



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**ESTUDIO COMPARADO DEL DESARROLLO DE
ASIMETRÍA CEREBRAL EN EL EPITÁLAMO DE PEZ
CEBRA (*Danio rerio*) Y PEZ MEDAKA (*Oryzias latipes*)**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO de

JAVIERA RÍOS CASTILLO

PROFESOR PATROCINANTE
Dra. Daniela Seelenfreund H.
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

DIRECTORES DE MEMORIA
Dr. Miguel Concha N.
Laboratorio de Estudios Ontogénicos
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dra. Iskra Signore A.
Laboratorio de Estudios Ontogénicos
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Santiago 2018

FINANCIAMIENTO

- FONDECYT, Proyecto Regular 1161274
- Iniciativa Científica Milenio, ICM P-09-015-F
- CONICYT, PIA ACT1402
- FONDAP 15150012

CONGRESO

- XII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Neurociencia 2017. Castro, Chile. **Poster: Epithalamic asymmetries: comparative approach of neurogenesis in zebrafish and medaka.** Ríos J., Signore I.A. and Concha M. L. Laboratory of Experimental Ontogeny, ICBM, Faculty of Medicine, Universidad de Chile; Biomedical Neuroscience Institute; Center for Geroscience, Brain Health and Metabolism.

Esta memoria está dedicada a mi tío Carlos,
su recuerdo siempre estará en nuestros corazones.

A mi amiga Karla,
que su alegría y amor le permita seguir hacia adelante.

I. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, por su cariño y amor incondicional, ser siempre mi mayor apoyo para todas las decisiones que he tomado y nunca dejar que me rinda. A mis hermanos; por estar ahí cuando necesitaba un descanso, hacerme reír con sus tonteras y nunca dudar de lo que soy capaz. Los amo.

También a Franco, por estar conmigo desde que comencé esta última etapa, alentarme a dar siempre mi mejor esfuerzo, su paciencia infinita y nunca perder la fe.

A Alida, una gran entrenadora, que me enseñó a mantener la mirada en alto, potenciarme y guiarme hasta el final.

También agradecer los miembros de LEO Lab; al jefe Miguel Concha, que me recibió en su laboratorio en mi primera unidad de investigación y siempre se tomó el tiempo y la paciencia para escuchar y ayudarme.

A Ailen (Ailencilla, la jefa, la jefaza); que me adoptó desde pequeña y lentamente me enseñó a ser autosuficiente, a sacar lo mejor de mí y además me ofreció su amistad, el sabio consejo, paciencia (infinita paciencia) y cariño.

A los master; Germán “pelao dame mate” Reig por su incondicional ayuda, la paciencia, los consejos y la amistad y Nestor “Nesturri” Guerrero, por su casi silenciosa compañía y sus bien camuflados consejos sobre la vida y la ciencia . A Karina, Yoya, Patricio “pregunta filosófica sin respuestas” Ahumada, Jani, Camilito Camilito, Fran, Andrea, Nancy, Toledo, Jorge J, Eduardito, Margarita, Claudia, Jasmín, Marisel; por la compañía, el ánimo, las risas, los consejos, los coffe breaks y ser siempre razones para alegrar las mañanas y las tardes. Y a Luchito y José porque sin ellos esto no hubiese resultado jamás! Y a Ro, que apareció en el momento indicado y me ayudó a continuar.

A los apañadores; Nané, Loreto, Nacho y Fabrizio, por el “descanso de media tarde”, la compañía trabajando los fines de semana, los carretes, las risas y las puteadas a la ciencia.

A mis amigas de bachillerato; Carla y Pauli, por todos los momentos compartidos dentro y fuera de la universidad, la complicidad, las copuchas, los carretes, pero sobretodo el fiel compañerismo y las risas, que agregaron a estos años hermosos recuerdos.

A las Yevenes! Yevenes Rubi, Yevenes Alanis y Yevenes Maquita, por lograr el balance perfecto entre disciplina y procrastinación, por esas tardes eternas en la

biblioteca, los almuerzos junto a Casimiro y el Rucio y por ser siempre una gama variada de conversaciones sin final.

A Carito Rehbein; por su hermosa personalidad y tener siempre a disposición un consejo sabio, una frase célebre, un dato freak y/o una muy disciplinada morisqueta.

A mi Alecita García; su gran ejemplo y mi admiración por ella ya no podrá cambiar jamás, tu pasión por la vida y el arte marcaron gran parte de mi vida. No cambies nunca chatita. Y a las farmacéuticas más choras de la vida; Dani, Maca, Carito y Chio! Siempre una alegría inmensa compartir con Uds. Tienen mis primeros recuerdos en la facultad, admiro su integridad e inteligencia y como han logrado construir sus vidas.

A mi familia en la distancia; mis tíos, mis primos, mis abuelos; a mi prima Luisa, mi primera amiga de la vida y su padre mi tío Carlos, que no alcanzó a ver el final de esta etapa, pero su recuerdo estará vivo por siempre.

A Karla y Nikol, las primeras. El tiempo y la distancia no nos han separado. Se vienen tiempos más complejos y espero tenerlas más cerca que nunca. Las adoro.

A los que de una u otra manera aportaron a esta memoria y a mí, a ser siempre una mejor persona y a no dejar que las pequeñas caídas definan mi camino.

II. INDICE GENERAL

I. AGRADECIMIENTOS	iv
II. INDICE GENERAL	vi
III. INDICE DE FIGURAS	ix
IV. INDICE DE TABLAS	x
V. ABREVIATURAS	xi
VI. RESUMEN	xii
VII. SUMMARY	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Asimetría izquierda-derecha en vertebrados.....	1
1.2 Asimetrías cerebrales en vertebrados.....	2
1.3 Modelos de estudio en asimetrías cerebrales: el epitálamo de teleósteos.....	3
1.4 Heterotopía y heterocronía en el epitálamo de pez cebra y pez medaka...	6
1.5 Asimetrías dependientes e independientes del órgano parapineal	9
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Materiales.....	19
4.1.1 Reactivos.....	19
4.1.1.1 Reactivos para biología molecular.....	19
4.1.1.2 Reactivos para Hibridación <i>in situ</i>	20
4.1.1.3 Reactivos para incorporación de BrdU	20
4.1.1.4 Reactivos para Inmunofluorescencia Indirecta.....	21

4.1.1.5 Reactivos para Ensayo TUNEL.....	21
4.1.2 Soluciones.....	22
4.1.3 Otros reactivos y materiales.....	23
4.1.4 Materiales Biológicos.....	23
4.1.4.1 Peces.....	23
4.1.4.2 Bacterias.....	24
4.1.4.3 Genes.....	24
4.2 Metodología.....	24
4.2.1 Mantenimiento de los peces.....	24
4.2.2 Clonamiento de genes.....	25
4.2.2.1 Clonamiento de genes de pez cebra.....	25
4.2.2.2 Clonamiento de genes para pez medaka.....	26
4.2.2.3 Linearización de plasmidios y producción de ribosondas anti sentido para pez cebra y pez medaka.....	27
4.2.3 Ensayo de proliferación celular con Bromodesoxiuridina.....	28
4.2.3.1 Preparación de enzima <i>Hatching</i>	28
4.2.3.2 Descorionado de embriones de pez medaka con enzima <i>hatching</i>	28
4.2.3.3 Incorporación de BrdU.....	29
4.2.3.4 Inmunofluorescencia doble contra BrdU y GFP con contratinción de núcleos en embrión completo.....	29
4.2.4 Doble Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra HuC y GFP en embrión completo.....	30
4.2.4.1 Selección de peces y tratamiento previo a inmunofluorescencia.....	30
4.2.4.2 Inmunofluorescencia en embrión completo.....	31
4.2.4.3 Análisis estadístico.....	31
4.2.5 Ensayo TUNEL para detección de células en fase apoptótica.....	32

5. RESULTADOS	34
5.1 Neurogénesis habenular celular mediante HuC	34
5.2 Proliferación celular en el epítalamo de embriones de pez medaka	43
5.2.1 Resultados de tratamiento con enzima <i>hatching</i> e incorporación de BrdU	43
5.2.2 Identificación de células en estado apoptótico tras tratamiento con BrdU	47
5.3 Obtención de marcadores específicos para subnúcleos habenulares lateral y medial	48
5.3.1 Obtención de sondas antisentido	48
5.3.2 Determinación indirecta de los subnúcleos habenulares mediante la expresión de genes asociados a funcionalidad en la habénula de pez cebra y medaka	50
6. DISCUSIÓN	55
6.1 Neurogénesis asimétrica	57
6.2 Proliferación asimétrica	63
6.2 Marcadores de subnúcleos habenulares	67
6.3 Factor temporal en estudio comparado	70
7. CONCLUSIONES	71
8. REFERENCIAS	73

III. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación y heterotopías del epitálamo entre pez cebra y medaka.	4
Figura 2. Secuencia, <i>timing</i> y duración de los eventos durante conectividad Opp-Hb.....	8
Figura 3. Comportamiento asimétrico durante la proliferación de los precursores habenulares identificados por BrdU.	12
Figura 4. Inicio de expresión de genes de complejo pineal y habénula en embriones de pez medaka y comparación <i>leftover</i> y <i>righton</i> entre larvas de pez cebra y medaka.....	14
Figura 5. Inicio y progreso de neurogénesis en pez cebra y medaka.	35
Figura 6: Tendencia de asimetría izquierda durante neurogénesis en los primeros estadios de pez medaka.	36
Figura 7. La neurogénesis en pez medaka tiene tendencia a presentar mayor número de células diferenciadas en habénula izquierda.....	38
Figura 8 . Tendencia de asimetría izquierda en primeros estadios de desarrollo.	40
Figura 9. El IA durante la neurogénesis	42
Figura 10. Descorionado exitoso de embriones de pez medaka mediante tratamiento con enzima de eclosión.	44
Figura 11 . Desarrollo de larvas de pez medaka luego tratamiento con BrdU.	45
Figura 12. Curva de concentración de reactivo BrdU para estandarizar protocolo de “pulso y caza” en tg(<i>flh/FoxD3:GFP</i>) de pez cebra..	47
Figura 13. Embriones tratados con BrdU presentan leve aumento de células apoptóticas en la región del epitálamo de pez cebra.	48
Figura 14. Obtención de sondas anti-sentido y sentido de <i>nptx2a</i> de medaka.. ...	50
Figura 15. Heterotopía entre los genes <i>narp</i> y su ortólogo <i>nptx2a</i>	53
Figura 16. Inicio y duración de la neurogénesis habenular en la ontogenia de la proyección Opp/Hbl.....	59

IV. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados para clonamiento de genes de pez medaka.....	26
Tabla 2. Concentraciones de BrdU y controles para ensayo de proliferación celular	29
Tabla 3. Tiempo de incubación con Proteinasa K en hibridación <i>in situ</i>	31
Tabla 4. Conteo de células en inmunofluorescencia contra HuC en embriones de pez medaka mediante Fiji.	37
Tabla 5. Datos para análisis estadístico del conteo de células por HuC en pez medaka.	38
Tabla 6. Valores-p para test pareado de Wilcoxon.....	40
Tabla 7. Test de términos pareados Mann Whitney en datos de habénula izquierda para determinar inicio de neurogénesis	41
Tabla 8. Test de términos pareados Mann Whitney en datos de habénula derecha para determinar inicio de neurogénesis	42
Tabla 9. Detalle de sobrevivencia de embriones luego de tratamiento con <i>HE</i> y BrdU	46
Tabla 10. Genes de pez cebra (primera columna) utilizados para el clonamiento de los genes ortólogos de pez medaka.	49
Tabla 11. Detalle de larvas tratadas por hibridación <i>in situ</i> a distintas concentraciones de sonda en pez cebra y medaka	51
Tabla 12. Detalle de larvas de pez medaka tratadas por hibridación <i>in situ</i> a distintas temperaturas de hibridación.....	52

V. ABREVIATURAS

A/P	Antero-posterior
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés <i>bovine serum albumin</i>)
D/V	Dorso-ventral
Dig	Digoxigenina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (del inglés <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNIP	Núcleo interpeduncular dorsal
DTT	Ditiotreitol
E3	Medio salino de crecimiento para pez cebra
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERM	Medio para crecimiento de crías de pez medaka (del inglés <i>Embryo Rearing Medium</i>)
FR	Fascículo Retroflexo
GFP	Proteína fluorescente verde (del inglés <i>green fluorescent protein</i>)
Hb	Habénula
HbD	Habénula derecha
HbI	Habénula izquierda
hpf	Horas post Fertilización
hsp	Proteína de shock térmico (del inglés <i>heat shock protein</i>)
HuC	Proteína con dominios de unión a RNA
IA	Índice de Asimetría
I/D	Eje izquierda-derecha
LB	Medio Luria Bertani
MAB	Tampón de ácido maleico (del inglés <i>maleic acid buffer</i>)
NIP	Núcleo interpeduncular
NTP Mix	Mezcla de nucleótidos trifosfatados (del inglés <i>nucleotide triphosphate mix</i>)
Opp	Órgano parapineal
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i>)
PK	Proteinasa K
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
rTdT	Desoxirribonucleotidil transferasa terminal recombinante
S.O.C	Medio rico en nutrientes (del inglés <i>super optimal broth with catabolite repression</i>)
TUNEL	Técnica de marcaje de extremo terminal con dUTP mediada por rTdT
UTS	Unidad de tiempo somito
vNIP	Núcleo interpeduncular ventral

VI. RESUMEN

Las asimetrías cerebrales en el eje izquierda-derecha de vertebrados poseen componentes altamente conservados y son un punto importante de estudio para la biología del desarrollo. Entre estas asimetrías, las más estudiadas se encuentran en el epitálamo, una región ubicada en el diencéfalo dorsal de vertebrados cuyas conspicuas asimetrías poseen un importante factor hereditario y de lateralidad. En esta región, se encuentra la presencia de un par de núcleos habenulares (Hb, órgano par), además se encuentra el complejo pineal formado por el órgano pineal (órgano impar) en la línea media y por el órgano parapineal (Opp) que se encuentra a la izquierda y proyecta axones eferentes hacia la habénula ipsilateral.

En este trabajo se realizó un estudio comparado entre dos especies de teleósteos, pez cebra (*D. rerio*) y pez medaka (*O. latipes*), para intentar dilucidar como se generan las características conservadas y especie-específicas durante la ontogenia del epitálamo.

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que estos teleósteos poseen variaciones morfotopológicas especie-específicas en la región del epitálamo (heterotopías) y, luego de normalizar los tiempos de desarrollo en ambas especies, se comprobó que también existen variaciones en la temporalidad del desarrollo (heterocronías). La heterocronía más significativa es que las proyecciones Opp de pez medaka se desarrollan antes que en pez cebra. Debido a lo anterior, se puede hipotetizar que las diferencias topológicas observadas entre ambas especies podrían tener relación con la temporalidad de desarrollo de los componentes que forman el circuito Opp-Hb. En este contexto, el momento en que ocurre la interacción entre el Opp y la Hb podría ser un factor importante para definir la citoarquitectura final del circuito. Lo anterior se respalda en el hecho de que en pez cebra las células habenulares tienen distinta temporalidad de proliferación en cada núcleo, lo que genera subnúcleos habenulares lateral y medial, de distintos tamaños. Este rasgo asimétrico sería dependiente de la presencia del órgano parapineal, ya que a cada subnúcleo se han asociado marcadores moleculares cuya expresión suele ser asimétrica, pero ésta se pierde

cuando el Opp es ablacionado. Por otra parte, la neurogénesis habenular, posee asimetría izquierda en su inicio, la cual se conserva incluso luego de ablacionar el Opp, lo que la define como un rasgo asimétrico independiente de la presencia del Opp. Luego, si suponemos que estas interacciones son conservadas también en el modelo de pez medaka, las eventuales variaciones heterocrónicas pueden estudiarse para comprender como podrían generarse las diferencias topológicas entre ambos teleósteos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue dilucidar si estas características se encuentran conservadas y observar de qué manera podría influir el adelantamiento de las proyecciones del Opp.

Se esperaba que la neurogénesis habenular de pez medaka inicie de manera asimétrica en el mismo momento de desarrollo que pez cebra. Por otro lado, se esperaba que la proliferación celular, al ser un evento dependiente del Opp, se inicie antes debido al adelantamiento de la ontogenia del Opp. Para estudiar lo anterior se utilizó el marcador pan neuronal HuC, para identificar neuronas diferenciadas y se usaron marcadores moleculares que en pez cebra se asocian al dominio de los subnúcleos habenulares.

Los resultados de nuestro estudio demostraron nueva evidencia de heterotopía y heterocronía entre pez cebra y medaka, se descartó la hipótesis planteada, pues la neurogénesis habenular en pez medaka está adelantada pero continúa siendo asimétrica en su inicio, lo que podría indicar que en esta especie sí existe una relación entre el Opp y la neurogénesis habenular. Por otro lado, con el gen *nptx2a*, ortólogo de *narp* de pez cebra, se encontró un arreglo topológico diferente a la asimetría izquierda esperada con *narp*, pues el marcador de pez medaka es más simétrico y se limita a una región más pequeña en ambas habénulas, asemejándose más a una topología propia a la descrita en la habénula derecha de pez cebra.

Nuestros estudios respaldan la idea de que las interacciones entre el Opp y la HbI parecen ser más complejas de lo que los estudios en pez cebra revelan. Nuestros resultados sugieren interacciones más tempranas y probablemente bidireccional entre la habénula izquierda y el órgano parapineal.

VII. SUMMARY

COMPARATIVE STUDY OF THE DEVELOPMENT OF EPITHALAMIC BRAIN ASYMMETRIES BETWEEN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) AND MEDAKA (*Oryzias latipes*)

Brain asymmetries along the left-right axis show highly conserved components across vertebrates. Among these asymmetries the most studied is found in the epithalamus, a region located in the dorsal diencephalon. Epithalamic asymmetries are conspicuous and genetically controlled, and are characterised by the presence of left-right differences in morphology and gene expression of the bilaterally paired habenular nuclei and by the left-sided asymmetric position and connectivity to the left habenula (Hb) of the unpaired parapineal organ (PpO), an accessory component of the pineal complex. In this work we performed a comparative study between two species of teleosts, zebrafish (*D. rerio*) and medaka (*O. latipes*), to elucidate how the conserved and species-specific features of epithalamic asymmetries are generated during the ontogeny of the epithalamus. Previous studies of our laboratory showed that these teleosts show both topological and temporal variations in the development of epithalamic asymmetries, known as heterotopies and heterochronies, respectively. Among the latter, the most significant difference is observed in the timing of connectivity of the parapineal organ to the left Hb, which in medaka fish begins earlier than in zebrafish.

Due to the above, we hypothesised that the topological differences observed between both species could be related to the temporality of development of the components that make up the parapineal-habenula circuit. In this context, the time in which the interaction between the parapineal organ and the habenula occurs could be an important factor in defining the final cytoarchitecture of the circuit. This idea is supported by the fact that in zebrafish the habenular cells have different temporality of proliferation in the left and right nuclei, which generates size differences in the lateral and medial habenular subnuclei on both sides. This asymmetric trait appears to depend on the presence of the parapineal organ, since the asymmetric expression of the molecular markers that have been associated to each habenular sub-nuclei is lost when the parapineal organ is physically removed

during development. In contrast, the onset of habenular neurogenesis is asymmetric even after ablating the PpO, which defines a type of asymmetry that is independent of the parapineal organ. Based on the above and if we assume that these types of asymmetries are also conserved in medaka, the heterochronic variations can be studied as a possible factor that explains how the topological differences of epithalamic asymmetry between both teleosts are generated. Therefore, the aim of this work was to have a first mechanistic approach to this question and investigate the timing and organisation of habenular neurogenesis in medaka and relate this to the pattern observed in zebrafish and the advancement of parapineal projections in both species. Habenular neurogenesis of medaka was expected to start asymmetrically at the same time as in zebrafish while cell proliferation, being an event dependent of the parapineal organ, it was expected to start earlier due to overtaking of parapineal projections in this species. The pan-neuronal marker HuC was used to identify differentiated neurons and molecular subnuclei.

The results of this study provided new evidence of heterotopic and heterochronic shifts between zebrafish and medaka that appear to rule out our hypothesis. The onset of habenular neurogenesis in medaka was asymmetric as in zebrafish but appeared at an earlier stage. This observation suggest that in contrast to zebrafish, the onset of asymmetric habenular neurogenesis in medaka has some type of dependency on the parapineal organ. This possibility can be assessed in the future by performing parapineal ablation in medaka. On the other hand, using the medaka *nptx2a* gene, an ortholog of zebrafish *narp*, we observed a different topological arrangement with a more restricted and fairly symmetric habenular expression, in contrast to the broad and pronounced left-sided asymmetric expression observed in zebrafish. This expression pattern resembles the topology described in the right habenula of zebrafish. In summary, our studies support the idea that interactions between the parapineal organ and the left Hb are more complex than the studies of zebrafish suggest. These interactions appear to have an earlier onset and show a bi-directional nature.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Asimetría izquierda-derecha en vertebrados

Las asimetrías morfológicas que se manifiestan durante la ontogenia o desarrollo embrionario son de interés significativo para los estudios de biología del desarrollo, principalmente porque a estos rasgos moleculares, celulares o de conectividad se les ha asociado además características de funcionalidad que se creen relevantes para el desempeño fisiológico de un organismo vivo (Vallortigara & Rogers, 2005; Duboc y cols. 2015). En los vertebrados se reconocen tres ejes corporales: antero-posterior (A/P), dorso-ventral (D/V) e izquierda-derecha (I/D), siendo este último el que presenta ciertas ventajas de estudio para observar asimetrías, debido principalmente a que sus anomalías no son tan severas como las que involucran a los otros ejes corporales (Hamada y cols. 2002).

Las asimetrías I/D se clasifican en tres tipos; (i) asimetrías fluctuantes o aleatorias, que se caracterizan por diferencias morfológicas, no heredables, generalmente sutiles, que no presentan un patrón de lateralidad dentro de una población y pueden incluso no desarrollarse; (ii) la anti-simetría, donde el rasgo asimétrico se presenta en toda la población, pero su lateralidad (dirección de la asimetría a nivel poblacional) I/D es azarosa. Un ejemplo de este fenómeno se puede observar en el cangrejo violinista (*Uca deichmann*), que puede poseer indistintamente más grande su tenaza izquierda o derecha (Palmer, 2012). El último tipo de asimetría es (iii) la asimetría direccional, en la cual tanto la presencia del rasgo asimétrico (asimetría *per se*) como su lateralidad son fuertemente heredables, sugiriendo la presencia de un importante componente genético en los mecanismos que la

controlan. Un ejemplo de asimetría direccional es la ubicación de los órganos internos de los mamíferos. Este trabajo se enmarca en este último tipo de asimetría.

1.2 Asimetrías cerebrales en vertebrados

En vertebrados se han descrito diferencias notables y conservadas entre los hemisferios cerebrales (Hackett, 2002; Sun & Walsh, 2006). Esto es especialmente importante porque se ha propuesto que la lateralización cerebral favorecería la capacidad de desarrollar tareas como comer, cazar o reconocer depredadores sobre todo en contextos multitarea (Dadda & Bisazza, 2006; Magat & Brown, 2009; M. Dadda & Bisazza, 2009; Mehlhorn y cols. 2010). Además en humanos se han descrito alteraciones de la asimetría cerebral que se relacionarían con patologías neurológicas como el autismo, la esquizofrenia y el déficit atencional (Escalante-Mead y cols. 2003; Herbert y cols. 2005; Mitchell & Crow, 2005; Bleich-Cohen y cols. 2009; Ter Huurne y cols. 2013).

A pesar de la importancia que podrían tener las diferencias morfológicas cerebrales, sobre todo con relación a su rol como sustrato anatómico de la lateralización funcional, aún es poco lo que conocemos de los mecanismos que controlan el desarrollo de las asimetrías cerebrales. Por ello con este trabajo de memoria pretendemos contribuir al saber en esta área, estudiando la ontogenia de las asimetrías izquierda-derecha en el sistema nervioso central de vertebrados.

1.3 Modelos de estudio en asimetrías cerebrales: el epitálamo de teleósteos

El ejemplo mejor estudiado de ontogenia de asimetrías cerebrales es el epitálamo, una región ubicada en el diencefalo dorsal y que presenta notables asimetrías morfológicas conservadas entre vertebrados. El epitálamo está compuesto por el complejo pineal y los núcleos habenulares. El circuito formado por estos núcleos cerebrales incluye además al núcleo interpeduncular (NIP), ubicado en el mesencefalo, una región más posterior y ventral que el diencefalo (Concha & Wilson, 2001; Concha y cols. 2009)

El modelo animal de asimetría epitalámica más estudiado es el pez cebra. En este teleósteo el complejo pineal se encuentra conformado por la glándula pineal (más bien simétrica) y el órgano parapineal (Opp, un órgano impar) que está ubicado a la izquierda de la línea media y proyecta sus axones exclusivamente a la habénula ipsilateral. Los núcleos habenulares (Hb, órgano par), también son asimétricos ya que el núcleo izquierdo (HbI) es de mayor tamaño que el derecho (HbD) y posee una mayor densidad de neuropila (Concha y cols. 2000). Las habénulas proyectan hacia el NIP en el mesencefalo a través del fascículo retroflexo (FR) izquierdo y derecho. Los axones eferentes de la HbI llegan preferentemente a la región más dorsal del NIP (dNIP), mientras que la HbD conecta principalmente hacia la región ventral (vNIP) (Villalón y cols. 2012) (Figura 1.I).

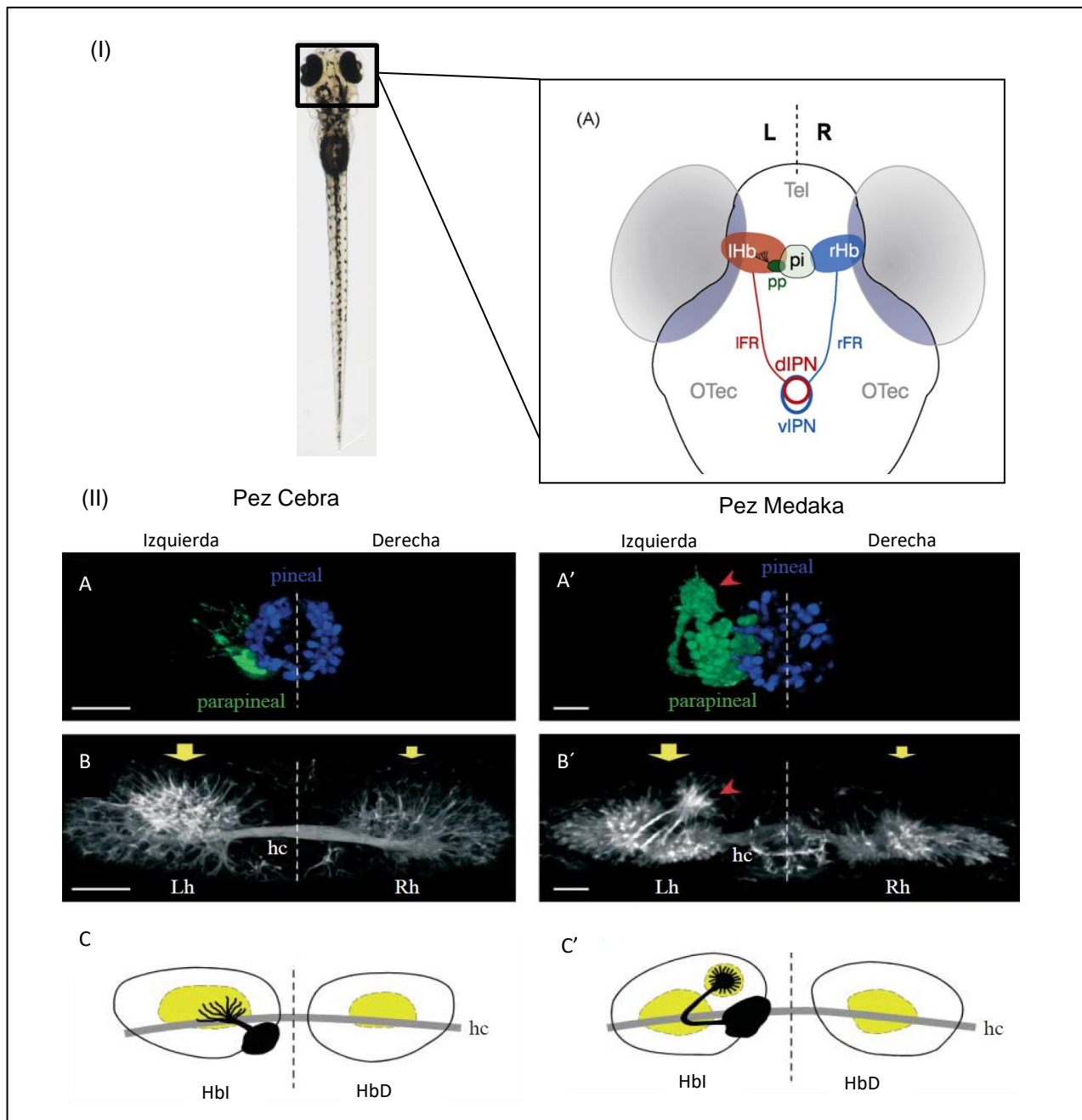


Figura 1. Ubicación y heterotopías del epitálamo entre pez cebra y medaka.

(I) Representación de la vista dorsal, anterior hacia arriba, del epitálamo de larva de pez cebra. En la línea media (indicada en I y II con línea punteada) se observa el complejo pineal formado por la glándula pineal (verde claro) y el órgano parapineal (verde oscuro) y los núcleos habenulares (izquierdo en rojo y derecho en azul). L: izquierda (*left*), R: derecha (*right*), IHb: habénula izquierda, rHb: habénula derecha, pi: glándula pineal, pp: órgano parapineal, IFR: fascículo retroflexo izquierdo, rFR: fascículo retroflexo derecho, dIPN: núcleo interpeduncular dorsal, vIPN: núcleo interpeduncular ventral.

(II) Imagen de Signore y cols. 2009. En el recuadro A, B y C se presentan asimetrías epitalámicas de pez cebra y en A', B' y C' de pez medaka. En A-A'; Imagen pseudocoloreada de microscopía confocal de una inmunofluorescencia indirecta en un pez transgénico que expresa GFP en el complejo. En azul la glándula pineal y en verde el órgano parapineal y sus proyecciones. La flecha roja indica las proyecciones del órgano parapineal. En B-B'; imagen de microscopía confocal de una inmunofluorescencia indirecta contra alfa tubulina acetilada mostrando neuropila habenular. C-C'; modelo de relación órgano parapineal-habénula; en negro órgano parapineal, en gris la comisura habenular y en amarillo los dominios de mayor de

Como se mencionó, la organización asimétrica de las estructuras presente en el epitalamo es conservada en su patrón general y este aspecto ha permitido usar el pez cebra intensivamente en el estudio de la ontogenia de las asimetrías cerebrales. A pesar de lo anterior, existen variaciones especie-específicas que no pueden ser ignoradas y por ello es necesario no limitar el estudio de un fenómeno biológico a un solo modelo animal.

Resulta entonces interesante utilizar un método de estudio comparativo para evaluar bajo conceptos ontogénicos y una mirada menos reduccionista la formación de este circuito en particular, identificando los eventos comunes que llevan a la generación de asimetrías conservadas y a la vez observar las variaciones que resultan en características especie-específicas. Nuestro laboratorio ha realizado estudios de este tipo en los teleósteos pez cebra (*Danio rerio*) y pez medaka (*Oryzias latipes*). Ambos poseen fertilización externa, transparencia óptica en su desarrollo a nivel larval y un rápido desarrollo embrionario (Kimmel y cols. 1995; Wittbrodt y cols. 2002; Iwamatsu, 2004; Furutani-Seiki & Wittbrodt, 2004).

Signore y cols. (2009), realizaron análisis morfológicos en pez medaka y se demostró que las características descritas previamente en pez cebra se encuentran conservadas en esta especie, pero con variaciones topológicas evidentes y llamativas en la estructuración del circuito en fase larval (entendido como el momento de desarrollo en que el embrión ya es capaz de nadar y alimentarse por sí mismo). Mientras pez cebra posee proyecciones más dispersas que se embeben en la región central del núcleo habenular, en pez medaka estos

axones se encuentran compactados y segregados del resto de la neuropila habenular en una región más reducida, anterior y medial de la Hbl, formándose un manojo axonal que asemeja una forma de “diente de león” (Signore y cols. 2009) (Figura 1.II).

1.4 Heterotopía y heterocronía en el epitálamo de pez cebra y pez medaka

Las variaciones relacionadas a la morfología y la ubicación (heterotopía) de la conectividad entre el órgano parapineal y la habénula izquierda encontradas en pez cebra y medaka, llevan a preguntar cómo estas características se desarrollan durante el crecimiento embrionario y en qué momento se generan las diferencias. Para ello se debe considerar, además de la topología, el factor temporal en el desarrollo de cada especie.

Para obtener una percepción temporal que permita realizar comparaciones significativas entre ambas especies, es necesario normalizar los tiempos de desarrollo. Signore y cols. (2009), realizaron la normalización del tiempo absoluto de desarrollo usando como unidad temporal la Unidad de Tiempo Somito (UTS). Este se define como el intervalo de tiempo absoluto necesario para la formación de un somito durante la fase lineal de la somitogénesis (segmentación sucesiva del mesodermo paraxial). En ambos teleósteos los hitos temporales fueron medidos de acuerdo a los datos de la literatura para la descripción de la ontogenia de pez cebra (Kimmel y cols. 1995) y medaka (Iwamatsu, 2004). Esta medida en UTS se utilizará como marco temporal de referencia en esta memoria para comparar los eventos ontogénicos en la conectividad Opp-Hb de ambas especies y se usará para medir y comparar secuencia (sucesión de los eventos), *timing*

(momento ontogénico en que ocurren los eventos) y duración (cuánto tarda el evento).

Con el método previamente descrito y utilizando cepas transgénicas de pez cebra y medaka que poseen fluorescencia en el complejo pineal, Signore y cols. (2009) determinaron que no sólo existen variaciones morfológicas o heterotópicas en la ontogenia de las proyecciones del órgano parapineal a la habénula izquierda, sino que además existen variaciones temporales (heterocronías) asociadas a este mismo proceso.

Tras los trabajos realizados en mi Unidad de Investigación, identificamos tres etapas en el proceso de inervación de las proyecciones Opp-Hbl: (i) la elongación inicial de las proyecciones desde el cuerpo del Opp, (ii) el ingreso de estas proyecciones a la Hbl y (iii) el establecimiento de los eferentes en el dominio de proyección. Todo lo anterior fue analizado hasta el estadio larval de ambas especies y se observó que una de las diferencias más importantes observadas en términos heterocrónicos ocurre en la primera etapa, donde las proyecciones parapineales de pez medaka comienzan a elongar antes que en pez cebra y además esta fase dura al menos tres veces más en pez medaka (Signore, 2015) (Figura 2 A, B y C).

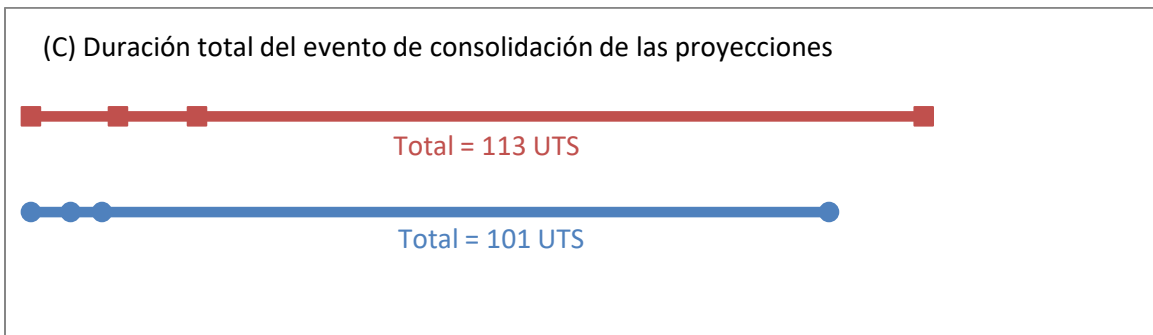
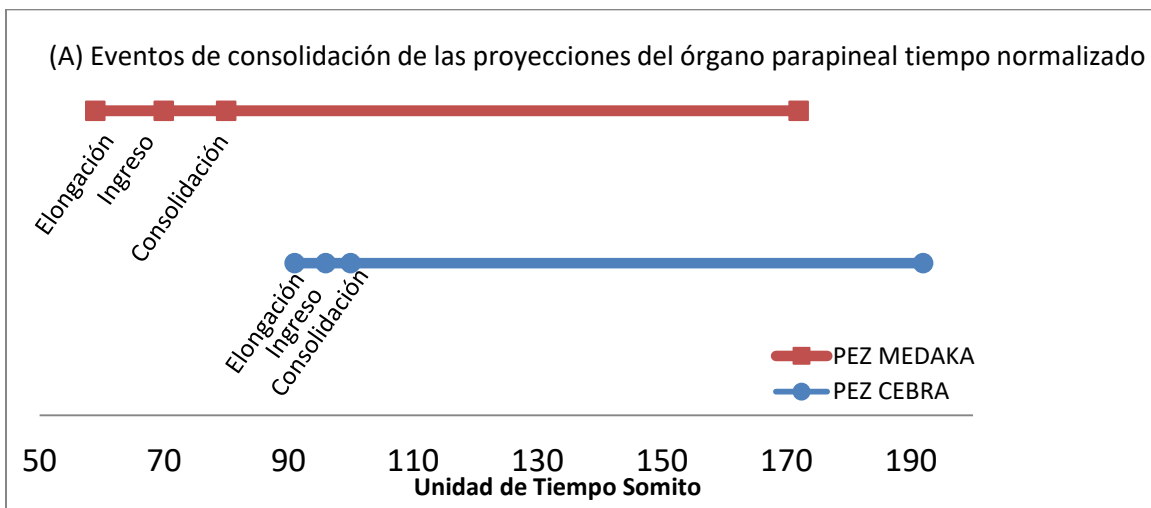
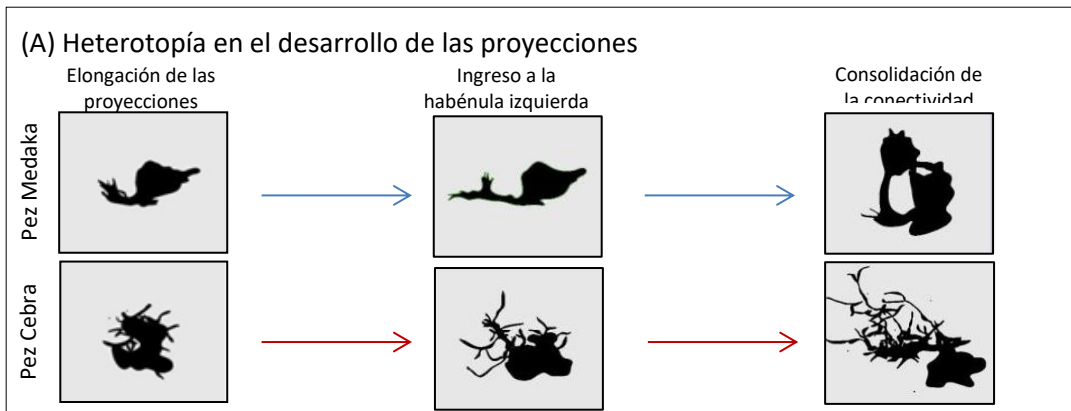


Figura 2. Secuencia, *timing* y duración de los eventos durante conectividad Opp-Hb. (A) Variaciones heterotópicas durante las etapas de elongación de las proyecciones del Opp hacia la habénula izquierda en pez medaka (arriba) y pez cebra (abajo). (B) Línea temporal de pez medaka (rojo) y pez cebra (azul) que indican el momento de inicio de la elongación de las proyecciones, entrada de las proyecciones y consolidación de la conectividad del Opp-Hbl (UTS). (C) Comparación de la duración total del evento desde el inicio de las elongaciones hasta la consolidación de la conectividad.

1.5 Asimetrías dependientes e independientes del órgano parapineal

Los antecedentes descritos sugieren que las diferencias topológicas del circuito Opp-Hb de pez medaka comparado con pez cebra podrían estar relacionadas con la heterocronía de su ontogenia. Esta idea se sustenta en la consideración teórica de que el establecimiento de la conectividad Opp-Hbl obedecerá a las interacciones entre las células del Opp que proyectarán sus eferentes y las células de la Hbl que recibirán dichas conexiones. Sin embargo, dichas interacciones a su vez dependerán del momento y estado del desarrollo en el que se encuentre cada uno de los grupos celulares que participan en ellas. Por ende, al existir una heterocronía en el desarrollo de órgano parapineal, podría afectarse la organización de los eferentes porque su relación con las células de la habénula izquierda se dará en otro momento del desarrollo de éstas últimas, generando diferentes interacciones y pudiendo resultar en consecuencia, en diferentes configuraciones morfológicas.

Hasta el momento no se ha establecido el mecanismo que controla cómo las proyecciones del órgano parapineal se establecen en ciertos sitios blancos, pero se han investigado algunas características topológicas, moleculares y celulares de la habénula izquierda y su relación con la presencia o ausencia del órgano parapineal, identificando que existen asimetrías habenulares tanto independientes como dependientes de la presencia del órgano parapineal.

Estudios realizados por Roussigné y cols. (2009), describieron la neurogénesis habenular de pez cebra, utilizando el transgénico fluorescente Tg(huC:GFP) donde HuC es un marcador pan neuronal post-mitótico de neuronas (se expresa

en todo tipo de neuronas diferenciadas) (Kim y cols. 1996; MN Hinman, 2008). Se observó que existen patrones de asimetría en la neurogénesis previo a las proyecciones del órgano parapineal, donde la diferenciación celular se inicia y se produce tempranamente en un mayor número de células en la habénula izquierda respecto de la habénula derecha cuya neurogénesis es más tardía. Al ablacionar el órgano parapineal, las células identificadas por HuC, mostraron conservar esta característica asimétrica, aunque con una menor población de células diferenciadas. Por lo anterior se concluyó que la asimetría en la neurogénesis habenular sería un evento *independiente del órgano parapineal* (Roussigné y cols. 2009).

Por otro lado, según lo descrito por Gamse y cols. (2003), existen asimetrías moleculares que sí son dependientes del órgano parapineal. El gen *left over (lov)* se ha descrito en larva principalmente como un marcador que se expresa en niveles más altos y en un mayor número de células en la HbI y con menor expresión en la HbD. La expresión de este gen es asimétrica alrededor de las 38 horas post fertilización (Gamse, 2003). Otra asimetría dependiente del Opp es la densidad de neuropila (ramificación de axones) identificada con anti-tubulina acetilada. Se sugiere que los eferentes del Opp contribuyen directamente al desarrollo de la asimetría en la neuropila habenular y particularmente en el modelo de pez medaka su topología se relaciona directamente con la conformación de las proyecciones (Figura 1.II.B´) (Concha y cols. 2000; Concha y cols. 2003; Signore y cols. 2009).

En el mismo estudio, se observó que los cambios en la expresión izquierda-derecha de *lov* en mutantes y cepas silvestres se relacionan directamente con la lateralidad del órgano parapineal. Esta asimetría de *lov* y neuropila desaparece cuando el órgano parapineal es ablacionado, volviéndose simétrico en ambas habénulas (Gamse y cols. 2003; Gamse y cols. 2005; Bianco y cols. 2008; Bianco & Wilson, 2009).

Relacionado con esto se ha descrito que la proliferación celular en la habénula también podría ser dependiente del Opp. En pez cebra, se ha demostrado que la proliferación de las células precursoras de los núcleos habénulares es asimétrica y además que esta diferencia mediaría el arreglo asimétrico de los subnúcleos habénulares lateral y medial. Esto se debe a que ambos subnúcleos se estarían generando a partir de la misma población de células progenitoras y que las células de proliferación más temprana originan el subnúcleo lateral mientras que las más tardías contribuyen al subnúcleo medial. La proliferación se inicia antes en la habénula izquierda que la derecha, donde una mayor tasa proliferativa da origen a un subnúcleo lateral izquierdo de mayor tamaño que el derecho, a la vez que las células que proliferan más tarde dan origen al subnúcleo medial, que es mayor en la habénula derecha que la izquierda (Aizawa y cols. 2007) (Figura 3).

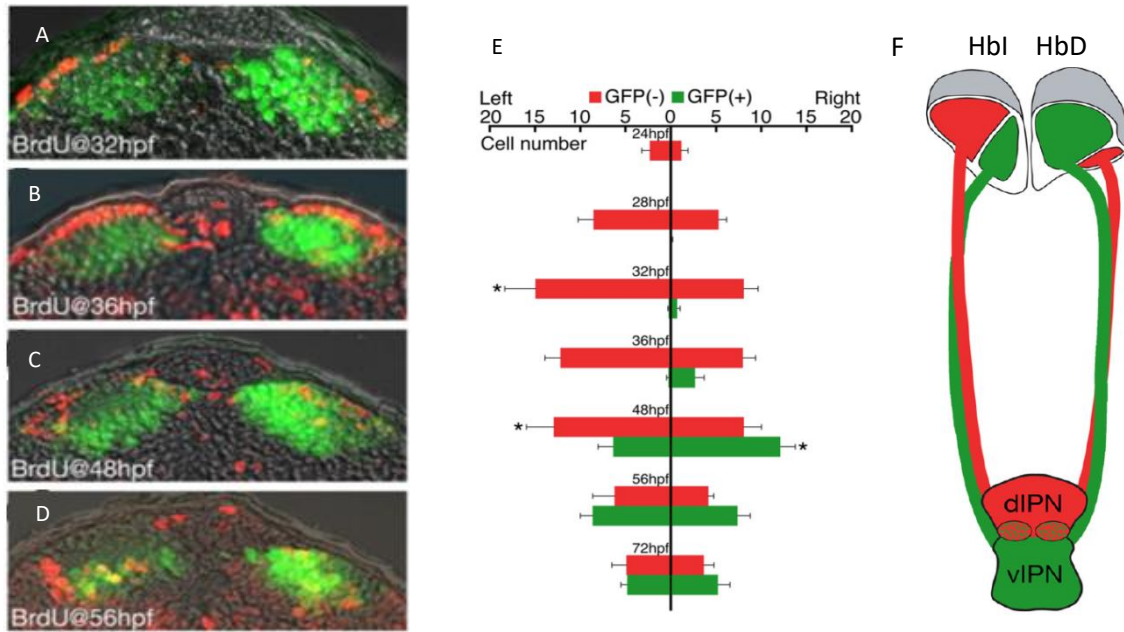


Figura 3. Comportamiento asimétrico durante la proliferación de los precursores habenulares identificados por BrdU.

A, B, C, D Imagen frontal de epítalamo de pez cebra *tg(brn3a:GFP)* de 5 días post fertilización. Inmunofluorescencia de ensayo de pulso y caza con BrdU. En la esquina se identifican las horas post fertilización a las cuales se aplicó el pulso. Rojo: células de subnúcleo lateral; Verde, células de subnúcleo medial. E, Primeras células en proliferar generan subnúcleo lateral GFP (-) y las que proliferan más tarde generan subnúcleo medial (GFP+). F, representación de los subnúcleos habenulares de pez cebra y su conectividad hacia el núcleo interpeduncular a través del fascículo retroflexo. Imagen modificada de Aizawa y cols. (2007).

En el mismo estudio se muestra que los subnúcleos habenulares identificables en el transgénico *Tg(brn3a-hsp70:GFP)* tienen directa relación topológica con la expresión de los genes *lov* y *righton (ron)* en los subnúcleos lateral y medial, respectivamente. Considerando que la expresión de ambos genes se vuelve relativamente simétrica cuando el Opp es ablacionado y que por ende la topología de los subnúcleos habenulares se considera dependiente del órgano parapineal, se ha propuesto que el órgano parapineal podría estar promoviendo la proliferación habenular más temprana en la habénula izquierda y esto incidiría finalmente en la organización de subnúcleos asociada a la expresión de los genes

mencionados (Gamse y cols. 2005; Concha y cols. 2009). Ambos eventos (proliferación asimétrica y organización de los subnúcleos) serían entonces ejemplos de asimetrías habenulares *dependientes* de la presencia del órgano parapineal.

Para investigar si estas relaciones de dependencia/independencia se conservan en pez medaka, se ha estudiado la expresión de marcadores de diferenciación del complejo pineal como *sox1a*, *flh* y *tbx2b* y marcadores de subpoblaciones habenulares tales como *lov*, *ron*, *brn3a* y *nrp1a* mediante hibridaciones *in situ* de nuestro laboratorio, para estudiar si se expresan de manera conservada tanto topológicamente como temporalmente. Los diferentes marcadores inician su expresión aproximadamente en la misma unidad de tiempo somito (UTS) que en pez cebra (Figura 4 A - H). La excepción es el gen *sox1a* cuyo inicio de expresión se encuentra adelantado en aproximadamente 20 UTS. Así, la heterocronía que produce el adelanto de las proyecciones del Opp de pez medaka parece no tener efecto sobre el momento de expresión del gen *lov* pero se mantiene cierto grado de asimetría en su expresión dado que su topología. Si bien no parece asociarse al subnúcleo lateral como lo hace en pez cebra, sí se asocia al dominio de proyección de los eferentes parapineal como muestra la conformación en “diente de león” que posee el Opp de pez medaka (Figura 4).

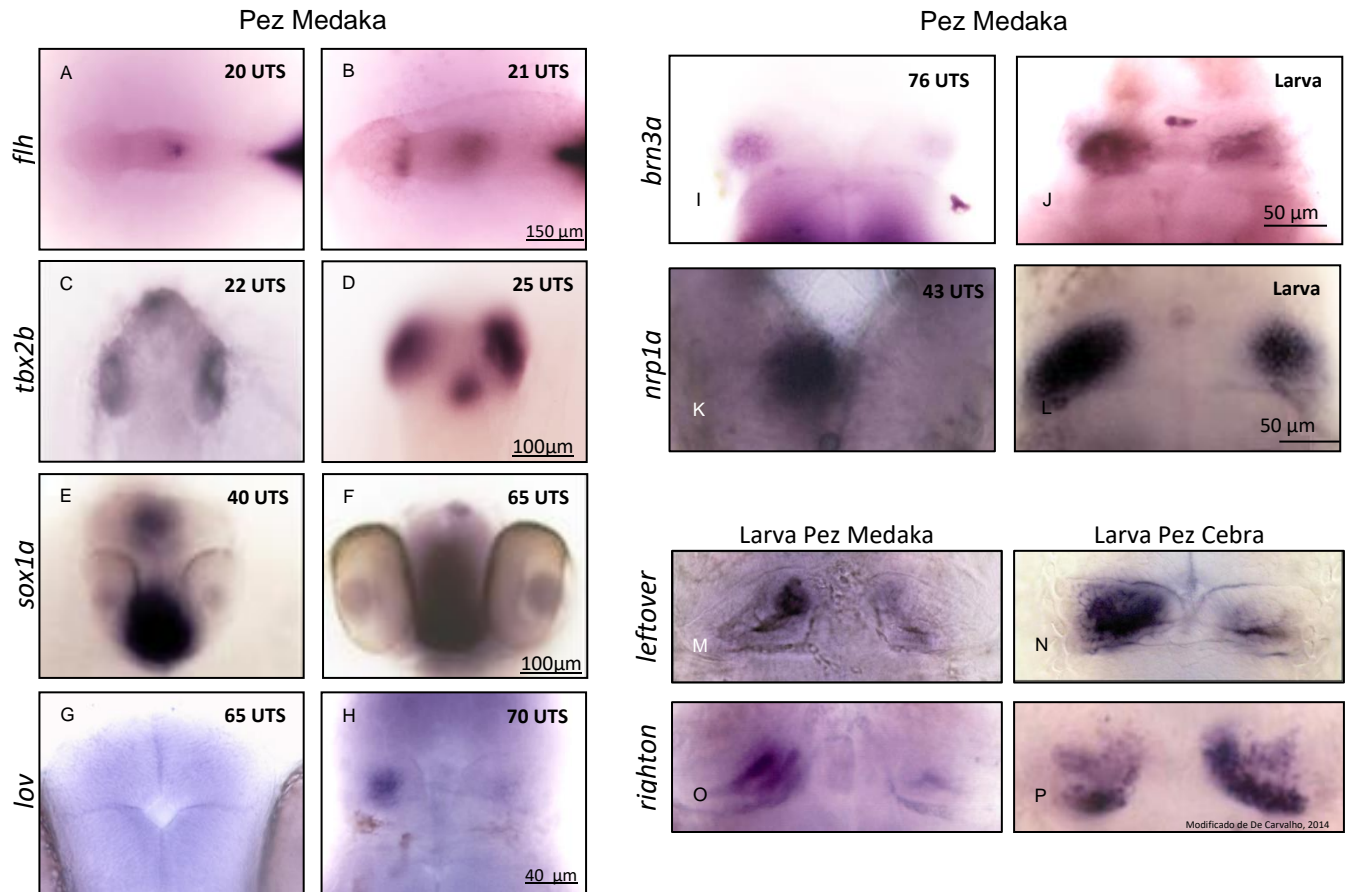


Figura 4. Inicio de expresión de genes de complejo pineal y habénula en embriones de pez medaka y comparación *leftover* y *righton* entre larvas de pez cebra y medaka

A, C, E y G; hibridación *in situ* en embriones pez medaka que aún no expresan los genes *flh*, *tbx2b*, *sox1a* y *lov*. B, D, F, H; inicio de expresión de los genes expresado en unidad de tiempo somito. I, K; inicio de expresión de los genes *brn3a* y *nrp1a* en habénula de embriones de pez medaka. J, L; expresión de los genes en estadio larval. M, N, O, P; comparación de la topología de expresión de los genes *leftover* (*lov*) y *righton* (*ron*) en larvas de pez cebra y medaka. Imagen modificada de Tesis de doctorado de I. Signore (2015).

Siguiendo con el mismo marco de trabajo para esta memoria y suponiendo conservación de la relación de dependencia entre proliferación habenular y presencia del Opp, deberíamos esperar que el evento de proliferación en pez medaka se encuentre adelantado en UTS, debido a la heterocronía que afecta al

órgano parapineal, como muestra el adelantamiento de las proyecciones y como sugiere la expresión adelantada del gen *sox1a*. Este evento podría ser descrito al igual que en pez cebra a través de la visualización indirecta de los subnúcleos habenulares utilizando marcadores moleculares descritos para caracterizar núcleos lateral y medial.

A la vez, si se conservara la independencia entre la neurogénesis asimétrica de los núcleos habenulares y la presencia del Opp, sería de esperar que la neurogénesis ocurriera en ambas especies en el mismo momento medido en UTS. Esto estaría sugerido por el hecho de que el inicio de la expresión de los genes habenulares descritos en pez cebra y medaka es temporalmente similar. En este caso, siendo la neurogénesis independiente del Opp, pez cebra y medaka no deberían presentar heterocronía en el inicio de la neurogénesis habenular.

2. HIPÓTESIS

El proceso de neurogénesis habenular (independiente del órgano parapineal) no presenta heterocronía en la ontogenia de las especies de pez cebra y medaka, mientras la proliferación celular de los núcleos habenulares (dependiente del órgano parapineal) presenta heterocronía luego de normalizar los tiempos ontogénicos de ambas especies en unidades de tiempo somito (UTS).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Describir y definir la temporalidad de la neurogénesis habenular y proliferación, observando de manera indirecta la topología de los subnúcleos habenulares de pez medaka, en un contexto comparado con pez cebra.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1 – Estudiar la diferenciación de las neuronas habenulares en pez medaka y pez cebra, identificando si existe neurogénesis asimétrica y el tiempo en que ésta ocurre.

Se planteó estudiar la neurogénesis por inmunohistoquímica, identificando el inicio y desarrollo de esta etapa en los núcleos habenulares. Metodológicamente, este objetivo se basa en (i) el uso del anticuerpo contra HuC/D, proteína específica de

neuronas diferenciadas, en intervalos temporales definidos según los estadios de interés en embriones de cepas transgénicas que expresan GFP en el complejo pineal y (ii) el análisis de imágenes por microscopía confocal.

Objetivo específico 2 – Evaluar y comparar la tasa de proliferación celular de núcleos habenulares de pez medaka y pez cebra.

Se planteó estudiar la tasa de proliferación de células precursoras de los núcleos habenulares de pez medaka, identificando el inicio, punto de mayor actividad de proliferación y el término de esta fase en términos topológicos y temporales para compararlo con el modelo ya descrito de pez cebra. Metodológicamente, este objetivo se basa en (i) el uso del nucleótido análogo de timina, bromodesoxiuridina (BrdU) para observar células en estado replicativo; (ii) procedimientos de inmunohistoquímica en intervalos definidos y (iii) análisis de imágenes por microscopía confocal.

Objetivo específico 3 – Analizar y comparar morfológicamente marcadores moleculares de la habénula de pez medaka y pez cebra.

Se planteó utilizar los marcadores génicos de la habénula lateral y medial para investigar la organización lateral/medial en pez medaka y analizarlos en relación a las diferencias en proliferación registradas en el objetivo específico 2.

Considerando que en nuestros trabajos anteriores en el laboratorio, se determinó que la expresión de los marcadores *leftover* y *righton* en pez medaka no parece estar conservada en el aspecto topológico lateral/medial cuando se comparan con pez cebra (ver introducción y Figura 4), propusimos usar otros marcadores de expresión descritos en subnúcleos lateral y medial en pez cebra. Estos marcadores son los genes *narp* y *vachtb*, que se asocian a los subnúcleos lateral y medial, respectivamente (ver sección 5.3.2). Para ello, se debieron clonar los genes ortólogos de pez medaka para posteriormente sintetizar sondas antisentido y realizar experimentos de hibridación *in situ* para ambas especies en estadio larval.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos

4.1.1.1 Reactivos para biología molecular

- Acetato de Sodio 3M pH 6, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Agarosa de bajo punto de fusión, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)
- Agarosa Ultra Pure, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)
- Agua libre de nucleasa, Thermo Fisher (Waltham, MA, EEUU)
- Amortiguador 10X PCR, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU)
- Ampicilina, US Biological (Salem, MA, EEUU)
- Cloruro de magnesio 25mM, Thermo Scientific (Waltham, MA, EEUU)
- Dig RNA Labeling Mix, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)
- Ditioneitol, DTT, Promega (Madison, WI, EEUU)
- DNasa I (libre de RNasa), Promega (Madison, WI, EEUU)
- Enzimas de restricción: NotI, Promega (Madison, WI, EEUU); EcoRI y KpnI, New England Biolab (Ipswich, MA, EEUU) cada una con sus respectivos tampones
- Estándar de peso molecular de DNA 1 Kb, Promega (Madison, WI, EEUU)
- Etanol, Merck (Darmstadt, Alemania)
- ExpressLink DNA Ligase, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)
- Fenol/Cloroformo básico/Alcohol isoamílico 25:24:1, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Formamida Desionizada, Winkler (Santiago, Chile)
- Inhibidor de RNasa, RNasin, Promega (Madison, WI, EEUU)

- Kanamicina, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Medio Super Óptimo de Cultivo con represión de catabolito, S.O.C., Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)
- NTP Mix 10X, Promega (Madison, WI, EEUU)
- Reactivo TRizol, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)
- RNA Polimerasa T7 y Sp6, Promega (Madison, WI, EEUU)
- Tampón transcripción 5X, Promega (Madison, WI, EEUU)
- DNA polimerasa Taq, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU)
- Tinción gel para DNA SYBR Safe, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)
- Vector TA cloning dual promoter pCRII®, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)

4.1.1.2 Reactivos para Hibridación *in situ*

- Anticuerpo Primario Anti-Digoxigenina-AP, Roche (Basilea, Suiza)
- Blocking Reagent, Roche (Basilea, Suiza)
- Metanol, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Proteinasa K, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Sustrato de precipitación para fosfatasa alcalina BMPurple, Roche (Basilea, Suiza)

4.1.1.3 Reactivos para incorporación de BrdU

- 5-Bromo-2'-desoxiuridina, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Anticuerpo primario Anti-conejo Anti-GFP, N° catálogo A11122, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)

- Anticuerpo primario monoclonal anti-ratón Anti-BrdU, N° catálogo B 2531, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Tetraborato di-sódico decahidrato 0,1M, Merck (Darmstadt, Alemania)

4.1.1.4 Reactivos para Inmunofluorescencia Indirecta

- Anticuerpo primario anti-conejo Anti-GFP, N° catálogo A11122, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)
- Anticuerpo primario monoclonal anti-ratón Anti-HuC, N° catálogo AB15882, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 F(ab')-Goat anti-rabbit IgG, N° catálogo A11070, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)
- Anticuerpo secundario Alexa Fluor 647 Anti-ratón, N° catálogo A21235, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)
- Dimetilsulfoxido, Winkler (Santiago, Chile)
- Solución de tinción Hoechst, Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU)
- Suero de cabra, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU)
- Tritón X-100, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)

4.1.1.5 Reactivos para Ensayo TUNEL

- Enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (rTDT), Promega (Madison, WI, EEUU)
- Mix de nucleótidos para ensayo TUNEL (fluoresceína-12-dUTP 50 µM; dATP 100 µM; Tris-HCl 10mM Ph 7,6; EDTA 1 mM), Promega (Madison, WI, EEUU)
- Solución de reacción ensayo TUNEL (2% enzima rTDT; 10% mix de nucleótidos en tampón de equilibrio)

4.1.2 Soluciones

- MAB (ácido maleico 0,1M; NaCl 0,15M pH 7.5)
- Solución de bloqueo para hibridación *in situ* (MAB + Blocking reagent 2%)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5M, pH 8,0; Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- HCl 2N en agua nanopura, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Medio estándar de crecimiento para embriones de pez medaka, ERM (Embryo Rearing Medium) (NaCl 17mM; KCl 0,4mM; CaCl₂ 0,27mM; MgSO₄ 0,65mM. Luego de la esterilización se agrega HEPES 500mM a pH 7,3)
- Medio estándar de crecimiento para embriones de pez cebra, E3 (NaCl 5mM; KCl 0,17mM; CaCl₂ 0,33mM; MgSO₄ 0,33mM; 10-5% azul de metileno).
- Medio Luria-Bertani (LB) (triptona 1%, extracto de levadura 5%, cloruro de sodio 1%) Fisher Scientific (Whaltam, MA, EEUU)
 - PBDBTr (PBS 1X + 1%DMSO; 0,8% Tritón)
- PBS 10X, Winkler (Santiago, Chile)
- PBST (PBS 1X + Tween-20 0,1%)
 - PBTr (PBS 1X + Tritón 0,5%)
- Solución amortiguadora de hibridación *in situ* o BMP Buffer
- Solución de bloqueo para incorporación de BrdU (PBT 1X; blocking reagent 0,2%, suero de cabra 10%, DMSO 1%)
- Solución de bloqueo para Inmunofluorescencia o IB (PBDBTr + 10% suero de cabra)

- Solución de hibridación *in situ* o Hyb: Hyb(-) (formamida 50%; SCC 5X; Tween-20 0,1%); Hyb (+) (formamida 50%; heparina 50 µg/mL; Tween-20 0,1%, RNA tórula de levadura 5mg/mL, agua nanopura estéril, ácido cítrico 1M pH 6,0 SCC5X)
- Solución E3 1X (NaCl 5mM; KCl 0,17mM; CaCl₂*2H₂O 0,33mM; MgSO₄*7H₂O 0,33mM; Azul de metileno 10%)
- Solución fijadora (paraformaldehído 4% en PBS 1X)
- Solución neutralizadora o tampón borato (Di Sodio tetraborato decahidrato 0,1M en PBS 1X)
- SSC 20X (175,3 g de NaCl; 88,2 g de citrato de sodio pH 7)
- Trizma Base, Sigma (St. Louis, MO, EEUU)
- Tween-20, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)

4.1.3 Otros reactivos y materiales

- Microcolumnas Probe Quant TM G-50, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Sistema comercial Fluorométrico TUNEL (Promega (Madison, WI, EEUU)
- Sistema comercial de extracción de DNA plasmidial, GeneJet Miniprep Purification, Thermo Scientific (Waltham, MA, EEUU)
- Sistema Comercial de extracción de productos de PCR desde agarosa AxyPrep, Axygen (Waltham, MA, EEUU)

4.1.4 Materiales Biológicos

4.1.4.1 Peces

- Las líneas silvestres CAB de pez medaka y Tübingen de pez cebrá, las cepas transgénicas Tg(*frx2::GFP*) y Tg(*foxD3::GFP*) de pez medaka y el transgénico

doble Tg(*flh/FoxD3:GFP*) de pez cebra fueron obtenidos en el Bioterio del Laboratorio de Estudios Ontogénicos, LEO-ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

4.1.4.2 Bacterias

- *E. coli* electrocompetentes ElectroMAX Stbl4, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)
- *E. coli* DH5α quimiocompetentes, Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña)

4.1.4.3 Genes

- El plasmidio del gen *vacthb* para pez cebra fue cedido gentilmente por la Dra. Erika Bullier (*Laboratoire Neurosciences Paris Seine – Institute de Biologie Paris Seine – Université Pierre et Marie Curie*)
- El plasmidio del gen *narp* fue cedido gentilmente por la Dra. Megumi Kobayashi (*Laboratory for Developmental Gene Regulation, Neural Growth and Regeneration Research Group, RIKEN Brain Science Institute*).

4.2 Metodología

4.2.1 Mantención de los peces

Los peces adultos se mantuvieron a 28°C bajo condiciones controladas de pH, conductividad del agua y ciclos diarios de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los embriones y larvas se obtuvieron por cruce natural y se mantuvieron en medio E3 para larvas de pez cebra y medio ERM para larvas de pez medaka en estufas a 28°C hasta el estadio de interés.

Los estadios de desarrollo de pez cebra se determinaron morfológicamente según Kimmel y cols. (1995) y pez medaka según Iwamatsu y cols. (2004). La edad cronológica se midió a través de horas post fertilización. La Unidad de Tiempo Somito (UTS) es la normalización del intervalo de tiempo absoluto necesario para la formación de un somito durante la fase lineal de la somitogénesis (segmentaciones del mesodermo paraxial) y se calculó de acuerdo a Signore y cols. (2009).

4.2.2 Clonamiento de genes

4.2.2.1 Clonamiento de genes de pez cebra

Los plasmidios que contenían los genes *vachtb* y *narp* fueron resuspendidos en agua nanopura estéril y luego de una hora se transformaron bacterias *th1B* alphaproteobacterias electrocompetentes mediante un método estándar donde las células recibieron un pulso eléctrico y se incubaron en medio rico en nutrientes (S.O.C.) con agitación a 37°C. Luego se extrajo 70µL del cultivo en agar LB/ampicilina (50µL/mL) y las colonias crecieron durante toda la noche a 37°. Al día siguiente, las colonias transformadas y con posible presencia del plasmidio se cultivaron individualmente en cultivo LB líquido durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se realizó la extracción del plasmidio mediante el protocolo descrito en GeneJet Miniprep Purification (Thermo Scientific). Con un ensayo de restricción se verificó la presencia del gen luego de la purificación. Para esto se linearizaron los plasmidios con las enzimas de restricción *NotI* y *EcoRI* para los genes *vachtb* y *narp*, respectivamente y el producto se revisó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

4.2.2.2 Clonamiento de genes para pez medaka

Se realizó la extracción de RNA a partir de homogenizado de larvas embriones de pez medaka que representara todos los estadios del desarrollo embrionario, previamente adormecidos en hielo durante 10 minutos. Se realizó la extracción por TRizol y el RNA purificado se usó como templado para transcripción inversa según el protocolo descrito en ImProm-II Reverse Transcription System (Promega).

Utilizando la base de datos ZFIN, se extrajo la secuencia génica de los genes *vachtb* y *narp* de pez cebra y mediante un alineamiento con Nucleotide BLAST se identificaron los genes *Oryzias latipes* neuronal pentraxin-2-like (LOC101164894), transcript variant X1, mRNA (*nptx2a*) y *Oryzias latipes* probable vesicular acetylcholine transporter-B (LOC101163117), mRNA (*slc183b*). Se diseñaron partidores para cada una de estas secuencias y su síntesis se encargó a la empresa Macrogen. Los partidores utilizados se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Partidores utilizados para clonamiento de genes de pez medaka

Gen	Partidor sentido	Partidor antisentido	Tamaño del producto
<i>nptx2a</i>	5'-GGATGAGCTGCGTAACACGA3'	5'-ATGGGGTTGTTCCCCATTC-3'	997 pares de bases
<i>slc183b</i>	5'-AATCAGCCCGCGTGAAGACTA-3'	5'-CACTGAGTGGAGTGCATGGT-3'	880 pares de bases

Utilizando estos partidores y el cDNA de pez medaka se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y se purificó el producto desde la banda del gel que se usó para el clonamiento de estos genes.

Los productos de purificación de banda se clonaron según el manual TA cloning® Kit Dual promoter (pCR®II). La ligación se realizó utilizando el vector pCRII y la

ligasa ExpressLink mediante el protocolo descrito en el manual. El producto de ligación se transformó en bacterias electrocompetentes *Stbl4* de la misma manera descrita previamente para los genes de pez cebra.

Los productos de purificación obtenidos mediante miniPrep fueron enviados a secuenciar a la empresa Macrogen y los cultivos positivos para los genes *slc183b* y *nptx2a* se utilizaron para linearizar los plasmidios con la enzima de restricción KpnI.

4.2.2.3 Linearización de plasmidios y producción de ribosondas anti sentido para pez cebra y pez medaka

Los plasmidios que contenían los genes fueron digeridos durante 3 horas a 37°C y luego se purificaron con fenol:cloroformo. La fase acuosa extraída se precipitó a -80°C durante 30 minutos. El precipitado se homogeneizó en presencia de acetato de sodio 3M y etanol 100% frío, se centrifugó y resuspendió en etanol 70%. Se centrifugó por última vez a máxima velocidad y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el DNA linearizado en agua nanopura estéril.

El DNA linearizado fue transcrito con las RNA polimerasas SP6 para el gen *narp*, polimerasa T3 para *vachtb* y polimerasa T7 para *slc183b* y *nptx2a*, respectivamente.

4.2.3 Ensayo de proliferación celular con Bromodesoxiuridina

4.2.3.1 Preparación de enzima *Hatching*

Previo al ensayo con BrdU, fue necesario retirar el corion de los embriones de ambas especies para la efectiva incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) al DNA. En el caso de pez cebra, el corion permite que este proceso sea realizado manualmente y de manera sencilla con pinzas sin peligro alguno de dañar o matar el embrión. En el caso de pez medaka sin embargo, las características físicoquímicas del corion no permiten este proceso y requieren de un tratamiento enzimático de dos pasos que incluye la obtención de la enzima de eclosión de los mismos embriones de pez medaka (Jung y cols. 2013). Para ello, se seleccionaron embriones de pez medaka pre eclosión (*hatching*) que poseen la glándula en que la enzima se acumula bien desarrollada. Esta es visible a través del corion desde el sexto día post fertilización y es reconocible por su característico color verde. Alrededor de 100 embriones se dejaron en hielo durante 5 minutos. Luego se homogeneizaron manualmente en PBS1X frío en razón de 0,75µL por embrión. El homogeneizado se dejó durante la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó la muestra a 4°C durante 10 minutos en minicentrífuga a 15000 rpm. La enzima *hatching* se extrajo junto con el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su uso mientras el *debris* fue eliminado.

4.2.3.2 Descorionado de embriones de pez medaka con enzima *hatching*

Se rasuraron manualmente las vellosidades del corion de pez medaka para facilitar el proceso de penetración de la enzima. Se colocaron hasta tres embriones de pez medaka por cada 10µL de enzima sin diluir en una placa

multipocillo. Se incubó a 28°C durante aproximadamente 1 hora o hasta que se observaron agujeros en la mayor parte de la superficie del corion que indican su destrucción y que permiten maniobrar con pinzas para retirar manualmente los fragmentos de corion remanentes. Los embriones descorionados fueron mantenidos en medio ERM en placas de vidrio hasta el estadio larval de interés.

4.2.3.3 Incorporación de BrdU

Los embriones descorionados fueron incubados en hielo durante 5 minutos en sus respectivos medios de crecimiento. El medio se reemplazó por BrdU 10mM con DMSO 10% diluido en medio E3 para pez cebra y medio ERM para medaka durante 20 minutos en hielo, para favorecer la incorporación del BrdU. Luego los embriones se recuperan en medio de crecimiento a 28°C y se fijaron en estadio larval (5 días post fertilización para pez cebra y 9 días post fertilización para pez medaka) en paraformaldehído al 4%. Luego, se probaron las siguientes concentraciones del reactivo BrdU con el fin de identificar y optimizar la inmunofluorescencia indirecta

Tabla 2. Concentraciones de BrdU y controles para ensayo de proliferación celular

Concentración BrdU para incubación	Concentración real
1X	3 mg/ml
0,5X	1.5 mg/ml
0,25X	0,75 mg/ml
0,1X	0,3 mg/ml

4.2.3.4 Inmunofluorescencia doble contra BrdU y GFP con contratinción de núcleos en embrión completo

Las larvas fijadas se rehidrataron en PBS tritón al 0,5% y se permeabilizó el tejido con proteinasa K durante 1 hora a 26°C. Las larvas se fijaron en

paraformaldehído/PBS al 4% y se incubaron durante 1 hora a 37°C en ácido clorhídrico para exponer el epítipo del compuesto bromado. Se neutralizó la reacción con tampón borato, pH 8,5 y se incubaron en solución de bloqueo de BrdU. Se incubó en anticuerpo anti-BrdU diluido (1:200) en solución de bloqueo y anti-GFP (1:1000) durante toda la noche a 4°C. Como anticuerpo secundario se usó Alexa 647 anti-mouse (1:200), Alexa 488 anti-rabbit (1:200) y solución de tinción Hoechst (1:1600) como contratinción para núcleos que permite observar el contexto celular de la muestra. Se lavó el anticuerpo secundario y los embriones se montaron en cámaras con agarosa de bajo punto de fusión al 1% preparada en medio E3. Los embriones se analizaron por microscopía confocal con el programa Olympus del microscopio del Instituto de Neurociencia Biomédica (BNI) y fueron analizadas con el programa *Fiji Is Just Image J* para realizar conteo de células.

4.2.4 Doble Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra HuC y GFP en embrión completo

4.2.4.1 Selección de peces y tratamiento previo a inmunofluorescencia

Se seleccionaron embriones transgénicos para GFP (*Tg(flh/FoxD3:GFP)* para pez cebra y *Tg(frx2::GFP)* para pez medaka) mediante fluorescencia. Los embriones de pez cebra se descorionaron y se fijaron en PFA al 4% en PBS durante toda la noche y los de peces medaka se fijaron dentro del corion en los estadios necesarios para poseer la misma línea temporal en Unidad de Tiempo somito en ambas especies. Al día siguiente se lavaron en PBS 1X y los embriones de pez medaka se descorionaron manualmente con pinzas.

4.2.4.2 Inmunofluorescencia en embrión completo

Se permeabilizaron ambas especies con proteinasa K 1X (10µg/mL) en estufa a 26°C durante el tiempo ideal para cada estadio (Tabla 3).

Tabla 3. Tiempo de incubación con Proteinasa K en hibridación *in situ*

Pez cebra (hpf*)	Tiempo	Pez medaka	Tiempo
24 - 29	10 min	St 17 - St 20	10 min
30 - 47	30 min	St 21 - St 28	30 min
48 - 95	40 min	St 28 - St 34	40 min
96 - 119	60 min	St 34 - St 37	50 min
120	60 min	St 37 < St 39	60 min

PK (10µg/mL) durante el paso de permeabilización en hibridación *in situ* e inmunofluorescencia.

*hpf; horas post fertilización.

Los embriones se incubaron en solución de bloqueo durante 2 horas en solución IB con agitación y luego se incubaron en anticuerpo primario con anti-HuC (1:100) y anti-GFP (1:1000) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron los embriones en PBTr durante dos horas y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-mousse Alexa Fluor 647 (1:200) y anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:200) junto a tinción Hoechst (1:1600). Al día siguiente se lavaron y montaron en cámaras de agarosa. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal con el programa Olympus del microscopio del Instituto de Neurociencias Biomédicas y fueron analizadas con el programa *Fiji Is Just Image J* para realizar conteo de células.

4.2.4.3 Análisis estadístico

Se usó test no paramétricos para comprobar si existía diferencia significativa en los datos obtenidos luego del conteo de células HuC positivas en los estadios analizados. Para esto se utilizó el programa Origin Pro 8 en el que se analizaron los datos mediante el test no paramétrico para términos pareados de Wilcoxon, para determinar si existían diferencias significativas entre el número de células

HuC positivo de la habénula izquierda y derecha. Además, se usó el test de Mann-Whitney para términos pareados entre células HuC positivas de la habénula izquierda y nuevamente para células de la habénula derecha. Por último, se midió el Índice de Asimetría (IA) definido como $IA = (N^{\circ} \text{ células izquierdas} - N^{\circ} \text{ células derechas}) / (N^{\circ} \text{ células izquierdas} + N^{\circ} \text{ células derechas})$.

4.2.5 Ensayo TUNEL para detección de células en fase apoptótica

Se seleccionaron algunos de los embriones tratados con BrdU como se describió en la sección 4.2.3.3 y se utilizaron para realizar un ensayo de TUNEL e identificar si existen células en estado apoptótico.

El sistema comercial de detección y el protocolo modificado fue cedido gentilmente por la Dra. Alicia Colombo del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile. Luego de la fijación con PFA 4%, los embriones se lavaron en PBS y luego se deshidrataron en una batería de metanol/PBS 1X (25%, 50% y 75%) hasta metanol 100% y se almacenaron a -20°C durante la noche. Al día siguiente se rehidrataron con una batería de metanol a PBS 1X tritón 0,5%. Se incubó con acetona 100% fría a -20°C durante 10 minutos y luego con proteinasa K 1X a 26°C durante 1 hora. Luego se lavó con PBS 1X. En adelante los embriones se mantuvieron en oscuridad. Se dejaron en tampón de equilibrio durante 10 minutos y luego durante toda la noche en oscuridad en una solución de reacción que contenía la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal recombinante (TDTTr) a 26°C. Al día siguiente se incubó a 37°C durante 1 hora y la reacción se detuvo con SCC 2X. Luego se incubó en PBS 1X que contenía contra tinción nuclear Hoechst (1:1600) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó en PBS 1X y se

montaron los embriones en agarosa 1% de bajo punto de fusión y obtuvieron por microscopía confocal con láser de excitación 405 para la contratinción y 488 para TUNEL. Las imágenes fueron analizadas con el programa *Fiji Is Just Image J*.

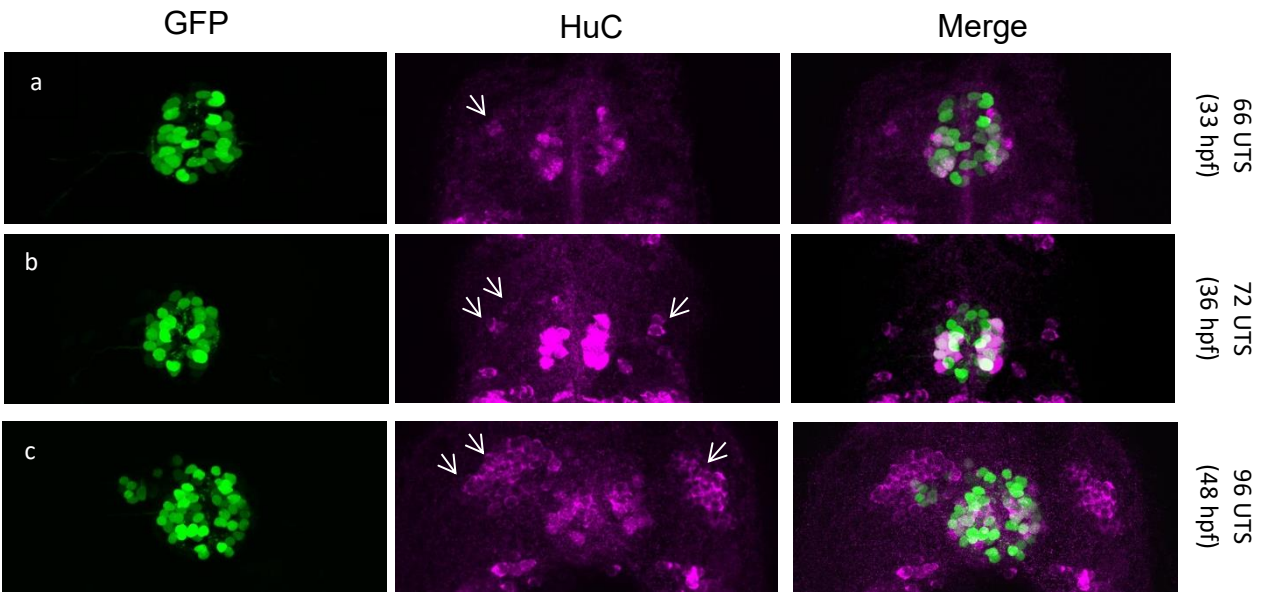
5. RESULTADOS

5.1 Neurogénesis habenular celular mediante HuC

Con el fin de estudiar la neurogénesis en la habénula de pez medaka y compararla con pez cebra, se realizó en ambos teleósteos inmunofluorescencia indirecta en el embrión completo contra la proteína HuC, descrita como marcador temprano de diferenciación.

La inmunofluorescencia determinó que la neurogénesis habenular de pez cebra identificada con el marcador HuC, se inicia cerca de las 33 horas post fertilización y es asimétrica izquierda en su inicio, con un pequeño grupo celular en el territorio de dicha habénula (Figura 5.A). Cercano al estadio 36-37 hpf (72-74 UTS) la asimetría aún es izquierda con unas pocas células marcadas en la habénula derecha. Esta característica asimétrica se mantuvo durante los primeros días de desarrollo hasta alcanzar la simetría cerca de las 73 hpf (146 UTS).

A. Pez Cebra



B. Pez Medaka

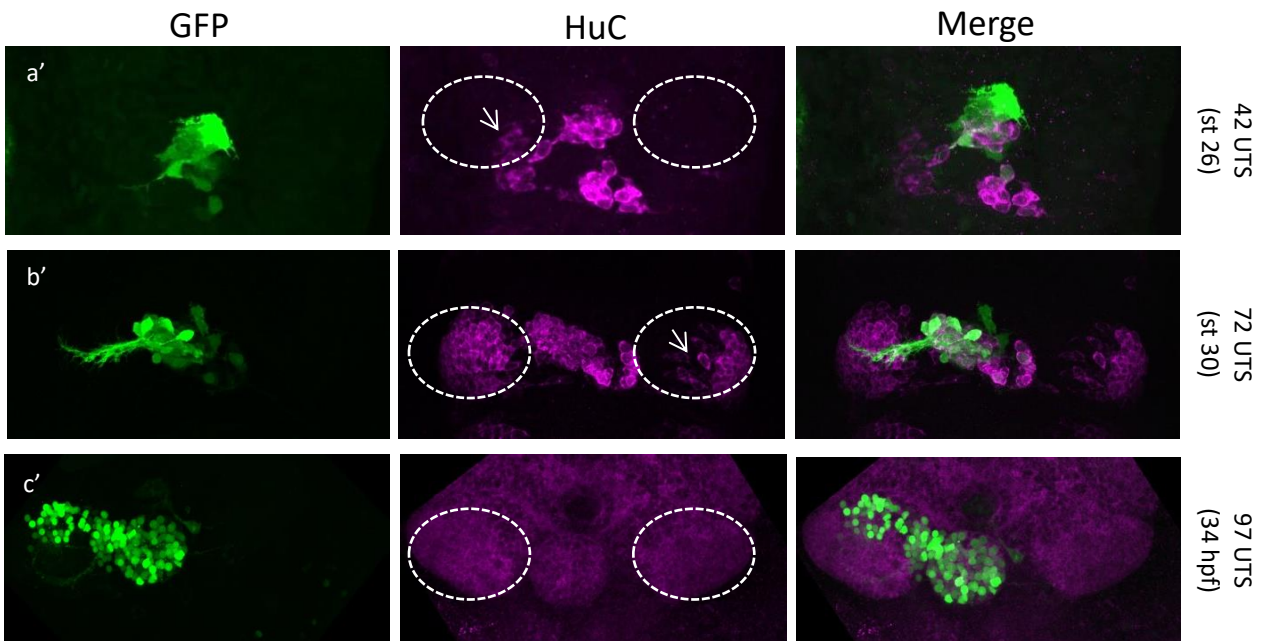


Figura 5. Inicio y progreso de neurogénesis en pez cebra y medaka.

Panel A. (a) Inicio de neurogénesis en pez cebra en *tg(flh/FoxD3:GFP)* y evolución durante el desarrollo (b, c).

Panel B. Inicio de neurogénesis en pez medaka y evolución durante el desarrollo (a') Inicio de neurogénesis en pez medaka en *tg(FoxD3:GFP)*; (b') pez medaka de 72 UTS *tg(frx2:GFP)* y (c') pez medaka de 97 UTS en *tg(FoxD3:GFP)*. En verde, complejo pineal; en magenta, célula huC positivas; flechas blancas indican neuronas diferenciadas; líneas punteadas indican el territorio correspondiente a los núcleos habenulares.

Como se aprecia en la figura 5.B, los ensayos de inmunohistoquímica demostraron que embriones de pez medaka también presentan asimetría izquierda en su neurogénesis habenular, la que se inicia aparentemente en el estadio 26 temprano (43 UTS) con un pequeño número de células positivas para HuC cerca de la región lateral de la habénula izquierda. La asimetría en la neurogénesis se conserva hasta estadios más tardíos y cerca del estadio 34-35 de medaka (96 UTS) alcanza la simetría en ambas habénulas (Figura 5.c'), momento en el cuál pez cebra aún conserva rasgos evidentemente asimétricos (Figura 5.c).

Una representación sencilla para evaluar la tendencia de los datos, es con un gráfico que represente punto a punto cada uno de los embriones analizados.

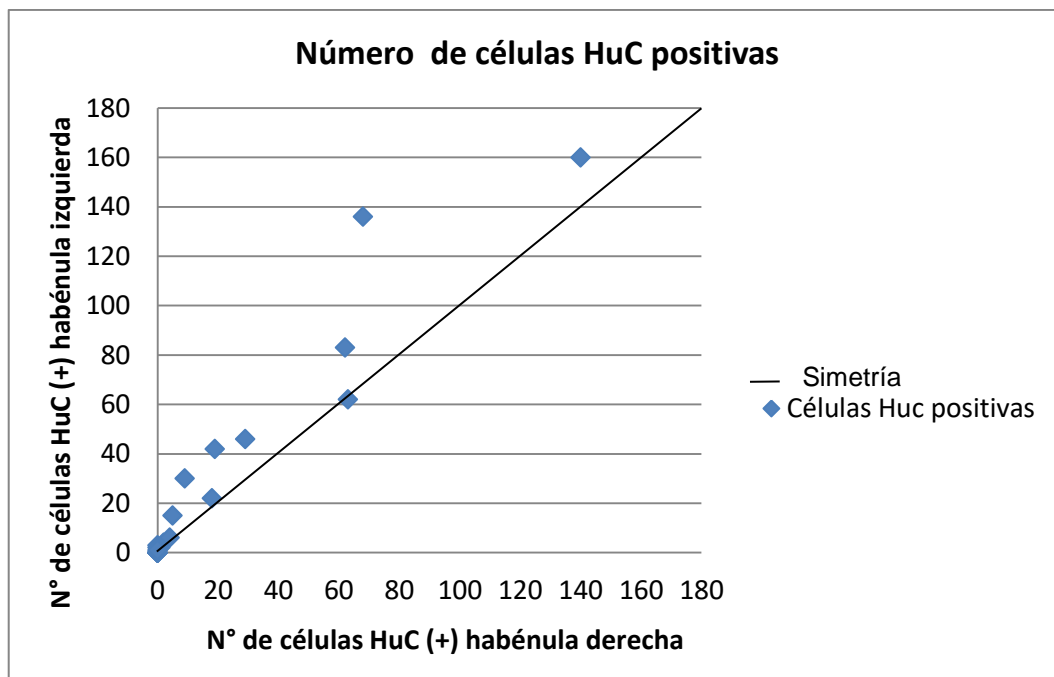


Figura 6: Tendencia de asimetría izquierda durante neurogénesis en los primeros estadios de pez medaka. Cada punto azul representa un embrión analizado y su relación I/D en el número de células. La recta negra representa el punto de simetría de diferenciación.

En la tabla 4 se presentan los datos obtenidos tras la cuantificación directa de células HuC positivas en la Hbl y HbD promediados por estadio.

Tabla 4. Conteo de células en inmunofluorescencia contra HuC en embriones de pez medaka mediante Fiji.

Estadio	UTS	Promedio células Hbl	Promedio células HbD	n	Se aprecia
24	35,1	0	0	2	-
25	39,9	0	0	5	-
26	43	3	1,16	6	-
27	46,2	31,25	20,5	4	-
28	49	49	33,5	2	-
29	59	42	19	1	-
30	65,4	111	101,5	2	-
31	75,7	136	68	1	-
32	80,5	NC	NC	3	izq>der
33	84,5	NC	NC	3	izq>der
34	96,4	NC	NC	3	izq>der
35	105,2	NC	NC	1	izq=der
36	114,8	NC	NC	1	izq=der

n = número de embriones analizados por estadio. (NC) no contable; (izq) izquierda; (der) derecha

Según el conteo se aprecia que el número de células en la diferenciación es siempre mayor en la habénula izquierda, desde el inicio de la diferenciación en el estadio 26. En los estadios más tardíos (>31) se puede apreciar que hay más células al lado izquierdo, pero no se pudo realizar conteo debido a la alta densidad celular y por lo tanto, no fueron considerados para el análisis estadístico.

Los datos destacados en escala de grises de la tabla 4 fueron utilizados para análisis estadísticos por separado debido al hecho de que corresponden a los estadios iniciales de la neurogénesis y que fueron utilizados justamente para poder identificar de manera precisa el momento en que este proceso celular

comienza. Por esta razón, en estos estadios se realizaron experimentos con un mayor número de muestras (n) y con una mejor resolución temporal. Por otro lado, los estadios más tardíos (28-29; 30-31) fueron agrupados debido a que esperábamos que ya estuviera avanzada la neurogénesis y por ello fuera innecesario un nivel mayor de resolución temporal. Por ello el n muestral en estos estadios fue más bajo. El set de datos utilizado para el análisis estadístico, el promedio y la desviación estándar desde las cohortes se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Datos para análisis estadístico del conteo de células por HuC en pez medaka.

Estadio	n	UTS rango	UTS promedio	Promedio células Hbl	Promedio células HbD	Desv estándar Hbl	Desv estándar HbD
24	2	35,1-39,8	37,4	0	0	0	0
25	5	39,9-42,9	41,4	0	0	0	0
26	6	43-46,1	44,5	3	1,1667	1,7889	1,6021
27	4	46,2-50,9	48,5	31,25	20,5	10,3722	8,9628
28-29	3	51-65,3	58,1	46,6667	28,6667	34,2394	29,7041
30-31	3	65,4-70,4	72,9	119,3333	90,3333	51,0816	43,0852

n: número total de embriones analizado; UTS: Unidad de tiempo somito

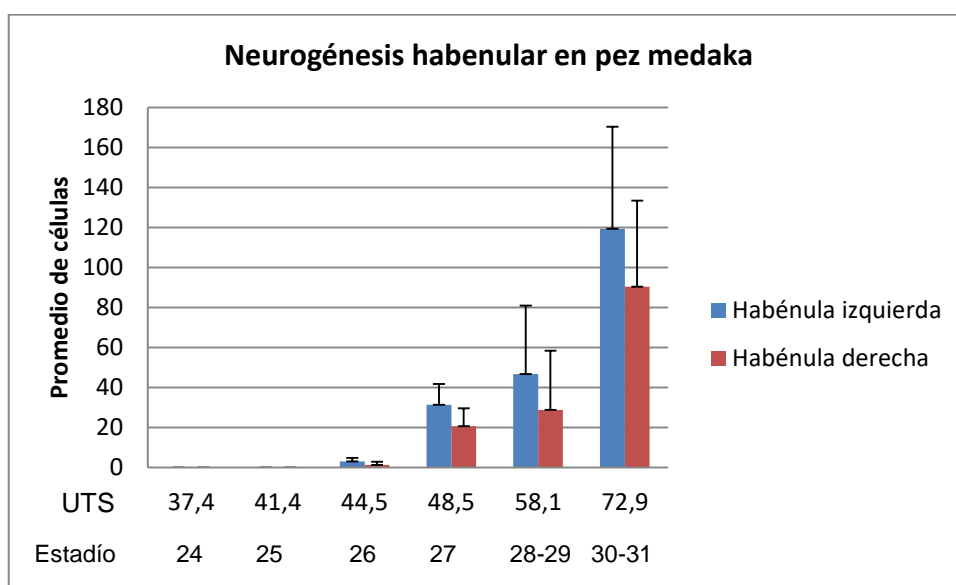


Figura 7. La neurogénesis en pez medaka tiene tendencia a presentar mayor número de células diferenciadas en habénula izquierda. En azul el promedio de células contadas por Fiji en la habénula izquierda y en rojo de la habénula derecha. UTS indicados como el promedio del rango y los estadios de medaka indican el estadio anatómico más representativo.

De acuerdo a los gráficos de la figura 7 generados a partir de la tabla 5, se vio la tendencia que sufre la diferenciación de las células de cada habénula, tal que a mayor estadio de desarrollo (en UTS), la habénula izquierda posee mayor promedio de células HuC positivas que la habénula derecha. En los datos correspondientes a estadios más avanzados, también se puede apreciar visualmente esta asimetría en la neurogénesis hasta volverse simétrica como en la figura 5.c' (datos no cuantificados).

Utilizando nuevamente los datos de la tabla 4, se generó un gráfico de dispersión con respecto al número de células contra estadio de desarrollo de pez medaka en UTS (Figura 8) para observar la tendencia del aumento del número de células positivas para HuC en la habénula izquierda comparada con la habénula derecha. A diferencia del gráfico anterior, éste utiliza el error estadístico que permite apreciar la precisión del punto en mi rango de datos por estadio.

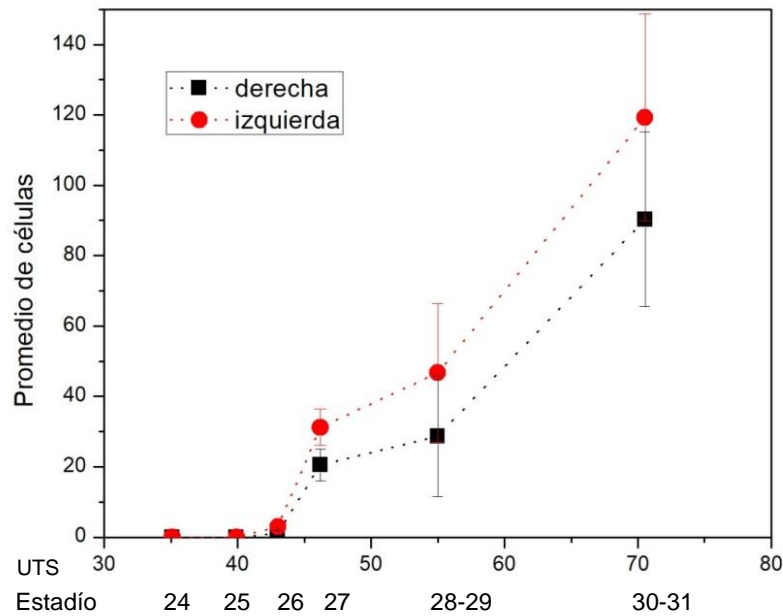


Figura 8 . Tendencia de asimetría izquierda en los primeros estadios de desarrollo. Promedio de células huC positivas habénula izquierda (puntos rojos) y derecha (cuadros negros). Las líneas representan el error estándar.

Para analizar el gráfico y evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas en el número de células entre izquierda y derecha de cada uno de los estadios, se usó el test no paramétrico para términos pareados de Wilcoxon. A partir de este análisis se determinó si el número de células HuC positivas de la célula izquierda, son significativamente distintas a la de la derecha a nivel de $p < 0,05$ y se obtuvo los datos de la siguiente tabla.

Tabla 6. Valores-p para test pareado de Wilcoxon.

Estadio medaka	24	25	26	27	28-29	30-31
Estadio en UTS	35,1	39,9	43	46,2	51	65,4
Valor p	1	1	0,03125	0,125	0,25	0,5

Se destaca en gris y negrita el valor-p ($p < 0,05$) en el estadio donde existe diferencia significativa en el promedio de número de células HuC positivas entre habénula izquierda y derecha.

A partir del test de Wilcoxon, se observó que existe diferencia significativa entre el número de células de la habénula izquierda con respecto a la derecha en el estadio 26 (43 UTS), correspondiente con el momento en que la neurogénesis asimétrica inicia.

Luego, se quiso determinar cuándo inicia la neurogénesis en cada uno de los núcleos habenuares. Para ello, se utilizó el test de Mann Whitney para términos no pareados y se comparó el número de células HuC positivas de un estadio contra cada uno de los otros estadios, solo en la habénula izquierda (Tabla 7) y luego se realizó el mismo procedimiento, comparando cada estadio contra cada uno de los otros estadios en la habénula derecha (Tabla 8). Ejemplo; se comparó el número de células del estadio 24 de la habénula izquierda contra el estadio 25, 26, 27, 28-29 y 30-31 de la habénula izquierda. Luego se comparó el estadio 25 contra 26, 27, 28-29 y 30-31 de la habénula izquierda y así sucesivamente. En las tablas 7 y 8 se destaca en gris los valores $p < 0,05$ y particularmente en gris oscuro los valores donde el estadio mayor posee un número de células distinto de cero.

Tabla 7. Test de términos pareados Mann Whitney en datos de habénula izquierda para determinar inicio de neurogénesis

	Estadio	24	25	26	27	28-29	30-31
Estadio	UTS	35,1	39,9	43	46,2	58,2	72,95
24	35,1	–	1	0,06352	0,10021	0,13864	0,13864
25	39,9	1	–	0,00538	0,0108	0,0168	0,0168
26	43	0,06352	0,00538	–	0,01392	0,02753	0,02753
27	46,2	0,10021	0,0108	0,01392	–	0,85968	0,05183
28-29	58,2	0,13864	0,0168	0,02753	0,85968	–	0,19043
30-31	72,95	0,13864	0,0168	0,02753	0,05183	0,19043	–

Resultado de valor $-p$ en análisis de términos pareados Mann Whitney al comparar uno a uno los estadios de desarrollo. Se destaca en escala de grises los valores $p < 0,05$. En gris oscuro los valores $p < 0,05$ donde inicia la neurogénesis en habénula izquierda

Tabla 8. Test de términos pareados Mann Whitney en datos de habénula derecha para determinar inicio de neurogénesis

	Estadío	24	25	26	27	28-29	30-31
Estadío	UTS	35,1	39,9	43	46,2	58,2	72,95
24	35,1	–	1	0,33963	0,10021	0,13864	0,13864
25	39,9	1	–	0,10406	0,0108	0,0168	0,0168
26	43	0,33953	0,10406	–	0,01306	0,0256	0,0256
27	46,2	0,10021	0,0108	0,01306	–	1	0,05183
28-29	58,2	0,13864	0,0168	0,0256	1	–	0,08086
30-31	72,95	0,13864	0,0168	0,0256	0,05183	0,08086	–

Resultado de valor p en análisis de términos pareados Mann Whitney al comparar uno a uno los estadíos de desarrollo. Se destaca en escala de grises los valores $p < 0,05$. En gris oscuro los valores $p < 0,05$ donde inicia la neurogénesis en habénula derecha.

Se calculó además el Índice de Asimetría (IA.), que da cuenta de la tendencia de la asimetría con respecto al total de células diferenciadas en ambas habénulas (Figura 9).

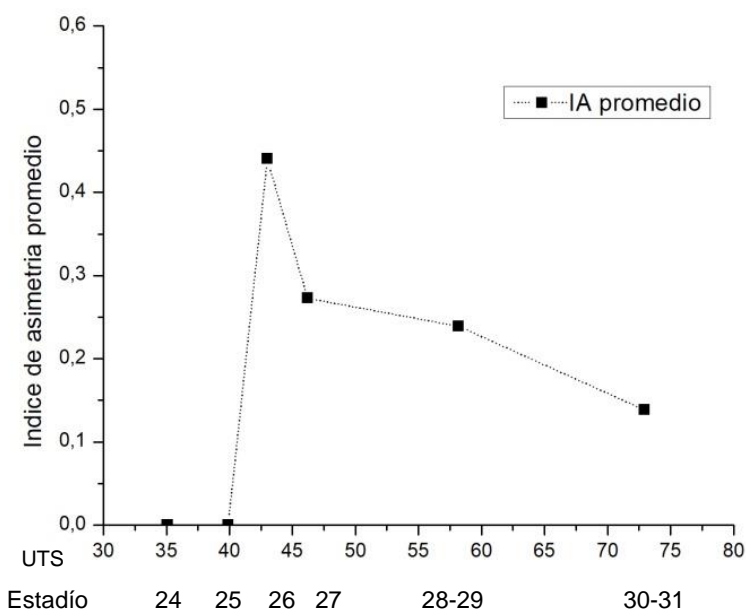


Figura 9. El IA es mayor en el estadío donde inicia la neurogénesis y decae en estadíos más tardíos mientras la neurogénesis se vuelve simétrica

A partir del gráfico de la figura 9 que representa el IA, se observa que en los primeros estadios el IA es cero, ya que en ese momento no hay células diferenciadas. En el estadio siguiente, correspondiente al estadio 26 de pez medaka, se encuentra el mayor índice asimetría, es decir, el punto en que la diferencia entre las células izquierda y derecha es más evidente. Este IA decae durante los estadios siguientes, lo cual se esperaba ya que en estadios más tardíos, la neurogénesis habenular tiende a la simetría conforme a que la población de progenitores neurales que genera las nuevas neuronas se va agotando y el número total de neuronas habenulares se estabiliza.

5.2 Proliferación celular en el epítalamo de embriones de pez medaka

5.2.1 Tratamiento con enzima *hatching* e incorporación de BrdU

Con el fin de analizar el inicio de la proliferación de precursores habenulares y el destino topológico en larvas de las células que proliferan en estadios tempranos, se decidió hacer un ensayo de “pulso y caza” con BrdU tanto en pez cebra como en medaka. Mediante este ensayo nos propusimos verificar si el mismo fenómeno es conservado en pez medaka y compararlo con pez cebra.

Para realizar lo descrito anteriormente en pez medaka, es necesaria la remoción del cori. En la figura 10 se muestran los embriones antes y después del tratamiento con enzima *hatching*. La supervivencia de los embriones obtenida fue de aproximadamente un 50% del total debido a la fragilidad de éstos al ser

manipulados durante la extracción de la membrana externa del corion (que no es degradada por la enzima de eclosión).

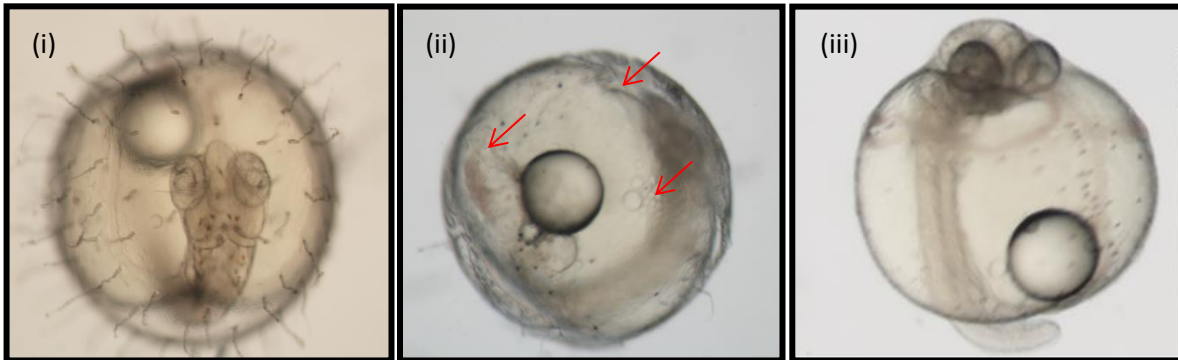


Figura 10. Descorionado exitoso de embriones de pez medaka mediante tratamiento con enzima de eclosión. Embrión de pez medaka en estadio 26 (i) previo al tratamiento, (ii) rasurado y tratado con enzima *hatching* y (iii) embrión descorionado. Las flechas rojas muestran los agujeros generados en la membrana interna del embrión por acción de la enzima.

Los embriones que sobrevivieron al tratamiento de descorionado y BrdU fueron analizados al noveno día post fertilización en el caso de pez medaka. Embriones que fueron tratados solo con DMSO presentaron un desarrollo anatómico normal similar al embrión sin tratar. (Figura 11 (i) y (ii)). Sin embargo, los embriones tratados con BrdU sufrieron malformaciones sutiles o severas (Figura 11 (iii)). Debido a (i) la muerte de embriones durante los primeros días luego del tratamiento, (ii) la generación de malformaciones en el desarrollo de ambas especies, caracterizada principalmente por edemas pericardiacos, hidrocefalias y malformaciones en la vesícula ótica y (iii) la falta de señal al momento de evaluar la inmunofluorescencia, se decidió modificar el protocolo original de tratamiento con BrdU.

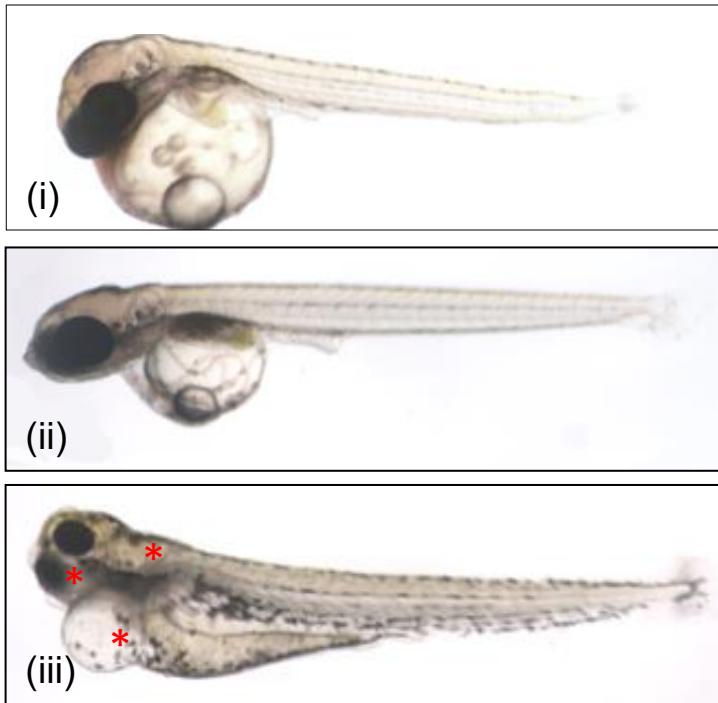


Figura 11 . Desarrollo de larvas de pez medaka luego tratamiento con BrdU.

Larvas de pez medaka de 8 días post fertilización. (i) Embrión control de pez medaka sin tratar de 8 días post fertilización, (ii) embrión de 9 días post fertilización tratado post fertilización con DMSO 10% por 30 minutos a los 3 días y (iii) embrión de 9 días post fertilización tratado con 10 mM de BrdU/10% DMSO durante 30 minutos a los 3 días post fertilización. Los asteriscos rojos indican malformación en la vesícula ótica, los ojos y edema pericardiaco.

Se realizaron pruebas de concentración de BrdU y tiempos de incubación para determinar la concentración mínima de detección y evitar malformaciones y mortandad en los embriones tratados (según tabla 2 descrita en la metodología). De esta manera se definió un protocolo de 5 minutos de incubación en hielo, luego un pulso de 20 minutos en medio con 10mM/DMSO 10% y se crecieron los embriones a 28° C hasta alcanzar el estadio larval, donde se fijaron en PFA fresco al 4%. El tratamiento anterior evitó las malformaciones con casos algunos casos excepcionales como se resume en la tabla 9.

Tabla 9. Detalle de sobrevivencia de embriones luego de tratamiento con *HE* y BrdU

Número inicial de embriones de pez medaka	Sobrevivencia luego de <i>HE</i>	Tratamiento	Sobrevivencia al estadio larval	Porcentaje de malformaciones
8	4	Control	4	0%
8	4	DMSO solo	4	0%
8	4	BrdU solo	4	0%
8	4	BrdU 10mM/15%DMSO	2	50%
8	4	BrdU 10mM/10%DMSO	4	25%

Sobrevivencia de embriones tras tratamientos con BrdU en pulsos de 20 minutos en hielo. Control: embriones descorionados con enzima *Hatching (HE)* y crecimiento en medio E3 a 28°C.

Los controles utilizados indicaron que el BrdU requiere del DMSO como vehículo para penetrar a la célula pero este compuesto por sí solo no genera ningún tipo de malformación o daño en el embrión a la concentración de trabajo usada en los ensayos (Figura 12).

Los ensayos en embriones tratados con BrdU que no sufrieron malformaciones fueron analizados por inmunofluorescencia contra BrdU y tanto en pez cebra como medaka indicó que el reactivo estaba presente en todas las células del epítalamo, identificadas por co-tinción con el reactivo Hoechst. Se observó que existía una importante desorganización celular en el cerebro de las larvas al compararlas con el control del *tg(flh/FoxD3:GFP)*. Las larvas transgénicas presentaron anomalías en la conformación del complejo Opp-Hb, evidenciando el daño neuronal causado por la toxicidad del compuesto.

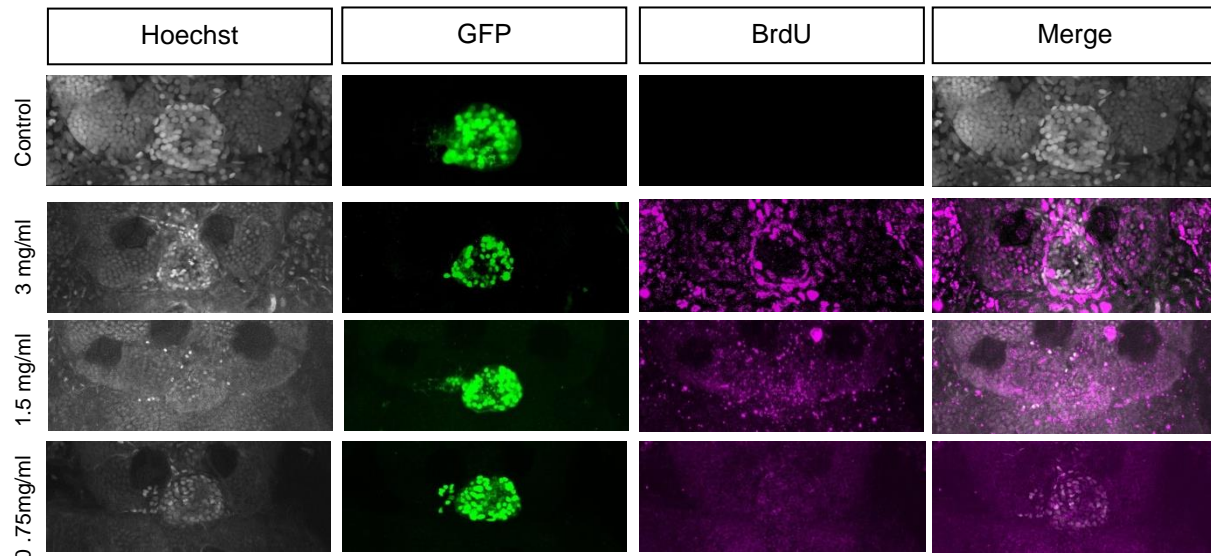


Figura 12. Curva de concentración de reactivo BrdU para estandarizar protocolo de “pulso y caza” en *tg(flh/FoxD3:GFP)* de pez cebra. Vista dorsal, anterior hacia arriba de inmunofluorescencia en epítalamo de larvas de pez cebra. Ensayo de curva de concentración con reactivo BrdU en larvas de pez cebra. Pulsos en embriones entre 24 a 30 horas post fertilización durante 20 minutos en hielo y fijados a los 5 días post fertilización. Magenta, células que incorporaron BrdU; verde, complejo pineal.

Tras distintas pruebas de concentración de BrdU, tiempos de incubación con el reactivo y fijación con paraformaldehído fresco, los resultados no fueron los esperados ya que se esperaba identificar el destino celular de las primeras células en proliferación, que al menos en pez cebra, debía observarse como una pequeña población de células marcadas con BrdU en la habénula izquierda cuando el pulso fuese en estadíos muy tempranos.

5.2.2 Identificación de células en estado apoptótico tras tratamiento con BrdU

Debido al resultado obtenido en los ensayos con BrdU tanto en pez cebra (figura 12) como en medaka (dato no mostrado), se consideró verificar si ello fue debido a una inducción de muerte celular y para ello se utilizó el ensayo de TUNEL. El

ensayo TUNEL se realizó en larvas que recibieron pulsos de BrdU 10mM/10% DMSO en estadios tempranos de desarrollo, como el descrito anteriormente en la sección de resultados (sección 5.1.1).

En la figura 13 se muestran los resultados del ensayo TUNEL, donde se aprecia que las larvas que recibieron pulsos de BrdU tienen un bajo número de células apoptóticas e incluso se asemejan al control que no recibió pulso. Por lo tanto, el ensayo con BrdU no genera un mayor número de células apoptóticas ni sugiere muerte celular con respecto al control en el estadio larval.

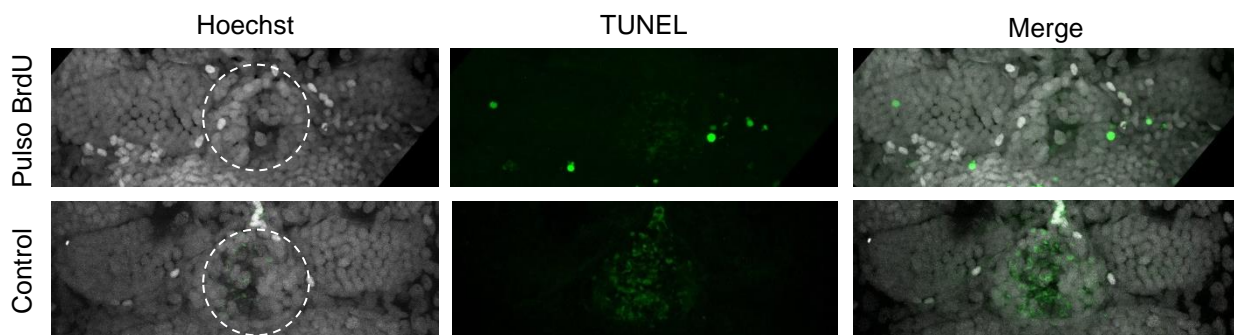


Figura 13. Embriones tratados con BrdU presentan leve aumento de células apoptóticas en la región del epitalamo de pez cebra. (i) Ensayo TUNEL con cotinción de hoechst en larva que recibió pulso de BrdU 10mM/10% DMSO durante 20 minutos a los 3 días post fertilización. (ii) Ensayo TUNEL en larva control.

5.3 Obtención de marcadores específicos para subnúcleos habenuares lateral y medial

5.3.1 Obtención de sondas antisentido

Para estudiar la existencia de subnúcleos en la habénula de pez medaka y complementar los datos obtenidos mediante la expresión del gen *leftover*, se eligió observar la expresión de otros genes marcadores de subnúcleos lateral y medial descritos en pez cebra: *narp* y *vachtb* respectivamente.

Para obtener la sonda antisentido necesaria para la hibridación *in situ* para pez cebra se usó cDNA integrado en plasmidios gentilmente otorgados por el instituto RIKEN y el Instituto Biologie Paris Seine.

Por otro lado, los genes de pez medaka debieron ser clonados. Usando las bases de datos de secuencias génicas de pez medaka y utilizando los genes de pez cebra como primera búsqueda de identidad de secuencia, se identificaron los siguientes genes candidatos (tabla 10).

Tabla 10. Genes de pez cebra (primera columna) utilizados para el clonamiento de los genes ortólogos de pez medaka.

Gen en pez cebra	Tipo de proteína	Referencia	Ortólogo en pez medaka
<i>narp</i>	Pentraxina reguladora de actividad neuronal	Agetsuma y cols. 2010	<i>nptx2a</i>
<i>vachtb</i>	Transportador vesicular de acetilcolina	Hong y cols. 2013	<i>slc183b</i>

Genes de pez cebra (primera columna); genes ortólogos de pez medaka (cuarta columna).

Se diseñaron partidores específicos para estos genes candidatos (como se describe en la tabla 1 sección 4.2.2.2 de Materiales y Métodos). Los genes amplificados por PCR fueron clonados en el plasmidio comercial pcR11 y para generar la sonda antisentido fue necesario transformar con éxito células electrocompetentes de la cepa *E. coli*, generar eficientemente cultivos en placas, purificar y linearizarlos para luego transcribir *in vitro* la sonda de mRNA (descrito en la sección 4.2.2.3 de Materiales y Métodos).

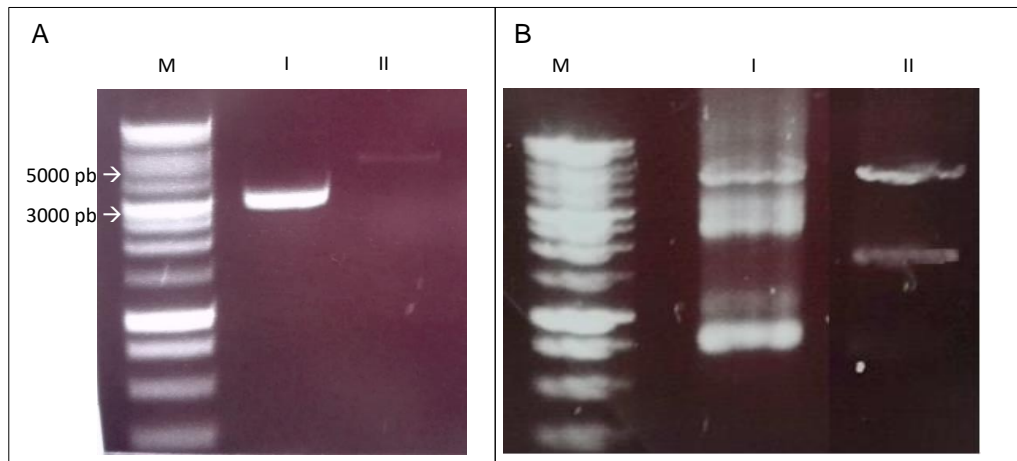


Figura 14. Obtención de sondas anti-sentido y sentido de *nptx2a* de medaka. (A) Digestión del plasmidio con *nptx2a*, (I) Plasmidio sin digerir; (II) plasmidio digerido con KpnI. (B) Producto final de la transcripción in vitro de la sonda *nptx2a* con: (I), polimerasa T7 (sonda anti-sentido), (II) y (II) polimerasa Sp6 (sentido).

La figura 14 muestra el análisis de electroforesis para la obtención de la sonda antisentido (Figura 14.A) de *nptx2a*, transcrita con la RNA polimerasa T7. Además se incluye la sonda sentido como control negativo transcrita con la RNA polimerasa Sp6.

5.3.2 Determinación indirecta de los subnúcleos habenulares mediante la expresión de genes asociados a funcionalidad en la habénula de pez cebra y medaka

Con el fin de estudiar la topología de los subnúcleos habenulares de pez medaka y pez cebra, se analizó la expresión de los marcadores *narp* y *vachtb*. Una vez generada la sonda, se realizó el mismo protocolo de hibridación *in situ* para ambas especies. La topología de expresión de estos genes se asocia a los subnúcleos presentes en los transgénicos de pez cebra; Narp (*narp*) para

subnúcleo lateral y el transgénico *brn3a* (*vachtb*) para subnúcleo medial. Debido a lo anterior se utilizaron larvas de más de 5 días post fertilización (120 hpf) de pez cebra y 9 días post fertilización (216 hpf) de pez medaka para asegurar que ambas especies se encuentran en el inicio del estadio larval.

Para favorecer la reproducibilidad del ensayo por hibridación *in situ* se estandarizó un protocolo luego de probar diferentes concentraciones de sondas y distintas temperaturas, lo que se describe en las tablas 11 y 12 con respecto a las larvas de pez medaka. La sonda sentido (control negativo) no arrojó resultados de expresión luego de utilizar el protocolo de hibridación (datos no mostrados).

Tabla 11. Detalle de larvas tratadas por hibridación *in situ* a distintas concentraciones de sonda en pez cebra y medaka

Especie	Gen	Concentración sonda	Número de embriones (n)	Resultados positivos
Pez Cebra	<i>vachtb</i>	1:100	10	0
		1:500	10	0
		1:1000	10	0
	<i>narp</i>	1:500	10	10
		1:1000	10	10
Pez Medaka	<i>slc183b</i>	1:50	5	0
		1:100	6	0
		1:500	20	0
		1:1000	10	0
	<i>nptx2a</i>	1:50	6	0
		1:100	10	0
		1:500	20	1
		1:1000	10	0

Hibridación *in situ* permeabilizada durante 1 hora con proteinasa K 1X e hibridación de la sonda a 65°C transcrita con RNA polimerasa T7.

Tabla 12. Detalle de larvas de pez medaka tratadas por hibridación *in situ* a distintas temperaturas de hibridación

Gen	Temperatura de hibridación de sonda	Número de embriones	Resultados positivos
<i>slc183b</i>	65°C	30	0
	70°C	N/A	N/A
<i>nptx2a</i>	65°C	46	1
	70°C	12	6

Hibridación *in situ* permeabilizada durante 1 hora con proteínasa K 1X y sonda diluida 1:500. (N/A) No Aplica.

En la figura 15 se observan los resultados de la hibridación *in situ* para cada gen en estadio larval. En pez cebra, la sonda *vachtb* no mostró señal de expresión en el diencéfalo dorsal y presentó una baja señal inespecífica en el resto del embrión incluso hasta 5 días de incubación con el tampón de revelado. La sonda fue re-sintetizada en más ocasiones (n=3) y se probó a distintas concentraciones (1:50; 1:100), pero aun así no se obtuvieron resultados positivos. La sonda de pez medaka, obtenida por el clonamiento del gen *slc183b* no presentó expresión en el diencéfalo dorsal aún luego de aumentar el tiempo de digestión con proteínasa K y concentrar las sondas. Estos resultados podrían deberse a que el gen *slc183b* de pez medaka no posee expresión habenuar durante el estadio de desarrollo estudiado. En el caso del gen *vachtb* de pez cebra, la falta de expresión puede deberse a una mala fabricación durante la elaboración de la sonda o un error en la inserción del plasmidio lo cual deberá corroborarse con un análisis de secuenciación del plasmidio que nos fue cedido.

La sonda *narp* de pez cebra sintetizada por el plasmidio cedido por RIKEN Brain Science Institute, presentó resultado positivo al siguiente día de incubación con el tampón de revelado *BM Purple*, coincidente con una mayor expresión en la región

lateral de la habénula izquierda y menor en la habénula derecha, tal como se describe en la literatura. La ribosonda obtenida por clonamiento del gen *nptx2a* de medaka presentó expresión en el diencéfalo cuando la sonda fue hibridada a 70°C, presentando señal en la región posterior a los núcleos habenulares. La señal posee expresión ligeramente mayor en la habénula derecha con respecto a la izquierda en embriones de estadio 39 (172,2 UTS). Este gen, homólogo de *narp* de pez cebra, no presentó coincidencia en su patrón de expresión revelando asimetría inversa en pez medaka.

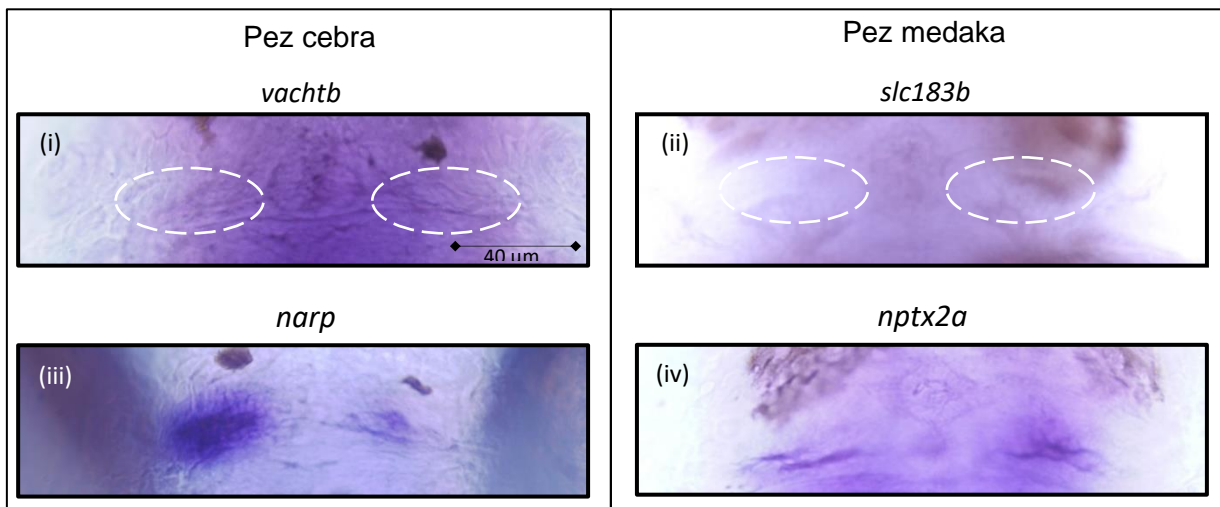


Figura 15. Heterotopía entre los genes *narp* y su ortólogo *nptx2a*. Vista dorsal (anterior hacia arriba) del epitálamo de larvas. Hibridación *in situ* contra los genes asociados a caracterización funcional de los núcleos habenulares en pez cebra (i) *vachtb* y (iii) *narp* y los de pez medaka (ii) *slc183b* y (iv) *nptx2a*. Las líneas blancas segmentadas indican el territorio de la habénula donde debería expresar los genes *vachtb* y *slc183b*

De acuerdo a estos resultados no fue posible establecer relación entre los genes asociados a la actividad colinérgica de la habénula en ambas teleósteos (*vachtb*, *slc183b*) pero si fue posible establecer la existencia de otra heterotopía presente en los genes asociados al tráfico de receptores AMPA. Mientras la habénula izquierda de pez cebra presenta mayor densidad de expresión del gen *narp*, en la habénula derecha su expresión es mucho menor y se reduce a una posición más posterior en la HbD de una manera que se asemeja a la expresión encontrada en ambas habénulas de pez medaka, aun cuando en este teleósteo los niveles de mayor expresión parecen ser algo mayor en la habénula derecha (Figura 15 iii y iv).

6. DISCUSIÓN

Dentro del reino animal existe un gran número de especies que pertenecen al reino Bilateria, es decir, que tienen un plan corporal simétrico con respecto a un eje corporal. Entre las características del reino Bilateria, existen desde pequeñas hasta significativas variaciones morfológicas que son propias de familias o incluso únicas de una especie y que han surgido producto de la evolución. Al mismo tiempo hay características que se encuentran conservadas entre animales muy distintos. Las asimetrías cerebrales en vertebrados son un claro ejemplo de lo último, conservando en algunos casos la identidad de poblaciones celulares, la conformación o morfología de un tejido y/o conectividad o también la función que cumplen dentro de los procesos o respuestas cerebrales (Concha & Wilson, 2001).

Producto de lo anterior es que surge la pregunta de cuáles son los mecanismos que explican que ciertas características se conserven al mismo tiempo que surgen variaciones especie-específicas. Algunos estudios proponen observar y comparar las ramas evolutivas y la divergencia de los órganos o tejidos y asociarlos a una función en cada organismo. En esta memoria se pretende aportar a un estudio más orientado a los mecanismos que producen más directamente los rasgos morfológicos y como las variaciones de estos mecanismos de la ontogenia pueden eventualmente explicar cambios en la filogenia. Para ello, usamos como foco de estudio la asimetría conservada del diencéfalo dorsal en dos especies de teleósteos, pez cebra y pez medaka cuyo rasgo distintivo es la asimetría direccional presente en la configuración del órgano parapineal y los núcleos

habenulares al mismo tiempo que se presentan conspicuas variaciones morfológicas especie-específica.

Los modelos para este tipo de estudio deben presentar ventajas idóneas para un estudio comparativo de biología del desarrollo. Los modelos pez cebra y medaka poseen 110 millones de años de evolución independiente y ofrecen la facilidad de observar la organogénesis con facilidad. Por otro lado, pez cebra se encuentra muy bien descrito debido a que su sistema génico está bien establecido y tiene la factibilidad de estudiar actividad neuronal y comportamiento. Debido a lo anterior, uno de los primeros desafíos que enfrenta este estudio es demostrar que pez medaka es realmente un modelo apropiado, práctico y eficaz para realizar un tipo de estudio comparado con pez cebra.

Como se mencionó anteriormente en la introducción, los estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que ambos teleósteos poseen heterotopías significativas en la consolidación del circuito Opp-Hb y al normalizar el tiempo de desarrollo de ambas especies con la Unidad de Tiempo Somito (UTS) se identificaron heterocronías en la etapa inicial de la elongación de las proyecciones del Opp hacia la habénula izquierda (Figura 2.A).

La inquietud que guía este trabajo de memoria de tesis es investigar si existe una relación mecánica y/o causal entre los fenómenos de heterotopía y de heterocronía que se observan al comparar el desarrollo de la proyección eferente del órgano parapineal hacia la habénula izquierda de pez cebra y medaka.

Como ya se expuso en la introducción, el supuesto teórico es que la organización asimétrica final de las proyecciones Opp/Hbl depende de las interacciones que existen entre estas dos estructuras. En este sentido se han identificado asimetrías de la habénula que son directamente dependientes de la presencia del órgano parapineal (es decir, son inducidas por esta estructura) y otras que se definen como independiente (es decir que se desarrollan debido a mecanismos particulares de la ontogenia de la habénula).

Dado que en medaka el órgano parapineal sufre una heterocronía respecto de pez cebra con una ontogenia que parece ser más temprana, cabe hipotetizar que aquellos mecanismos de asimetría habenular dependientes del órgano parapineal también podrían adelantarse, mientras que aquellos que no dependen del órgano parapineal deberían ocurrir aproximadamente en el mismo tiempo normalizado en ambos teleósteos.

En este trabajo de memoria se pone a prueba esta hipótesis considerando dos eventos asimétricos que se han descrito en la habénula de pez cebra: la neurogénesis asimétrica (independiente del órgano parapineal) y la proliferación celular asimétrica que determina el arreglo subnuclear lateral/medial (dependiente del órgano parapineal).

6.1 Neurogénesis asimétrica

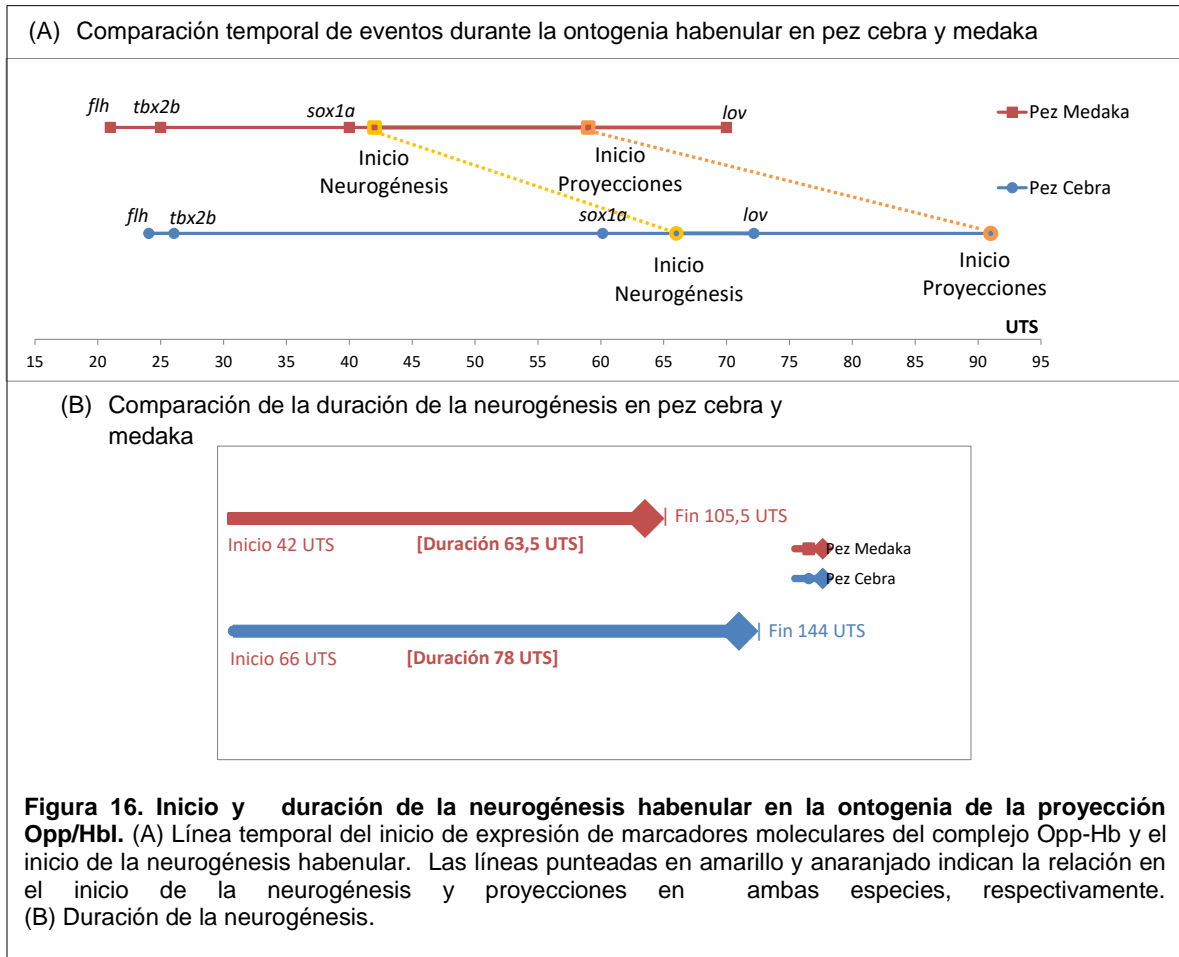
En esta memoria se realizó inmunofluorescencia contra la proteína HuC. Ésta es una proteína pan neuronal, perteneciente a la familia de factores Elav que se encuentra en el citoplasma de todos los tipos de neuronas (Kim y cols. 1996).

Dado que la neurogénesis habenular en pez cebra está descrita como un evento de desarrollo de asimetría independiente del órgano parapineal (Roussigné y cols. 2009), se esperaba observar lo mismo en el modelo de pez medaka y por lo tanto, la neurogénesis en este teleósteo debería comenzar en casi la misma Unidad de Tiempo somito que pez cebra y ser asimétrico izquierdo.

Se ha descrito previamente en pez cebra en Aizawa y cols. (2005), que la neurogénesis se inicia alrededor de las 36 – 37 hpf (72 UTS). Se observó que el inicio de la diferenciación es asimétrico y presenta lateralidad izquierda, según lo descrito en la cepa transgénica *tg(huC:kaede)* (Sato y cols. 2006) mientras Roussigné y cols. 2009 identificó que la neurogénesis se inicia a las 32 horas post fertilización (64 UTS) utilizando el *tg(huC:GFP)* como marcador (Roussigné y cols. 2009). Por lo tanto, la primera parte de este estudio fue dilucidar cuál es el inicio de la neurogénesis en embriones de pez cebra en base a ensayos de inmunohistoquímica contra HuC. Se determinó que la neurogénesis en pez cebra inicia a las 33 hpf (66 UTS) y esto coincide relativamente a lo descrito en Roussigné y cols. (2009).

Luego, dado que no existe cepa transgénica de pez medaka asociada a la proteína HuC, fue necesario utilizar la misma inmunohistoquímica contra HuC para detectar el inicio de la neurogénesis en estos embriones, como se describe en materiales y métodos. Respecto de la neurogénesis asimétrica, nuestros resultados de la inmunohistoquímica contra HuC usando el tiempo normalizado en unidad de tiempo somito (UTS) demostraron que la diferenciación neuronal es estadísticamente asimétrica en la habénula de pez medaka y se inicia cerca de las

las 42 UTS, mientras que en pez cebra la neurogénesis asimétrica se inicia a las 66 UTS, es decir, al menos unas 24 UTS de diferencia.



La figura 16.A, muestra una línea temporal que incorpora los eventos de inicio de expresión de los genes estudiados en nuestro laboratorio y el inicio de la neurogénesis en cada especie; en la figura se aprecia la heterocronía en cuánto al inicio de la neurogénesis y el inicio de las proyecciones y que la distancia entre ambos eventos no es proporcional en las especies. En la figura 16.B, se muestra el tiempo de duración de la neurogénesis que considera el inicio de la diferenciación de las neuronas habenulares hasta el punto en que la habénula

alcanza la simetría en ambas habénulas determinadas por HuC y existe alrededor de 10 UTS de diferencia el tiempo total del evento de asimetría entre los teleósteos.

Al igual que en pez cebra, la diferenciación de la habénula comienza antes del inicio de las proyecciones del órgano parapineal. Sin embargo, en pez cebra el inicio de la neurogénesis es a las 66 UTS y las neuronas eferentes del Opp inician su proyección a las 91 UTS, por lo tanto, entre ambos eventos hay alrededor de 25 UTS. Mientras en pez medaka, la neurogénesis inicia a las 42 UTS y el inicio de las proyecciones es a las 55 UTS, por lo que la diferencia entre ambos eventos es de aproximadamente 12 UTS.

Dentro de los análisis estadísticos realizados en esta tesis para corroborar el inicio y desarrollo asimétrico de la neurogénesis destacamos el gráfico 6 (sección 5.1 de resultados) ya que representa mejor la tendencia asimétrica de la neurogénesis en los primeros estadios de desarrollo. Este gráfico presenta el número de células de la habénula izquierda y la derecha HuC positivas de todos los embriones analizados. El gráfico demuestra que los puntos en general se ubican a la izquierda y no se sobreponen a la recta de simetría (dónde el número de células izquierda y derecha se vuelven iguales), por lo que podemos concluir la existencia de una tendencia asimétrica en nuestros datos la cuál es izquierda.

Por otro lado, el test de Mann Whitney realizado estadio a estadio en la habénula izquierda y habénula derecha es el que mostró mayor significancia en el inicio asimétrico de la neurogénesis habenular. De acuerdo a estos valores, el análisis

indica que en la habénula izquierda existe diferencia significativa entre 39,9 UTS y 43 UTS, correspondiente al estadio 25 y 26 de pez medaka (ver tabla 7), en donde se describe el inicio de la neurogénesis habenular y donde es estadísticamente significativo que el número de células es distinto de cero. Por otro lado, al analizar la población de datos de la habénula derecha se encuentra diferencia significativa entre los tiempos 43 y 46,2 UTS, correspondientes a los estadios 26 y 27 de pez medaka (ver tabla 8), en donde el número de células es estadísticamente mayor a cero. Se espera que el resto de los datos también tengan diferencias significativas en el número de células entre el resto de los estadios pero debido al bajo tamaño muestral no se logra en todos los casos la significancia estadística. Por lo tanto, con este test identificamos el inicio y de la neurogénesis en pez medaka, que inicia antes en la habénula izquierda que la derecha.

En base toda la información anterior, se concluye que la neurogénesis habenular de pez medaka inicia de manera asimétrica en la habénula izquierda a los 42 UTS (estadio 26) y luego de este estadio existe una tendencia a tener un mayor número de células diferenciadas en la habénula izquierda por sobre la derecha por lo menos hasta las 75,7 UTS (estadio 31) que fue el último estadio donde se pudo contar.

En la literatura, la tendencia a la asimetría izquierda también ha sido representada utilizando el Índice de Asimetría (IA), definido como $IA=(I-D)/(I+D)$, donde I es el número de células HuC positivo de la habénula izquierda; D es el número de células HuC positivo de la habénula derecha (Coles, 2008) (Savic & Lindstrom, 2008) (Roussigné, M.Isaac H. Bianco, 2009). Para el cálculo del índice, se usó el

promedio de células izquierdas y derechas para cada caso con lo que se obtuvo el gráfico de la figura 9. El IA es mayor en el estadio 26 (42 UTS) de pez medaka y decae durante los estadios siguientes, lo cuál es esperable ya que la asimetría debe minimizarse mientras la neurogénesis se vuelve simétrica.

Por otro lado, si bien el uso del IA evidencia el punto donde la asimetría es más evidente con respecto al total de células y como ésta decae en el tiempo, este índice está sujeto a controversia ya que en general, este tipo de análisis se emplea en muestras con n muestral mucho más grande que el nuestro (Coles, 2008; Savic & Lindstrom, 2008).

La significancia de nuestros datos cobra importancia particular considerando que en este trabajo, se esperaba encontrar que la neurogénesis asimétrica habenular debía iniciarse en igual UTS en ambas especies, ya que si se trata de un evento que no depende del Opp, la heterocronía del órgano parapineal de pez medaka no debería ser un factor relevante. Sin embargo, se identificó una nueva heterocronía en el sistema, ya que el evento de inicio de la neurogénesis asimétrica sí está adelantado con respecto a pez cebra en al menos 24 UTS y además el tiempo que tarda el Opp en comenzar a proyectar luego de iniciada la neurogénesis es casi la mitad del tiempo que le toma al Opp de pez cebra, como se observa en la figura 16.A.

Esto nos hace pensar que puede existir una relación más temprana entre la neurogénesis habenular y el Opp y que durante la ontogenia todo este circuito se adelanta, ya que mantiene la secuencia de sus eventos. O bien, existe algún

efecto del órgano parapineal sobre la neurogénesis habenular de tal modo que este no es un evento completamente independiente del Opp en pez medaka o que en esta especie existe una relación que en pez cebra no existe o no ha sido descrita.

Una manera de acercarnos a esa respuesta sería ablacionando el Opp de pez medaka y observar si esto afecta al inicio de la neurogénesis. Si es así, se debería esperar que la neurogénesis habenular de pez medaka se retarde.

Debido a lo anterior es que los intentos por dilucidar las relaciones ontogénicas que determinan la configuración del circuito Opp-Hb realizados en esta memoria no son totalmente concluyentes pero se destaca la nueva evidencia de sucesos heterocrónicos y heterotópicos en la neurogénesis y de expresión habenular (respectivamente) que no estaban descritos anteriormente en pez medaka y aportarán de manera indirecta a la comprensión del establecimiento de las variaciones topológicas encontradas en ambos teleósteos.

6.2 Proliferación asimétrica

Debido a la estructura fisicoquímica de las diferentes capas que constituyen el corion de pez medaka, al pequeño espacio perivitelino y a la presión interna del huevo, la eliminación manual del corion en esta especie produce que el huevo explote y el embrión muera. Por ello, previo al tratamiento con BrdU, fue necesario estandarizar un protocolo de descorionado con enzima hatching (descrito en la sección de Materiales y Métodos 4.2.3.1).

Luego de lograr descoronar con éxito (sección de resultados 5.2.1) se utilizó el marcador de proliferación celular, bromodesoxiuridina, para investigar si este evento se conserva en pez medaka y si su patrón temporal presenta alguna heterocronía.

La proliferación celular en los núcleos habenulares de pez cebra utilizando un ensayo de pulso y caza con BrdU fue descrito en Aizawa y cols. (2007) y con ello se identificó el destino de las primeras células que proliferan en el epítalamo. En pez cebra, las primeras células que proliferan tienen destino celular en las regiones laterales de la habénula (o subnúcleos laterales) que tal como se describe en la sección de la introducción, es la región donde se expresa el gen *lov*. Por otro lado, las células que comienzan a proliferar más tarde tienen destino celular en las regiones mediales de los núcleos habenulares (o subnúcleo medial) lo que se asocia a la expresión del gen *ron*. Además, se ha descrito que la asimetría de expresión de estos dos genes depende de la presencia y lateralidad del Opp (asimetría parapineal dependiente).

Los resultados del tratamiento con BrdU no fueron positivos a pesar de utilizar el protocolo descrito por Aizawa y cols. (2005) en pez cebra y medaka. El reactivo resultó ser altamente tóxico para los embriones, generando malformaciones e incluso una alta mortandad, cercana al 50% de los embriones tratados. Según Galvao y cols. (2014), el dimetilsulfoxido es tóxico en un organismo vivo a bajas concentraciones (<10%) durante exposiciones largas de tiempo, superiores a 24 horas (Galvao y cols. 2014), contrario al caso tratado en esta memoria en el cual el tratamiento fue durante intervalos de tiempo más cortos. Los 10mM de BrdU

con 15% de DMSO utilizado inicialmente fue tóxico para los embriones pero se probó que cada uno de los compuestos por sí solos no eran capaces de lograr la penetrancia del reactivo pues el DMSO favorece el transporte del BrdU al interior de la célula debido a su naturaleza anfipática.

Se logró determinar la relación ideal entre estos compuestos para que la penetrancia y detección fuese posible durante la inmunofluorescencia, evitando el desarrollo de malformaciones y llevando a 100% la viabilidad de los embriones, sin embargo, los resultados no fueron los esperados. Aizawa y cols. 2005, realizaron pulsos de BrdU y se identificó el destino celular de las primeras células en proliferar. Este ensayo de “pulso y caza” con BrdU, debía demostrar que las células en proliferación de los estadios más tempranos tienen un destino celular en las regiones laterales de los núcleos habenules y este marcaje debe ser asimétrico, con una mayor población de células proliferando en la habénula izquierda con respecto a la derecha. Gracias a la tinción con Hoechst para contexto celular, se evidenció que el compuesto BrdU se incorporó a prácticamente todas las células del cerebro del embrión. Cabe destacar que el BrdU posee ciertas desventajas en su uso: (i) mientras más divisiones celulares existen, la señal se va perdiendo y se vuelve menos evidente; esto explicaría porque algunas células tienen una señal más intensa que otras y algunas poseen pequeñas señales de fluorescencia; (ii) genera toxicidad celular; debido a su incorporación directa en el DNA, podría intervenir con la expresión génica normal, lo que se manifestó en las malformaciones vistas en los embriones durante su desarrollo y (iii) se incorpora en células dañadas (Taupin, 2007).

Este último punto fue considerado para realizar el ensayo de TUNEL; ya que la señal presente en todas las células del cerebro podría ser producto de un importante daño a nivel de población celular. Este ensayo descartó muerte celular en los embriones tratados ya que unas pocas células estaban sufriendo de apoptosis luego del pulso con BrdU, mostrando un marcaje apoptótico similar al control (Figura 13). Aun así, no se descarta totalmente que las células estén dañadas pues el ensayo de TUNEL da cuenta de células en fase final de muerte y no necesariamente de una célula en reparación. Un ensayo con caspasas sería lo ideal para ayudar dilucidar esta interrogante.

Si bien lo anterior no descarta que hubiese ocurrido apoptosis en estadíos tempranos o más cercanos al momento del pulso, las células aún podrían estar experimentando una fase de reparación celular y que ésta fuese la razón de incorporar BrdU en todas las células del tejido. Esto último puede ser el causante de las malformaciones en el desarrollo de las larvas, ya que el compuesto BrdU al incorporarse al DNA produce toxicidad en la célula, generando teratomas, desestabilizando el DNA, alterando la transcripción de genes y la traducción de proteínas (Larison & Bremiller, 1990) lo que explicaría la desorganización celular y las malformaciones vistas en el Opp en pez cebra (Figura 12) y en la larva completa (Figura 11, iii).

Debido a las complicaciones evidentes del uso de esta técnica no fue posible investigar como ocurre la proliferación celular en los núcleos habenuares de pez medaka y mucho menos determinar si ésta tiene relación con el órgano parapineal como se propone que sucede en pez cebra. Además, pez medaka ha dejado en

evidencia que es un modelo más sensible a los ensayos realizados en los embriones descorionados y esto dificulta los procesos experimentales.

6.2 Marcadores de subnúcleos habenulares

A pesar de las dificultades con los experimentos de incorporación de BrdU, investigamos la citoarquitectura habenular con marcadores asociados a los subnúcleos lateral y medial que se encuentran descritos en pez cebra, *narp* (marcador de subnúcleo lateral) y *vachtb* (marcador de subnúcleo medial).

El gen *narp* de pez cebra codifica una pentraxina asociada con la actividad sináptica que regula el tráfico de los receptores de glutamato (Elbaz y cols. 2015) y su expresión génica se asocia topológicamente a los subnúcleos laterales de la habénula de pez cebra por lo que su expresión es predominantemente en el lado izquierdo (Agetsuma y cols. 2010). Por otro lado, el gen *vachtb* de pez cebra codifica una proteína de transporte asociada a las vesículas sinápticas de acetilcolina y su expresión visualizada por hibridación *in situ* se asocia topológicamente a los subnúcleos mediales de la habénula de pez cebra por lo que su expresión es predominantemente derecha (Hong y cols. 2013). El clonamiento de estos genes en pez medaka fue exitoso pero sólo para el gen ortólogo de *narp*, el gen *nptx2a*, al que fue posible observar su expresión epitalámica. Si bien en pez medaka también existe expresión en los núcleos habenulares, la topología es evidentemente distinta a pez cebra. En pez medaka se pierde el rasgo asimétrico izquierdo característico del gen y el dominio de expresión es más bien posterior y asociado a la zona cercana a la comisura habenular. Además, hay una mayor marca en la habénula derecha y no en la

izquierda como en pez cebra, aunque en ningún caso existe un gran dominio de expresión (Agetsuma y cols. 2010). Una interpretación posible de este resultado podría ser que pez medaka también posee poblaciones celulares similares al subnúcleo lateral de pez cebra pero su topología es distinta, en donde ninguna de las habénulas tiene un subnúcleo lateral de gran dimensión y ambas habénulas poseen rasgos de habénula derecha. La excepción sería el marcador *leftover* el que sí se expresa mayormente en la habénula izquierda tal como ocurre en pez cebra, pero su topología sugiere que se encuentra específicamente asociado a la zona de proyección de los eferentes del órgano parapineal.

Debido a que pez medaka no cuenta con modelos transgénicos que permitan observar subnúcleos habenulares como en pez cebra, lamentablemente el estudio de estos no puede ser complementado con la observación de otros marcadores asimétricos a nivel de proteína tales como Brn3a, por ahora.

Por otro lado, el resultado negativo del gen *slc183b* (gen ortólogo de *vachtb*) podría deberse a un error durante la elaboración de la sonda o un error en el *timing* o ventana temporal de búsqueda de la expresión. Se descarta que el protocolo de hibridación estuviese errado ya que las sondas *nptx2a* y *narp* fueron positivas y la última se relaciona perfectamente a lo descrito en la literatura según Aizawa y cols. 2010. El resultado negativo de la hibridación *in situ* con el gen *vachtb* de pez cebra, podría deberse a una baja calidad del plasmidio recibido o que el plasmidio no portara el gen. Lamentablemente, no se pudo corroborar la presencia del gen en las colonias transformadas porque no se contaba con los partidores necesarios para realizar un ensayo de PCR pero un ensayo de

restricción con enzimas específicas para cortar el gen y el vector serviría para determinar si éste está presente. Así, dado que no fue posible reproducir el resultado descrito para pez cebra en la literatura con esta sonda, no es posible decir que *slc183b* de pez medaka no se expresa en el epítalamo. Lamentablemente, el resultado de este experimento nos deja sin información alguna sobre el dominio medial de la habénula de pez medaka y no nos permite formular interpretaciones más acabadas, pues el complemento en la expresión de ambos genes habría resultado ideal para una visión más completa sobre la existencia y configuración de los subnúcleos habenulares en pez medaka. Aparentemente, el gen *nptx2a* no puede asociarse directamente a la configuración de las proyecciones del Opp como en pez cebra, pues no evidencia similitud topológica a la conformación en “diente de león” como el gen *lov*.

Cabe destacar que la topología descubierta para *nptx2a* parece presentar una inversión en la magnitud de la expresión que también se presenta en la expresión del gen *ron* de pez medaka (Figura 4.III), ya que en pez cebra se asocia a los subnúcleos habenulares mediales y se expresa más en la habénula derecha pero en pez medaka es asimétricamente izquierdo. Esto puede sugerir que la habénula izquierda de pez medaka posee características más parecidas a la habénula derecha de pez cebra en ambos núcleos (que es aquella que tienen un núcleo medial más grande y que no recibe influencias de la presencia de la proyección del órgano parapineal).

Esto podría demostrarse obteniendo una descripción acabada de la topología de otros marcadores mediales, en particular la expresión del gen *slc183b*, ortólogo de

vachtb (marcador de subnúcleo medial) que podría dar luces para validar o rechazar la hipótesis anterior.

6.3 Factor temporal en estudio comparado

Los resultados y análisis presentados en este trabajo son posibles de describir gracias a normalización del tiempo de desarrollo de los teleósteos descritos. Dentro de la biología del desarrollo el tiempo es un factor temporal que debe ser tratado con rigurosidad pues no todos los eventos ontogénicos pueden ser extrapolables a todas las especies. Precisamente en este trabajo de tesis, el factor temporal es el que cobra la mayor relevancia ya que da cuenta de relaciones ontogénicas que no podrían ser vistas con un estudio comparado directo. Esto es posible gracias a la selección de los modelos, que hasta ahora han sido una selección acertada para observar factores ontogénicos conservados y especie-específica. Si bien existe cierta complejidad al pasar de un modelo altamente descrito a uno menos utilizado, nuestros estudios sientan bases sólidas para validar el uso de nuevas herramientas en estudios filogenéticos y de biología del desarrollo, agregando elementos antes no utilizados que permiten descripciones más acertadas en estudios comparados.

7. CONCLUSIONES

- Se identificó heterocronía en el inicio de la diferenciación de neuronas habenules entre pez cebra y pez medaka ya que la neurogénesis, identificada con marcador HuC inicia 24 UTS antes en pez medaka.
- En pez medaka, la neurogénesis inicia antes en la habénula izquierda que la derecha, tal como en pez cebra.
- En pez medaka, la neurogénesis tiene un comportamiento asimétrico izquierdo durante los primeros estadios de desarrollo hasta alcanzar la simetría en ambas habénulas.
- En pez medaka, la duración del evento asimétrico de neurogénesis (es decir, desde que inicia en la habénula izquierda hasta que se vuelve simétrica, dura 15 UTS menos que pez cebra.
- El adelantamiento de la neurogénesis de pez medaka, sugiere que podrían existir interacciones más tempranas entre el Opp-Hbl con respecto a lo que se ha descrito en pez cebra.
- No fue posible replicar el ensayo de “pulso y caza” en los teleósteos pez cebra y medaka.
- Los pulsos con BrdU en estadios tempranos pueden provocar malformaciones en pez cebra y medaka, manifestados como hidrocefalias, edemas cardíacos y mal desarrollo de ojos.
- Los pulsos con BrdU en estadios tempranos no provocan alta muerte celular (apoptosis).

- Existe heterotopía en la expresión del gen *narp* y su ortólogo en pez medaka *nptx2a* ya que este último no es asimétrico izquierdo como en pez cebra.
- La expresión del gen *nptx2a* es levemente asimétrico derecho y su expresión se restringe a territorios más posteriores en cada una de las habénulas.
- La topología de expresión del gen *nptx2a* de ambas habénulas de pez medaka se asemeja a la expresión del gen *narp* en la habénula derecha de pez cebra, lo que sugiere que los núcleos habenulares de pez medaka poseen rasgos citoarquitectónicos similares a la habénula derecha de pez cebra.
- Los resultados sugieren interacciones más complejas entre el Opp-Hbl en pez medaka con respecto a lo que se ha descrito en pez cebra.

8. REFERENCIAS

- Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., ... Okamoto, H. (2010). The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nat Neurosci*, *13*(11), 1354–1356. <https://doi.org/10.1038/nn.2654>
- Aizawa, H., Goto, M., Sato, T., & Okamoto, H. (2007). Temporally Regulated Asymmetric Neurogenesis Causes Left-Right Difference in the Zebrafish Habenular Structures. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.004>
- Bianco, Isaac HWilson, S. W., Carl, M., Russell, C., & Clarke, J. D. (2008). Brain asymmetry is encoded at the level of axon terminal morphology. *Neural Development*, *3*(1). <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-9>
- Bianco, I. H., & Wilson, S. W. (2009). The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *364*(1519), 1005–20. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0213>
- Bleich-Cohen, M., Hendler, T., Kotler, M., & Strous, R. D. (2009). Reduced language lateralization in first-episode schizophrenia: An fMRI index of functional asymmetry. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, *171*(2), 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.03.002>
- Coles, P. (2008). Statistical errors and asymmetry indices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(45), E82–E82. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806646105>
- Concha, Miguel L., Signore, Iskra A. Colombo, A. (2009). Mechanisms of directional asymmetry in the zebrafish epithalamus. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *20*(4), 498–509. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2008.11.007>
- Concha, M. L., Burdine, R. D., Russell, C., Schier, A. F., & Wilson, S. W. (2000). A Nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron*, *28*(2), 399–409. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00120-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00120-3)
- Concha, M. L., Russell, C., Regan, J. C., Tawk, M., Sidi, S., Gilmour, D. T., ... Wilson, S. W. (2003). Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality. *Neuron*, *39*(3), 423–438. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00437-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00437-9)
- Concha, M. L., & Wilson, S. W. (2001). Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J. Anat*, *199*, 63–84. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2001.19910063.x>
- Dadda, M., & Bisazza, A. (2006). Does brain asymmetry allow efficient

- performance of simultaneous tasks? *Animal Behaviour*, 72(3), 523–529.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.10.019>
- Dadda, M., Zandona, E., Agrillo, C., & Bisazza, A. (2009). The costs of hemispheric specialization in a fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1677), 4399–4407.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1406>
- Duboc, V., Dufourcq, P., Blader, P., & Roussigné, M. (2015). Asymmetry of the Brain: Development and Implications. *Annual Review of Genetics*, 49(1), 647–672. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055322>
- Elbaz, I., Lerer-Goldshtein, T., Okamoto, H., & Appelbaum, L. (2015). Reduced synaptic density and deficient locomotor response in neuronal activity-regulated pentraxin 2a mutant zebrafish. *The FASEB Journal*, 29(4), 1220–1234. <https://doi.org/10.1096/fj.14-258350>
- Escalante-Mead, P. R., Minshew, N. J., & Sweeney, J. A. (2003). Abnormal brain lateralization in high-functioning autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 33(5), 539–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14594334>
- Furutani-Seiki, M., & Wittbrodt, J. (2004). Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mechanisms of Development*, 121(7–8), 629–637.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.05.010>
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. R., & Cordeiro, M. F. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB Journal*, 28(3), 1317–1330. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>
- Gamse, J. T. (2003). The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon. *Development*, 130(6), 1059–1068.
<https://doi.org/10.1242/dev.00270>
- Gamse, J. T., Kuan, Y.-S., Macurak, M., Brösamle, C., Thisse, B., Thisse, C., & Halpern, M. E. (2005). Directional asymmetry of the zebrafish epithalamus guides dorsoventral innervation of the midbrain target. *Development*, 132(21), 4869–4881. <https://doi.org/10.1242/dev.02046>
- Hackett, B. P. (2002). Formation and malformation of the vertebrate left-right axis. *Current Molecular Medicine*, 2(1), 39–66.
<https://doi.org/10.2174/1566524023363031>
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., & Saijoh, Y. (2002). Establishment of Vertebrate Left–Right Asymmetry. *Nature Reviews Genetics*, 3(2), 103–113.
<https://doi.org/10.1038/nrg732>
- Herbert, M. R., Ziegler, D. A., Deutsch, C. K., O'Brien, L. M., Kennedy, D. N., Filipek, P. A., ... Caviness, V. S. (2005). Brain asymmetries in autism and developmental language disorder: A nested whole-brain analysis. *Brain*,

128(1), 213–226. <https://doi.org/10.1093/brain/awh330>

- Hong, E., Santhakumar, K., Akitake, C. A., Ahn, S. J., Thisse, C., Thisse, B., ... Halpern, M. E. (2013). Cholinergic left-right asymmetry in the habenulo-interpeduncular pathway. *PNAS*, *110*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1319566110>
- Iwamatsu, T. (2004). Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes* q. *Mechanisms of Development*, *121*, 605–618.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.03.012>
- Jung, G., Hug, M., Halter, C., Friesenhengst, A., Walzer, J., & Czerny, T. (2013). Diffusion of small molecules into medaka embryos improved by electroporation. *BMC Biotechnology*, *13*(1), 53. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-53>
- Kim, C. H., Ueshima, E., Muraoka, O., Tanaka, H., Yeo, S. Y., Huh, T. L., & Miki, N. (1996). Zebrafish *elav*/HuC homologue as a very early neuronal marker. *Neuroscience Letters*, *216*(2), 109–112. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)13021-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)13021-4)
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, *203*(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Larison, K. D., & Bremiller, R. (1990). Early onset of phenotype and cell patterning in the embryonic zebrafish retina. *Development (Cambridge, England)*, *109*, 567–576.
- Magat, M., & Brown, C. (2009). Laterality enhances cognition in Australian parrots. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *276*(1676), 4155–4162. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1397>
- Mehlhorn, J., Haastert, B., & Rehkemper, G. (2010). Asymmetry of different brain structures in homing pigeons with and without navigational experience. *Journal of Experimental Biology*, *213*(13), 2219–2224.
<https://doi.org/10.1242/jeb.043208>
- Mitchell, R. L. C., & Crow, T. J. (2005). Right hemisphere language functions and schizophrenia: The forgotten hemisphere? *Brain*, *128*(5), 963–978.
<https://doi.org/10.1093/brain/awh466>
- MN Hinman, H. Lou. (2008). Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci*, *20*(65), 3168–3180. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.01.076.White>
- Palmer, R. A. (2012). Developmental origins of normal and anomalous random right-left asymmetry: Lateral inhibition versus developmental error in a threshold trait. *Contributions to Zoology*, *81*(2), 111–124.
- Roussigné, M. Isaac H. Bianco, S. W. W. and P. B. (2009). Nodal signalling

- imposes left-right asymmetry upon neurogenesis in the habenular nuclei. *Development*, 136(9), 1549–1557. <https://doi.org/10.1242/dev.034793>
- Sato, T., Takahoko, M., & Okamoto, H. (2006). HuC:Kaede, a useful tool to label neural morphologies in networks in vivo. *Genesis*, 44(3), 136–142. <https://doi.org/10.1002/gene.20196>
- Savic, I., & Lindstrom, P. (2008). Reply to Coles: The results stand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(45), E83–E83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808087105>
- Signore, I. A. (2015). Heterotopía y Heterocronía en el desarrollo de la asimetría del epítalamo en pez cebra y medaka.
- Signore, I. A., Guerrero, N., Loosli, F., Colombo, A., Villalón, A., Wittbrodt, J., & Concha, M. L. (2009). Zebrafish and medaka: model organisms for a comparative developmental approach of brain asymmetry. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1519), 991–1003. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0260>
- Sun, T., & Walsh, C. A. (2006). Molecular approaches to brain asymmetry and handedness. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(8), 655–662. <https://doi.org/10.1038/nrn1930>
- Taupin, P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews*, 53(1), 198–214. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.08.002>
- Ter Huurne, N., Onnink, M., Kan, C., Franke, B., Buitelaar, J., & Jensen, O. (2013). Behavioral consequences of aberrant alpha lateralization in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*, 74(3), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.02.001>
- Vallortigara, G., & Rogers, L. J. (2005). Survival with an asymmetrical brain: advantages and disadvantages of cerebral lateralization. *The Behavioral and Brain Sciences*, 28(4), 575-89-633. <https://doi.org/10.1017/S0140525X05000105>
- Villalón, A., Sepúlveda, M., Guerrero, N., Meynard, M. M., Palma, K., & Concha, M. L. (2012). Evolutionary plasticity of habenular asymmetry with a conserved efferent connectivity pattern. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035329>