). De esta manera seleccionamos como morfantes larvas de 5 dpf que por tinción *in vivo* con DASPEI mostraban ya sea un número menor o la ausencia total de neuromastos de la LLP. Luego analizamos en estas larvas la conectividad habenular por inmunotinción contra α -tubulina acetilada, encontrando en algunas larvas inyectadas con *MOsdf1a* proyecciones ectópicas inter-habenulares semejantes a las observadas en mutantes *ody*^{-/-} (fig.18). En general son proyecciones axonales más finas que se presentan en un porcentaje bajo de morfantes seleccionados (24%, n=31). Estos resultados se obtuvieron inyectando *MOsdf1a* en cada blastómero de embriones en estadio de 4 células (1,5 mM, 0,5 nl por blastómero). Concentraciones mayores a 2 mM son tóxicas, produciendo defectos en el desarrollo general de los embriones, mientras que concentraciones más bajas (0,3 mM) no producen proyecciones habenulares ectópicas aun cuando estas larvas muestran defectos parciales en la formación de la LLP (Tabla 6).

Peces	Morfolino <i>sdf1a</i> Concentr. (volumen)	Normal N (%)	Grado 1 N (%)	Grado 2 N (%)	Proy. Hab. N (%)
<i>wild type</i>	-	50 (100)	-	-	-
<i>wild type</i>	0.3 mM	16 (29)	40 (71)	-	-
<i>wild type</i>	1 mM (0,5 nl)	-	34 (64)	19 (36)	-
<i>wild type</i>	1,5 mM (0,5 nl x 4)	-	32 (68)	15 (32)	1 (2)
<i>wild type</i>	1,5 mM (0,5 nl x 4)	-	5 (20)	20 (80)	6 (24)
<i>ody</i> ^{-/-} (1)	-	-	14 (45)	17 (55)	25 (81)
<i>ody</i> ^{-/-} (1)	1,5 mM (0,5 nl x 4)	-	-	19 (100)	11 (58)
<i>ody</i> ^{-/-} (2)	-	-	24 (60)	16 (40)	21 (53)
<i>ody</i> ^{-/-} (2)	1,5 mM (0,5 nl x 4)	-	1 (2)	42 (98)	17 (40)

Tabla 6. Inyección de morfolinós para *sdf1a* en embriones *wild type* y en dos grupos de mutantes *ody*^{-/-}, clasificando por tinción de neuromastos con DASPEI los efectos del morfolino en la formación de la LLP normal, parcial (grado 1) o severo (grado 2), y por inmunotinción de α -tubulina, la formación de proyecciones ectópicas habenuares (proy. hab).

En otra serie de experimentos se inyectó *MOsdf1a* en mutantes *ody*^{-/-} con el fin de aumentar el porcentaje de larvas con proyecciones ectópicas habenuares observado en mutantes de *cxcr4b*. Se inyectó *MOsdf1a* en embriones *ody*^{-/-} obtenidos de padres *ody*^{-/-} (*ody*-*MOsdf1a*), dejando como grupo control *ody*^{-/-} hermanos no inyectados (*ody*-control) seleccionados del mismo cruce. La actividad del morfolino se comprobó al obtener un 100% de larvas *ody*-*MOsdf1a* con pérdida completa de los neuromastos de la LLP, considerando que el grupo de *ody*-control presenta pérdida parcial o total de la LLP en un 45% y 55%, respectivamente, en uno de los grupos experimentales. Sin embargo, cuando analizamos la frecuencia de las alteraciones de conectividad habenuar de *ody*-*MOsdf1a* y *ody*-control no encontramos un aumento en la formación de proyecciones ectópicas por efecto del morfolino (Tabla 6). Un efecto secundario de la inyección de *MOsdf1a* en mutantes *ody*^{-/-} fue la eliminación de las proyecciones axonales de clase I que se extienden entre la habénula y el borde anterior del telencéfalo (fig.19). Estas proyecciones están presentes en los *ody*-control, pero desaparecen en el grupo *ody*-*MOsdf1a*, mientras que las proyecciones inter-habenuares, o de clase II, se conservan en ambos grupos. Una revisión más detallada de la inmunotinción muestra que en la línea media dorsal del diencéfalo de los *ody*-*MOsdf1a* se puede distinguir la formación inicial de posibles proyecciones de clase I que llegaron a extenderse brevemente en dirección anterior quedando con un extremo redondeado. Si efectivamente el bloqueo de la función de *sdf1a* en estos mutantes impide la extensión

de estas proyecciones hacia el borde anterior del telencéfalo, entonces podríamos decir que las proyecciones de clase I en principio no siguen rutas aleatorias sino que son guiadas por Sdf1a endógeno expresado en regiones del cerebro anterior por la activación de algún receptor desconocido o del propio Cxcr4b, si consideramos posibles actividades residuales de este receptor aún presentes en mutantes *ody*^{-/-}, como se mencionó anteriormente.

En el bloqueo del ligando Sdf1b, las distintas concentraciones de MO*sdf1b* ensayadas no producen proyecciones ectópicas habenules, aún cuando las concentraciones más altas de morfolino (2 mM; 0,5 nl) también lograron afectar el desarrollo de la LLP. Se ha descrito en la literatura que el bloqueo de *sdf1b* con morfolinós no afecta la migración del primordio ni la extensión del axón de la LLP (Li y cols., 2004), por lo tanto los efectos producidos en la formación de la LLP podrían ser un resultado indirecto del exceso de morfolino usado y la alta homología de secuencia con *sdf1a*.

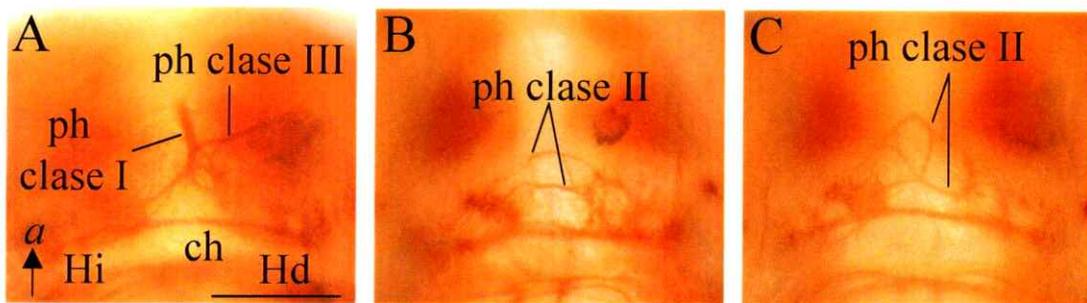


Figura 18. Fenocopias de las proyecciones ectópicas habenules en morfantes de *sdf1a* analizadas por inmunotinción anti α -tubulina acetilada. Se muestran vistas dorsales del cerebro anterior de tres larvas que forman principalmente proyecciones ectópicas (ph) de clase II (**B**, **C**), y un caso donde se forma una proyección de clase III y el segmento inicial de una posible proyección de clase I (**A**). Barra: 100 μ m.

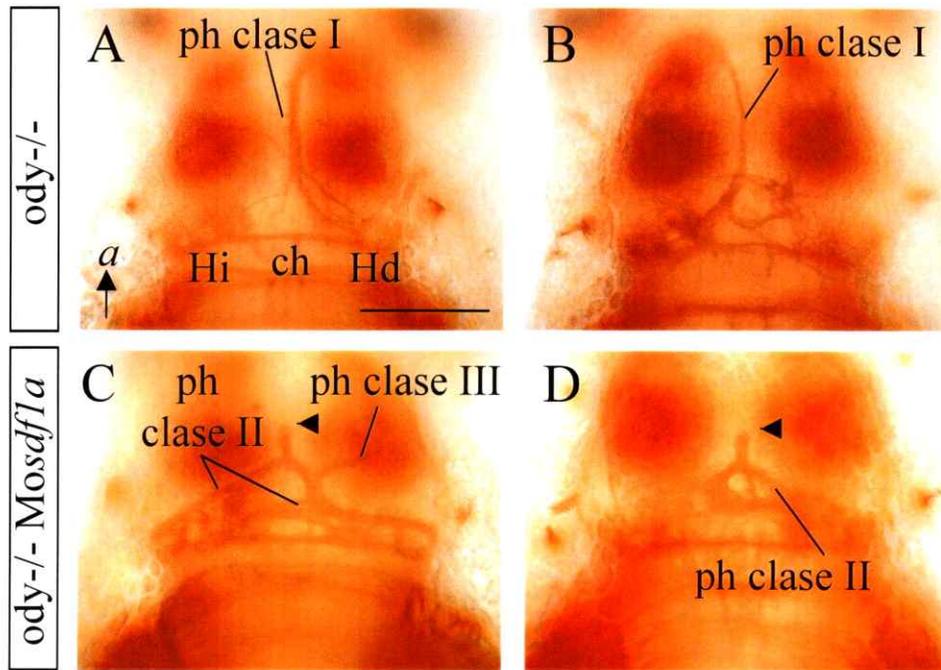


Figura 19. Efecto de la inyección de morfolino antisentido para *sdf1a* (*Mosdf1a*) en mutantes *ody*^{-/-}. Todos los paneles son vistas dorsales del cerebro anterior de mutantes *ody*^{-/-} de 5 dpf analizados por inmunotinción anti α -tubulina acetilada. (A, B) controles no inyectados. (C, D) mutantes inyectados con *Mosdf1a*. En ninguno de los *ody*^{-/-} inyectados se encontraron las proyecciones ectópicas (ph) de clase I observadas en mutantes control, observándose solamente un segmento inicial de esta clase de proyecciones (cabeza de flecha). Barra: 100 μ m.

4.2. Bloqueo de la función de *sdf1a* en peces cebra transgénicos ET16:*gfp*

La posibilidad de obtener proyecciones ectópicas habenulares GFP positivas y que puedan ser visibles por fluorescencia *in vivo* de GFP o por inmunotinción anti-GFP se probó inyectando *MOsdf1a* en embriones ET16:*gfp*. Como habíamos mencionado previamente estos peces transgénicos expresan GFP en el tracto H-IP, específicamente en los núcleos habenulares, fascículos retroflexos y NIP. La eficiencia del *MOsdf1a* fue de un 100% con respecto a la pérdida de neuromastos de la LLP en todos los embriones inyectados con 0,5 nl de 2 mM de morfolino. Las nuevas inyecciones de *MOsdf1a* no produjeron proyecciones ectópicas habenulares visibles por fluorescencia *in vivo* de GFP, lo que podría significar que el bloqueo de *sdf1a* no fue suficiente para llegar a

formar estos axones ectópicos en estas inyecciones, aunque también era posible que estas proyecciones no expresaran GFP en los peces ET16. Para analizar esto realizamos inmunotinción de α -tubulina acetilada en las larvas ET16 inyectadas con MO*sdf1a*, y en otro grupo inmunofluorescencia doble para α -tubulina acetilada y GFP. En estos peces vimos la pérdida del axón de la LLP correspondiente a peces que no desarrollan neuromastos de la LLP por efecto del MO*sdf1a* y una disminución general de la neuropila habenular, pero no fue posible obtener proyecciones ectópicas habenulares. La inmunofluorescencia doble muestra una desorganización de la neuropila habenular y tractos axonales con menor formación de redes axonales en otras regiones del cerebro de peces inyectados con MO*sdf1a*, mientras que la expresión de GFP muestra una menor compactación de los núcleos habenulares conservando la diferencia de tamaño relativo entre los núcleos izquierdo y derecho en los casos analizados (Fig.20). Estos resultados indican que el bloqueo de *sdf1a* altera el desarrollo temprano de algunas estructuras embrionarias, como por ejemplo la LLP y algunas regiones del cerebro, mientras que en el sistema habenular probablemente retrasa su formación sin producir los efectos esperados en el desarrollo más tardío de la conectividad habenular de los morfantes de *sdf1a* analizados.

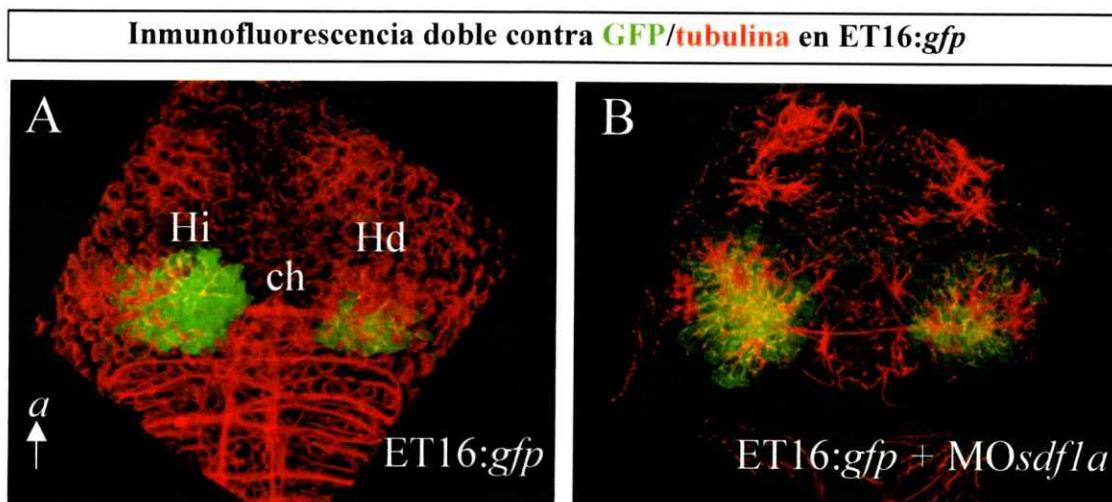


Figura 20. Microscopía confocal de inmunofluorescencia doble para α -tubulina acetilada y GFP en peces ET16:*gfp*. Las imágenes muestran una vista dorsal de la región habenular de peces de 5 días control no inyectado (A) y uno inyectado con 2 mM de MO*sdf1a* (B).

4.3. Estudios de conectividad habenular en mutantes de *sdf1a*

La obtención de fenocopias de mutantes *ody*^{-/-} en algunos peces inyectados con MO*sdf1a* indican la posible participación del señalamiento Sdf1a/Cxcr4b en el proceso de formación del circuito H-IP, pero la baja incidencia de estas alteraciones de conectividad habenular en los morfantes de *sdf1a*, nos llevó a buscar nuevas aproximaciones experimentales para demostrar el papel de Sdf1a en este proceso. Recientemente se describió en pez cebra un mutante para *sdf1a*, denominado *medusa* (*med*^{-/-}), que muestra un fenotipo altamente penetrante que afecta fuertemente la formación de la LLP (Valentin y cols., 2007). Para comenzar nuestros experimentos, recibimos larvas de peces *medusa* fijadas a los 4 dpf para los primeros análisis de conectividad habenular por inmunotinciones anti α -tubulina acetilada. En dos grupos de alrededor 50 peces cada uno se identificaron los mutantes *med*^{-/-} por la pérdida del axón y neuromastos de la LLP, encontrándose aproximadamente un 25 % de larvas *med*^{-/-} en cada grupo, lo que indica que estos provienen de cruces de padres heterocigotos para la mutación de *sdf1a* (*med*^{+/-}). De los mutantes *med*^{-/-} identificados, 6 larvas de cada grupo muestran alteraciones de la conectividad habenular con formación de proyecciones ectópicas, es decir, alrededor de un 40% de las larvas *med*^{-/-} presentan fenocopias de los mutantes *ody*^{-/-} (Fig.21). Estas corresponden a proyecciones ectópicas interhabenulares (clase II) y proyecciones que se extienden a regiones anteriores del cerebro (clase I). El análisis confocal de la conectividad habenular vista por inmunofluorescencia de α -tubulina acetilada de un tercer grupo de peces *medusa* permite la observación de proyecciones axonales inter-habenulares ectópicas más finas entre los mutantes (Fig.22). Análisis por inmunofluorescencia de un nuevo grupo de *med*^{-/-} muestra fenocopias de mutantes *ody*^{-/-} que incluyen fuertes proyecciones axonales de clase I (Fig.22C). Estos resultados apoyan fuertemente el papel de la vía de señalización Sdf1a/Cxcr4b en funciones de guía axonal durante la formación del circuito H-IP.

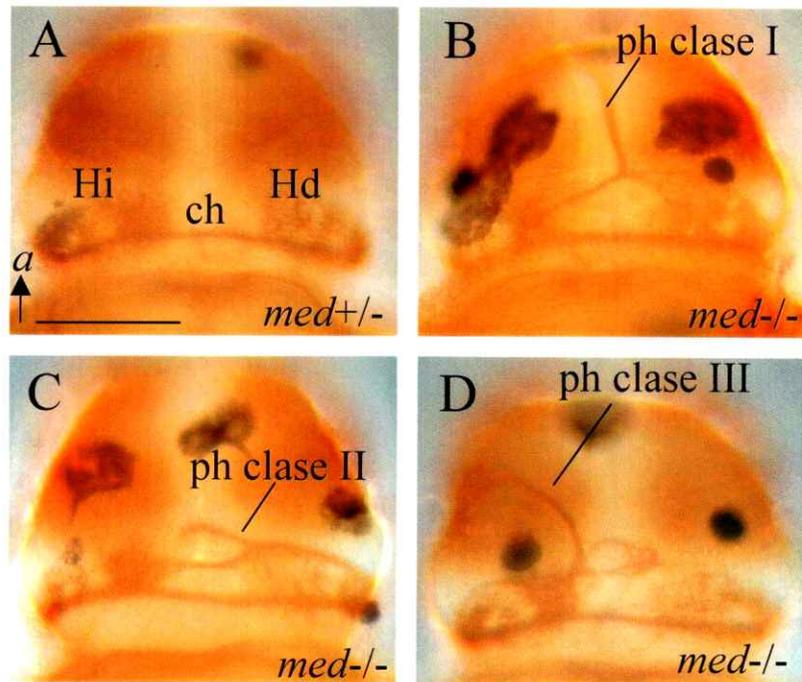


Figura 21. Peces *medusas* de 4 dpf analizados por inmunotinción anti α -tubulina acetilada. **A**, conectividad habenular normal de una larva *med+/-*. **B-D**, mutantes *med-/-* que forman las distintas clase de proyecciones ectópicas (ph) encontradas en mutantes *ody-/-*. Barra: 100 μ m

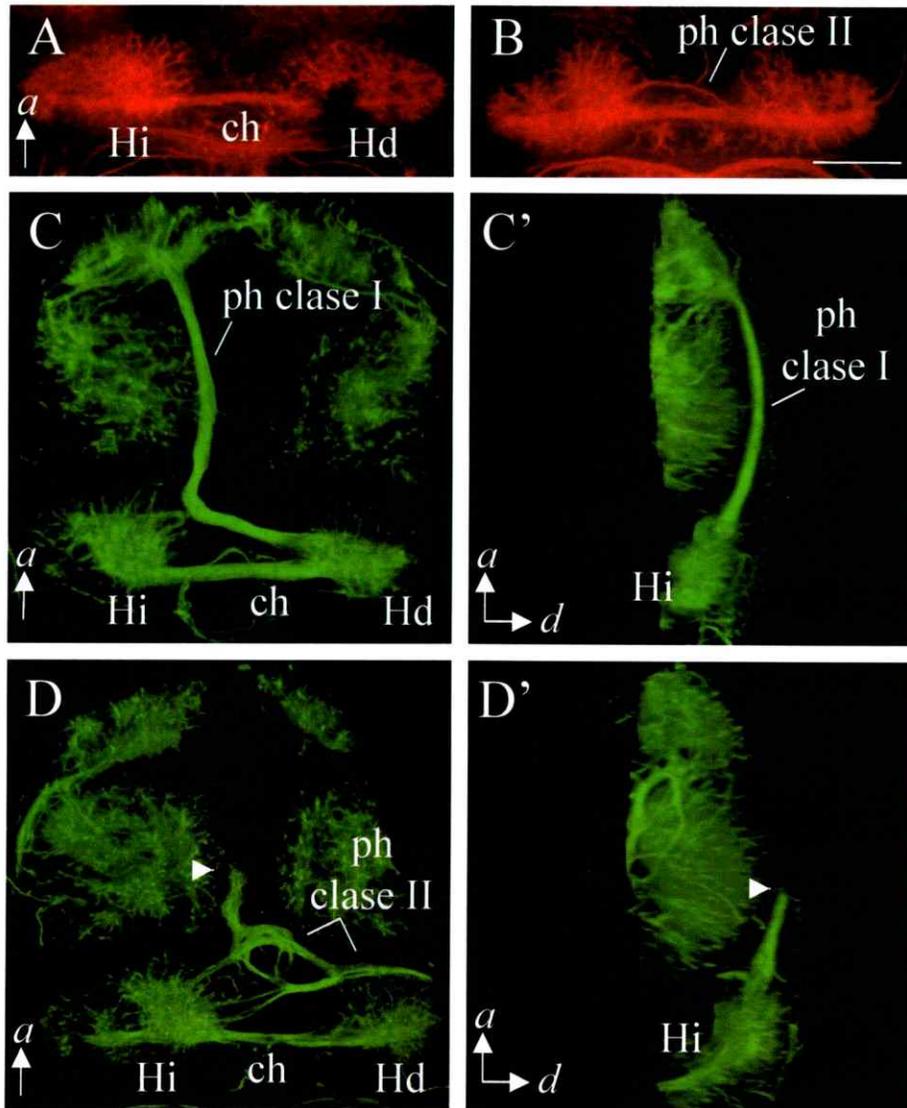


Figura 22. Análisis confocal de las proyecciones habenulares en peces *medusa*^{-/-} de 4 dpf vistas por inmunofluorescencia de α -tubulina acetilada. **A**, neuropila habenular normal. **B**, detección de finas proyecciones ectópicas (ph) de clase II. **C**, **C'**, prominente proyección de clase I en vista dorsal y lateral, respectivamente. **D**, **D'**, proyecciones de clase II y segmento inicial de una proyección de clase I (cabeza de flecha) en vista dorsal y lateral, respectivamente. Barra 50 μ m.

5. Origen de las alteraciones de conectividad habenular en mutantes *ody*^{-/-}

La adquisición de líneas transgénicas de peces cebra que expresan GFP en el tracto H-IP nos permitió realizar una aproximación experimental en el estudio de la naturaleza de las proyecciones ectópicas habenulares que observamos en mutantes *odysseus*. La primera línea, denominada *brn3a-hsp70:gfp*, expresa GFP bajo el control de elementos enhancer de *brn3a*, un gen que codifica un factor de transcripción con dominio POU expresado en la habénula. En estos peces, GFP se expresa en subpoblaciones de neuronas habenulares y en sus axones. Las células GFP positivas ocupan la región medial de los núcleos habenulares, siendo mayor el dominio de expresión en la habénula derecha (Aizawa y cols., 2005). La segunda línea corresponde a ET16:*gfp*, peces que usamos anteriormente en la localización del NIP. Esta línea enhancer trap lleva una inserción de Tol2-GFP y marca un subgrupo de neuronas habenulares con dominios de expresión mayor en la habénula izquierda que en la derecha, fascículos retroflexos y NIP (Bianco y cols., 2008). En ambas líneas transgénicas no se observa expresión de GFP en estría medular y comisura habenular, indicando que sólo las proyecciones axonales de origen habenular son GFP positivas. Mediante el uso de estas líneas transgénicas buscamos determinar si las proyecciones ectópicas de los mutantes *ody*^{-/-} son también de naturaleza habenular. Estos experimentos se iniciaron con la generación en el laboratorio de dos nuevas líneas de peces obtenidas por cruces entre mutantes *ody*^{-/-} y peces *brn3a-hsp70:gfp*; y entre mutantes *ody*^{-/-} y peces ET16:*gfp*. De estos cruces se obtuvieron embriones con genotipos *ody*(+/-)/*brn3a:gfp* y *ody*(+/-)/ET16:*gfp*, respectivamente. Ambas líneas transgénicas son portadores de la mutación de *cxcr4b*, y se crecieron hasta etapas adultas reproductivas para obtener de ellos embriones homocigotos para la mutación de *cxcr4b* con genotipos *ody*(-/-)/*brn3a:gfp* en la primera línea, y *ody*(-/-)/ET16:*gfp* en la segunda, dentro del 25% de los embriones obtenidos en cada cruce.

5.1. *ody(-)/brn3a:gfp*

Los primeros análisis de conectividad habenular se realizaron en larvas *ody(-)/brn3a:gfp*. En esta línea de peces encontramos que no era necesario la activación por calor del promotor *hsp70* para obtener expresión de GFP, lo que indicaría que posiblemente como resultado de estos cruces hubo una pérdida de la regulación transcripcional por *hsp70* permitiendo una expresión constitutiva de GFP bajo el control de enhancers de *brn3a*. En esta línea de peces observamos que los neuromastos de la LLP también presentan fluorescencia *in vivo* de GFP, lo que permitió identificar tempranamente como mutantes *ody(-)* las larvas que presentaban un menor número de neuromastos o la ausencia total de ellos. Algunos de los mutantes *ody(-)* así identificados mostraron proyecciones ectópicas habenulares visibles por fluorescencia *in vivo* de GFP que luego fueron analizadas por microscopía confocal. Una de las primeras características observadas en estos mutantes por fluorescencia *in vivo* de GFP es la aparente fusión de los núcleos habenulares producida por la presencia de proyecciones ectópicas inter-habenulares GFP positivas. También se pudo observar en estos mutantes que la presencia de proyecciones a nivel habenular está asociada a una disminución relativa en la intensidad de fluorescencia de GFP en el NIP y fascículo retroflexo, lo que podría reflejar la pérdida de conectividad eferente habenular con el NIP en los peces mutantes *ody(-)* (Fig.23).

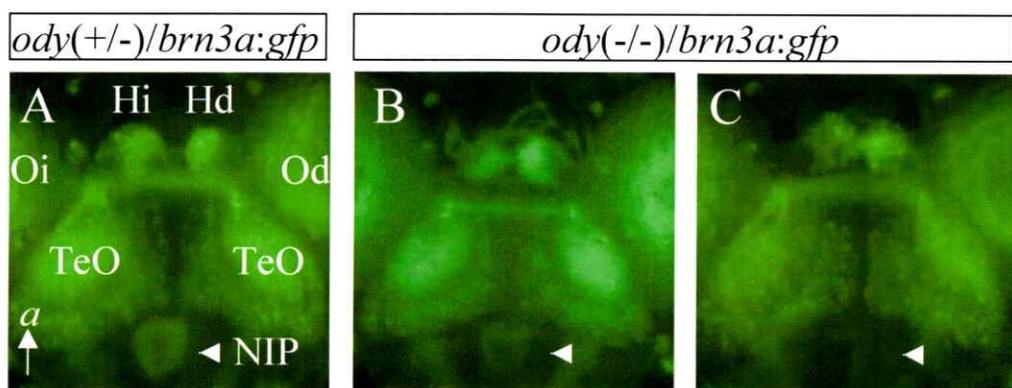


Figura 23. Expresión *in vivo* de GFP en cerebro de larvas provenientes de un cruce entre peces *ody(+/-)/brn3a:gfp* vista en lupa de fluorescencia. **A**, desarrollo de conectividad normal de los núcleos habenulares izquierdo (Hi) y derecho (Hd) y del anillo axonal del NIP (cabeza de flecha) en *wild type sibling*. **B**, mutante con múltiples proyecciones ectópicas interhabenulares y NIP débilmente marcado. **C**, mutante con proyecciones interhabenulares con fusión de los núcleos habenulares y un NIP prácticamente ausente. Oi, ojo izquierdo; Od, ojo derecho; TeO, tectum óptico.

Un grupo de larvas seleccionadas como *ody(-)/brn3a:gfp* que presentan proyecciones ectópicas habenulares se analizaron por inmunofluorescencia doble contra GFP y α -tubulina acetilada (Fig.24). En los experimentos anteriores del análisis de mutantes *ody(-)* usando el marcador general de axones α -tubulina acetilada observamos la formación de proyecciones axonales ectópicas que conectaban con los núcleos habenulares. Ahora en base a los resultados de la inmunotinción doble en mutantes *ody(-)/brn3a:gfp* podemos decir que estos axones ectópicos son de origen habenular dado que la expresión de GFP en esta región del epítalamo es específica del circuito H-IP.

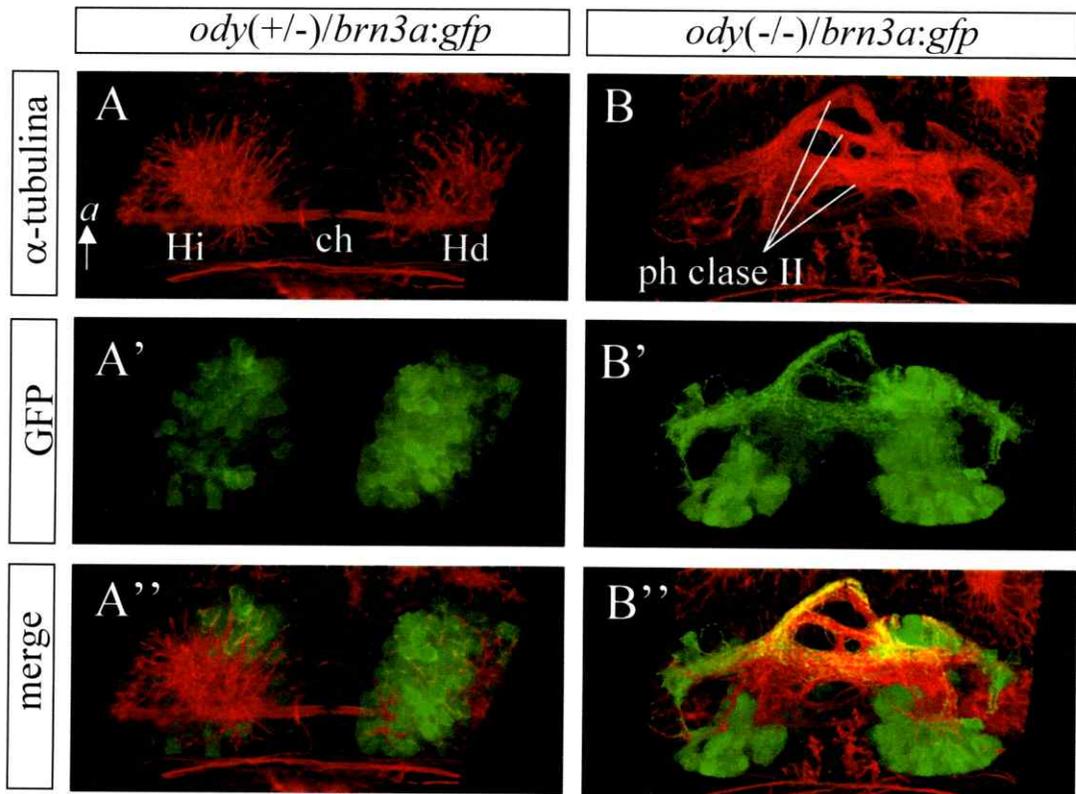


Figura 24. Análisis del carácter eferente de las proyecciones ectópicas habenulares en larvas *ody(-)/brn3a:gfp*. Las imágenes confocales muestran en canales separados el resultado de la inmunofluorescencia doble contra α -tubulina acetilada (A, B), GFP (A, B') con mayor expresión en la habénula derecha, y la fusión (merge) de ambas imágenes (A'', B''), respectivamente. Las proyecciones ectópicas habenulares (ph) de clase II formadas en *ody(-)/brn3a:gfp* muestran colocalización de ambos marcadores moleculares.

5.2. *ody(-)/ET16:gfp*

Los estudios de peces obtenidos de cruces entre mutantes *ody*^{-/-} y peces *ET16:gfp* proporcionan nuevas evidencias del origen habenular de las proyecciones ectópicas encontradas en mutantes *ody*^{-/-}. Los peces *ody*^(+/-)/*ET16:gfp* generados en estos cruces se crecieron hasta etapas reproductivas para obtener de ellos larvas *ody*^(-/-)/*ET16:gfp* identificados por marcación de neuromastos con DASPEI y por fluorescencia *in vivo* de GFP en el tracto H-IP. Al igual que en la línea anterior, un 25% de los embriones obtenidos en cada cruce son mutantes *ody*^{-/-} y una fracción de ellos son transgénicos GFP positivos. Entre las larvas seleccionadas encontramos nuevamente mutantes *ody*^{-/-} con proyecciones ectópicas habenulares GFP positivas. El análisis confocal de la inmunofluorescencia doble contra GFP y α -tubulina acetilada de estas larvas mostró la presencia de ambos marcadores moleculares en los axones ectópicos habenulares (Fig.25). En la mutante *ody*^{-/-} de la figura se puede observar además que la comisura habenular no expresa GFP, sólo α -tubulina acetilada, manteniéndose como una proyección axonal independiente que no contribuye a la formación de los axones ectópicos habenulares GFP positivos. Como indicamos anteriormente, la expresión de GFP en peces *ET16:gfp* está restringida principalmente a componentes del circuito H-IP, es decir, los núcleos habenulares, los eferentes habenulares, o fascículos retroflexos, y el NIP; por lo tanto, los axones ectópicos que se forman en mutantes *ody*^{-/-} son de origen habenular. Los resultados obtenidos con estas nuevas líneas transgénicas indican que las proyecciones habenulares ectópicas vistas en mutantes *ody*^{-/-} posiblemente corresponden a axones eferentes de origen habenular similares a los que forman los fascículos retroflexos, pero que por la ausencia de un receptor *Cxcr4b* funcional siguen rutas aleatorias debido a una pérdida de guía axonal.

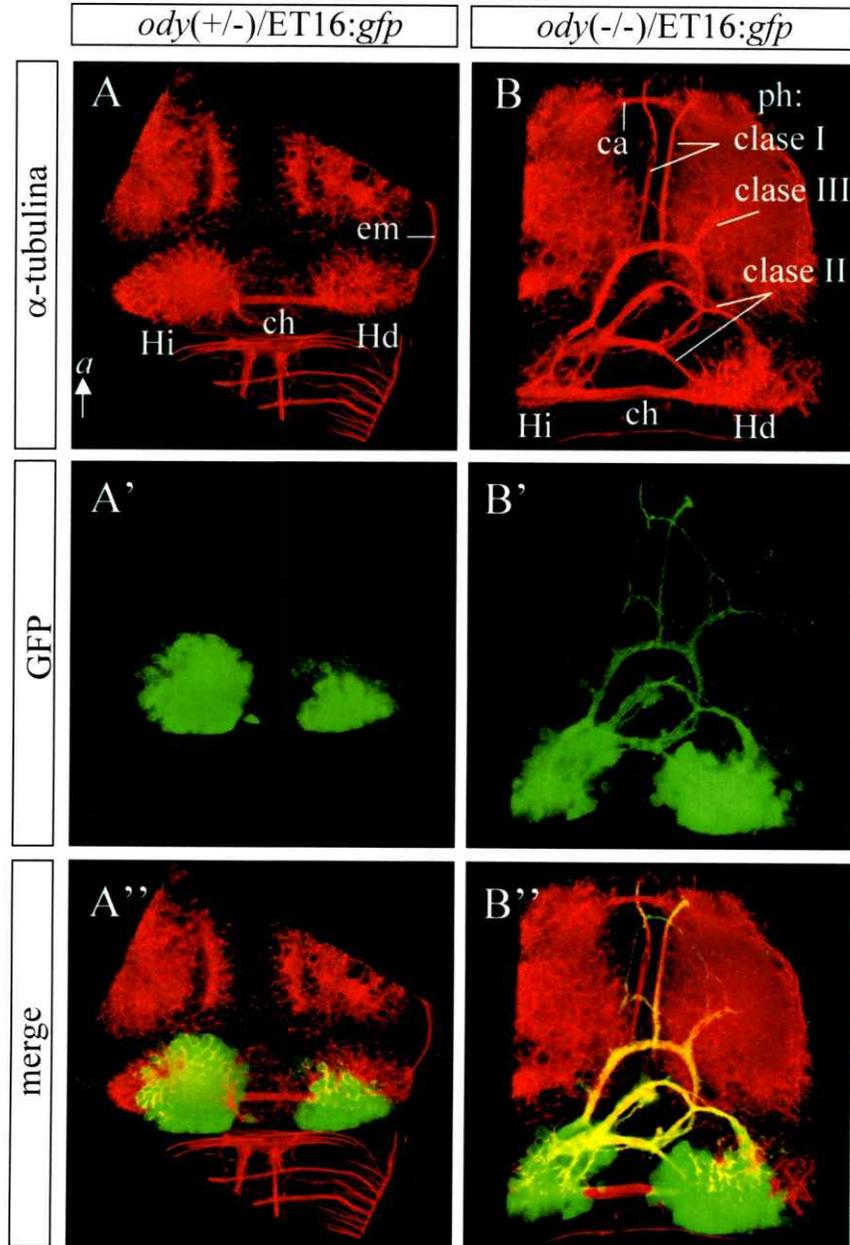


Figura 25. Análisis del carácter eferente de las proyecciones ectópicas habenulares en larvas *ody(-/-)/ET16:gfp*. Las imágenes confocales muestran en canales separados el resultado de la inmunofluorescencia doble contra α -tubulina acetilada (A, B), GFP (A, B') con mayor expresión en la habenula izquierda, y la fusión (merge) de ambas imágenes (A'', B''), respectivamente. En esta larva *ody(-/-)/ET16:gfp* se forman proyecciones ectópicas habenulares (ph) de clase I, II y III, y todas ellas muestran colocalización de ambos marcadores moleculares. En ambas larvas se puede observar que la comisura habenular (ch) no expresa GFP, como tampoco el segmento de estria medular visto en *ody(+/-)/ET16a:gfp*. Dos proyecciones de clase I alcanzan regiones anteriores del telencéfalo cercanas a la comisura anterior (ca).

DISCUSIÓN

Patrones de expresión de quimioquinas y su posible función en guía axonal

Los diversos procesos del desarrollo embrionario que involucran la vía de señalización de Sdf1a/Cxcr4b, entre ellos la migración del primordio de la LLP, migración de las células germinales, guía axonal de los células ganglionares de la retina y formación del sistema olfatorio, requieren la expresión de ligando y receptor de quimioquinas de acuerdo al desarrollo espacio-temporal de estos procesos. Una característica común en estos procesos es la separación espacial de los dominios de expresión para ligando y receptor. El grupo de células involucrado en procesos de migración (primordio de la LLP, células germinales) expresan el receptor Cxcr4b en la membrana celular, mientras que Sdf1a, el ligando que es secretado, se expresa en las regiones blanco y en la vía por donde se desplazan estas células (miosepto, región gonadal). Por su parte en los procesos de guía axonal el receptor se expresa en las regiones donde se localizan los cuerpos neuronales (retina, placoda olfatoria) que extienden procesos axonales en dirección a las fuentes de Sdf1a (tallo óptico, borde del bulbo olfatorio). Se ha demostrado que la única quimioquina que participa en estos procesos de guía axonal es Sdf1a, y su función principal sería permitir la salida de los axones hacia sus núcleos blanco.

Previo a la formación del sistema de conexiones del circuito H-IP observamos la expresión de *cxcr4b* en los núcleos habenuares izquierdo y derecho, mientras que en las regiones del borde posterior a estos núcleos se expresa *sdf1a*, sugiriendo que la posible función de Sdf1a en este sistema también es permitir la salida de axones, específicamente, las eferencias habenuares que forman los fascículos retroflexos que proyectan hacia el NIP.

Para el ligando *sdf1b* no se han descrito funciones específicas en procesos de migración celular o guía axonal. Sin embargo, la expresión inicial de este ligando en regiones del mesencéfalo ventral donde se forma el NIP, y su consiguiente expansión hacia regiones anteriores por donde tienen acceso los fascículos retroflexos, sugieren que *sdf1b* posiblemente permite la entrada de los axones hacia el NIP durante el

establecimiento del circuito H-IP. De esta manera *sdf1b* actuaría de forma complementaria con *sdf1a* durante la formación de este circuito, lo que también ha sido propuesto para el proceso de guía axonal de las células ganglionares de la retina donde se observa la expresión de *sdf1a* en el sector del tallo óptico más cercano a la salida de los axones de la retina, mientras que *sdf1b* se expresa en segmentos más distantes del tallo óptico. Nuestros resultados también muestran la expresión de *sdf1b* en el borde antero-lateral de la habénula, en las regiones por donde llegan las aferencias habenulares provenientes del palio a través de la estría medular. Estas observaciones sugieren que la posible función de Sdf1b en esta región es permitir la entrada de axones hacia la habénula. De esta manera ambos ligandos participarían en la formación del tracto H-IP con funciones complementarias: Sdf1a permite la salida de axones desde los núcleos habenulares, y Sdf1b, la entrada de axones a los núcleos blanco, es decir, habénula y NIP.

Penetrancia de la mutación de *cxcr4b*

Los fenotipos que produce la pérdida de función de *cxcr4b* en mutantes *ody*^{-/-} en la formación de la LLP y migración de las células germinales durante el desarrollo embrionario (Knaut y cols., 2003; Li y cols., 2004), fueron usados en la identificación de embriones y larvas mutantes *ody*^{-/-}. En base a los resultados obtenidos en estos análisis clasificamos dos subgrupos principales de mutantes *ody*^{-/-} de acuerdo al grado de severidad de los defectos encontrados en la formación de la LLP, y que denominamos grado 1 y grado 2. Ambos subgrupos de mutantes *ody*^{-/-} fueron analizados separadamente en los estudios de conectividad axonal del tracto H-IP, encontrando en cada subgrupo una proporción de mutantes que presentaban proyecciones axonales ectópicas habenulares (alrededor de 30%) siendo el resto mutantes *ody*^{-/-} con conectividad habenular normal. La incidencia de estos fenotipos es relativamente semejante para ambos subgrupos, pero la magnitud de estos defectos, indicado por la presencia de proyecciones ectópicas múltiples, es mayor en el grupo de mutantes clasificados como severos o grado 2. Estas observaciones corresponden a larvas *ody*^{-/-} obtenidos de peces *ody*^{+/-} de la primera generación o F1. Cuando se analizan mutantes

ody^{-/-} obtenidos de peces *ody*^{-/-}, o generación F2, la proporción de mutantes con alteraciones axonales a nivel habenular aumenta, llegando a encontrar en algunos casos hasta un 60% de mutantes con proyecciones axonales ectópicas. En estos mutantes también se observan fenotipos más severos en cuanto a la presencia de proyecciones múltiples y a la pérdida de conectividad eferente entre la habénula y el NIP. Estos resultados muestran la importancia de *Cxcr4b* en el desarrollo normal del circuito H-IP, ya que su ausencia produce que algunos axones tomen direcciones aberrantes disminuyendo a su vez el número de axones que llegan al NIP. Sin embargo, como vimos anteriormente, no todos los mutantes presentan alteraciones de conectividad habenular, lo que podría significar posibles actividades residuales del receptor *Cxcr4b* en los mutantes *ody*^{-/-} que explicarían los fenotipos parciales encontrados no sólo en la formación de este circuito, sino que también aquellos observados en los distintos procesos de migración celular y guía axonal estudiados con esta mutante. Esta posible actividad residual del alelo de la mutante *ody*^{-/-} ha sido sugerida para explicar por qué en mutantes de *cxcr4b ody*^{-/-} no se reproducen los efectos del bloqueo de *cxcr4b* con morfolinós en la pérdida de células ganglionares de la retina (Pujic y cols., 2006). Esto podría explicar también la variedad de fenotipos entre parciales y severos descritos en la formación de la LLP de los mutantes *ody*^{-/-}. En procesos de guía axonal de las neuronas sensoriales olfatorias que conectan con el bulbo olfatorio, los *ody*^{-/-} también presentan defectos variables de conectividad en un 40-56% de los mutantes, mientras que el porcentaje restante desarrolla una conectividad normal (Miyasaka y cols., 2007). La incidencia de estos defectos de guía axonal en el sistema olfatorio en desarrollo es semejante a lo observado en nuestros estudios del sistema H-IP, donde las proyecciones axonales ectópicas se presentan en un 50-60% de los mutantes en los casos más severos, mientras que el resto de ellos desarrolla conectividad normal. Estos datos indican que en los procesos de guía axonal los niveles de actividad de *Cxcr4b* que permiten el desarrollo normal de conectividad axonal probablemente sean menores a los niveles requeridos para los procesos de migración celular, y por ello todos los embriones *ody*^{-/-} muestran en grado variable defectos en la formación de la LLP y migración de las células germinales sin observarse fenotipos normales. Esta posible actividad residual de

cxcr4b en mutantes *ody*^{-/-}, responsable de los defectos parciales observados en los distintos procesos del desarrollo en que participa este receptor, podría significar una ventaja comparativa en el estudio de las funciones de *Cxcr4b* al permitir que estos embriones se desarrollen hasta estadios adultos con capacidad reproductiva, a diferencia de lo que ocurre en ratones donde la eliminación del gen *Cxcr4* es embriológicamente letal produciendo múltiples fenotipos que incluyen defectos serios en el desarrollo de los sistemas inmune, circulatorio y nervioso central (Tashibana y cols., 1998; Zou y cols., 1998).

Una explicación alternativa a la presencia de mutantes *ody*^{-/-} con desarrollo normal de conectividad axonal tiene relación con la posible participación de otras moléculas que adopten las funciones de *Cxcr4b* en estos procesos. Estos factores podrían ser moléculas de guía axonal que actúen en forma independiente del sistema de señalización *Sdf1a/Cxcr4b* como también factores que interactúen con esta vía. A este último caso podría pertenecer *Cxcr7*, un nuevo receptor de *Sdf1a* descrito primero en mamífero (Balabanian y cols., 2005), y que recientemente ha ganado importancia en pez cebra por sus funciones complementarias a *Cxcr4b* en los procesos de migración del primordio de la LLP (Dambly-Chaudiere y cols., 2007; Valentin y cols., 2007) y en la migración de las células germinales (Boldajipour y cols., 2008) a través de su interacción con el ligando *Sdf1a*. La expresión de *cxcr7* descrita en embriones de 24 hpf (Thisse y cols., 2001; Miyasaka y cols., 2007 en figura suplementaria) muestran patrones de expresión en el diencéfalo dorsal en regiones presuntivas de la zona anterior de los núcleos habenules y posiblemente en la habénula misma. En un embrión normal las funciones del receptor *Cxcr7* podrían incluir secuestro o internalización de *Sdf1a* generando de esta manera un gradiente del ligando, lo que permitiría que la guía axonal de los eferentes habenules producida por la señalización a través de *Cxcr4b* ocurra en los puntos con mayor concentración del ligando, es decir las regiones posteriores de la habénula. Al bajar los niveles de *Cxcr4b*, probablemente las funciones remanentes de *Cxcr7* en mutantes *ody*^{-/-} permiten la salida de los eferentes habenules resultando en desarrollo normal de conectividad habenules en aproximadamente la mitad de los mutantes, aunque también es posible que *Cxcr7* adquiriera nuevas funciones de guía

axonal en la ausencia de *Cxcr4b*, cuando las diferentes afinidades por el ligando ya no están consideradas. Un dato interesante es la ubicación de los genes *cxcr4* y *cxcr7* en posiciones vecinas del cromosoma 1 de ratón (Hessen y cols., 1998) y en el cromosoma 2 de humanos junto a otros dos receptores de quimioquina. Probablemente los genes homólogos en pez cebra presentan una organización genómica similar con una posible regulación transcripcional compartida que garantice las funciones complementarias de *Cxcr4b* y *Cxcr7*.

Otro resultado que llama la atención es la mayor proporción de larvas *ody*^{-/-} con defectos de guía axonal en el tracto H-IP encontrado en los cruces de padres *ody*^{-/-} (F2) en comparación con los obtenidos de padres *ody*^{+/-} (F1). Esto podría indicar la presencia de un componente materno en los embriones *ody*^{-/-} obtenidos de peces *ody*^{+/-} que minimizan los defectos de guía axonal producidos por la mutación de *cxcr4b*. Este componente se perdería en los embriones mutantes obtenidos de padres con genotipo *ody*^{-/-}. Sin embargo, este aspecto todavía debe ser investigado.

Efectos de la mutación de *cxcr4b*: proyecciones ectópicas habenuares

Entre los distintos fenotipos asociados al mutante *ody*^{-/-}, uno de los más notorios es la formación de prominentes proyecciones axonales ectópicas relacionadas a la habénula que abarcan extensas regiones dorsales del telencéfalo dorsal. Entre las diversas proyecciones ectópicas distinguimos dos patrones principales de conectividad en relación a la dirección que estos tractos axonales adoptan y que denominamos clase I y clase II. En los defectos de guía axonal de las neuronas olfatorias descritos en mutantes *ody*^{-/-} (Miyasaka y cols., 2007) se utilizó un criterio de clasificación de acuerdo a la severidad de los fenotipos encontrados (pérdida unilateral o bilateral de conectividad), y como veremos más adelante nuestra clasificación también podría estar directamente relacionada con efectos parciales o severos de la mutación de *cxcr4b*.

Entre las rutas preferentes que adoptan los axones ectópicos habenuares por la pérdida de función de *cxcr4b* describimos en un primer grupo las proyecciones ectópicas habenuares de clase I, que corresponden a extensas proyecciones axonales que conectan la habénula con el borde anterior del telencéfalo. Estas proyecciones han sido

observadas en mutantes *ody*^{-/-} que se obtienen ya sea de la generación F1 o F2 de mutantes, aunque en estos últimos sólo se observan en los mutantes clasificados como leves o grado 1 (en base a la formación incompleta de la LLP). El segundo grupo corresponde a las proyecciones axonales interhabenulares denominadas de clase II, que también se pueden observar en los distintos grupos de mutantes *ody*^{-/-}, pero con una mayor incidencia en los mutantes *ody*^{-/-} grado 2 (ausencia de LLP) que provienen de la generación F2.

Por lo tanto las proyecciones ectópicas de clase I están ausentes en los mutantes *ody*^{-/-} que tienen fenotipos severos en la pérdida de la LLP y mayor penetrancia de la mutación, es decir, *ody*^{-/-} grado 2 y obtenido de F2; mientras que en los mutantes con fenotipos leves se favorece la formación de estas proyecciones extensas de clase I. Una explicación de este fenómeno se basa en la posible actividad residual de *cxcr4b* en mutantes *ody*^{-/-}, que podría dar cuenta en principio de la extensión de estas proyecciones hasta el borde anterior del telencéfalo, y la ausencia de factores repelentes en esta región.

Los niveles residuales de *cxcr4b* en mutantes *ody*^{-/-} serían suficientes para interactuar con fuentes del ligando endógeno Sdf1a presentes en el borde anterior del telencéfalo, permitiendo que los axones habenulares sigan preferentemente la línea media dorsal del telencéfalo para alcanzar esta nueva región blanco. Los patrones de expresión de *sdf1a* en la región del telencéfalo que queda entre la placoda olfatoria y el bulbo olfatorio en estadio de 2 dpf. (Fig.A6, Miyasaka y cols., 2007) apoyan esta idea. Una evidencia experimental que muestra que la guía axonal de las proyecciones de clase I de mutantes *ody*^{-/-} es dependiente de la actividad de Sdf1a proviene de los resultados del bloqueo de *sdf1a* en mutantes *ody*^{-/-} mediante morfolinis. Las proyecciones de clase I que regularmente se forman en los mutantes *ody*^{-/-} controles desaparecen cuando se inyecta el morfolino de *sdf1a*, quedando además un pequeño segmento inicial de esta posible proyección de clase I que parece truncado (Fig.19). Interesantemente, todas las larvas mutantes inyectadas con morfolino de *sdf1a* pierden completamente la LLP, mientras que el grupo control de mutantes no inyectados presenta una proporción similar

de larvas con pérdida parcial o total de la LLP. Estos datos señalan nuevamente la relación entre pérdida completa de LLP y la ausencia de proyecciones de clase I.

La posible ausencia de quimiorrepelentes en la línea media dorsal del telencéfalo favorecería la dirección hacia anterior de las proyecciones de clase I, mientras que rutas alternativas, incluyendo la dirección normal, se verían bloqueadas por la presencia de quimiorrepelentes en regiones posteriores de la habénula. Moléculas candidatas que podrían cumplir este papel pertenecen a la familia de ligando/receptor Slit/ROBO de carácter repelente axonal, considerando no sólo sus patrones de expresión sino que también los efectos antagónicos que Sdf1a/Cxcr4b ejerce sobre estos factores durante la guía axonal de las células ganglionares de la retina en pez cebra (Chalasanani y cols., 2007). Al parecer esta interacción no ocurriría a través de una competencia entre factores quimioattractantes y quimiorrepelentes, ya que se ha demostrado *in vitro* que Sdf1a no presenta actividad atractante con varias clases de neuronas de vertebrados (Chalasanani y cols., 2003). Por otro lado, experimentos que producen la expresión ubicuota de *sdf1a* en embriones de 12 o 19 hpf sólo inducen un posicionamiento errado de las neuronas olfatorias, pero no los defectos de guía axonal de sus proyecciones con el bulbo olfatorio observados en mutantes *ody*^{-/-} (Miyasaka y cols., 2007). Por lo tanto, la posible función de Sdf1a sería reducir la respuesta de los conos de crecimiento a factores quimiorrepelentes, como ha sido demostrado *in vitro* (Chalasanani y cols., 2003) e *in vivo* (Chalasanani y cols., 2007), generando de esta manera un ambiente permisivo para la salida de axones hacia sus núcleos blanco. Posiblemente la vía de señalización Sdf1a/Cxcr4b también interactúa con Slit/ROBO durante la formación del sistema olfatorio, ya que se ha demostrado en forma independiente la participación de ambas vías en su desarrollo (Miyasaka y cols., 2005 y 2007), pero esto aún no ha sido investigado. Los patrones de expresión de estos factores repelentes también sugieren su participación en la formación del tracto H-IP, ya que las variantes génicas de *slit* se expresan en regiones de la línea media del cerebro posterior, y en los bordes del cerebro anterior, quedando ausente de la línea media dorsal del telencéfalo (Chalasanani y cols., 2007), la región por donde se extienden las proyecciones ectópicas habenulares de clase I. Llama la atención también la expresión de uno de los receptores de Slit, la variante 2

de *robo3*, detectada en el diencéfalo a los 2 dpf (Challa y cols., 2005) en una región que parece corresponder a los núcleos habenulares. La confirmación de este dato explicaría la tendencia en los mutantes *ody*^{-/-} a formar extensiones axonales que “escapan” de los núcleos habenulares al estar ausente la función antagónica de *Sdf1a/Cxcr4b*. Nuestras observaciones indican que las proyecciones axonales clase I de mutantes *ody*^{-/-} se extienden hasta las regiones del borde anterior del telencéfalo conectando posiblemente con el bulbo olfatorio ipsi o contralateral. Probablemente la participación activa de la vía *Sdf1a/Cxcr4b* y de *Slit/ROBO* descritos en esta zona influyen en la dirección de los axones ectópicos habenulares, aunque para analizar este punto se requieren experimentos con marcadores moleculares específicos de axones de neuronas olfatorias que indiquen si efectivamente el bulbo olfatorio es un núcleo blanco de las proyecciones habenulares descritas en este trabajo.

Como mencionamos anteriormente los mutantes *ody*^{-/-} con fenotipos más severos tienden a formar múltiples proyecciones ectópicas interhabenulares denominadas de clase II, y este parecería corresponder al fenotipo que produce los niveles más bajos de *cxcr4b* en mutantes *ody*^{-/-}. En estos casos los axones habenulares serían insensibles a fuentes lejanas de *Sdf1a* haciendo que los axones se mantengan en la vecindad de los núcleos habenulares, siendo las únicas zonas permisivas para su extensión las regiones dorsales que quedan entre los núcleos habenulares e inmediatamente anteriores a ellos.

Un tercer tipo de proyecciones ectópicas habenulares clasificadas como clase III, tiene como blanco principal la región del palio que se localiza en los bordes dorso-laterales del telencéfalo. En esta región se encuentran los núcleos que dan origen a los aferentes habenulares que forman la estría medular (Fig.A1). Estas proyecciones se podrían considerar como resultado de un grado de severidad intermedio entre las proyecciones de clase I y II y su formación tiene una mayor incidencia en los mutantes *ody*^{-/-} grado 2 de la F2, el grupo de mutantes que pierde las proyecciones de clase I. Una forma de interpretar estos resultados es que las proyecciones que no llegan a extenderse hasta el borde anterior del telencéfalo sólo alcanzan regiones mediales del telencéfalo, cruzando diagonalmente la línea media dorsal en la mayoría de los casos. Posibles

moléculas atrayentes para estos axones podrían incluir factores aún desconocidos que participan en la conectividad axonal de la red de núcleos aferentes habenulares localizados en el palio. Probablemente los dominios de expresión de *cxcr7* también incluyen esta región (Miyasaka y cols., 2007, en figura suplementaria) de tal manera que este receptor nuevamente podría estar participando en la guía axonal de los axones eferentes habenulares por la pérdida de función de *cxcr4b*.

De esta manera las tres clases de proyecciones descritas podrían reflejar tres rutas preferenciales que siguen los axones ectópicos habenulares establecidas de acuerdo a un gradiente antero-posterior del conjunto de señales que permiten la guía axonal de estas proyecciones ectópicas en la región dorsal del telencéfalo de mutantes *ody*^{-/-}. Los mutantes con fenotipos leves permiten la formación de proyecciones extensas de clase I, y los mutantes severos, proyecciones de clase II y III preferentemente.

La acumulación de proyecciones habenulares a distintos niveles entre la habénula y el borde anterior del telencéfalo en mutantes *ody*^{-/-} junto con los antecedentes de la pérdida de guía axonal de las células ganglionares de la retina y neuronas sensoriales olfatorias descritas en estos mutantes y que muestran proyecciones ectópicas que quedan dentro del ojo, en el primer caso, y entre la placoda olfatoria y el borde del telencéfalo, en el segundo, indican que la pérdida de función de *cxcr4b* afecta principalmente la salida de los axones eferentes durante la formación de estos circuitos.

Efectos de la mutación de *cxcr4b*: pérdida de conectividad H-IP

Asociado a la formación de proyecciones axonales habenulares en direcciones ectópicas se produce una pérdida de conectividad axonal con el NIP en mutantes *ody*^{-/-}. Esto se observó por análisis confocal de la marcación diferencial de los núcleos habenulares con trazadores lipofílicos y fotoconversión de la marcación de DiI en tractos H-IP unilaterales. Entre los fenotipos observados en esta mutante describimos la menor densidad axonal en la conectividad tipo anillo del NIP y defacilaciones de los eferentes habenulares. Esto indica que la pérdida de función del receptor *Cxcr4b* en los núcleos habenulares impide las posibles funciones del ligando *Sdf1a* presente en los bordes posteriores de la habénula, y de *Sdf1b*, expresado inicialmente en el NIP y luego

en la región por donde pasan los fascículos retroflexos. El modelo explicativo más simple es que estas quimioquinas actúan como quimioattractantes axonales que dirigen correctamente las proyecciones eferentes hacia el NIP. Sin embargo, los mutantes *ody*^{-/-} que tienen defectos de conectividad eferente presentan un grado variable de severidad cuando se comparan los tractos H-IP izquierdo y derecho, siendo afectada mayormente una de las dos proyecciones eferentes. Las proyecciones habenuares ectópicas también se forman preferentemente en uno de los dos núcleos habenuares, precisamente en el núcleo que pierde conectividad con el NIP. Estos efectos diferenciales en componentes bilaterales con respecto al eje izquierdo-derecho también se observan en mutantes *ody*^{-/-} con respecto a los otros procesos de guía axonal donde se ha descrito la participación de *Cxcr4b*. En la guía de axones retinales de mutantes *ody*^{-/-}, los defectos se observan en uno de los ojos solamente (Li y cols., 2005), mientras que los defectos de guía axonal de neuronas olfatorias entre los mutantes *ody*^{-/-} que presentan estas alteraciones la mitad son unilaterales y el resto bilaterales (Miyasaka y cols., 2007). En este último trabajo los autores explican que los defectos de guía axonal en mutantes *ody*^{-/-} ocurren de una manera de todo o nada. Al parecer la vía de señalización *Sdf1a/Cxcr4b* se requiere en etapas tempranas del crecimiento de axones pioneros hacia los puntos de salida, los que sirven como plataforma esencial para los siguientes axones en extensión. Si estos axones pioneros alcanzan un número umbral se establece una proyección sólida con el núcleo blanco con una conectividad normal. En el sistema H-IP todos los mutantes *ody*^{-/-} que tienen defectos de conectividad eferente muestran un grupo de axones que sale correctamente desde el borde posterior de la habénula para formar el tramo inicial del fascículo retroflexo, pero probablemente en un número insuficiente para establecer una conectividad normal con el NIP, ya que muchos de estos axones escogen puntos de salida ubicados en el borde anterior de la habénula. La salida de axones por puntos de salida opuestos al normal también se ha observado en las proyecciones axonales motoras de ratones en la ausencia de señalamiento de *Cxcr4*. En este sistema algunos axones de motoneuronas salen en forma aberrante por el punto de salida dorsal de la médula espinal en vez de hacerlo correctamente por el punto de salida ventral (Lieberam y cols., 2005). En mutantes *ody*^{-/-}, el tracto del fascículo retroflexo que logra formarse

inicialmente es compacto, pero luego presenta defasciculaciones axonales que indican la pérdida de guía axonal sugiriendo la posible participación de otros factores en las etapas finales de conectividad con el núcleo blanco. Entre estos posibles factores proponemos Sdf1b por su expresión en el NIP y en el paso de los axones eferentes en navegación, y cuya función se vería afectada al perderse la señalización con Cxcr4b en *ody*^{-/-}. A su vez también podrían participar factores repelentes del sistema Slit/ROBO expresados en la región medial del cerebro posterior. De esta manera una de las posibles funciones de las quimioquinas sería crear un ambiente permisivo para los eferentes habenules en su extensión al NIP al contrarrestar los efectos repelentes de estos factores permitiendo primero la salida de los axones eferentes y luego su extensión hacia el NIP.

En base a nuestras observaciones la conectividad normal de los fascículos retroflexos izquierdo y derecho con el NIP parece depender principalmente de la funcionalidad de las quimioquinas y su receptor Cxcr4b, ya que la acción específica de neuropilina 1a, un receptor de semaforina 3D expresado únicamente en la habénula izquierda y que guía los axones de los eferentes habenules izquierdo hacia la región dorsal del NIP (Kuan y cols., 2007), parece depender del número de axones que lleguen al NIP en mutantes *ody*^{-/-}, lo que indicaría que éste proceso fino de guía axonal es secundario durante la formación del tracto H-IP. La semaforina 3D por lo tanto surge como posible quimioattractante de los eferentes habenules del fascículo retroflexo izquierdo, mientras que los patrones de expresión de otras semaforinas y neuropilinas en la vecindad de ambos fascículos retroflexos y del NIP sugieren la participación de estas moléculas en conjunto con las quimioquinas en la guía axonal de los eferentes habenules.

Estudios funcionales de guía axonal por quimioquinas: eficiencia de morfollnos versus mutantes

Un aspecto importante para nuestra hipótesis de trabajo era demostrar la participación de las quimioquinas ligandos del receptor Cxcr4b en la formación del tracto H-IP. Para ello buscamos obtener fenocopias de las alteraciones de conectividad

habenular observadas en mutantes *ody*^{-/-} considerando que estos fenotipos son el resultado de una vía ligando/receptor no funcional.

La primera aproximación experimental fue el bloqueo de los ligandos mediante morfolinós específicos para *sdf1a* y *sdf1b* en embriones silvestres. Los morfolinós para *sdf1a* efectivamente producen defectos en la formación de la LLP en grado variable como ha sido descrito en la literatura, y este parámetro se utilizó en nuestro trabajo para medir la actividad del morfolino y seleccionar así los morfantes. Sin embargo, estas cantidades de morfolino no alteraron la conectividad habenular y fue necesario usar concentraciones mayores de morfolino de *sdf1a* para obtener proyecciones ectópicas habenulares en algunos de los embriones inyectados. Aunque se logró reproducir los fenotipos observados en mutantes *ody*^{-/-} a nivel habenular, estos eran de una incidencia y severidad menores, y las concentraciones más altas de morfolino usadas sólo alteraban el desarrollo normal de los embriones llegando a ser letales.

El uso de morfolinós para bloquear la función de las quimioquinas es efectivo principalmente en el estudio de los procesos de migración celular donde éstas participan. Sin embargo, en la guía axonal de las neuronas sensoriales olfatorias su acción es prácticamente nula, reproduciendo sólo en un 4% de los embriones inyectados los fenotipos que se observan en el 50% de los mutante *ody*^{-/-} (Miyasaka y cols., 2007); mientras que su eficiencia para producir errores en la guía de los axones ganglionares de la retina no puede ser determinado *per se* ya que los defectos encontrados se obtuvieron en embriones coinyectados con morfolino para *sdf1a* y *cxcr4b* (Li y cols., 2005). Esto podría indicar la influencia de dos factores principales que afectarían la eficiencia del morfolino: la concentración efectiva de quimioquina requerida para cada proceso y la etapa del desarrollo en que éste ocurre. El primero ha sido sugerido por Miyasaka y cols., 2007, en cuanto a que los procesos de migración celular posiblemente requieren mayores cantidades de quimioquina en comparación con los procesos de guía axonal, de tal manera que mínimas cantidades de quimioquina no bloqueadas por el morfolino serían suficientes para llevar a cabo los procesos de guía axonal. El segundo factor tiene relación con la probable disminución de la eficiencia del morfolino para interferir la función de las quimioquinas en procesos que ocurren en etapas del desarrollo

relativamente tardías. Los procesos de migración celular donde participan las quimioquinas ocurren dentro del primer día del desarrollo de pez cebra, mientras que los procesos de guía axonal de los ganglios retinales y neuronas olfatorias se establecen durante el segundo día. En nuestro trabajo hemos visto que la formación del tracto H-IP ocurre entre 2.5 y 3 dpf. Por lo tanto ambos factores podrían disminuir las posibilidades de eliminar eficazmente la función de las quimioquinas en procesos de guía axonal del tracto H-IP mediante morfolinós.

Una alternativa para el estudio de la función de *Sdf1a* en la formación del tracto H-IP se basa en la reciente descripción de la mutante de *sdf1a* denominada *medusa*. El análisis de conectividad habenular de mutantes *med*^{-/-} seleccionados por los defectos en la formación de la LLP muestra claramente fenocopias de las tres clases de proyecciones axonales ectópicas observadas en mutantes *ody*^{-/-} con una incidencia de hasta un 40% en algunos de los grupos estudiados. Estos mutantes *med*^{-/-} se obtuvieron de padres *med*^{+/-}, es decir, corresponderían a mutantes de primera generación o F1, y comparativamente, un 40% de larvas *med*^{-/-} con proyecciones ectópicas habenulares es relativamente mayor al porcentaje de mutantes *ody*^{-/-} de F1 que presentan estas proyecciones, acercándose más al porcentaje encontrado en *ody*^{-/-} de una F2. Además todos los mutantes *med*^{-/-} identificados se podrían clasificar como mutantes grado 2 por la ausencia total de la LLP. Esto indicaría que la pérdida de función de *sdf1a* en estas mutantes probablemente tiene un mayor efecto que la mutación de *cxcr4b* tanto en procesos de migración celular como en funciones de guía axonal, y esto podría reflejar el requerimiento específico de este ligando para activar no sólo a *Cxcr4b* sino que también *Cxcr7*, el segundo receptor de quimioquina necesario para la formación de la LLP (Valentin y cols., 2007).

Hasta la fecha no hay reportes de estudios funcionales de *Sdf1a* en procesos de guía axonal usando peces *med*^{-/-}, y en base a los resultados obtenidos en estos experimentos, podríamos decir que el uso de esta mutante presenta claras ventajas con respecto al bloqueo de la función de *sdf1a* con morfolinós, que ha sido la principal estrategia experimental en los estudios de la participación de esta quimioquina en procesos de guía axonal en pez cebra.

Al igual que en mutantes *ody*^{-/-}, no todos los *med*^{-/-} presentan alteraciones de conectividad habenular, lo que sugiere la participación de otros factores que compensan la ausencia de Sdf1a. Entre ellos podríamos mencionar a Sdf1b, que aunque en etapas iniciales no se expresa en los puntos de salida de los eferentes habenulares, luego en etapas posteriores llega a expresarse en la vecindad de esta región donde la acción quimioattractante de Sdf1b, demostrada en experimentos de sobreexpresión local de este ligando en regiones cercanas a los axones retinales (Li y cols., 2005), podría estar ejerciendo funciones complementarias de guía axonal en la formación del tracto H-IP. También es posible la existencia de vías de señalización aún desconocidas que normalmente actúen en conjunto con la vía Sdf1a/Cxcr4b durante la formación del tracto H-IP, pero que dentro del nuevo contexto generado por la ausencia de Sdf1a podrían adquirir mayor relevancia, aunque por la incidencia de los fenotipos observados su participación sería en forma estocástica.

Todavía queda por resolver cuál es la función exacta de Sdf1a en la formación del circuito H-IP y si ésta actividad es la misma en todos los procesos de guía axonal en que participa. Su función como quimioattractante de conos de crecimiento axonal sólo ha sido sugerida en el sistema de células ganglionares de la retina (Li y cols., 2005), aunque en forma indirecta, ya que los experimentos que muestran estas propiedades fueron dirigidos sólo para el estudio de *sdf1b*. Como mencionamos anteriormente una posible función de Sdf1a es crear un ambiente permisivo que modifique la respuesta de los axones a otros factores. Se sabe por ejemplo que la respuesta de los conos de crecimiento a algunas moléculas guía como netrina y semaforinas varía dependiendo de los niveles intracelulares de los segundos mensajeros Ca^{2+} , AMP cíclico (cAMP) y GMP cíclico (cGMP) (Song y Poo, 1999). Sdf1a vía Cxcr4b señala a través de la proteína Gi disminuyendo por lo tanto los niveles de cAMP (Tran y Miller, 2003). Estudios en *Xenopus* han demostrado que la respuesta de los conos de crecimiento a muchos factores de guía axonal podrían ser de atracción o de repulsión dependiendo de si el nivel de cAMP dentro de la neuronas es alto o bajo, respectivamente (Ming y cols., 1997; Song y cols., 1997 y 1998). En pez cebra se ha visto que la actividad diferencial de la proteína kinasa A (PKA) entre la placoda olfatoria y el borde del bulbo olfatorio regula la guía

axonal de los axones sensoriales hacia el bulbo olfatorio (Yoshida y cols., 2002) y dado que los efectos de cAMP pueden ser mediados por PKA, la expresión de *sdf1a* en esta región sugiere fuertemente su papel en la regulación de estas funciones (Miyasaka y cols., 2007). De esta manera la pérdida de función de *sdf1a* produciría un nuevo contexto para las moléculas de guía axonal alterando la formación de circuitos axonales en forma evidente, mientras que la sobreexpresión localizada de *sdf1a* en regiones cercanas a estos circuitos en embriones normales no produciría defectos notorios en la guía axonal, como ha sido demostrado para los axones que conectan con el bulbo olfatorio (Miyasaka y cols., 2007).

Se espera que la formación de proyecciones habenulares ectópicas en mutantes *med-/-* esté asociada también a la pérdida de conectividad eferente con el NIP como vimos en mutantes *ody-/-*, ya que la salida normal de los eferentes habenulares estaría seriamente afectado por la pérdida de función de *sdf1a*, pero esto aún debe ser analizado.

Identificación de las proyecciones ectópicas habenulares en mutantes *ody-/-*

Dentro de las opciones del origen y la identidad de las proyecciones habenulares ectópicas formadas en larvas por la pérdida de función de *cxcr4b* se consideran en primer lugar como posible fuente los axones propios del circuito T-H-IP que incluyen los aferentes, comisuras y eferentes habenulares, ya que en todos los casos analizados las proyecciones axonales ectópicas se conectan con por lo menos uno de los núcleos habenulares sin encontrar segmentos de proyecciones aislados en la vecindad. Un posible origen externo de estos axones, es decir, proyecciones provenientes de otros circuitos neuronales también alterados por la mutación de *cxcr4b* se descartan de acuerdo a los datos de la literatura que indican que los axones que pierden guía axonal en la retina quedan dentro del ojo y no salen hacia el tallo óptico (Li y cols., 2005), y lo mismo ocurre con los axones de la placoda olfatoria que quedan en el límite del borde anterior del telencéfalo y la placoda sin salir hacia el bulbo olfatorio (Miyasaka y cols., 2007).

Las marcaciones habenulares con trazadores lipofílicos muestran que estas proyecciones ectópicas están en contacto físico directo con los núcleos habenulares a nivel de membranas celulares y de acuerdo a nuestras observaciones los únicos tractos axonales que se marcan por difusión del trazador son las aferencias provenientes de núcleos ventro-laterales de la eminencia talámica y los eferentes habenulares que forman los fascículos retroflexos a través de los cuales se marca el NIP, quedando descartados la comisura habenular y las aferencias de la estría medular. En experimentos de doble marcación con trazadores en forma diferencial para la habénula y estría medular se pudo observar que este tracto ingresa a la habénula sin marcar este núcleo por difusión del trazador, manteniéndose como un tracto independiente dentro de la habénula. Además la marcación específica de un núcleo habenular no marca el núcleo contralateral por difusión del trazador a través de la comisura habenular lo que significa que este tracto también es independiente de la habénula. De esta manera las probabilidades de que las proyecciones ectópicas correspondan a eferentes habenulares aumentan si consideramos además el fenotipo asociado de pérdida de conectividad eferente con el NIP observado en los mutantes *ody*^{-/-}. Las evidencias moleculares que señalan finalmente la naturaleza axonal eferente de estas proyecciones se basan en el uso de dos líneas transgénicas de peces que expresan GFP en el tracto H-IP llamadas *brn3a:gfp* y *ET16:gfp* descritas recientemente. Una característica común para ambas líneas de peces es la expresión específica de GFP en componentes del tracto H-IP que incluyen la habénula, fascículos retroflexos y NIP, no observándose expresión de GFP en estría medular, comisura habenular y aferencias ventro-laterales en los estadios analizados. Ambas líneas transgénicas mutantes *ody*^{-/-} muestran proyecciones ectópicas GFP positivas, es decir, los diferentes dominios de expresión de GFP en la habénula de ambas líneas contribuyen a la formación de estas proyecciones por lo tanto éstas no son exclusivas de alguna subregión habenular definida por estos transgénicos. Los fascículos retroflexos también son GFP positivos en ambas líneas aunque con distinta intensidad de acuerdo a si provienen de la habénula izquierda o derecha. Por otro lado, todas las proyecciones ectópicas detectadas con el marcador general de α -tubulina son GFP positivas, por lo

tanto no existen axones provenientes de otras regiones que contribuyan a la formación de estas proyecciones ectópicas.

Los mutantes transgénicos analizados en estos experimentos corresponden a mutantes *ody*^{-/-} de primera generación o F1 ya que provienen de padres *ody*^{+/-} y en ellos se puede observar la formación de las distintas clases de proyecciones ectópicas que hemos descrito, en particular en el mutante *ody*^(-/-)/*ET16:gfp* de la Fig.25 donde se puede apreciar los tres tipos de proyecciones formando un complejo patrón de conectividad ectópica. La simple observación de la red axonal de este circuito sugiere la presencia de un gradiente de señales de guía axonal en el eje antero-posterior que se establece en la superficie del telencéfalo dorsal de mutantes *ody*^{-/-}. Estas señales tendrían su centro en la parte anterior del telencéfalo y se canalizarían a través de la línea media dorsal distribuyéndose en forma radial. Las proyecciones que se forman en la regiones cercanas a los núcleos habenules (clase II) se extienden entre ellos formando semicírculos que aumentan de amplitud en dirección anterior para luego abrirse en bifurcaciones que generan proyecciones rectas que llegan hasta el palio (clase III), o hasta el borde anterior del telencéfalo (clase I). Como mencionamos anteriormente este gradiente se podría generar en mutantes *ody*^{-/-} por la expresión anterior de *sdf1a*, la actividad residual de *cxcr4b* (o de *cxcr7*) en los núcleos habenules y la ausencia de repelentes en la región dorsal del telencéfalo. Un análisis temporal del desarrollo de estos circuitos en mutantes *ody*^{-/-}, y en particular estudios de conectividad de neuronas individuales, mostraría la secuencia de eventos que llevan a su formación revelando los vectores que siguen las múltiples proyecciones, el grado de dependencia entre ellas y su relación con la pérdida de conectividad con el NIP.

CONCLUSIÓN

En este estudio demostramos la participación de la vía de señalización Sdf1a/Cxcr4b en el establecimiento del circuito H-IP durante el desarrollo de pez cebra, siendo éste el primer antecedente que involucra a las quimioquinas en la formación de este sistema de conducción altamente conservado entre los vertebrados. Los fenotipos anormales de conectividad habenular observados en larvas que tienen pérdida de función del receptor Cxcr4b o de su ligando Sdf1a son el resultado de una alteración en la guía axonal de los eferentes habenulares y no es producto de efectos indirectos derivados de mal posicionamiento o especificación de los núcleos neuronales involucrados.

Durante el desarrollo del circuito H-IP (Fig.26) la expresión del ligando Sdf1a en los bordes posteriores de la habénula permite que los axones eferentes habenulares que expresan el receptor Cxcr4b se dirijan hacia los puntos de salida localizados en esta región formando los fascículos retroflexos que se extienden hacia regiones posteriores del mesencéfalo ventral. La expresión de Sdf1b en el NIP permite la entrada de los eferentes habenulares a este núcleo donde se segregan de acuerdo al origen habenular izquierdo-derecho de estos axones. La presencia de una vía de señalización Sdf1a/Cxcr4b inactiva altera la guía de estos axones haciendo que los eferentes habenulares se dirijan hacia puntos de salida opuestos al normal para luego proyectarse hacia regiones anteriores del cerebro. La extensión de estas proyecciones ectópicas y las regiones blanco que conectan parecen ser estereotipadas y posiblemente responden a un gradiente de señales aún desconocido que se manifiesta al perderse la función de esta quimioquina.

Los resultados obtenidos con las líneas mutantes *ody*^{-/-} transgénicas que expresan GFP en el tracto H-IP se consideran como la primera evidencia molecular de la naturaleza eferente habenular de las proyecciones ectópicas que se forman por pérdida de señalización de la vía Sdf1a/Cxcr4b, descartándose la contribución de aferencias habenulares y comisura habenular en la formación de estas proyecciones.

Todavía queda por resolver si las quimioquinas Sdf1a y Sdf1b actúan como quimioattractantes de los eferentes habenulares o si son moléculas que modifican la

respuesta de los conos axonales a otros factores de guía axonal. Experimentos de sobreexpresión local de las quimioquinas serán determinantes en la resolución de esta interrogante.

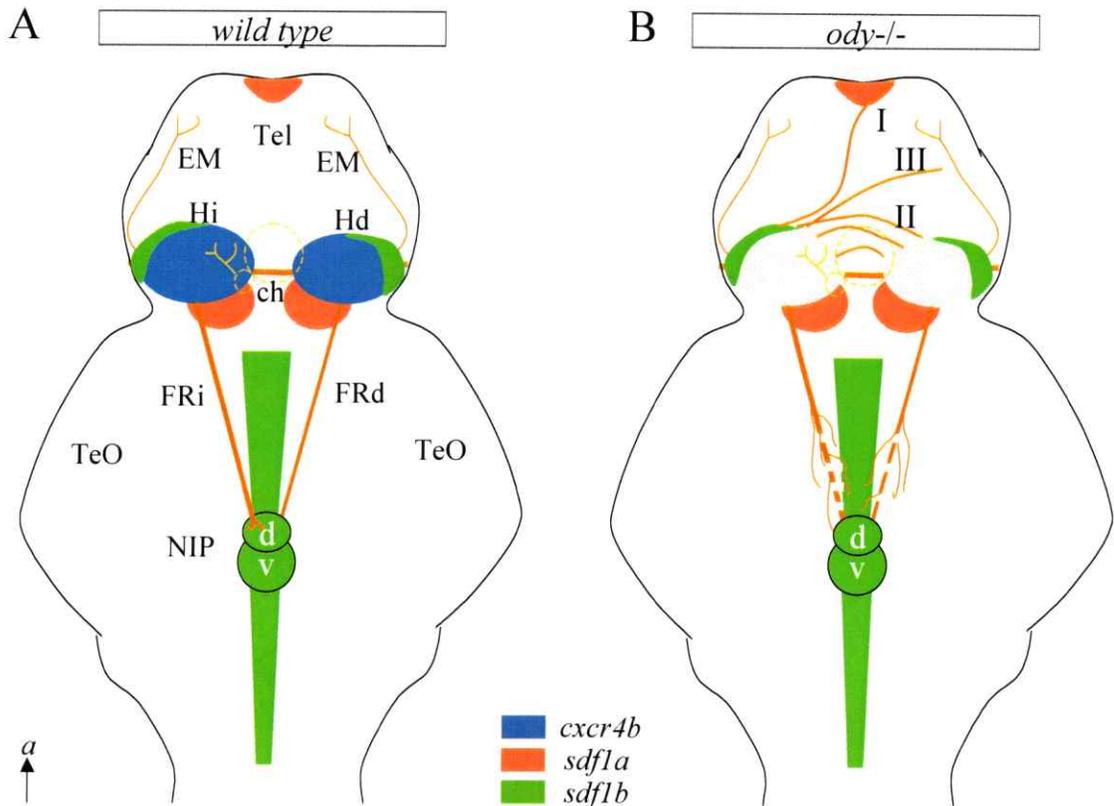


Figura 26. Diagrama esquemático del cerebro de larvas de pez cebra que muestra el papel de las quimioquinas en el establecimiento de la conectividad habénulo-interpeduncular. **A**, la expresión del receptor *cxcr4b* (azul) en la habénula y del ligando *sdf1a* (rojo) en el borde posterior de la habénula permite la salida de los axones eferentes organizados en los fascículos retroflexos izquierdo y derecho (FRi, FRd). La expresión del ligando *sdf1b* en el NIP (verde) posiblemente participa en la guía de los eferentes habenuares hacia este núcleo. **B**, cuando la actividad de *cxcr4b* está ausente en mutantes *ody^{-/-}*, los axones eferentes habenuares son guiados en forma errada hacia tres regiones blanco principales: el borde anterior del telencéfalo (I), la habénula contralateral (II) y regiones del palio (III). Este fenotipo está asociado a una pérdida de conectividad axonal con el NIP y desfasciculación de las proyecciones eferentes habenuares. La pérdida de función de *sdf1a* en peces mutantes *med^{-/-}* fenocopia las proyecciones ectópicas habenuares observadas en *ody^{-/-}*, siendo probable que la secuencia de eventos que llevan a una pérdida de conectividad eferente con el NIP también esté presente en *med^{-/-}*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aizawa, H., Bianco, I.H., Hamaoka, T., Miyashita, T., Uemura, O., Concha, M.L., Russell, C., Wilson, S.W. and Okamoto, H. 2005. A novel feature of CNS circuitry by which left-right information from the forebrain laterotopically represented along the dorso-ventral axis of a midbrain target nucleus. *Curr. Biol.* 15: 238-243.
- Aizawa, H., Goto, M. Sato, T. and Okamoto, H. 2007. Temporally regulated asymmetric neurogenesis causes left-right difference in the zebrafish habenular structures. *Dev. Cell* 12: 87-98.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K.Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M. and Bachelier, F. 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 280: 35760-35766.
- Bianco, I.H., Carl, M., Russell, C., Clarke, J.D. and Wilson, S.W. 2008. Brain asymmetry is encoded at the level of axon terminal morphology. *Neural Dev.* 3: 9
- Boldajipour, B., Mahabaleswar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q. and Raz, E. 2008. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132: 463-473.
- Chalasani, S.H., Sabelko, K.A. Sunshine, M.J., Littman, D.R. and Raper, J.A. 2003. A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *J. Neurosci.* 23: 1360-1371.
- Chalasani, S.H., Sabol, A., Xu, H., Gyda, M.A., Rasband, K., Granato, M., Chien, C.B. and Raper, J.A. 2007. Stromal cell-derived factor-1 antagonizes slit/robo signaling in vivo. *J. Neurosci.* 27: 973-80.
- Challa, A.K., McWhorter, M.L., Wang, C., Seeger, M.A. and Beattie, C.E. 2005. Robo3 isoforms have distinct roles during zebrafish development. *Mech. Dev.* 122: 1073-86.
- Charo, I.F. and Ransohoff, R.M. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354: 610-621.
- Chong, S.W., Emelyanov, A., Gong, Z. and Korzh, V. 2001. Expression pattern of two zebrafish genes, *cxcr4a* and *cxcr4b*. *Mech. Dev.* 109: 347-354.
- Concha, M.L., Burdine, R.D., Russell, C., Schier, A. F. and Wilson, S.W. 2000. A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron* 28: 399-409.
- Concha, M.L. and Wilson, S.W. 2001. Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J. Anat.* 199: 63-84.
- Concha, M.L., Russell, C., Reagan, J.C., Tawk, M., Sidi, S., Gilmour, D.T., Kapsimali, M., Sumoy, L., Goldstone, K., Amaya, E. Kimelman, D., Nicolson, T., Gründer, S., Gomperts, M., Clarke, J.D. and Wilson, S.W. 2003. Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality. *Neuron* 39: 423-438.
- Dambly-Chaudiere, C., Cubedo, N., and Ghysen, A. 2007. Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev. Biol.* 7: 23.

- David, N.B., Sapede, D., Saint-Etienne, L., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudiere, C., Rosa, F.M. and Ghysen, A. 2002. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 16297-16302.
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Köprunner, M., Dörries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T. and Raz, E. 2002. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111: 647-659.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.-L. and Postlethwait, J. 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531-1545.
- Fricke, C., Lee, J.S., Geiger-Rudolph, S., Bonhoeffer, F. and Chien, C.B. 2001. *astray*, a zebrafish roudabout homolog required for retinal axon guidance. *Science* 292: 507-510.
- Gamse, J.T., Thisse, C., Thisse, B., and Halpern, M.E. 2003. The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalons. *Development* 130: 1059-1068.
- Gamse, J.T., Kuan, Y.S., Macurak, M., Brösamle, C., Thisse, B., Thisse, C., and Halpern, M.E. 2005. Directional asymmetry of the zebrafish epithalamus guides dorsoventral innervation of the midbrain target. *Development* 132: 4869-4881.
- Gilmour, D.T., Maischein, H.M. and Nüsslein-Volhard, C. 2002. Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* 34: 577-588.
- Heesen, M., Berman, M.A., Charest, A., Housman, D., Gerard, C. and Dorf, M.E. 1998. Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1. *Immunogenetics* 47: 364-370.
- Hendricks M and Jesuthasan S. 2007. Asymmetric innervation of the habenula in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 502: 611-9.
- Higashijima, S., Nose, A., Eguchi, G., Hotta, Y. and Okamoto, H. 1997. Mindin/F-spondin family: novel ECM proteins expressed in the zebrafish embryonic axis. *Dev. Biol.* 192: 211-227.
- Hutson, L.D. and Chien, C-B. 2002. Pathfinding and error correction by retinal axons: the role of *astray/robo2*. *Neuron* 33: 205-217.
- Kim, C.H., Bae, Y.K., Yamanaka, Y., Yamashita, S., Shimizu, T., Fujii, R., Park, H.C., Yeo, S.Y, Huh, T.L, Hibi, M. and Hirano, T. 1997. Overexpression of neurogenin induces ectopic expression of HuC in zebrafish. *Neurosci. Lett.* 239: 113-116.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
- Knaut, H., Steinbeisser, H., Schwarz, H. and Nüsslein-Volhard, C. 2002. An evolutionary conserved region in the *vasa* 3'UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish. *Curr. Biol.* 12: 454-66.
- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., The Tübingen Screen Consortium and Nüsslein-Volhard, C. 2003. A zebrafish homologue of the chemokine receptor *Cxcr4* is a germ-cell guidance receptor. *Nature* 421: 279-282.
- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B. and Raz, E. 2001. A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* 15: 2877-2885.

- Kuan, Y.S., Yu, H.H., Moens, C.B. and Halpern, M.E. 2007 Neuropilin asymmetry mediates a left-right difference in habenular connectivity. *Development* 134: 857-65.
- Li, Q., Shirabe, K. and Kuwada, J.Y. 2004. Chemokine signaling regulates sensory cell migration in zebrafish. *Dev. Biol.* 269: 123-136.
- Li, Q., Shirabe, K., Thiesse, C., Thiesse B, Okamoto H., Masai, I. and Kuwada, J. 2005. Chemokine signaling guides axons within the retina in zebrafish. *J. Neurosci.* 25: 1711-1717.
- Lieberam, I., Agalliu, D., Nagasawa, T., Ericson, J. and Jessell, T. M. 2005. A Cxcl12-Cxcr4 chemokine signaling pathway defines the initial trajectory of mammalian motor axons. *Neuron* 47: 667-679.
- Ming, G.L., Song, H.J., Berninger, B., Holt, CE., Tessier-Lavigne, M. and Poo, M-m. 1997. cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19: 1225-1235.
- Minina, S., Reichman-Fried, M., and Raz, E. 2007. Control of receptor internalization, signaling level, and precise arrival at the target in guided cell migration. *Curr. Biol.* 17: 1164-1172.
- Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S.Y., Hutson, L.D., Chien, C.B., Okamoto, H. and Yoshihara, Y. 2005. Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development* 132: 1283-93.
- Miyasaka N., Knaut H. and Yoshihara Y. 2007. Cxcl12/Cxcr4 chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system. *Development* 134: 2459-68.
- Mizoguchi, T., Verkade, H., Heath, J.K., Kuroiwa, A. and Kikuchi, Y. 2008. Sdf1/Cxcr4 signaling controls the dorsal migration of endodermal cells during zebrafish gastrulation. *Development* 135: 2521-2529.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Plump, A.S., Tessier-Lavigne, M. and Chédotal, A. 2002. Slit1 and Slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. *J. Neurosci.* 22: 5473-5475.
- Pujic, Z., Omori Y., Tsujikawa, M., Thisse, B., Thisse, C. and Malicki, J. 2006. Reverse genetic analysis of neurogenesis in the zebrafish retina. *Dev. Biol.* 293: 330-347.
- Song, H.J., Ming, GL. and Poo, M-m. 1997. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388, 275-279.
- Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., Tessier-Lavigne, M. and Poo, M-m. 1998. Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 281: 1515-1518.
- Song, H.J. and Poo, M.M. (1999). Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr Opin Neurobiol* 9: 355-363.
- Sutherland, R.J. 1982. The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 6: 1-13.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., Kishimoto, T. and Nagasawa, T. 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393: 591-594.

Thisse, B., Pflumio, S., Fürthauer, M., Loppin, B., Heyer, V., Degrave, A., Woehl, R., Lux, A., Steffan, T., Charbonnier, X.Q. and Thisse, C. 2001. Expression of the zebrafish genome during embryogenesis (NIH R01 RR15402). ZFIN Direct Data Submission (<http://zfin.org>).

Tran, P. B. and Miller, R. J. 2003. Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 444 -455.

Valentin G., Hass P. and Gilmour D. 2007. The chemokine Sdf1 coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Curr. Biol.* 17: 1026-1031.

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

Yoshida, T., Ito, A., Matsuda, N. and Mishina, M. 2002. Regulation by protein kinase A switching of axonal pathfinding of zebrafish olfactory sensory neurons through the olfactory placode-olfactory bulb boundary. *J. Neurosci.* 22: 4964 -4972.

Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I. and Littman, D.R. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393: 595-599.

