

UCH-FC
MA8-82
M322
C.1

ESCUELA DE POSTGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**ROL DE LA QUIMIOQUINA SDF1a EN LA
MIGRACIÓN CELULAR COLECTIVA Y GUÍA
AXONAL DE LA LINEA LATERAL POSTERIOR
EN PEZ CEBRA**

Tesis

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Camila Francisca Mardones Krsulovic

Agosto, 2012

**Director de Tesis
Dr. Miguel Luis Allende Connelly
Co-Director de Tesis
Dr. Leonardo Valdivia**

SANTIAGO - CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

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

Camila Francisca Mardones Krsulovic

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 14 de Agosto de 2012.

Director de Tesis:
Dr. Miguel Allende Connelly

Co-Director de Tesis:
Dr. Leonardo Valdivia

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Alejandro Roth

.....

Dr. Álvaro Glavic



BIOGRAFÍA



Toda mi infancia me crié en la ciudad de Buin, ubicada en las afueras de Santiago. A los 15 años, mi vida cambió: de ciudad tranquila, me trasladé a una ciudad agitada; de la libertad de una casa, me mudé a un limitado departamento; de un colegio católico, particular y mixto, me cambié a un liceo laico, público y femenino. En fin, la llegada a Santiago no fue trivial, pero tenía un propósito bien definido, poder obtener una formación sólida para poder ingresar a la Universidad, indiscutiblemente a la Universidad de Chile. Por fortuna eso no fue un problema y la elección fue la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Al final de esta carrera opté por continuar mi formación en la misma facultad de ciencias, y me mantuve trabajando en el área de la Biología del Desarrollo, como lo hice en pregrado. Fue así como realicé esta Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas bajo la tutela del Dr. Allende. Tanto la Universidad como el laboratorio me han entregado una amplia gama de conocimientos que sin duda me servirán para afrontar las problemáticas que se me presentarán en el futuro, tanto en un tema científico como un tema de vida.



AGRADECIMIENTOS

Estas palabras se las dedico a cada una de las personas que estuvieron presentes durante esta etapa en la cual realicé esta Tesis. Primero que todo quiero agradecer a mi hermana Javiera, porque ha sido siempre un pilar fundamental en mi vida, la que me ha ayudado a avanzar sin mirar atrás o mas bien tomando todos y cada uno de los eventos pasados como un aprendizaje que sin duda contribuirán de manera positiva en mi vida. También quiero agradecer a mis padres, Víctor y Verónica, los cuales me apoyan día a día apoyándome incondicionalmente. A ellos tres quiero además agradecerles por la comprensión que han tenido conmigo, ya que en más de una ocasión no he estado presente en jornadas familiares de fin de semana. Gracias también a la Sra. Carmen, porque ella si que me ha soportado más en las malas que en las buenas, por toda su paciencia.

Quiero hacer mención honrosa dentro de estos agradecimientos a la persona que me ha mantenido activa y motivada: Leonardo Valdivia, porque me ha mostrado lo que es ser un científico de verdad, dedicado, apasionado y enamorado de lo que hace. Agradezco también todo el apoyo brindado durante mi estadía en Londres, sin todo el apoyo brindado hubiesen sido infinitas los días de frustración laboral y las tardes libres de aburrimiento. Agradezco a Miguel que me permitió realizar esta tesis libremente, por todo su *feedback* entregado y por haberme permitido realizar una estadía en Londres, lo que sin duda me enriqueció como investigador y como persona, me hizo crecer (un poco obligada, pero crecí al fin y al cabo). Agradezco a toda la gente del Lab MA, en especial a Cata y Floro, por sus infinitos consejos que en más de una ocasión me ayudaron para continuar frente a la adversidad. A la Javi, por todo sus consejos y buena onda. A María, por todo lo que me fortaleció como persona haberla conocido. A Juanito, Sra. Angélica y Don Víctor, por que sin ellos (y Cata) el lab y viviero estarían "patas pa'riba". A Clau, Luisa, Carmen, Vivi (por los cruces realizados y el apoyo en general), Mario, a Marjorie, a Simon, Lau, Naty, Dani, Nikki, Undu, Oscar, Rosario. Gracias a Rod y todo el laboratorio de Steve Wilson, porque me acogieron muy bien durante mi estadía. En general a todos, por todos y cada uno de sus aportes y contribuciones positivas dentro de este trabajo.

No puedo dejar de agradecer a mis amigos de la U: Nacho, Bebipe, Gatz, Negro, Uli, Perú, porque desde ese segundo año de universidad han estado siempre ahí, en las buenas y en las malas, y por más que pase el tiempo siguen estando y siguen alegrando mis días. También están mis amigos fuera de la U: Nacho (te repites el plato! Siempre presente), Franche, porque la Trifulca nunca se detendrá!, Cota, por ser mi lucecita que me llena de alegrías, a mi Paito, por las infinitas tardes de risa y las noches de patitas, a mi Rafa, porque estando lejos estás siempre presente, a mi Josecita, por tu amistad infinita (21 años no es menor), a mi Pipi, porque eres un ejemplo para mi. En fin la familia y los amigos siempre han sido, son y serán un apoyo fundamental en cada etapa de vida.

Finalmente quiero agradecer a una persona que dentro de lo posible a tratado de apoyarme, y me ha alentado para que esta tesis esté hoy terminada, para que esta etapa culminara para empezar otras nuevas, gracias Adrián Valenzuela por tu amor.

ÍNDICE DE CONTENIDOS



1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El pez cebra como modelo de estudio.....	3
1.2 Desarrollo embrionario del pez cebra y la línea lateral.....	6
1.3 Genética de la formación del sistema de la línea lateral.....	11
1.4 Elongación de axones del nLLP a lo largo del miosepto.....	14
1.5 Señalización a través del ligando SDF1a en la formación del sistema de la línea lateral.....	15
1.6 Nuevo mutante para <i>sdf1a</i>	20
1.7 Planteamiento del problema.....	22
1.8 Hipótesis.....	23
1.9 Objetivo general.....	23
1.10 Objetivos específicos.....	23
2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.1 Cuidado y manejo peces.....	25
2.2 Extracción de ADN.....	26
2.3 Genotipado.....	27
2.4 Microscopía y procesamiento de imágenes.....	32
2.5 Inmunocitoquímica.....	32
2.6 Hibridación in situ.....	34
2.7 Marcaje de BrdU.....	36
2.8 Inyección de morfollinos, ADN, ARN y <i>heatshock</i>	37
2.9 Incubación con BIO y marcaje con BODIPY.....	38
2.10 Determinación de dirección de polarización del citoesqueleto.....	38
3.- RESULTADOS.....	40
3.1 Caracterización molecular y fenotípica de la LLP en peces mutantes para <i>sdf1a</i>	40
3.1.1 Descripción molecular de la mutación <i>sdf1a</i> ^{u766}	40
3.1.2 Descripción fenotípica, clasificación y cuantificación de fenotipos de peces <i>sdf1a</i> ^{u766} al término de la migración del pLLP.....	45
3.1.3 Comparación con peces <i>medusa sdf1</i> ¹³⁰⁵¹⁶	51
3.1.4 Descripción de la migración <i>in vivo</i> en peces <i>sdf1a</i> ^{u766}	54
3.2 Estudio de la conformación del primordio migratorio de la LLP y de su comportamiento celular en peces mutantes.....	58
3.2.1 Estudio del tamaño de primordios mutantes: evaluación de proliferación dentro del primordio migratorio.....	58
3.2.2 Formación de protrusiones y dinámica citoesqueleto.....	59
3.2.3 Descripción de la morfología y polaridad del primordio migratorio mutante.....	63
3.3 Estudio del comportamiento del nervio de la LLP en peces mutantes <i>sdf1a</i> ^{u766}	67
3.3.1 Determinar los eventos de comportamiento anómalos producidos en el nLLP en mutantes <i>sdf1a</i> ^{u766}	67
3.3.2 Determinar la presencia de glías que recubren el nLLP en ausencia de SDF1a.....	70
3.3.3 Estudiar regeneración de nervio post-axotomía en mutantes.....	72
3.3.4 Efecto local de SDF1a sobre el nLLP.....	74
3.3.5 Estudiar el comportamiento del nLLP en ausencia de los receptores para SDF1a.....	76
4.- DISCUSIÓN.....	81
5.- CONCLUSIÓN.....	91
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	92
7.- ANEXOS.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estadios del pez cebra.	4
Figura 2: Esquema de diferentes estadios del pez cebra.	6
Figura 3: Formación de la línea lateral posterior.	8
Figura 4: Línea lateral y neuromasto.	9
Figura 5: Línea lateral: células del primordio, nervio y glías.	9
Figura 6: Relación nervio/primordio durante la formación de la LLP.	10
Figura 7: Polarización del primordio y Moléculas involucradas.	14
Figura 8: Expresión de repelentes axonales.	15
Figura 9: Expresión de <i>sdf1b</i> en embrión de 36hpf.	17
Figura 10: Expresión de <i>sdf1a</i> y receptores.	18
Figura 11: Mutación <i>sdf1a</i> ³⁰⁵¹⁶	20
Figura 12: Peces mutantes <i>sdf1a</i> ^{u766} de 3dpf silvestre con la tinción vital DiAsp.	21
Figura 13: Peces mutantes <i>sdf1a</i> ^{u766} . Inmunocitoquímica contra tubulina acetilada en peces de 3dpf.	22
Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa al 3%, genotipado.	28
Figura 15: Esquema resumen de la identificación genotípica de peces mutantes.	31
Figura 16: Gráfico roseta usado para representar la polarización de microtúbulos.	39
Figura 17: Variantes de <i>splicing</i> de <i>sdf1a</i>	43
Figura 18: Esquema de las variantes de <i>splicing</i> de <i>sdf1a</i>	44
Figura 19: Clasificación de fenotipos de peces mutantes <i>sdf1a</i> ^{u766}	47
Figura 20: Confirmación de la proporción de fenotipos en un fondo genético diferente.	48
Figura 21: Clasificación de fenotipos de migración axonal en peces mutantes.	50
Figura 22: Secuencia en dos tiempos del proceso de migración en pez <i>medusa</i>	52
Figura 23: Gráficos comparativos entre mutantes <i>sdf1a</i> ^{u766} y <i>sdf1a</i> ³⁰⁵¹⁶	53
Figura 24: Prueba de complementación. Se realizó un cruce entre peces <i>sdf1a</i> ^{u766} y <i>sdf1a</i> ³⁰⁵¹⁶ . Al no recuperarse el fenotipo silvestre en peces portadores de ambas mutaciones, se asume que en ambos mutantes SDF1a se encuentra ausente.	53
Figura 25: Montaje de pez para realizar <i>timelapse</i>	55
Figura 26: Pez Tg[<i>cxcr4b</i> :mRFP ^{ump1} , <i>neurod</i> :EGFP ^{nl1}] de 33hpf.	57
Figura 27: Proliferación en primordio migratorio.	59
Figura 28: Primordio silvestre y un primordio mutante.	60
Figura 29: Cuantificación de la polarización de microtúbulos.	62
Figura 30: Hibridación <i>in situ</i> de la sonda <i>fgf10</i> , marcador anterior.	64
Figura 31: La adhesión celular estaría afectada.	65
Figura 32: Morfología de primordios migratorios de 33hpf.	66
Figura 33: Desfasciculación.	68
Figura 34: Ramificación.	69
Figura 35: Estudio de presencia de glía en una pérdida de función de <i>sdf1a</i>	71
Figura 36: Regeneración del axón luego de axotomía en peces carentes de SDF1a.	73
Figura 37: Respuesta del primordio/nervio frente a una fuente local de SDF1a exógeno.	75
Figura 38: Sobreactivación de la vía Wnt mediante la incubación con BIO.	77
Figura 39: Nervio de la LLP en mutantes para <i>cxcr7b</i> 30hpf.	78
Figura 40: Nervio en mutantes para <i>cxcr7b</i> 2dpf.	78
Figura 41: Nervio en mutantes <i>ody</i> (<i>cxcr4b</i>) 2dpf.	79
Figura 42: Esquema hipotético propuesto.	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tabla resumen de las líneas de peces utilizadas en este trabajo.....	26
Tabla 2: Tabla resumen con los estadios (en días post fertilización) y tiempos de incubación en proteínasa K Proteínasa K.....	33
Tabla 3: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.....	34
Tabla 4: Tabla resumen con los estadios (en días post fertilización) y tiempos de incubación en proteínasa K.....	35
Tabla 5: Proporción de cada uno de los 4 fenotipos mutantes, obtenidos en una primera aproximación.	47



LISTA DE ABREVIATURAS

aa	: aminoácido	NaCl	: cloruro de sodio
AB	: cepa silvestre de pez cebra	Na ₂ HPO ₄	: fosfato disódico
ADN	: ácido desoxirribonucleico	nLLP	: nervio de la LLP
AMP _c	: AMP cíclico	<i>ody</i>	: mutante <i>odyseuss</i> , <i>cxcr4b</i> ^{-/-}
ARN	: ácido ribonucleico	ON	: <i>over night</i>
ARN _m	: molécula de ARN mensajero	pb	: pares de base
BIO	: 6-bromindirubin-3'-oxima	PBST	: buffer fosfato salino con detergente Tween20
BrdU	: bromodeoxiuridina	PCR	: reacción de polimerasa en cadena
BSA	: suero de albúmina bovina	PFA	: paraformaldehído
<i>cxcl12</i>	: gen codificante del ligando CXCL12 o SDF1.	pLLP	: primordio de la LLP
CXCR	: receptores de la familia CXC	prim	: primordio
CaCl ₂	: Cloruro de Calcio	PTU	: feniltiourea
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol	RFP	: <i>red fluorescent protein</i>
DiAsp	: 2-Di-4-Asp	RT	: <i>room temperature</i>
DMSO	: dimetilsulfóxido	RT-PCR	: PCR en tiempo real
dNTPs	: deoxinucleósido trifosfatos	Rv	: <i>reverse</i>
dpf	: días post-fertilización	SDF1a	: proteína <i>stromal-cell derived factor 1a</i>
D17	: nombre común del mutante <i>sdf1a</i> ^{u766}	<i>sdf1a</i>	: gen codificante para SDF1a
EB3	: <i>end-binding protein 3</i>	<i>sdf1a_tv1</i>	: variante de transcrito 1 de <i>sdf1a</i>
DTA	: ácido Etilenodiaminotetracético	<i>sdf1a_tv2</i>	: variante de transcrito 2 de <i>sdf1a</i>
ENU	: <i>N-ethyl-N-nitrosourea</i>	<i>sema3aa</i>	: gen codificante para semaforina3aa, un repelente axonal
E3	: medio para embriones	SSC	: saline-sodium citrate (SSC) buffer
Fw	: <i>forward</i>	TAB5	: cepa silvestre de pez cebra
Fgf	: factor de crecimiento fibroblástico	Tg	: transgénico
GFP	: <i>green fluorescence protein</i>	Tris	: tris(hidroximetil)aminometano
gLLP	: ganglio de la LLP	ZFIN	: The Zebrafish Model Organism Database www.zfin.org
HCl	: ácido clorhídrico		
hpa	: horas post-axotomía		
hpf	: horas post-fertilización		
hyb	: buffer de hibridación		
HS	: <i>Heatshock</i>		
H ₂ O	: agua		
IgG	: inmunoglobulina G		
kb	: kilo bases		
KCl	: cloruro de potasio		
KOH	: hidróxido de potasio		
LG	: grupo de ligamiento		
LLA	: línea lateral anterior		
LLP	: línea lateral posterior		
L1-L5	: neuromastos de la LLP		
MetOH	: metanol		
MgSO ₄	: sulfato de magnesio		

RESUMEN

SDF1a es una molécula quimioattractante necesaria para diversas funciones durante el desarrollo que involucran migración celular dirigida. Este ligando interactúa con los receptores CXCR4 y participa en la guía y anidamiento de células primordiales germinales e inmunes, entre otras. Nosotros nos focalizamos en descubrir funciones biológicas adicionales para esta molécula, específicamente en el sistema de la línea lateral del pez cebra. Este sistema se forma mediante la migración direccional de un primordio de células que recorre el cuerpo del embrión siguiendo una ruta definida por la expresión de SDF1a. A través de un proceso morfogénico altamente complejo, el primordio deposita grupos de células regularmente espaciados que se diferencian como los órganos mecanosensores llamados neuromastos.

Como parte de una búsqueda a gran escala de mutantes que afecten el desarrollo de la línea lateral, rescatamos una mutación puntual en *sdf1a*, un gen encontrado previamente mutado en el mutante *medusa*. En los mutantes para *sdf1a*, el primordio es capaz de migrar aunque a una velocidad menor con respecto a la condición silvestre. Además, los primordios mutantes pierden la capacidad de migrar a través del camino correcto, el miosepto horizontal, y lo hacen por rutas aberrantes. Para desarrollar el trabajo hemos utilizados peces portadores de la mutación en el gen *sdf1a* y que, al mismo tiempo, expresan los marcadores GFP y/o RFP en células del

primordio, glías, y/o en el nervio de la LLP, para así visualizar mejor el fenotipo. La migración de estos componentes en peces mutantes y silvestres fue monitoreada a través de microscopía de tiempo extendido y se analizó la formación de protrusiones, polaridad, proliferación, ruta migratoria y polarización de microtúbulos. Estos resultados muestran que el primordio mutante no se polariza correctamente y que la proliferación se encuentra reducida comparada con el primordio silvestre. Sin embargo, en mutantes *sdf1a* los neuromastos son depositados y son funcionales. También examinamos la interacción nervio-primordio: a diferencia de lo que ocurre en peces silvestres, en peces mutantes i) el nervio crece permanentemente extendiéndose de manera independiente del primordio, ii) se defascicula, y iii) genera ramas que no inervan neuromastos. Sin embargo, las glías que acompañan al nervio se desarrollan normalmente y están presentes en todas las ramas del nervio. El proceso de regeneración del nervio post axotomía no se ve afectado en peces mutantes. Se concluye que la ausencia de SDF1a no impide la migración de este cohorte de células, pero es requerido para mantener la cohesividad del sistema, para asegurar la direccionalidad de migración del primordio, y directa o indirectamente, para generar la adecuada fasciculación del nervio y su correcta extensión axonal.

ABSTRACT

SDF1a is a chemoattractant necessary for diverse functions during development that involve directed cell migration. This ligand interacts with CXC receptors and participates in guidance and homing of primordial germ cells and immune cells, among other cell types. We aim to uncover additional biological functions for this molecule, specifically in the zebrafish mechanosensory lateral line system. This system is formed by directional migration of a primordium of cells that runs through the body of the embryo along a path defined by the expression of SDF1a. Through a highly complex morphogenetic process, the primordium deposits regularly spaced clusters of cells that differentiate as mechanosensory organs called neuromasts.

As part of a large-scale screen to search for zebrafish mutants affecting the lateral line, we recovered a point mutation in *sdf1a*, a gene previously found mutated in *medusa* mutants. In *sdf1a* mutants, the lateral line primordium migrates, albeit at a slower speed than the wild type primordium. Furthermore, mutant primordia fail to travel along the proper pathway, the horizontal myoseptum, instead following aberrant directions. In this work, we used zebrafish carrying mutations for *sdf1a* that, at the same time express expressing GFP/RFP markers in the primordium, neuromasts, glial cells and/or nerve of the lateral line to further examine the phenotype. Migratory events were monitored through timelapse microscopy by protrusion formation, polarity, proliferation, migration pathway and microtubule polarization. These results show that the mutant primordium fails to polarize

correctly and that there is reduced proliferation compared to wild type primordia. However, in mutants, neuromasts are deposited and they are functional. We also examined the primordium-nerve interaction; in mutant fish i) the growing nerve consistently travels independently of the primordium, ii) it defasciculates and iii) it generates branches that do not innervate neuromasts. However, glial cells appear normal and are present in all branches of the nerve. The nerve regeneration process is not affected in mutants after axotomy. We conclude that the absence of SDF1a does not prevent migration of this cellular cohort, but that is required to maintain cohesiveness, for primordium migration directionality and, directly or indirectly, to generate proper nerve fasciculation and proper axonal extension.

1. INTRODUCCIÓN

La migración celular colectiva es el desplazamiento coordinado de un grupo coherente de células que interactúan entre ellas (Haas y Gilmour, 2006). Este proceso biológico es indispensable durante la morfogénesis en el desarrollo embrionario de organismos multicelulares (David et al., 2002; Haas y Gilmour, 2006; Streichan et al., 2011; Theveneau et al., 2010), así como también en procesos anormales observados en organismos superiores como la metástasis durante la progresión de algunos tipos de cáncer (Friedl y Gilmour, 2009).

En el contexto del embrión, durante el desarrollo animal, dicho proceso migratorio permite la formación de estructuras y órganos en posiciones específicas (Dambly-Chaudière et al., 2003). Estos movimientos celulares durante la morfogénesis son finamente regulados, dependiendo de varios factores que incluyen señalizaciones tróficas para la comunicación entre tejidos (David et al., 2002). La quimiotaxis, involucra señales tróficas y es un mecanismo bastante aceptado como un nodo de control importante al momento de regular estos movimientos, dirigiendo células individuales o grupos de ellas a través de gradientes moleculares (Dormann y Weijer, 2001). Las quimioquinas son proteínas de bajo peso molecular (atractantes o repelentes) las cuales son responsables de dirigir y guiar el movimiento. SDF1 es una

quimioquina presente en vertebrados que se a descrito y estudiado por participar en estos procesos que involucran desplazamiento de células.

Los eventos que comprenden migración celular dirigida fueron inicialmente estudiados en cultivo celular (Vicente-Manzanares y Rick, 2011). Más tarde se incorporaron modelos invertebrados como *Drosophila melanogaster* (Prasad et al., 2011; Moreira et al., 2011), *Caenorhabditis elegans* (Wong et al., 2011) y *Dictyostelium discoideum* (Artemenko et al., 2011), los cuales han permitidos estudiar ampliamente dicho proceso y sentaron las bases mecánísticas y moleculares iniciales de la migración celular colectiva.

El éxito de los estudios realizados en estos modelos, se basa en la existencia de atractivas características, variadas herramientas genéticas y en la capacidad de realizar monitoreo *in vivo*, lo que ha permitido estudiar el proceso de migración celular con gran detalle (Friedl y Gilmour, 2009), dejando en evidencia que ese nivel de resolución en un organismo intacto es una herramienta poderosa para estudiar un proceso a nivel molecular y sistémico (Vicente-Manzanares y Rick, 2011). En la práctica, la razón por la cual la migración celular ha sido ampliamente estudiada en los modelos anteriormente nombrados es debido a sus propiedades ópticas, herramientas moleculares y de transgénesis que han permitido introducir marcadores en determinados grupos celulares para seguir procesos *in vivo* bajo el microscopio. Ésto sumado a que los procesos de desarrollo son relativamente rápidos, y a que existen mutantes y otros recursos para hacer análisis funcionales de genes, llevan a concluir que este conjunto de propiedades y ventajas son fundamentales para disectar la mecánica de migración celular en un contexto normal y en un organismo completo

(Vicente-Manzanares y Rick, 2011; Wong et al., 2011; Moreira et al., 2011; Prasad et al., 2011; Artemenko et al., 2011).

En estudios con fines biomédicos surgió la necesidad de contar con modelos vertebrados que fuesen más cercanos a los humanos, para realizar aproximaciones más relevantes. Por ello, la línea lateral del pez cebra recientemente ha ganado posición como un atractivo modelo en vertebrados, en el que ocurren procesos de migración colectiva durante la organogénesis, presentando además las características simples y similares a las ventajas anteriormente mencionadas en invertebrados. Éste es un sistema sensorial presente en peces y anfibios que comprende sólo 6 tipos celulares, el cual se forma a través de un patrón casi invariable, el cual se encuentra innervado por axones que se extienden cientos de micrones en línea recta (Dambly-Chaudière et al., 2003). Todas estas ventajas combinadas con las intrínsecas del organismo modelo del pez cebra que se detallan a continuación, han posicionado a este sistema como un escenario atractivo para combinar análisis genéticos, celulares y moleculares (Ghysen et al., 2004) y que han permitido estudiar varios procesos biológicos como morfogénesis (Dambly-Chaudière et al., 2003), innervación (Bricaud et al., 2001), proliferación (Laguerre et al., 2005), diferenciación (Grant et al., 2005), y migración (David et al., 2002).

1.1 El pez cebra como modelo de estudio

El pez cebra (*Danio rerio*), es un pequeño pez tropical de agua dulce proveniente del sudeste asiático. Debido a su tamaño (Figura 1), fácil cultivo, manipulación y rápido desarrollo, este organismo se ha convertido en un importante modelo vertebrado en la actualidad (Harper y Lawrence, 2010).

Este es un pez teleósteo introducido como animal modelo para realizar estudios genéticos durante los años 70, por el Dr. George Streisinger de la Universidad de Oregon, Estados Unidos (Chitnis et al., 2011). El pez cebra cuenta con una versión simplificada de los órganos y estructuras presentes en vertebrados superiores (Nüsslein-Volhard y Dahm 2002), y por esta razón, durante las últimas décadas, ha sido utilizado como modelo de estudio en diversos procesos biológicos así como también de procesos patológicos para el estudio de enfermedades (Harper y Lawrence, 2010).

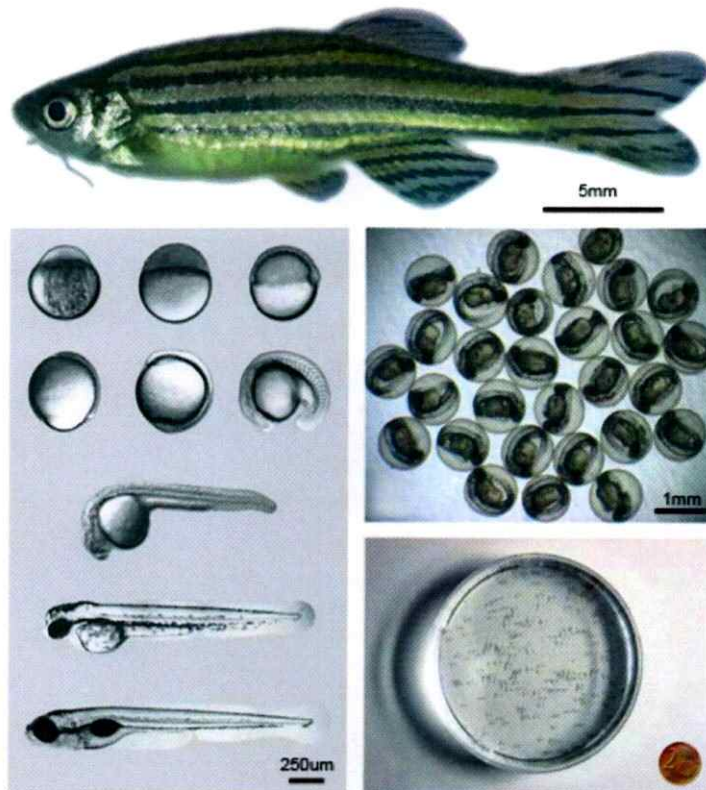


Figura 1: Estadios del pez cebra. Este cuadro muestran distintas etapas del desarrollo del pez cebra: A) Fotografía de un pez cebra adulto. Estos miden aproximadamente 3cm de largo (de cabeza a cola). B) Distintos estadios del embrión del pez cebra, desde 0 a 40hpf. En estos embriones es posible ver el óvulo fecundado a las 0hpf, la formación del blastómero 4hpf, la gastrulación del embrión 6 y 8hpf, y la morfogénesis, 10, 18, 24 y 48hpf (Kimmel et al., 1995). También es posible ver una larva de 5dpf, esta larva presenta ya todos sus órganos formados y sólo le falta crecer. Además es capaz de nadar y alimentarse. C) Grupo de embriones de 40hpf dentro del corion observados bajo lupa, nótese la facilidad de visualización de las distintas estructuras del pez por simple observación, eso se debe a la transparencia de los tejidos en estadios tempranos. D) Larvas de 72hpf, estas larvas ya no presentan corion y se pueden agrupar decenas de ellas en una misma placa Petri.

Este animal, cuenta con una larga lista de características favorables, entre las que destacan:

1.- **Fácil manejo**. Debido a el tamaño del animal en estado adulto (aproximadamente 3cm) permite almacenar decenas de individuos en un espacio reducido (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002).

2.- **Procesos biológicos accesibles**. La transparencia durante los estados embrionarios y larvales, permite visualizar procesos *in vivo* de una manera accesible y no invasiva (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002).

3.- **Ciclo de vida corto**. Frente a nuestra escala temporal, el pez cebra presenta un ciclo de vida de corto período de duración. El organismo ha terminado su embriogénesis y presenta un plan corporal definido, a los 3 días post fertilización. A los 3 meses ya es sexualmente maduro (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002).

4.- **Gran número de individuos por cruce**. Presenta fecundación externa y se puede obtener fácilmente más de 100 embriones diarios por cruce a partir de una pareja (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002).

5.- **Diversas cepas transgénicas y mutantes**. El genoma del pez cebra se encuentra completamente secuenciado, lo que ha permitido desarrollar herramientas y metodologías para lograr un gran número de cepas transgénicas y mutantes. Las cepas transgénicas disponibles han permitido seguir procesos *in vivo*, y, junto a los mutantes, han permitido obtener información sobre la función de diversos genes. Esta es una de las principales ventajas y que lo han convertido en un modelo ideal para corroborar un sin número de evidencias obtenidas *in vitro* y contextualizar los diversos procesos y acontecimientos biológicos en el animal intacto.

1.2 Desarrollo embrionario del pez cebra y la línea lateral

Una de las ventajas de este animal es que su desarrollo ocurre rápidamente, frente a nuestra escala temporal o comparado con otros vertebrados. A las 24 de desarrollo, el embrión del pez cebra ya posee un plan corporal básico establecido y a las 72hpf ya es una larva de aproximadamente 3.5mm con capacidad natatoria, Al quinto día su mandíbula está formada y es capaz de alimentarse por si solo. Luego de esto, el animal sólo comienza a crecer (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002) (Figura 2).

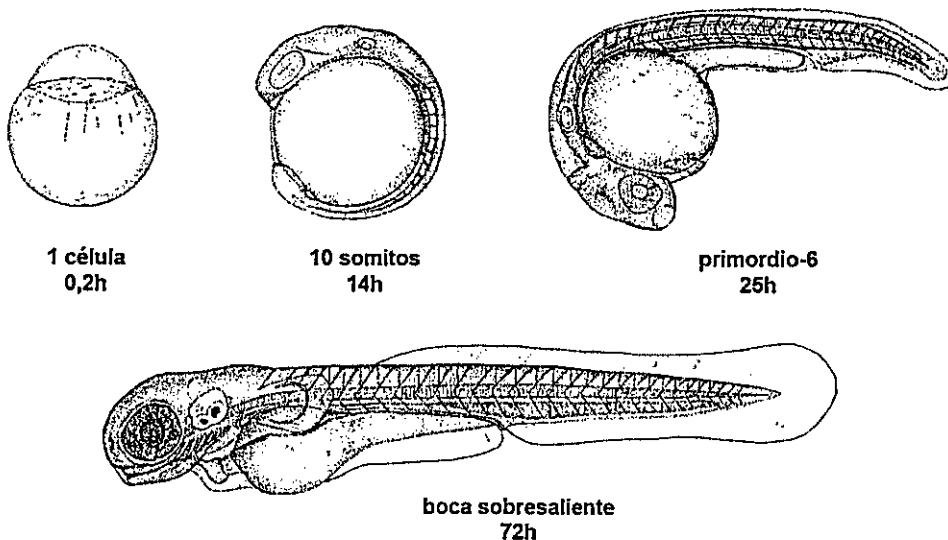


Figura 2: Esquema de diferentes estadios del pez cebra. Se muestran distintos estadios con sus correspondientes tiempos (en horas post fertilización) a una temperatura de 28,5°C. Figura adaptada de (Kimmel et al., 1995).

Durante el primer día de desarrollo en el embrión del pez cebra, se forman diversas estructuras y órganos, y entre ellos se forma uno que está íntimamente relacionado con el sistema nervioso periférico: la línea lateral (Metcalf et al., 1985). Éste es un sistema mecanosensorial presente en anfibios y peces teleósteos (Pichon y Ghysen, 2004), que permite captar las perturbaciones del medio acuático y se relaciona con

conductas reproductivas y de aprendizaje, de predación y de nado en cardúmen (Chitnis et al., 2011).

La línea lateral del pez cebra se subdivide en dos ramas principales: línea lateral anterior (LLA) y la línea lateral posterior (LLP), las cuales difieren en su placoda de origen (anterior o posterior a la placoda ótica, respectivamente); además difieren en la ubicación de su ganglio (anterior o posterior al oído, respectivamente) y en la posición de sus proyecciones neuronales en el cerebro anterior (David et al., 2002). Por la accesibilidad de la LLP, ésta ha sido principalmente utilizada como modelo de estudio y la LLA se encuentra aún sin ser mayormente explorada.

A las 19 hpf la formación de la LLP comienza en la parte rostral del pez, posterior al oído, cuando el ganglio y el primordio de la LLP se hacen evidentes como un grupo celular coherente que corresponde a la placoda (Figura 3a) (Dambly-Chaudière et al., 2007). Ambos se generan a partir de esta placoda común que adquiere característica discretas donde las células anteriores formarán el ganglio, cuyos axones más tarde se extenderán acoplados a las células traseras de la placoda, las que darán origen al primordio migratorio (pLLP) (Figura 3b) (Becker et al., 2001). Este pLLP está compuesto por alrededor de 100 células agrupadas y estructuralmente polarizadas, las cuales comienzan a migrar colectivamente alrededor de las 20hpf, a través del miosepto horizontal desde la cabeza hasta la punta de la cola. Este proceso finaliza alrededor de las 42hpf (Sapède et al., 2002), cuando el primordio se fragmenta en la región más caudal, formando los neuromastos terminales (Gompel, 2001).

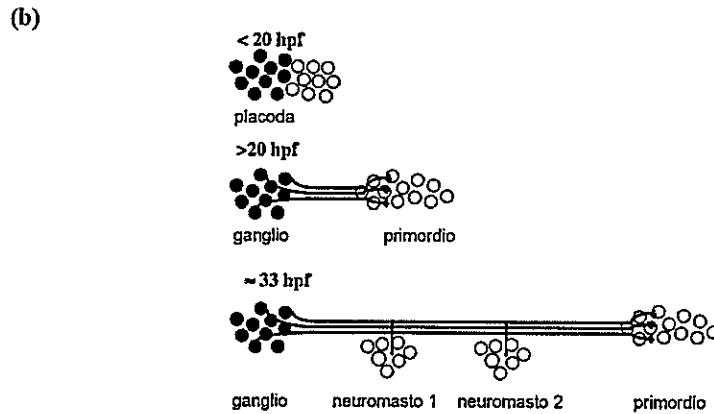
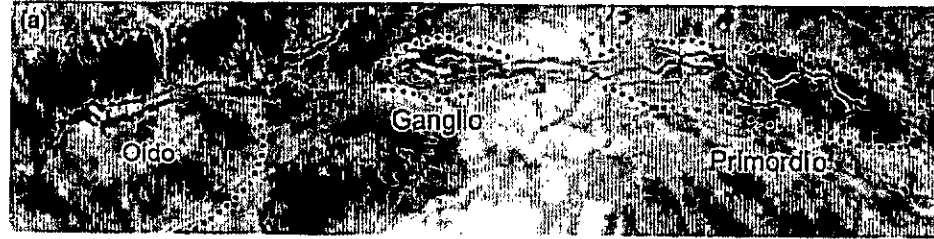


Figura 3: Formación de la línea lateral posterior. a) Se observa el oído a la izquierda, ganglio al centro y el primordio comenzando a migrar a la derecha. b) Esquema de la formación de ganglio y primordio de la LLP a partir de un mismo grupo de células de la placoda, a las 19hpf estas células forman la placoda de la LLP, luego las células más caudales comienzan a migrar y forman el primordio, mientras que las células más rostrales forman el ganglio de la LLP (gLLP). Figura adaptada de (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004; Becker et al., 2001).

Durante su ruta migratoria, el pLLP deposita grupos discretos de células que dan origen a las unidades mecanosensoriales que componen la línea lateral, y que se conocen como neuromastos. Estas son 7-8 estructuras posicionadas a intervalos regulares sobre el miosepto, línea media del cuerpo del embrión (Figura 5A). Los neuromastos son la unidad básica de este sistema y se componen de un núcleo central de células ciliadas mecanosensoras, innervadas por fibras aferentes, y rodeadas por células de soporte y del manto (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004) (Figura 4).

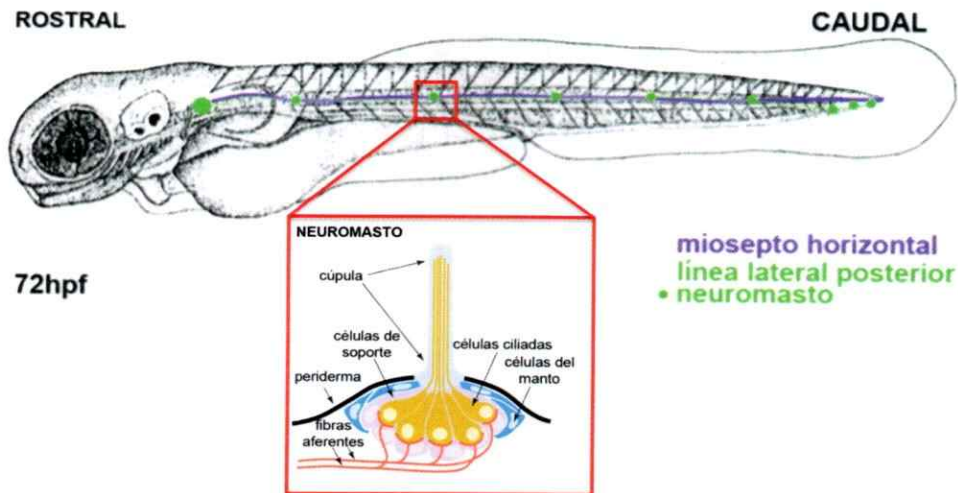


Figura 4: Línea lateral y neuromasto. El esquema muestra un pez de 72hpf con la LLP graficada sobre el miosepto horizontal coloreado de morado, los neuromastos se muestran como puntos verdes. Un cuadro rojo marca el tercer neuromasto de la LLP y amplifica un esquema de su estructura donde se muestran los distintos tipos celulares que componen este órgano mecanotransductor: células ciliadas que están en contacto directo con el exterior y que permiten sentir las perturbaciones del entorno; las células del manto y de soporte, células accesorias que rodean a las ciliadas y axones que conectan al sistema con el cerebro del animal. Figura adaptada de (Kimmel et al., 1995; Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004).

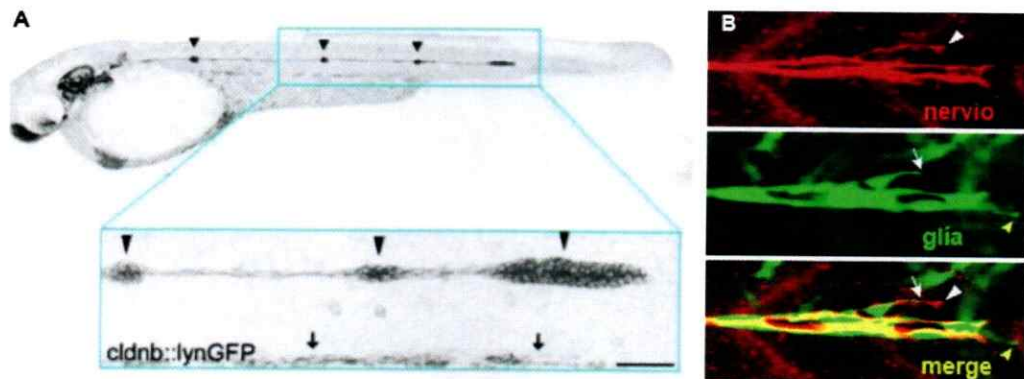


Figura 5: Línea lateral: células del primordio, nervio y glías. A) Migración de la LLP. Se muestra un pez cercano a las 38hpf, Tg[-8.0cldnb:lynGFP] es una línea transgénica que expresa GFP en las células de la LLP. Es posible visualizar el pez completo en la región superior de la figura, y con puntas de flecha se muestran dos neuromastos que ya han sido depositados, y el primordio aun en migración. El cuadro en cian muestra un aumento de la región del primordio en donde se ven dos neuromastos depositados señalados con puntas de flecha y las flechas muestran los pronefros, que también son marcados en esta línea. Figura adaptada de (Haas y Gilmour, 2006). En la figura se muestra una fotografía de los conos axonales durante la migración del nervio, se observa el nervio (en rojo) acompañado por las glías (verde). La última imagen, muestra la co-migración (Gilmour et al., 2002).

Las fibras aferentes que inervan neuromastos son axones provenientes del ganglio de la línea lateral posterior (gLLP), cuyo conjunto de axones forman el nervio de la línea lateral posterior (nLLP). Los axons del nLLP se encuentran recubiertos por células de Schwann que lo acompañan en todo momento (Gilmour et al., 2002) (Figura 5B). Este nervio se extiende fasciculado y se encuentra acoplado al primordio a través de fenómeno dinámico durante todo el proceso migratorio, sin que sus conos de crecimiento sobrepasen jamás la porción delantera del primordio (Metcalf et al. 1985) (Figura 6).

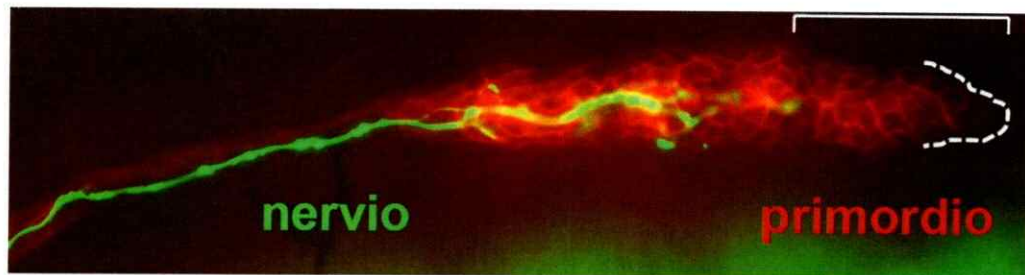


Figura 6: Relación nervio/primordio durante la formación de la LLP. Fotografía de un embrión Tg[*cxcr4b:mRFP^{u/mpl}*; *neurod:EGFP^{nl}*], donde el nervio se muestra en verde y células provenientes del primordio en rojo. Los axones de se extienden a partir del gLLP acoplado al primordio migratorio de LLP. El límite anterior del primordio se encuentra delimitado con una línea punteada blanca. En la figura se muestra que el nervio no invade la región delatara del primordio (señalado con corchete), interactuando solamente con las células pertenecientes a los 2/3 traseros del primordio.

Genética y estructuralmente las células que componen los neuromastos de la LLP son idénticas a las células presentes en el oído del animal, pero difieren fisiológicamente, ya que estas últimas permiten captar las perturbaciones a corta distancia, mientras que las células ciliadas de los neuromastos permiten censar las perturbaciones a distancias mayores.

El desarrollo de la LLP conlleva una serie de procesos coordinados de migración celular colectiva, proliferación, morfogénesis y diferenciación. Cada uno de estos procesos se encuentra dirigido por diferentes genes pertenecientes a vías de señalización que se entrelazan (Aman y Piotrowski, 2011). Esta orquestación de

moléculas que comandan diferentes procesos biológicos en un sistema simple de manejar y visualizar, lo convierte en un atractivo modelo en el estudio de dichos procesos. Es así, que ya por casi dos décadas, se ha utilizado la migración del pLLP como modelo de estudio de la migración celular colectiva, coordinada, dirigida, y poco a poco se han ido descifrando los actores que la efectúan y que la dirigen (Aman y Piotrowski, 2011).

1.3 Genética de la formación del sistema de la línea lateral

Varios genes han sido analizados funcionalmente durante la formación de la LLP, involucrándose en diferentes procesos biológicos como: *patterning* del primordio, proliferación, adhesión celular, migración celular colectiva, entre otros (Aman y Piotrowski, 2011).

El pLLP es una estructura polarizada y es por ello que durante la migración existen principalmente dos zonas que son distinguibles considerando la morfología y comportamiento celular: la región delantera del primordio o *leading zone* presenta características mesenquimáticas (Aman y Piotrowski, 2011) con protusiones que se extienden mayoritariamente en la dirección de la migración (Haas y Gilmour, 2006); por otra parte, la región trasera o *trailing zone*, presenta características epiteliales, con células formando arreglos tipo rosetas que preforman los neuromastos que serán depositados por el primordio (Figura 7B). En esta última región, que corresponde a los 2/3 del primordio, se pueden distinguir dos o tres de estos arreglos en cualquier momento durante la migración (Aman y Piotrowski, 2008). Varios estudios han demostrado que dicha polaridad es producida principalmente debido a la interacción de dos vías de señalización que interactúan complementariamente:

- **La vía de señalización de Wnt/ β -catenina.** Esta se encuentra activa en la región delantera del primordio, donde induce la expresión de ligandos secretados pertenecientes a la vía de señalización de *Fgf*. Interesantemente, también induce la expresión del factor inhibitorio de la vía *Fgf*, *sef* el que se acopla a membrana (Figura 7A). Por lo que, en esta región delantera del primordio, esta vía de señalización de *Fgf* no se encontraría activa. A esta activación restringida de la vía de Wnt/ β -catenina, se le ha atribuido el control de la expresión localizada de dos receptores CXCR y además la coordinación la migración celular del primordio con la deposición de neuromastos restringiendo la señalización de *Fgf* a las células de la región trasera (Aman y Piotrowski, 2008).
- **La vía de señalización *Fgf*.** Esta vía esta activa en la región trasera debido a que los factores secretados, los que activan y regulan positivamente la vía de señalización de *Fgf*. La activación de *Fgf* en esta región, produce la expresión de *dkk*, un represor de la vía Wnt/ β -catenina (Aman y Piotrowski, 2011). De esta forma, la señalización de *Fgf* se encuentra activa en la región posterior y restringida a esta zona, y la vía de señalización de Wnt/ β -catenina se encuentra activa y restringida a la región delantera, produciéndose así una polarización del primordio a nivel estructura completa. Además produce el comienzo de la expresión de *atoh1a*, factor de transcripción que le otorga a células del pro-neuromasto el potencial de llegar a ser progenitores de células ciliadas (Matsuda y Chitnis, 2010).

Las vías de señalización de Wnt/ β -catenina y de Fgf también se encuentran relacionadas con la proliferación, proceso que se restringe a la región delantera del primordio (Aman et al., 2011).

La formación del núcleo mecanotransductor de la rosetas se genera a través del mecanismo de inhibición lateral, mediada por Notch/Delta (Figura 7B) (Mizoguchi et al., 2011). La expresión de *deltaA* produce la expresión de *atoh1a*, factor determinante en la especificación de células ciliadas (Matsuda y Chitnis, 2010). En el centro del proneuromasto, este activa la vía Fgf en las células del entorno, al mismo tiempo activa la expresión de *deltaD*, ligando de Notch, y Notch a su vez inhibe a *atoh1a* en células vecinas, otorgándole el destino de células de soporte. También genera una baja de expresión de cadherinas, que reduce la cohesión de la estructura, permitiendo la fragmentación del primordio y el desprendimiento de un neuromasto (Matsuda y Chitnis, 2010).

La Figura 7 muestra un resumen de la interacción de estas dos principales vías, las que polarizan el primordio durante la migración: algunas moléculas activan o reprimen a estas vías de señalización en las distintas regiones del primordio (anterior o posterior), produciendo la polaridad.

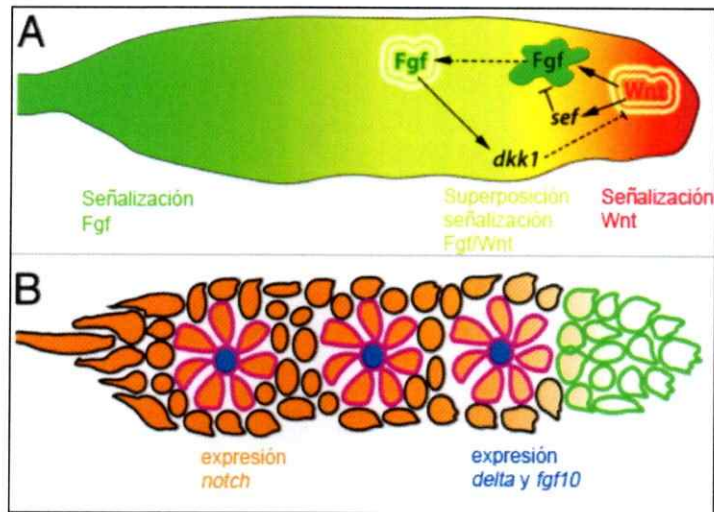


Figura 7: A) Polarización del primordio: Moléculas interactuando dentro del primordio. En este esquema se resumen las principales vías de señalización activas en las distintas zonas del primordio: Wnt/ β -catenina y *Fgf*. B) Moléculas involucradas en la formación de rosetas en la región trasera: Notch y Delta. (Aman y Piotrowski, 2011).

1.4 Elongación de axones del nLLP a lo largo del miosepto

Como fue mencionado previamente, como parte fundamental del sistema mecanosensorial de la línea lateral se encuentra el nervio, el cual inerva todos los núcleos de células ciliadas de los neuromastos depositados. Los axones de este nervio provienen del gLLP y extienden sus conos de crecimiento acoplados a las células del primordio de la LLP. Estos conos nunca sobrepasan los 2/3 de la región trasera, es decir, los conos axonales en ningún momento tienen contacto con las células de la *leading zone* (Metcalf et al., 1985; Gilmour et al., 2004).

Se ha postulado que la extensión de los axones provenientes del gLLP, no es de manera autónoma, sino que se asocian con el primordio y elongan debido al movimiento de éste (Gilmour et al., 2004). Por otro lado, se sabe que existen moléculas que son capaces de repeler conos axonales; éstas se expresan alrededor de la ruta migratoria, dejando el camino del miosepto libre de ellas, camino por el cual

se extiende y desarrolla la LLP (Figura 8) (Brösamle y Halpern, 2009). Dentro de este grupo de moléculas repelentes, destacan principalmente tres duplas de receptor-ligando: *robo1/slit* (Lee et al., 2001); *nogo/nogo66*; y *sema3aa/neuropilina-plexina* (Brösamle y Halpern, 2009), otro receptor involucrado en repulsión y colapso axonal, el cual tendría el mismo patrón de expresión de *nogo- γ* (Shoji et al., 1998). En conjunto, todas estas moléculas permiten la guía y elongación axonal del nLLP a través del miosepto.

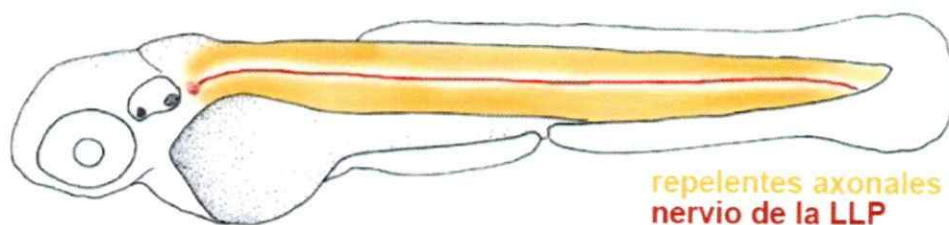


Figura 8: Expresión de repelentes axonales. Se muestra un esquema de una larva de 3dpf, el nervio en rojo se extiende por el miosepto horizontal libre de repelentes axonales, expresados en los somitos dorsales y ventrales (se muestra en naranja).

1.5 Señalización a través del ligando SDF1a en la formación del sistema de la línea lateral

Varios estudios en ratón y pez cebra han demostrado un rol fundamental para SDF1/CXCR en la migración de distintos tipos celulares (David et al., 2002; Mizoguchi et al., 2008; Balabanian et al., 2005; Miyasaka et al., 2007; Tiveron y Cremer, 2008; Boldajipour et al., 2011; Raz, 2004). SDF1 (por su nombre en inglés: stromal-cell derived factor 1) es una quimioquina descrita como la responsable de producir el movimiento celular y guiar al primordio a través de su correcta ruta. SDF1 fue descrita inicialmente en el sistema inmune por su rol quimioattractor de leucocitos, a partir de estudios con células de médula ósea de ratón en cultivo celular (Bleul et al., 1996). Otros estudios en mamífero sugieren su participación en

procesos normales durante el desarrollo embrionario, controlando migración celular, proliferación y neuromodulación, así como también, en procesos patológicos como infección con VIH (Oberlin et al., 1996), metástasis de células cancerígenas (Tamamura et al., 2007), desórdenes inflamatorios crónicos y en enfermedades proliferativas benignas (Janowski, 2009).

En el pez cebra *sdf1* presenta dos parálogos: *sdf1a* y *sdf1b* (Li et al., 2004). SDF1a es una proteína de 99 aminoácidos (Valentin et al., 2007), la que ha sido involucrada en diferentes procesos biológicos, tales como extensión axonal, sobrevivencia y diferenciación de células retinoganglionares (Chalasani et al., 2003); regulación de elongación axonal de neuronas hipocampales (Pujol et al., 2005); migración y extensión de neuronas sensoriales del ganglio trigémino (Knaut et al., 2005); regeneración de la aleta caudal (Dufourcq et al., 2006); migración de células primordiales germinales y melanóforos (Blaser et al., 2006; Svetic et al., 2007); ensamblaje de placoda y guía axonal en sistema olfatorio (Miyasaka et al., 2007).

La secuencia genómica de *sdf1a* en el pez cebra está conformada por 14.02kb, que codifican para 4 exones en el grupo de ligamiento (LG) 13. En la literatura, sólo ha sido reportada una variante de transcrito para *sdf1a* (www.ensembl.org/Danio_rerio/Gene/Splice), *sdf1a_tv1*: esta secuencia comprende los 4 exones que codifican para una proteína de 99 aminoácidos (Figura 11B) (Valentin et al., 2007).

En particular, en la formación de la línea lateral posterior, SDF1a ha sido descrito como un quimioattractante suficiente y necesario para que se produzca la migración del pLLP (David et al., 2002; Li et al., 2004; Valentin et al., 2007). *sdf1b* se ha descartado como participante dentro de dicho proceso migratorio ya que no se ha

detectado su expresión en el miosepto horizontal durante el período en el cual migra el primordio (Li et al., 2004)(Figura 9).

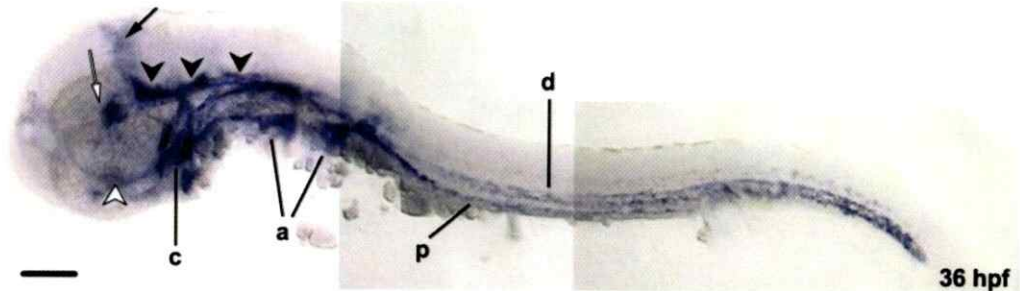


Figura 9: Expresión de *sdf1b* en embrión de 36hpf. Existe expresión en distintas regiones del Sistema Nervioso Central (flechas y puntas de flecha), así como también en: (c) cartílago de la cabeza presuntivo, (a) arcos faríngeos, (p) pronefros y (d) aorta dorsal. Su expresión no se observa en el miosepto horizontal como *sdf1a* (Li et al., 2004).

Varios reportes han demostrado que SDF1 activa dos receptores de quimioquinas: CXCR4 y CXCR7 (Balabanian et al., 2005; Burns et al., 2006; Valentin et al., 2007; Dambly-Chaudière et al., 2007; Boldajipour et al., 2008). Este último receptor une al ligando con mayor afinidad que el primero (Balabanian et al., 2005), y activaría vías de señalización distintas dentro de la célula diana (Dambly-Chaudière et al., 2007). CXCR4 es un receptor transmembrana acoplado a proteínas G, que una vez activo produce incrementos de Ca^{+2} citosólico (Blaser et al., 2006; Burns et al., 2006) y variaciones de AMPc dentro de la célula (Chalasanani et al., 2003).

Durante el desarrollo de la línea lateral en el pez cebra, ambos receptores son expresados en dominios discretos dentro del primordio (Valentin et al., 2007; Dambly-Chaudière et al., 2007). *cxcr4b* se expresa de manera temprana en todo el pLLP alrededor de 19hpf, e interactuaría en primera instancia con SDF1a que esta presente en el miosepto horizontal a partir de las 20hpf (David et al., 2002). Se ha propuesto que esta interacción produciría una disminución temporal del ligando hacia la parte trasera del primordio, lo que llevaría a una disminución de la activación por parte del ligando en esa zona. Esto permitiría el comienzo de la

expresión de *cxcr7b* a las 22hpf en esa región; esta nueva interacción ligando-receptor llevaría a su vez a la inhibición de la expresión de *cxcr4b* en la parte trasera, regulándose así la complementariedad de expresión de ambos receptores, y dándole a su vez polaridad de migración al primordio (Dambly-Chaudière et al., 2007; Valentin et al., 2007) (Figura 10).

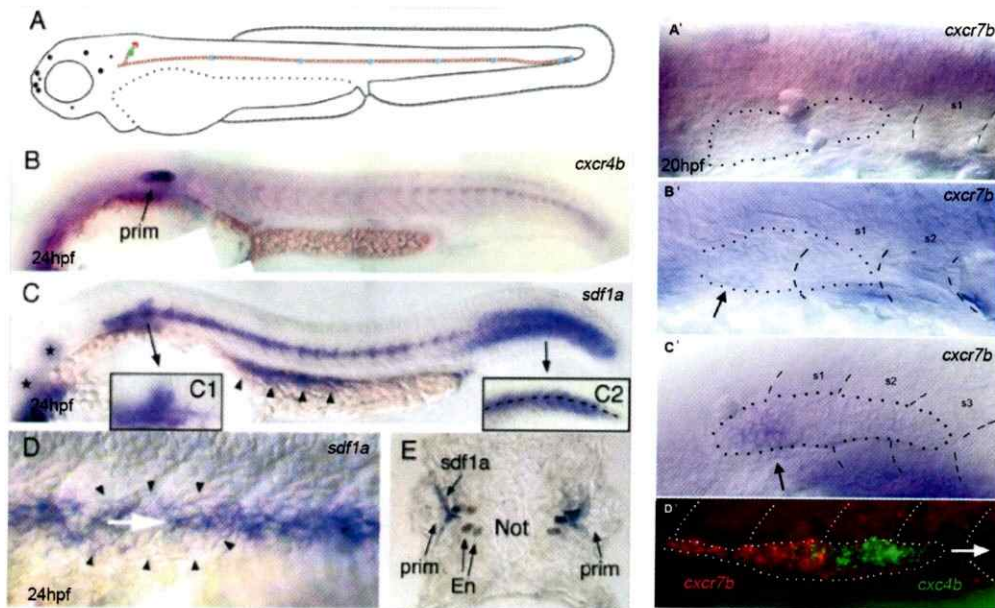


Figura 10: Expresión de *sdf1a* y receptores. A) Se muestra un esquema de un embrión de pez cebra de 2dpf con la LLP formada, neuromastos (puntos celestes) depositados sobre miosepto horizontal (línea roja). B) Hibridación *in situ* contra *cxcr4b* en un embrión de 24 hpf, donde se aprecia su expresión en el primordio (prim). C) En el mismo estadio el *sdf1a* es predominantemente expresado en el miosepto horizontal. Esta expresión se extiende también hacia los pronefros (puntas de flecha). También existe marca en rombómeros señalados con asteriscos. C1 y C2) Expresión de *sdf1a* a 29hpf, en primer somito y cola, respectivamente. D) El primordio de la LLP (delimitado con puntas de flecha) migra en dirección posterior (flecha blanca), sobre el células que expresan *sdf1a* en el miosepto. E) Células que expresan *sdf1a* coinciden con células *engreiled* positivas, y no son parte de la notocorda. Figuras de David et al 2002. A') Expresión de *cxcr7b* a las 20 hpf, cuando comienza la migración del primordio (delimitado con puntos negros) no hay expresión de *cxcr7b*. B') Cuando el primordio se encuentra en contacto con el somito 1, comienza a expresarse levemente *cxcr7b* en la región trasera del prim. C') La expresión se incrementa cuando el primordio alcanza el somito 3. D') Expresión diferencial y complementaria de los dos receptores de SDF1A, una doble hibridación *in situ* muestra la expresión de ambos receptores: en verde *Cxcr4b* y en rojo *Cxcr7b*, en el primordio migratorio. Figura adaptada de (Dambly-Chaudière et al., 2007; Valentin et al., 2007).

En el año 2007 fue aislada una mutación para *sdf1a* en el pez cebra, por Guillaume Valentin y el grupo de Darren Gilmour, en el laboratorio europeo de Biología molecular, Heidelberg, Alemania. Esto como resultado de un sondeo de genética

reversa a gran escala, en la búsqueda de reguladores de morfogénesis de la línea lateral posterior (Valentin et al., 2007). A este mutante le denotaron como *medusa* (Figura 11A), el cual presenta una mutación puntual, cuyo alelo se denominó *sdf1a*¹³⁰⁵¹⁶. La mutación se encuentra en la secuencia codificante del gen *sdf1a* donde se ha introducido un codón de término prematuro, dando como resultado una proteína trunca de 33aa no funcional (Figura 11B). Fenotípicamente, *medusa* evidencia un cese prematuro de la migración, luego de iniciado el proceso de desarrollo de la LLP (Valentin et al., 2007).

En el mismo trabajo se observó la migración del pLLP en ausencia de cada receptor por separado. Ellos observaron que en peces con pérdida de función para cada uno de los receptores por separado la migración presentaba un fenotipo menos penetrante que la ausencia del ligando, y que en ausencia de ambos receptores simultáneamente, se fenocopiaba el fenotipo del mutante *medusa*. Se postuló que esta reducción de la migración en ausencia de uno de los receptores era menos drástica en ausencia de cada receptor por separado, debido a la compensación que producía el otro que se encontraba presente. Estos experimentos fueron realizados con la utilización del mutante *ody*, el cual no presenta el receptor CXCR4b y el morfolino para CXCR7b. (Figura 11D, comparar C y E).

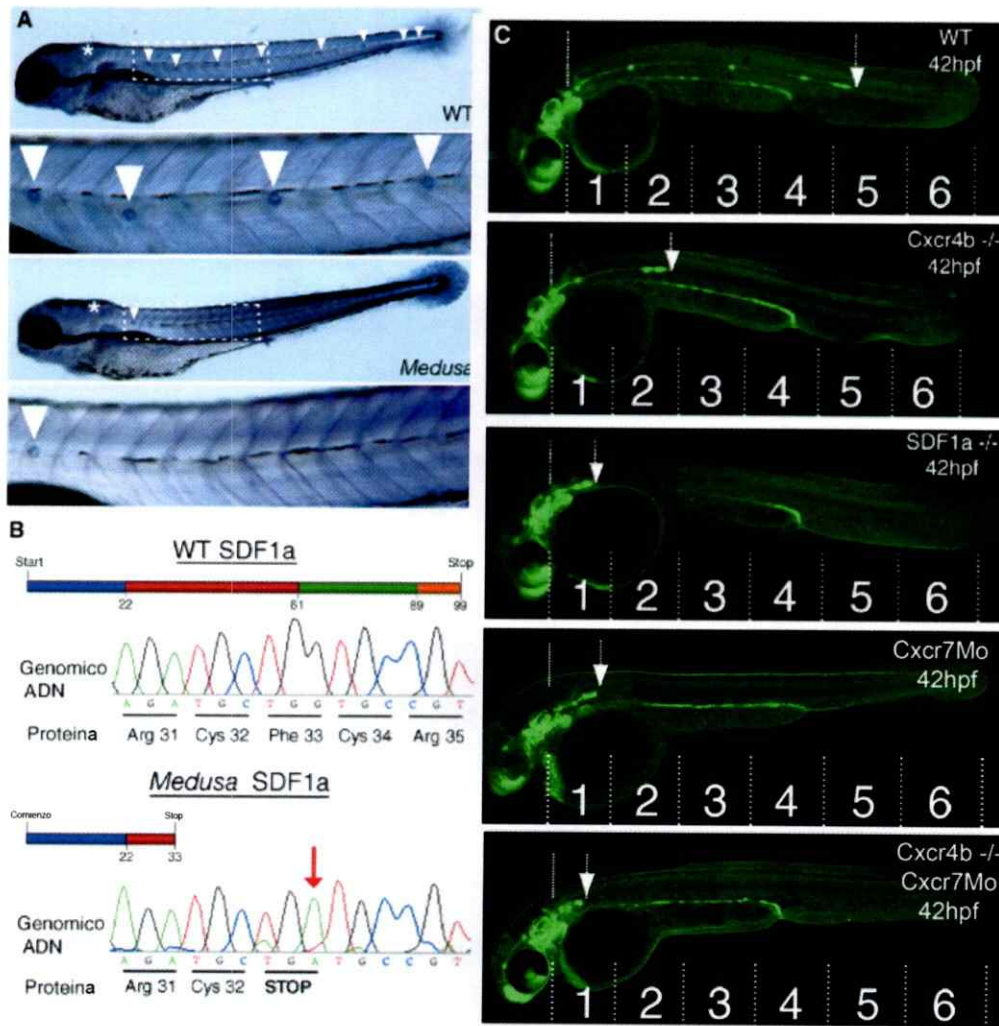


Figura 11: Mutación *sdf1a*³⁰⁵¹⁶. A) Con una tinción de fosfatasa alcalina se muestran los neuromastos depositados (puntas de flecha) en peces de 4,5dpf. En imágenes superiores se muestra el fenotipo en peces silvestres en el cuerpo completo y magnificación. En imágenes inferiores se muestra el fenotipo en peces *medusa*, donde se observa una reducción en el número de neuromastos. B) Representación de la proteína SDF1a en peces silvestres y mutantes: una mutación sin sentido en peces *medusa* introduce un codón de término prematuro en el exón 2, el cual genera una proteína trunca de tan sólo 33aa (cada color representa un exón). C) Comparación de peces Tg[-8.0cldnb:lynGFP]⁷¹⁰⁶ silvestre, morfantes para *cxcr7b*, mutantes para *cxcr4b* y *medusa*. Figura de Valentin et al., 2007.

1.6 Nuevo mutante para *sdf1a*

En un rastreo para mutaciones que afectan el desarrollo del pez cebra, llevado a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. Stephen Wilson en University College of London, nuestro laboratorio aisló cepas que presentan mutaciones que revelan fenotipos en la línea lateral (LLP), a partir de peces mutagenizados químicamente

con ENU, agente que produce cambios puntuales en ADN de sus células, inclusive las de la línea germinal, por lo que la mutación es capaz de pasar a las generaciones futuras (Solnica-Krezel et al., 1994). Una de estas mutaciones, fue particularmente interesante debido a que evidencia un robusto defecto durante la migración del primordio de la LLP. Mediante mapeo genético y análisis de complementación hemos identificado la mutación en el locus del gen *sdf1a*, denominada *sdf1a^{u766}*. Peces portadores de esta mutación recesiva y con una penetrancia alta muestran una migración parcial y aberrante del pLLP, migrando por sobre el cuerpo y/o vitelo del pez, depositando unos pocos neuromastos (Figura 12). Así, la comparación directa entre nuestros datos y la información existente en la literatura que mostraba que el fenotipo del mutante de *sdf1a^{u766}* era distinto a *medusa*.

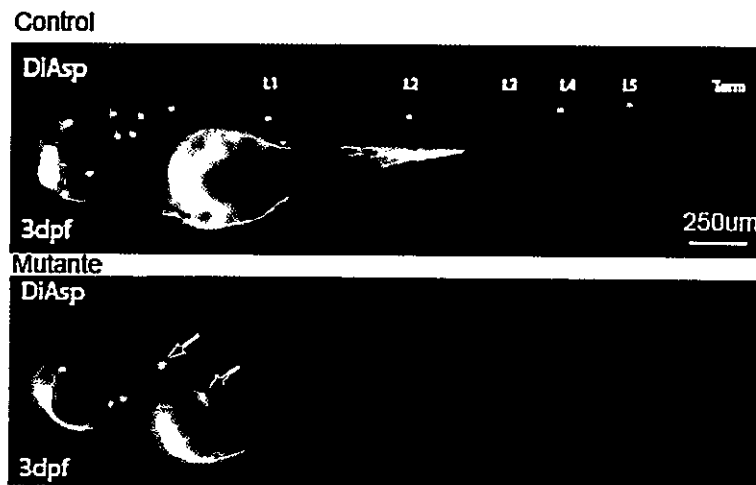


Figura 12: En la figura se muestran fotografías tomadas usando microscopía fluorescente. (A) Se muestran peces cebra de 3dpf silvestre (control, arriba) y mutante *sdf1a^{u766}* (abajo) que han sido teñidos con la tinción vital DiAsp que marcan todos los neuromastos de la línea lateral, tanto los de la LLA, como de los de la LLP, los que son denominados como (L1-L5 y term). Las flechas rojas en el pez mutante indican dos neuromastos de la LLP ubicados en posición ectópica.

Realizando inmunocitoquímica de peces mutantes de 3dpf, inesperadamente, observamos que aunque en peces mutantes el nervio también seguía un camino

aberrante, diferente al del miosepto horizontal, era recurrente observar mas de una rama principal que se extendia en direcciones diversas. En la Figura 13 se muestra un ejemplo de lo observado.

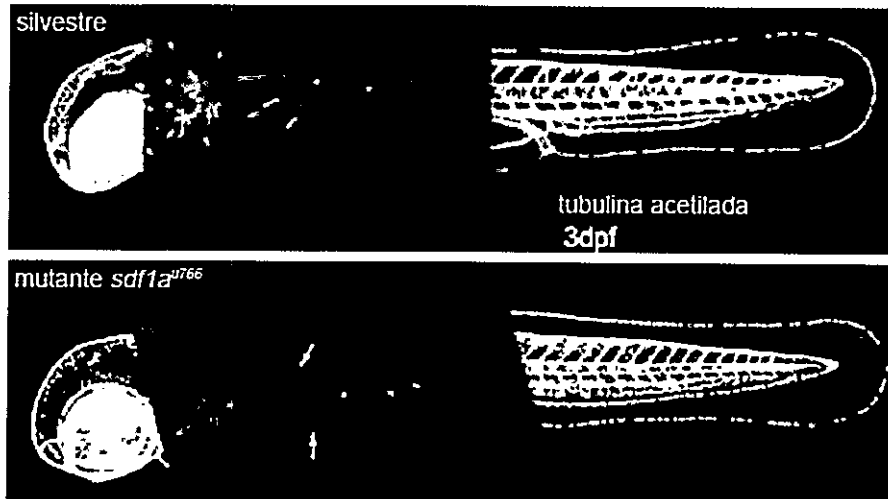


Figura 13: Ejemplo de comportamiento del nervio durante la formación de la LLP en peces mutantes *sdf1a^{u766}*. Inmunocitoquímica contra tubulina acetilada en peces de 3dpf, en el pez mutante (abajo) las ramas del nervio se apuntan con flechas blancas.

1.7 Planteamiento del problema

Estudios previos involucraron a SDF1a directamente el movimiento del primordio (Valentin et al., 2007). Además comparando nuestros datos preliminares con lo presentes en la literatura, obtuvimos que los dos alelos mutantes para *sdf1a* presentaban diferencias fenotípicas en cuanto a la LLP. Esto sugería que, el mutante portador del alelo *sdf1a^{u766}* podría presentar una pérdida parcial de SDF1a, a diferencia del mutante *medusa*, reportado como una pérdida de función completa del gen. En embriones mutantes *sdf1a^{u766}* de pez cebra de 3dpf, se constató que existía migración del primordio en la mayoría de los casos, aunque la ruta migratoria se veía afectada. De tal modo, existía la posibilidad que SDF1a tuviese una participación en

otras funciones dentro del proceso de formación de la línea lateral posterior, además de producir el movimiento.

1.8 Hipótesis

SDF1a (*excl12*) regula la direccionalidad de la migración del primordio de la línea lateral posterior (LLP) en el pez cebra, y también controla la interacción del nervio de la LLP con el primordio y su fasciculación.

1.9 Objetivo general

Caracterizar una nueva mutación en *sdf1a*, *sdf1a*^{u766}, y estudiar en detalle el rol de SDF1a en el proceso de formación de la LLP.

1.10 Objetivos específicos

I. Caracterización molecular y fenotípica de la LLP en peces mutantes para *sdf1a*

- i. Descripción molecular de la mutación *sdf1a*^{u766}
- ii. Descripción fenotípica, clasificación y cuantificación de fenotipos peces *sdf1a*^{u766} al término de la migración del pLLP
- iii. Comparación de alelo *sdf1a*¹³⁰⁵¹⁶ (*medusa*) con *sdf1a*^{u766} (D17)
- iv. Descripción detallada de la migración del pLLP *in vivo* en peces *sdf1a*^{u766}

II. Estudio de la conformación del primordio migratorio de la LLP y de su comportamiento celular en peces mutantes

- i. Estudio del tamaño de primordios mutantes: evaluación de proliferación dentro del primordio migratorio
- ii. Formación de protrusiones y dinámica del citoesqueleto

iii. Descripción de la morfología y polaridad del primordio migratorio mutante

III. Estudio del comportamiento del nervio de la LLP en el mutante *sdf1a*^{u766}

- i. Determinar los eventos de comportamiento anómalo producidos en el nLLP en mutantes *sdf1a*^{u766}
- ii. Determinar la presencia de glías que recubren el nLLP en ausencia de SDF1a
- iii. Estudiar regeneración del nervio post-axotomía en mutantes
- iv. Efecto local de SDF1a sobre el nLLP
- v. Estudiar el comportamiento del nLLP en ausencia de de los receptores para SDF1a

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cuidado y manejo peces

Se utilizaron embriones y larvas de pez cebra de cepas: silvestres (AB, Tab5 y cepa propia); transgénicas Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{zf106}, Tg[neurod:EGFP]^{nl1}, Tg[cxcr4b:mRFP]^{ump1}, Tg[foxd3:GFP]^{zf15}; y mutantes (*sdf1a*^{u766}; *sdf1a*ⁱ³⁰⁵¹⁶; *ody*ⁱ²⁶⁰³⁵; *cxcr7b*^{sa16}) (Tabla 1).

Una vez que los peces mutantes *sdf1a*^{u766} llegaron a la adultez, nuestro primer paso fue realizar cruzas de peces *sdf1a*^{+u766} con peces Tg[-8.0cldnb:lynGFP]^{zf106}, además realizamos cruzas de peces *sdf1a*^{+u766} con peces Tg[neurod:EGFP]^{nl1}, de esta crusa seleccionamos los peces tg[*sdf1a*^{+u766}; neurod:EGFP^{nl1},] y una vez que estos peces fueron sexualmente maduros, los cruzamos con los peces Tg[cxcr4b:mRFP]^{ump1}. En paralelo realizamos cruces entre peces *medusa* y los peces Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{zf106} y Tg[neurod:EGFP]^{nl1}.

Por lo que quedamos con las siguientes líneas:

- Tg[*sdf1a*^{u766}; -8.0cldnb:lynEGFP^{zf106}]
- Tg[*sdf1a*^{u766}; neurod:EGFP^{nl1}]
- Tg[*sdf1a*^{u766}; neurod:EGFP^{nl1}; cxcr4b:mRFP^{ump1}]
- Tg[*sdf1a*ⁱ³⁰⁵¹⁶; -8.0cldnb:lynEGFP^{zf106}]
- Tg[*sdf1a*ⁱ³⁰⁵¹⁶; neurod:EGFP^{nl1}]

Los embriones luego de la fecundación fueron mantenidos en placas Petri bajo condiciones estándares determinadas (Kimmel et al., 1995) y controladas: ciclo de luz/oscuridad (14 y 10, respectivamente); temperatura aproximada a los 28,5° C, pH entre 7 y 7,3 pH; conductividad entre 500-600 µS, en medio para embriones E3 1x con 0,1% de azul de metileno (para 1L de stock 50x: 14,44g NaCl, 0,63g KCl, 2,42g CaCl₂ x 2•H₂O, MgSO₄ x 7•H₂O), el cual no afecta el desarrollo y *patterning*. El estadio de los peces fue determinado de acuerdo a lo establecido por (Kimmel et al.,

1995). E3 con PTU (1-fenil-2-tiourea, 0,2mM) fue utilizado en peces utilizados para realizar microscopia *timelapse*. Los embriones fueron incubados a partir de las 10hpf y antes de las 28hpf, esta droga inhibe la pigmentación en dichos embriones.

Tabla 1: Tabla resumen de las líneas de peces utilizadas en este trabajo.

Nombre	Fenotipo	Tipo	Laboratorio de origen	Referencia
Tg [foxd3:GFP] ^{7/13}	GFP en células gliales de la LLP	Transgénesis por inserción	Nusslein-Volhard Lab	(Gilmour et al., 2002)
TgBAC [neurod:EGFP] ^{7/106}	GFP reproduce el patrón de expresión de <i>neurod</i> , por lo que se expresa en el nervio de la LL	Transgénesis por inserción	Nechiporuck Lab	(Obholzer et al., 2008)
Tg [-8.0cldnb:lynEGFP] ^{7/106}	GFP expresado bajo el control del promotor <i>cldnB</i> que se expresa en derivados de placodas sensoriales, incluyendo la LL	Transgénesis por inserción	Gilmour Lab	(Haas y Gilmour 2006)
Tg [cxcr4b:mRFP] ^{ump1}	RFP de membrana dirigido bajo un promotor mínimo de <i>cxcr4b</i> y expresado en células de la línea lateral y neuromastos	Transgénesis por inserción	Ghysen Lab	(Gamba et al., 2010)
<i>D17</i> o <i>sdf1a</i> ^{7/166}	LLP presenta un destino aberrante y menor número de neuromastos	Mutación puntual recesiva del gen <i>sdf1a</i>	Wilson Lab	No publicado
<i>medusa</i> o <i>sdf1a</i> ^{103/16}	LLP presenta un destino aberrante y menor número de neuromastos	Mutación puntual recesiva del gen <i>sdf1a</i>	Gilmour Lab	(Haas y Gilmour 2006)
<i>odysseus</i> o <i>cxcr4b</i> ^{200/33}	LLP presenta un menor número de neuromastos	Mutación puntual recesiva del gen <i>cxcr4b</i>	Nusslein-Volhard Lab	(Knaut et al., 2003)
<i>cxcr7b</i> o <i>cxcr7b</i> ^{201/6}	LLP presenta un menor número de neuromastos	Mutación puntual recesiva del gen <i>cxcr7b</i>	Stemple Lab	(Busch-Nentwich et al., 2010)

Se especifica nombre de la línea, el fenotipo presentado, tipo de mutación o transgénesis, laboratorio de origen y referencia del trabajo donde fue inicialmente publicado.

2.2 Extracción de ADN

Para realizar extracción de ADN y, posteriormente el genotipado, se depositó tejido de colas, embriones enteros o parte de ellos, en pocillos individuales. Luego se agrega a cada pocillo 50µL de solución básica 1x (ver más abajo), se calienta a 95°C durante 30 minutos y se enfría a temperatura ambiente por algunos minutos. Luego agregar 50µL de solución de neutralización 1x. El ADN obtenido generalmente se diluye antes de ser utilizado.

Soluciones Stock:

Solución Básica 50x

- 14.03g KOH cristales (1.25M concentración final)
- 4mL 0.5 EDTA (10mM concentración final)
- H₂O hasta 200mL (volumen total)

Solución de Neutralización 50x

- 63.04g TRIS HCL (2M concentración final)
- H₂O hasta 200mL (volumen total)

Para identificar peces mutantes *sdf1a*^{u766} y *cxcr7b*, el genotipado de estos embriones fue realizado en algunos casos.

2.3 Genotipado

Peces *sdf1a*^{u766}

La mutación puntual encontrada en *sdf1a*^{u766} fue usada como un polimorfismo específico para genotipar embriones y peces portadores, a través de PCR flanqueando la mutación y una posterior digestión enzimática. El ensayo fue realizado mediante la utilización de la enzima de restricción BsrI, la cual en la secuencia normal del gen, producía un corte en la secuencia $\begin{matrix} \text{ACTGGNN} \\ \text{TGACCNN} \end{matrix}$ del amplificado, produciendo dos fragmentos de alrededor de 100pb que generan una banda para el caso de peces silvestres, y dos bandas de alrededor de 200 y 100pb para el caso de peces heterocigotos. En peces mutantes al producirse una mutación puntual la secuencia blanco de la enzima cambia ccaGt → ccaAt, por lo que se pierde el sitio de corte generándose solo un fragmento de 200pb (Figura 14).

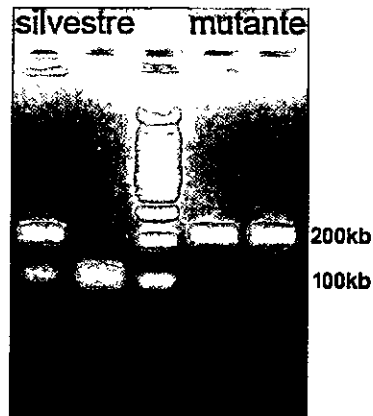


Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa al 3%, del producto obtenido luego de la digestión con la enzima BsrI. A la izquierda de la columna de peso molecular se observan dos peces silvestres izquierda: heterocigoto, derecha: silvestre. A la derecha de la banda de peso molecular se aprecia el genotipo de dos peces mutantes, en los que se ve una sola banda de alrededor de 200pb, en donde no ha ocurrido digestión del amplificado.

La mutación es recesiva, por lo que, los peces mutantes *sdf1a*^{u766} presentan una mutación puntual en ambos alelos de dicho gen. El fenotipo de los peces mutantes se hace evidente sólo en condiciones de homocigosis, y es fácilmente identificable observando defectos en la ruta migratoria del primordio y el depósito de los neuromastos de la LLP. Esta mutación, es una sustitución del tipo g→c en el intrón 2-3. Los partidores para realizar la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) fueron Fw: TGATGATTGCTTGCTTATACTGC y Rv: TTCTTACTTGTTGATGGCGTTC, el fragmento amplificado es de 200pb.

Las condiciones de la reacción se resumen a continuación:

Reactivos	1Rxn	Concentración Final
ADN templado	1 μL	
Buffer PCR 10x	2,5 μL	1x
MgCl ₂ 50mM	0,75 μL	1,5mM
dNTP mix 10mM	0,5 μL	0,2mM cada uno
Partidor Fw 10μM	1 μL	0,5μM
Partidor Rv 10μM	1 μL	0,5μM
Taq polimerasa	0.5 μL	1 unidad
Agua destilada	17,75 μL	
	25 μL Totales	

Primero se realizó un PCR en gradiente para determinar la temperatura de alineamiento, obteniéndose 56°C como temperatura óptima. Luego se realizó el PCR de genotipo y la posterior digestión con la enzima BsrI.

<u>Programa de PCR</u>			<u>Digestión</u>		<u>1Rxn</u>	
1) 94°C	3	min	ADN templado	20	μL	
2) 94°C	30	seg	Buffer de enzima 10x	5	μL	
3) 56°C	30	seg	Enzima BsrI	1	μL	
4) 72°C	30	seg	Agua destilada	24	μL	
repetir paso 2-4 x 44 veces			Total	50	μL	
5) 72°C	5	min				
6) 10°C	30	min				

Condiciones Reacción de Digestión

T_{incubación} 65°C

t_{digestión} 3hrs

Luego el producto PCR digerido fue comprobado en un gel de agarosa al 3% durante 40min a 180V (Figura 13).

Peces *cxcr7b*

La mutación es recesiva, por lo que, los peces mutantes *cxcr7b* presentan una mutación puntual en ambos alelos de dicho gen. El fenotipo de los peces mutantes se hace evidente sólo en condiciones de homocigosis, y es fácilmente identificable observando defectos en migración del primordio de la LLP, el cual se detiene prematuramente en su recorrido a través del miosepto.

Esta mutación, es una sustitución puntual t→g en la base 228 del gen. Los partidores para realizar la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) fueron Fw: GTGAGAGCCGAGAGGACACCTTA y Rv: GTAAGGAAGAAGATACTGCTG. En el alelo silvestre, junto con los partidores, se introduce un sitio de corte para la enzima DdeI, con la que se generan dos bandas de 15pb de diferencia. Las condiciones de la reacción se resumen a continuación:

<u>Reactivos</u>	<u>1Rxn</u>		<u>Concentración Final</u>
ADN templado	1	μL	
Buffer PCR 10x	2,5	μL	1x
MgCl ₂ 50mM	0,75	μL	1,5mM
dNTP mix 10mM	0,5	μL	0,2mM cada uno
Partidor Fw 10μM	1	μL	0,5μM
Partidor Rv 10μM	1	μL	0,5μM
Taq polimerasa	0.5	μL	1 unidad
Agua destilada	17,75	μL	
	25	μL	Totales

<u>Programa de PCR</u>			<u>Digestión</u>		<u>1Rxn</u>
1) 94°C	3	min	ADN templado	25	μL
2) 94°C	30	seg	Buffer de enzima 10x	5	μL
3) 55°C	30	seg	Enzima Ddel	0,5	μL
4) 72°C	30	seg	BSA	0,5	μL
repetir paso 2-4 x 35 veces			Agua destilada	19	μL
5) 72°C	5	min	Total	50	μL
6) 10°C	30	min			

Condiciones Reacción de Digestión

T_{incubación} 37°C

t_{digestión} 3hrs

Luego el producto PCR digerido fue comprobado en un gel de agarosa al 3% durante 1hr a 200V. La Figura 14 resume el proceso del genotipado.



Figura 15: Esquema resumen de la identificación genotípica de peces mutantes. Desde la recolección de muestras el reconocimiento en el gel electroforético.

2.4 Microscopía y procesamiento de imágenes

Para manipular y observar bajo microscopía, los peces se anestesian con Tricaína (etil-*m*-aminobenzoato metanosulfonato). Para esto se prepara una solución de Na_2HPO_4 a pH 7-7,3 en agua destilada y luego se disuelven 4 mg de tricaína por cada 1 mL de la solución. Esta solución se almacena a -20°C durante varios meses. Para anestesiarse embriones y larvas, se disuelven 4mL de la solución en 100mL de medio E3. Los peces anestesiados se observaron directamente bajo el microscopio y o lupa, o fueron montados en agarosa de bajo punto de fusión al 1% en E3 sin azul de metileno y sin PTU. Las imágenes fueron tratadas utilizando los *software* ImageJ y Adobe Photoshop.

Para las películas se realizaron captura de imágenes durante intervalos establecidos, a temperatura controlada y en medio E3 con tricaína. Al final de la captura de imágenes se revisó cada uno de los peces montados y se corroboró de que el latido del corazón fuese normal.

2.5 Inmunocitoquímica

Embriones fijados en PFA 4% en PBST ON a 4°C o 1-2 horas a RT, fueron lavados repetidas veces con PBST durante 5 minutos, luego fueron deshidratados con MetOH durante al menos 1 hora a -20°C .

Los embriones fueron re-hidratados en lavados sucesivos en gradiente de MetOH/PBST (75% , 50%, 25%) durante 5 minutos cada uno, luego se realizaron dos lavados con PBST 100% por 5 minutos.

Para la permeabilización del tejido se utilizó proteinasa K a partir de un stock (10mg/mL; se usó $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en PBST). Los tiempos utilizados fueron acorde con el estadio, y se resumen en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2: Tabla resumen con los estadios (en días post fertilización) y tiempos de incubación en proteinasa K Proteinasa K

1dpf	10 mins
2dpf	20 mins
3dpf	25 mins
4dpf	30 mins
5dpf	35 mins

Usando una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en PBST para permeabilizar tejidos para realizar inmunocitoquímica.

Luego se fijaron los peces tratados con proteinasa K en PFA 4% durante 20 minutos y luego se hicieron sucesivos lavados en PBST durante 5 minutos cada uno. Posteriormente, fueron incubados en solución de bloqueo durante 1 hora.

Solución de Bloqueo de Inmuno (para preparar 100mL):

- 10 mL de suero de cabra
- 10mg/mL de solución total de BSA
- 1mL DMSO
- 100 μL de tritón
- aforar a 100 mL con PBST.

Luego se incubó ON en Anticuerpo primario, diluido en solución de bloqueo. Se realizaron 4 lavados de 20 minutos cada uno, con PBST, y se incubó nuevamente en solución de bloqueo por 30 minutos. Posteriormente se realizó una incubación ON con el/los anticuerpo(s) secundario(s) diluido en solución de Bloqueo o una incubación de al menos 2 horas a RT, protegidos de la luz.

Finalmente se realizaron 4 lavados de 20 minutos para extraer el anticuerpo secundario excedente, y las muestras se visualizaron bajo microscopía de fluorescencia. Los anticuerpos fueron agrupados en la Tabla 3.

Tabla 3: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados

Anticuerpo	Anti	Hospedero	Concentración	Detalles
Primario	GFP	Conejo	1/200	Policlonal Invitrogen N° cat A11122
Primario	GFP	Ratón	1/500	Monoclonal Millipore N° cat MAB3580
Primario	Tubulina acetilada	Ratón	1/1000	Monoclonal Sigma-Aldrich N° cat T7451
Primario	BrdU	Ratón	1/400	Monoclonal Roche N° cat 11170376001
Primario	β -catenina	Conejo	1/200	Sigma-Aldrich N° cat C2206
Secundario	IgG Ratón	Cabra	1/200	Invitrogen Alexa Fluor 488 N° cat A11029
Secundario	IgG Conejo	Cabra	1/200	Invitrogen Alexa Fluor 488 N° cat A11034
Secundario	IgG Conejo	Burro	1/200	Invitrogen Alexa Fluor 568 N° cat A10042
Secundario	IgG Ratón	Cabra	1/200	Invitrogen Alexa Fluor 594 N° cat A11032
Secundario	IgG Conejo	Cabra	1/200	Invitrogen Alexa Fluor N° cat A31632

2.6 Hibridación in situ

Se realizó hibridación *in situ* de *fgf10*, para detectar el ARN mensajero de Fgf10. Los embriones a partir de las 24 hpf fueron incubados en E3 con PTU para evitar la pigmentación, luego fueron removidos de la membrana coriónica y fijados en PFA 4% al estadio correspondiente ON a 4°C o 2hrs a RT.

Se realizaron 3 lavados con PBST y luego fueron deshidratados en MetOH 100% al menos 2hrs a -20°C. Los embriones fueron rehidratados en un gradiente de diluciones sucesivas de MetOH/PBST (75%, 50%, 25%) durante 5 minutos cada una a RT. Los lavados terminaron con uno de PBST y luego una permeabilización con proteinasa K 10 μ g/mL, los tiempos fueron de acuerdo al estadio, señalado en la Tabla 4.

Tabla 4: Tabla resumen con los estadios (en días post fertilización) y tiempos de incubación en proteinasa K

Proteinasa K	Concentración protK	Tiempo
30hpf	1x	20min
33hpf	1x	25min
2dpf	1x	20min
3dpf	2x	25min

Usando una concentración de 1ug/ μ L en PBST para permeabilizar tejidos para realizar hibridación *in situ*.

Luego de la permeabilización, los embriones fueron fijados en PFA 4% a RT durante 20 minutos y se realizaron sucesivos lavados con mezclas de buffer hyb- / 2xSSC a 70°C durante 15min cada uno (desde 100% hyb- hasta 100% 2xSSC). Luego se realizaron dos lavados con 0,2XSSC durante 30 minutos cada uno.

Luego se realizaron lavados de 10 minutos cada uno en diluciones sucesivas de 0,2xSSC/PBST, y se bloqueó durante 4 horas en solución de bloqueo de *In situ*.

Posteriormente, se incubó en anticuerpo ON a 4°C.

Solución de bloqueo de *in situ*:

- PBST
- 2% de suero de cabra
- 2mg/mL BSA

Se enjuagó con PBST a RT y luego se realizaron 6 lavados de 15 minutos cada uno, y se lavó en buffer de tinción 3x5mins para luego incubarse en buffer de tinción con NBT/BCIP Roche (20uL por 1mL de solución de buffer de tinción).

Buffer de tinción (50mL):

- 5mL 1M Tris pH 9,5
- 2,5mL 1M MgCl₂
- 1mL 5M NaCl
- 50 μ l Tween 20
- con PVA 500mg/50mL para buffer de tinción + NBT/BCIP
- completar con agua

Para detener la reacción de tinción, los embriones son lavados con *Stop Solution*:

- PBS 1x pH 5.5
- EDTA 1mM
- 0,1% Tween 20

2.7 Marcaje de BrdU

Embriones decorionados de 33hpf Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{z/106} y Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{z/106}; *sdf1a*^{u766}], respectivamente, fueron incubados en 10mM de BrdU con DMSO al 15% en E3, durante 30 minutos en hielo, protegido de la luz y en placas Petri de vidrio. Cumplido el tiempo, los embriones fueron lavados con E3 con PTU durante una hora a RT en placas de vidrio. Luego los embriones fueron fijados en PFA 4% ON, lavados en PBST y transferidos a MetOH y fueron almacenados a -20°C ON. Los embriones fueron rehidratados con PBST y tratados con proteinasa k durante 15 minutos (10µg/mL) . Luego se realizaron varios lavados en PBST y los embriones fueron fijados en PFA 4% durante 30 minutos y luego se realizaron dos lavados en HCl 2N durante 10 minutos cada uno. Se lavó con PBST y se incubó durante 1 hora en solución de bloqueo de inmuno, se incubó en anticuerpo anti BrdU a 1/400 ON, se lavó durante 1 día en PBST varios lavados. Y se incubó en anticuerpo secundario Alexa Fluor ON. Los núcleos fueron previamente marcados con DAPI durante 10 minutos a una concentración de 1 µg/mL en PBST, y posteriormente lavados con PBST dos veces.

Para la cuantificación de las células BrdU positivas, se contaron las células GFP positivas del primordio, luego las células BrdU positivas dentro de éste, luego se realizó una razón entre este último valor y las células GFP positivas totales. Luego se realizó un análisis estadístico usando el *software* Prism y se estableció que la significatividad de la diferencia de la razón entre peces silvestres y mutantes.

2.8 Inyección de morfolinós, ADN, ARN y *heatshock*

Se inyectaron 150pg (10nL) del constructo HSP70:SDF1a::GFP en peces silvestre en el estadio de 1-8 células para generar expresión en mosaico. Se dejó un grupo de peces silvestres sin inyectar para que sirvieran como control. A las 30hpf se realizó el *heatshock* durante 1hr a 37°C en E3 sin PTU y sin azul de metileno.

Separé 4 grupos, los cuales fueron fijados con PFA a las 54hpf:

- No inyectados sin HS
- No inyectados con HS
- Inyectados sin HS
- Inyectados con HS

Se inyectó ARNm codificante para una proteína de unión al extremo positivo de extensión de microtúbulos (EB3), acoplada a un marcador fluorescente (GFP), EB3::GFP en estadio de 1-4 células en peces Tg[*cxcr4b:mRFP*]^{*ump1*} entre 250-500pg, se seleccionaron a las 26hrs peces que tuviesen marca en el citoesqueleto de las células del primordio, fueron anestesiados, montados en agarosa de bajo punto de fusión 1% y observados entre las 30 y 33hpf.

La empresa GenTool, fabricó y nos proporcionó el morfolino de *sdf1a* de secuencia 5' ATCACTTTGAGATCCATGTTTGCA 3' (David et al., 2002). Se inyectaron 8nL de una solución al 0,5mM, en peces Tg[*foxd3:GFP*]^{*715*}. A los 3dpf se fijaron y se realizó una tinción inmunocitoquímica contra GFP, tubulina acetilada, mientras los núcleos fueron contrateñidos con tinción de DAPI 1µg/mL en PBST, incubando por 10 minutos en oscuridad y luego se realizaron dos lavados con PBST.

2.9 Incubación con BIO y marcaje con BODIPY

Peces TgBAC[neurod:EGFP]^{nl1} de 26 a 36hpf fueron incubados en una solución de 5 μ M de BIO (activador de la vía Wnt) al 2% de DMSO en agua de peces, en placas Petri pequeñas con una fina cama de agarosa para evitar el deterioro de los embriones. Todo protegido de la luz. Luego se realizaron lavados con agua de peces y se incubaron en BODIPY, un marcador lipídico fluorescente que se asocia a la membrana celular, permitiendo marcar el contorno de las células individuales.

2.10 Determinación de dirección de polarización del citoesqueleto

Peces Tg[cxcr4b:mRFP]^{ump1} inyectados con EB3::GFP, se registraron bajo un microscopio fluorescente *spinning disk*: los primordios de 3 peces mutantes y 2 silvestres (identificados posteriormente por genotipo), durante un minuto. Esto permitió registrar la dinámica de formación de “cometas” durante la polarización de microtúbulos que ocurre en la migración del primordio. Luego los resultados fueron agrupados en un gráfico de roseta (Figura 15) : 0-7 determina la dirección de migración de los cometas formados por el citoesqueleto, siendo 0 dirección hacia dorsal, 2 hacia posterior, 4 hacia ventral y 6 hacia rostral, con respecto al pez . El primordio lo tomamos como un círculo y lo dividimos en 4 partes: posterior (azul), arriba (rojo), abajo (morado), delantera (verde). En las 4 regiones fueron cuantificados todos los cometas que fueran posible visualizar con claridad, en dos células de cada región.

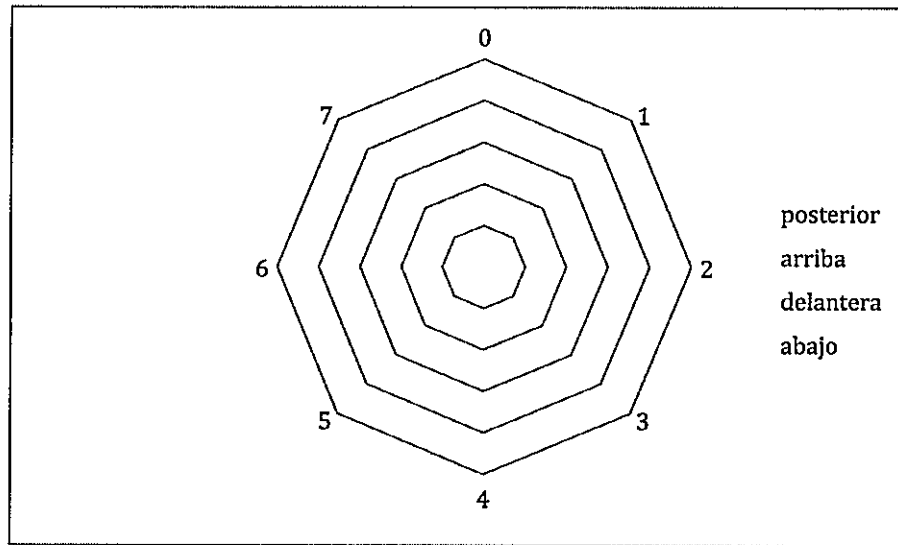


Figura 16: Gráfico roseta usado para representar la polarización de microtúbulos. 0-7 da la dirección de la polarización de microtúbulos, con respecto al pez. Y los diferentes colores mostrarán las diferentes regiones del primordio donde se cuantificó: azul posterior, rojo arriba, verde delantera y morado abajo.

3.- RESULTADOS

3.1 Caracterización molecular y fenotípica de la LLP en peces mutantes para *sdf1a*

3.1.1 Descripción molecular de la mutación *sdf1a*^{u766}

El rastreo e identificación de mutaciones en el pez cebra han demostrado ser una de las aproximaciones más fructíferas para el análisis de nuevas funciones génicas durante el desarrollo embrionario, a través de un paradigma de genética directa. Esta metodología fue empleada a mediados de los años 90 en dos importantes estudios que generaron un gran número de mutantes (Heisenberg et al., 1996; Driever et al., 1996). Hasta la fecha han identificado cientos de genes esenciales para el desarrollo embrionario en este organismo (Gilbert, 2010).

Como parte de una colaboración con un equipo de investigación en el extranjero, nuestro laboratorio realizó hace un tiempo un rastreo sistemático de mutaciones que afectan el desarrollo de la línea lateral en el pez cebra, a partir de una colección de peces mutagenizados químicamente con ENU (Solnica-Krezel et al., 1994). Durante el proceso se pudo aislar 6 mutaciones diferentes que afectan diversos aspectos del desarrollo de este sistema. Una de estas mutaciones evidenciaba una migración aberrante del primordio de la línea lateral, el cual era altamente penetrante. A través de mapeo genético y análisis de complementación encontramos una mutación en el gen *sdf1a*, el cual codifica para una quimioquina que ha sido involucrada en procesos

migratorios, y que es responsable de este fenotipo. De esta manera nos enfocamos en el estudio de este alelo ya que presentaba diferencias con una línea mutante previamente descrita para este gen (*medusa*, Valentin et al. 2007), lo cual daba indicios de posibles funciones anexas para esta molécula.

Para identificar la lesión a nivel molecular, primero se mapeo la mutación a partir del ADN genómico de mutantes. El nuevo alelo, denominado *sdf1a*^{u766}, presenta una lesión genómica la cual es una mutación puntual consistente en una transición G → A, en la unión entre el intrón 2 con el exón 3, que corresponde a un sitio aceptor de *splicing*.

Para determinar la consecuencia de esta mutación en la expresión del gen, se extrajo ARNm de un pez silvestre y uno mutante (identificados por fenotipo al 3dpf) y se realizó RT-PCR con partidores específicos para *sdf1a*. En el gel electroforético (Figura 17) se encontraron tres bandas (para cada condición se realizaron 4 réplicas): una de mayor tamaño (H), una de tamaño medio (M) y otra mas pequeña (L). En condición silvestre las bandas principales eran la media (M), y la pequeña (L). La banda (H) aumentaba en intensidad en peces mutantes. Las 3 bandas de los 5 individuos de cada condición fueron secuenciadas.

En los individuos silvestres las banda la media (M), corresponde al transcrito previamente descrito (Valentin et al., 2007), la cual comprende los 4 exones del gen; y la banda (L), corresponde a un trascrito que comprende los exones 1-2-4, y de la que no existía registro previo. Estas dos variantes de *splicing* fueron denominadas respectivamente como transcritos: *sdf1a_tv1* (exones 1-2-3-4) y *sdf1a_tv2* (1-2-4) (Figuras 17 y 18), de acuerdo al sistema de nomenclatura establecido por ZFIN. La banda (H) comprende otras variantes aberrantes de *splicing*, la que además de

codificar para la secuencia de 4 exones, contiene parte de la secuencia no codificante del transcrito ubicado en la región 3'. Luego realizamos una comparación de secuencias a través de BLAST de nucleótidos, así confirmamos que la banda (L) comprendía a la variante *sdf1a_tv2* y estaba presente en silvestre y mutante, mientras que en el mutante se perdía el transcrito *sdf1a_tv1* presente en la banda (M) en el pez silvestre, y se generaban variantes de *splicing* aberrantes que generan proteínas sin sentido. La secuencia de la banda (M) del mutante, muestra que el transcrito aberrante empalma en una región dentro del intrón dos, agregando una secuencia de 40 nucleótidos adicionales, los que desplazarían el marco de lectura. La banda (H) que comprende otras variantes aberrantes de *splicing*, se ven aumentadas en el pez mutante. Las secuencias de esta banda en la condición mutante no fue posible aislarla para realizar la secuenciación. Cada una de las bandas en cada uno de los individuos analizados se adjunta en el material suplementario (Anexo A), junto con el análisis de las secuencias de las posibles proteínas generadas (Anexo B).

Con esta aproximación observamos la presencia de dos variantes de *splicing*, una de las cuales no había sido descrita previamente en el pez cebra, encontramos que la mutación *sdf1a^{u766}* induce una aberración en el empalme entre el exón 2-3 y por lo tanto la variante *sdf1a_tv1* no se genera, produciéndose sólo la variante más pequeña y otras con secuencias aberrantes. Estos resultados sugerían que la variante de *splicing* más pequeña podría tener un rol distinto al de la variante con los 4 exones, ya descrita.

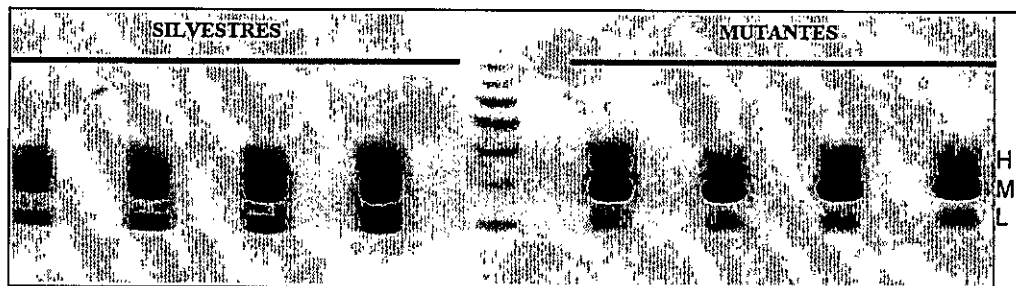


Figura 17: Variantes de *splicing* de *sdf1a*. Se muestra el gel electroforético del producto de RT-PCR obtenido peces *siblings* (izquierda) y mutantes *sdf1a^{u766}* (derecha), al centro el estándar del peso molecular. Se pueden distinguir tres grupos de banda: H (high), de mayor peso molecular; M (medium), de igual peso que la variante de *sdf1a* ya descrita; y L (light), banda de menor peso molecular. Esta última banda se aprecia tanto en mutantes como silvestres (*siblings*).

Con estos datos moleculares obtenidos para esta mutación, junto con los ya reportados para la mutación previamente descrita en peces *medusa*, se realizó una comparación molecular entre ambos mutantes para *sdf1a*, la cuál se resume en la Figura 18.

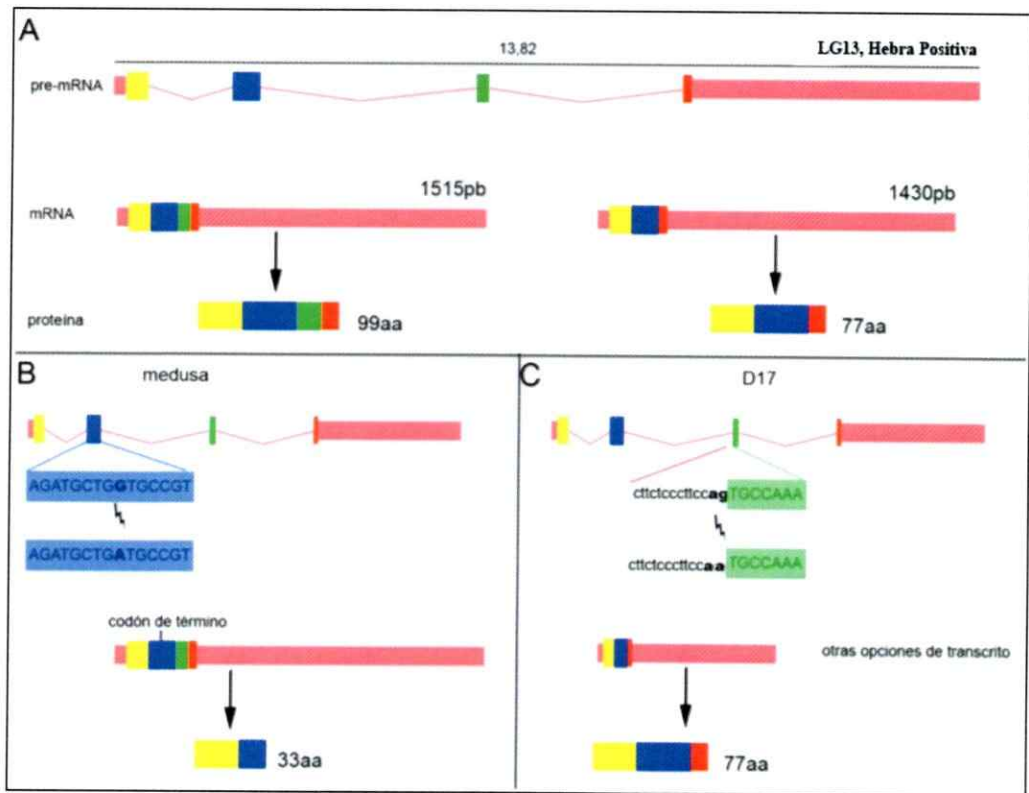


Figura 18: Esquema de las variantes de *splicing* de *sdf1a* (A) Secuencia genómica de *sdf1a* de 13,82kb en el LG13; pre-ARNm donde se muestran los 4 exones en colores (amarillo, azul, verde, naranja); mRNA de variantes *sdf1a_tv1* y *sdf1a_tv2*, y proteínas traducidas. (B) pre-ARNm de mutante *medusa*, donde se muestra la mutación puntual del exón 2 y (C) pre-ARNm de mutante D17 o *sdf1a^{u766}*, se muestra la mutación en el sitio dador de *splicing*, y los posibles transcritos.

Como se puede ver, en ninguno de los dos mutantes se produce un transcrito que contenga el exón 3, pero a diferencia de *medusa* (*sdf1a³⁰⁵¹⁶*), en el alelo *sdf1a^{u766}* se produce la variante *sdf1a_tv2*. Dada la aparente diferencia fenotípica entre ambos alelos -ausencia de migración de primordio en *medusa* (Valentin et al., 2007) vs. migración en *sdf1a^{u766}*- se hipotetizó que la variante *sdf1a_tv2* podría participar en la migración del primordio. Para abordar esta interrogante, se compararía el alelo nulo *medusa* con el del nuevo mutante, mediante una caracterización fenotípica de ambos.

3.1.2 Descripción fenotípica, clasificación y cuantificación de fenotipos de peces *sdf1a*^{u766} al término de la migración del pLLP.

La migración del pLLP termina cerca de las 40 hpf cuando alcanza la punta de la cola y ha depositado todos los neuromastos que comprenden la línea lateral embrionaria (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2007). Al tercer día de desarrollo todos esos neuromastos se encuentran completamente funcionales. Por lo tanto, como una primera aproximación analizamos el fenotipo de peces *sdf1a*^{u766} después del período de migración.

Con el fin de investigar detalladamente el fenotipo aberrante de la LLP en los mutantes, se analizó la mutación en 2 fondos reporteros transgénicos que marcan distintos componentes de la línea lateral y permiten seguir su desarrollo *in vivo*. El primero es Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{zfl06}, que marca con GFP las membranas de todas las células del primordio y los neuromastos, además de las células interneuromásticas de la línea lateral (Haas y Gilmour, 2006). El segundo es el fondo TgBAC[neurod:EGFP]^{ml} que permite seguir la extensión de los axones del nervio de la LLP (Obholzer et al., 2008). Una primera observación de peces Tg[*sdf1a*^{u766}; -8.0cldnb:lynEGFP^{zfl06}], evidenció que en los mutantes existía migración del PLL en un número considerable de individuos, lo que difería con el fenotipo del mutante previamente reportado *medusa* (Valentin et al., 2007). Sin embargo, esta migración es aberrante ya que no sigue la ruta normal por el miosepto horizontal, sino que avanza por otras zonas anatómicas del embrión (ver más abajo).

Como parte inicial de la caracterización, además quisimos dilucidar si esta línea lateral aberrante era viable en el tiempo o degeneraba. Para esto, realizamos un seguimiento diario de la funcionalidad de los neuromastos de peces Tg[-

8.0cldnb:lynEGFP]^{z/106} mutantes, hasta los 8dpf, realizando marcaje con una tinción vital para células ciliadas. Nuestros resultados mostraron no sólo que la línea lateral permanece sin degenerar, sino que también los neuromastos que conforman esta línea lateral aberrante no perdían su capacidad de incorporar DiAsp, un marcador confiable de la correcta diferenciación de las células ciliadas mecanotransductoras (datos no mostrados) (Collazo et al., 1994). Estos resultados indican que la formación y mantención de los neuromastos de la línea lateral son propiedades autónomas del primordio y que la migración colectiva y dirigida siguiendo el miosepto no es un pre-requisito para la diferenciación.

Para analizar si la migración aberrante en mutantes ocurría preferencialmente por alguna ruta, se realizó una clasificación fenotípica usando los peces [*sdfa*^{u766};- 8.0cldnb:lynEGFP]^{z/106}] en base al camino seguido por el primordio a los 3dpf, tiempo en el cual la migración del PLL ya ha terminado (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004). Un cruce de dos peces de este genotipo produce un 25% de animales con un patrón de migración aberrante, aunque este patrón es variable. Con un universo de 65 larvas mutantes analizadas por un sólo lado del cuerpo, se definió la existencia de 4 fenotipos distintos, denominados acorde al destino final del primordio: *ventral* (primordio en la región ventral, cercano a zona de los pronefros), *vitelo* (primordio avanza hasta llegar al vitelo), *detenido* (primordio avanza sólo una fracción de camino y queda detenido muy cercano al ganglio) y *vuelta en "u"* (el primordio avanza muy poco, pero retrocede cambiando el sentido migratorio)(Figura 19). Las proporciones obtenidas de cada fenotipo se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Proporción de cada uno de los 4 fenotipos mutantes, obtenidos en una primera aproximación.

Fenotipo	Proporción
ventral	51%
vitelo	26%
detenido	12%
vuelta en u	11%

Utilizando un total de 65 peces [*sdf1a*^{u766}; -8.0cldnb:lynEGFP^{z7106}] de 3dpf.

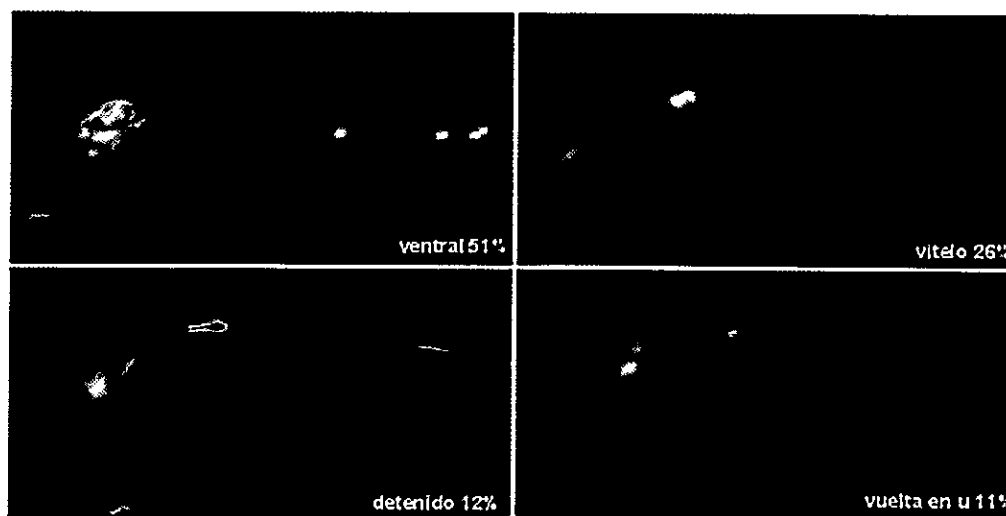


Figura 19: Clasificación de fenotipos. Luego de visualizar 65 embriones de peces cebra [*sdf1a*^{u766/-}; -8.0cldnb:lynEGFP^{z7106}], que marca las células del primordio de la LLP, determinamos una clasificación de 4 fenotipos: ventral 51%, vitelo 26%, detenido 12% y vuelta en u 11%. El fenotipo mayoritario es el que presenta una mayor distancia recorrida por el primordio.

Para confirmar el resultado anterior, analizamos larvas [*sdf1a*^{u766}; -8.0cldnb:lynEGFP^{z7106}] de 3dpf en un fondo genético diferente y proveniente del laboratorio del Dr. Stephen Wilson en UCL. El estudio se realizó con un total de 24 embriones de los que se obtuvo la siguiente proporción: ventral 46%, vitelo 29%, detenido 12,5% y vuelta en u 12,5% (los dos últimos suman el 25%). Siendo nuevamente el fenotipo ventral el predominante (Figura 19). Por lo tanto, en las larvas mutantes *sdf1a*^{u766} existe migración del pLLP y formación de neuromastos, pero la LLP generada presenta una ubicación aberrante, sin importar el fondo genético en el cual esté inserta la mutación.

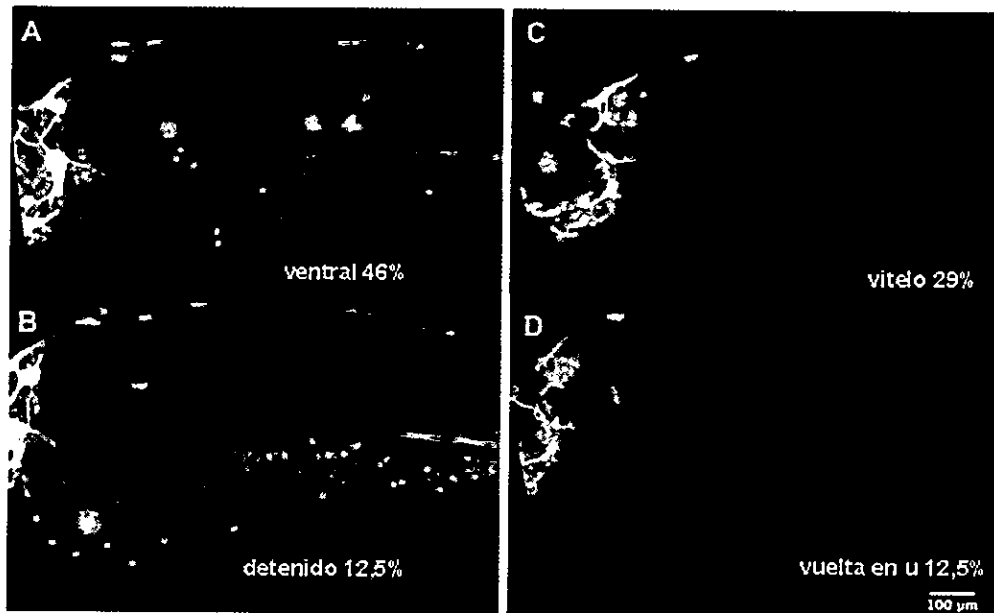


Figura 20: Confirmación de la proporción de fenotipos para la falta de función de *sdf1a* en un fondo genético diferente. En peces cebra $Tg[sdf1a^{u766};-8.0cldnb:lynEGFP^{z106}]$, se confirmó el fenotipo ventral como mayoritario, seguido por el fenotipo vitelo. La flecha roja muestra el destino final de la rama principal del pLLP.

Varios reportes han demostrado que el pLLP permanece íntimamente unido a los conos axonales en extensión durante su migración (Gilmour et al., 2004; Metcalfe et al., 1985). Como mostraron nuestros resultados preliminares (Figura 13), en experimentos de inmunocitoquímica contra tubulina acetilada en peces *sdf1a*^{u766} fijados de 3dpf, observamos que aunque en peces mutantes el nervio también seguía un camino aberrante, diferente al del miosepto horizontal, era recurrente observar más de una rama principal que se extendía en direcciones diversas. Esto nos llevó a preguntarnos si nervio y primordio podrían no estar siguiendo una misma ruta, y si estos se mantenían acoplados durante el período de migración en los mutantes.

Para responder esto hicimos uso de una tercera línea transgénica que expresa RFP de membrana en todas las células del primordio denominada $Tg[cxcr4b:mRFP]^{ump1}$, en

conjunto con TgBAC[neurod:EGFP]^{nl1}, lo que nos permitiría seguir el proceso migratorio del pLLP y la extensión de los axones del nervio simultáneamente.

Usando peces doble transgénicos y portadores de la mutación Tg[*sdf1a*^{u766}; *cxcr4b*:mRFP^{ump1}; neurod:EGFP^{nl1}], se repitió el análisis fenotípico para visualizar el comportamiento de ambas estructuras en un mismo individuo. En esta instancia decidimos agrupar los fenotipos “detenido” y “vuelta en u” en uno sólo, debido a que en ellos, el primordio permanecía en la misma región: en el tronco, próximo al ganglio, avanzando una distancia corta en comparación con los otros dos fenotipos. (Figura 21). Así, se dejó la clasificación de fenotipos mutantes para *sdf1a* con sólo tres categorías.

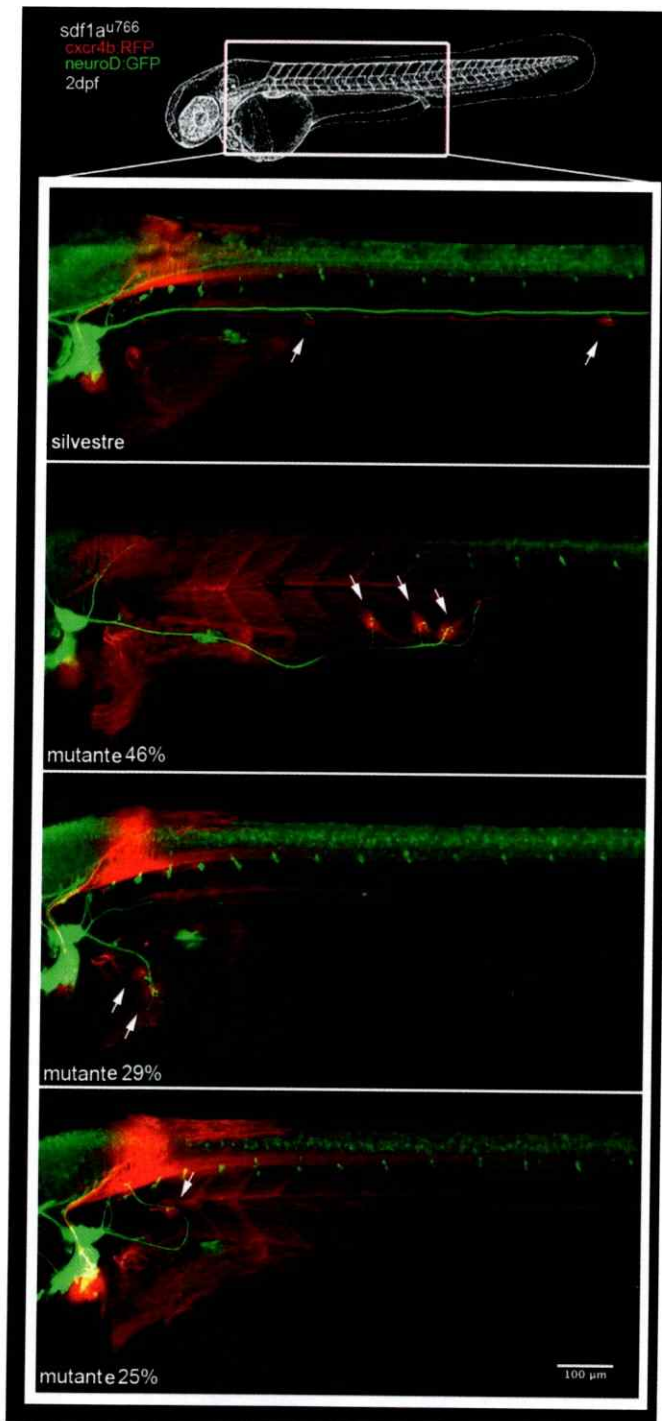


Figura 21: Clasificación de fenotipos de migración axonal en peces mutantes. Se usaron peces mutantes, que expresan RFP en células del primordio y GFP en nervio de la LLP Tg[sdf1a^{u766}; cxcr4b:mRFP^{umpl}; neuroD:EGFP^{nl1}]. El fenotipo ventral se mantiene como el principal con un 46% , seguido por el fenotipo vitelo. El estudio se realizó en 24 peces mutantes de 2 dpf. Con flechas blancas se señalan los neuromastos de la LLP.

En conjunto, nuestros datos muestran que en los mutantes *sdf1a*^{u766} existe migración del primordio, y éste se dirige mayoritariamente a una región ventral. Interesantemente existe un desacople parcial entre el nervio y el primordio, lo que nos llevó a preguntarnos cómo *sdf1a* afecta el comportamiento del nervio, lo que será abordado más adelante en esta tesis.

Sin embargo, debido a la diferencia de nuestros resultados sobre migración del primordio en comparación con los del alelo *medusa*, examinamos si este último tenía un fenotipo más severo que *sdf1a*^{u766}, lo que podría explicar esta diferencia.

3.1.3 Comparación con peces *medusa* *sdf1*^{t30516}

Con el fin de poder examinar en nuestras manos el fenotipo de *medusa* (alelo *sdf1*^{t30516}) y compararlo con *sdf1a*^{u766}, generamos peces portadores para *medusa* en dos fondos transgénicos, Tg[*sdf1*^{t30516}; -8.0cldnb:lynEGFP^{z/106}] y Tg[*sdf1*^{t30516}; neurod:EGFP^{n/1}], los que nos permitirían estudiar el comportamiento de la línea lateral de la misma forma que con el nuevo alelo.

Observamos que en los peces mutante *medusa* también existía migración del pLLP y que se repetían los fenotipos observados en peces *sdf1a*^{u766}, siendo predominante el fenotipo ventral, donde existe una distancia de migración considerable recorriendo varios cientos de micrones. La Figura 22 muestra una secuencia en dos tiempos, de la migración del primordio de la línea lateral en un pez [*sdf1*^{t30516}; -8.0cldnb:lynEGFP^{z/106}] donde se muestra el destino ventral que el primordio alcanza.

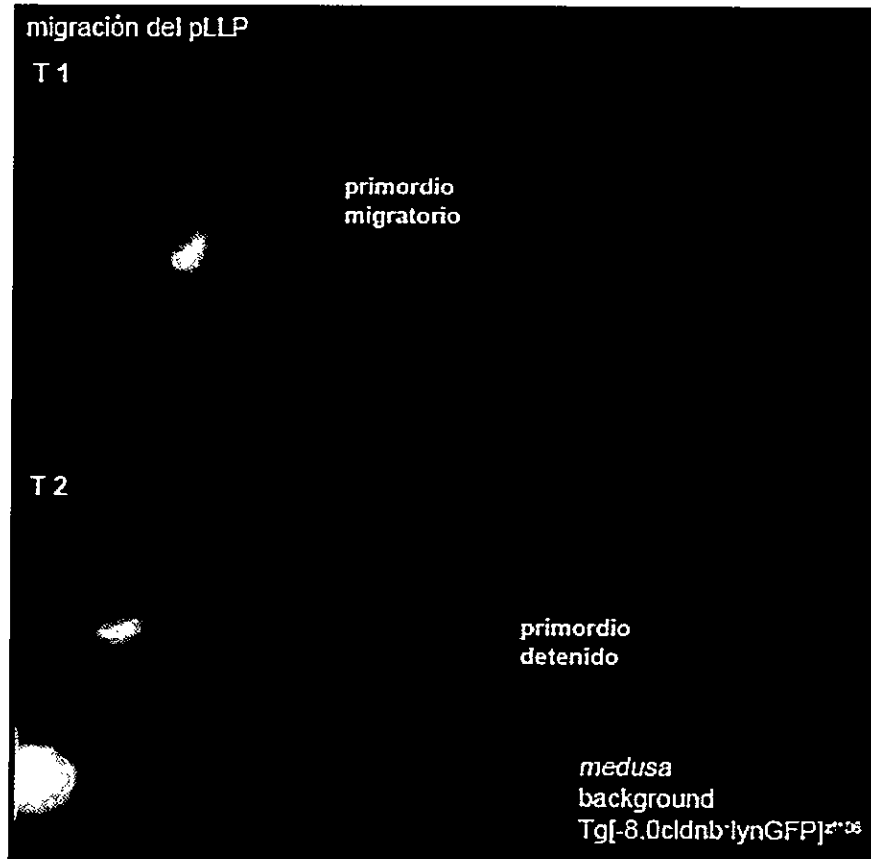


Figura 22: Secuencia en dos tiempos del proceso de migración en pez *medusa* en fondo Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{u766}. Se observa cómo el primordio se dirige por una región aberrante, con destino ventral, al igual que lo que ocurre mayoritariamente en el mutante *sdf1a*^{u766}

La cuantificación de los fenotipos previamente establecidos en el mutante *sdf1a*^{u766} se realizó en 17 larvas *medusa* de 3dpf, y esos datos se compararon con 24 mutantes *sdf1a*^{u766} de la misma edad. El resultado muestra que el fenotipo mayoritario en ambos mutantes es el de destino ventral, en el cual ocurre una migración considerable por parte del primordio (Figura 23). Esto sugiere que la migración del primordio de la LLP no dependería de SDF1a como ha sido reportado (Valentin et al., 2007).



Figura 23: Gráficos comparativos entre mutantes *sdf1a*^{u766} y *sdf1a*^{t30516} que muestra fenotipo ventral como mayoritario (en azul). El estudio se hizo utilizando 24 individuos *sdf1a*^{u766} y 17 individuos *sdf1a*^{t30516} los cuales se clasificaron en cuanto al fenotipo presentado por la LLP. Estos fueron cuantificados en peces con fondo transgénico Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{z106} o Tg[cxcr4b:mRFP]^{ump1}

Como una manera de apoyar estas observaciones, una prueba de complementación realizados mediante la cruce de peces portadores de ambos alelos mutantes, demuestran que no existe rescate del fenotipo, lo que sugiere que únicamente SDF1a se encuentra mutado en ambos peces (Figura 24).

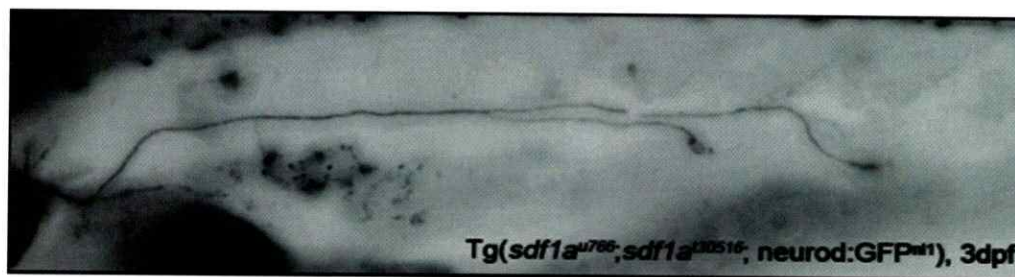


Figura 24: Prueba de complementación. Se realizó un cruce entre peces *sdf1a*^{u766} y *sdf1a*^{t30516}. Al no recuperarse el fenotipo silvestre en peces portadores de ambas mutaciones, se asume que en ambos mutantes SDF1a se encuentra ausente.

Finalmente, los mismos resultados fueron observados luego de analizar peces Tg[*sdf1a*^{t30516}; -8.0cldnb:lynEGFP]^{z106} y Tg[*sdf1a*^{u766}; -8.0cldnb:lynEGFP]^{z106}, lo que sin duda llevaba a pensar que si bien ambos mutantes genotípicamente eran

distintos, ambas mutaciones producen el mismo efecto, y por lo tanto *sdf1a*^{u766} sería una mutación que genera una pérdida de función, del tipo nula.

El haber realizado la cuantificación de fenotipos en distintos fondos genéticos avala el hecho de que el fenotipo observado no es artefactual y que en ambos mutantes la LLP aberrante se formaría bajo las mismas condiciones de ausencia de SDF1a.

Aunque en *sdf1a*^{u766} existe una variante de ARNm que se encuentra ausente en el mutante *medusa*, en ambos existe migración del pLLP, entonces esta evidencia nos llevó a descartar el efecto secundario de la variante de transcrito más pequeña. Nuestra interpretación de los resultados es que SDF1a no es indispensable para ocurra migración del pLLP, sino que tendría una rol en conferir direccionalidad al sistema. Por otro lado, esta falla en la direccionalidad de la migración podría verse reflejada en una alteración en la polarización del citoesqueleto, lo que generaría protrusiones mal posicionadas.

3.1.4 Descripción de la migración *in vivo* en peces *sdf1a*^{u766}

Con el fin de estudiar la dinámica del proceso migratorio en peces mutantes para *sdf1a*, se realizó un seguimiento *in vivo* del proceso. Para ello, se analizaron embriones mediante microscopía de fluorescencia de tiempo extendido. Recurrimos a las cepas mutantes en fondo transgénico, las que expresaban GFP y/o RFP en ciertos tipos celulares del sistema de la LLP. Se registró el proceso en todos los casos, luego de comenzada la migración en peces silvestres (alrededor de las 24hpf) e idealmente se siguió hasta el final del proceso (42hpf). La Figura 25 muestra un pez durante el momento inicial del montaje.



Figura 25: Montaje de pez para realizar *timelapse*. Foto inicial del registro mediante microscopía de fluorescencia de tiempo extendido. En la esquina superior izquierda se muestra un esquema de un pez de 24hpf. Un rectángulo blanco enmarca la región ampliada en la figura principal. En rojo se destaca el ganglio de la LLP y el pLLP. Pez con fondo genético $Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{z/106}$, izquierda rostral, derecha caudal, arriba dorsal y abajo ventral.

A partir de los *timelapses* se pudo observar que el primordio mutante presenta un retraso en el comienzo de su migración, el que varía ligeramente entre un pez y otro, pero en todos los casos ocurre posterior a las 24hpf (a diferencia del primordio silvestre que comienza a migrar entre las 20-22hpf). Luego de esta ventana de retraso, el primordio es capaz de migrar. Al cuantificar la velocidad de migración se encontró que el primordio mutante migra a una velocidad menor a la mitad que la del primordio silvestre (20 pixeles/hora vs 50 pixeles/hora, promedio silvestres $n=4$ y mutantes $n=8$). Esto apoya la idea de que *sdf1a* conferiría direccionalidad mas que capacidad migratoria *per se* (ver Video 1, 2 y 3).

Si efectivamente *sdf1a* controla la direccionalidad de la migración, ambos primordios de un mismo pez mutante deberían presentar trayectorias migratorias diferentes entre sí. Al analizar este fenómeno en peces individuales, encontramos que efectivamente éstos presentan comportamientos distintos, donde siguen caminos aberrantes independientes. Aunque si bien pueden tener el mismo destino, ese camino para alcanzar ese destino no es igual en ningún caso, a diferencia de lo que ocurre en la condición silvestre. Estos datos sugieren que posiblemente lo que esté

comandando esta migración o dando direccionalidad en ausencia de SDF1a, no es algo uniforme, lo que se condice con que existan diversos fenotipos mutantes. Por otro lado, está reportado que *sdf1b* se expresa en los pronefros durante este estadio en el que el primordio está en migración, área que coincide con la región ventral seguida por el primordio aberrante (Li et al., 2004), por lo que posiblemente este parálogo para *sdf1*, pueda estar actuando como quimioattractante bajo estas condiciones, ya que se ha confirmado su participación en la migración de otros tipos celulares, como las células primordiales germinales (Sánchez-Sánchez et al., 2010).

Por último, se observó en los videos que el nervio parecía tener un comportamiento más dinámico en comparación con peces silvestres. Se observaron ramas axonales laterales que se extendían y retraían. Además, los conos de crecimiento axonal, parecían más dinámicos que en condición normal y el primordio mutante parecía tener un tamaño menor que en condiciones silvestres cuando se visualizaba durante la migración en peces con fondo transgénico Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{z106}. Ambos aspectos serán tratados por separado, más adelante en esta tesis.

En conjunto, nuestros resultados muestran que en peces mutantes para *sdf1a*^{z766} la línea lateral posterior se forma de manera aberrante, siguiendo un recorrido distinto del miosepto horizontal. Además, el primordio mutante tiene una migración más lenta comparada con el silvestre y tarda más en comenzar la migración.

Con el fin de estudiar la formación de la línea lateral de manera más global y abarcando a los dos tipos celulares más importantes: nervio y primordio, fue que utilizamos peces dobles transgénicos Tg[*cxcr4b*:mRFP^{ump1}; *neurod*:EGFPⁿ¹¹], los que nos permitió seguir el proceso de migración de primordio y la extensión del nervio simultáneamente (Figura 26).

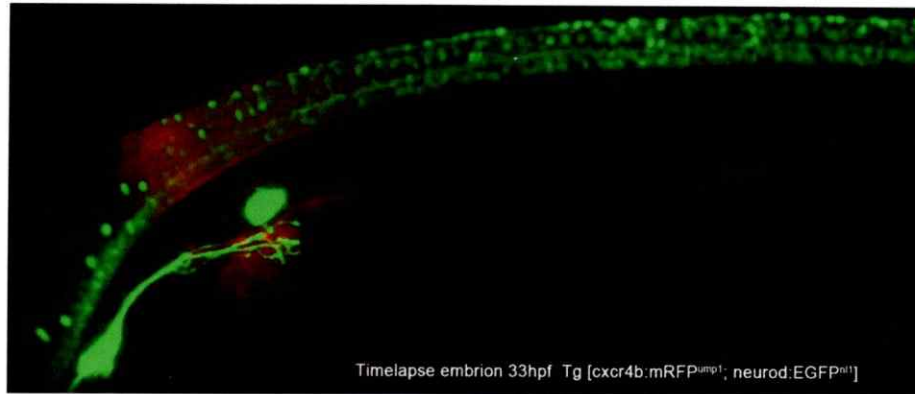


Figura 26: Pez doble transgénico Tg[cxcr4b:mRFP^{ump1}; neurod:EGFP^{nl1}] de 33hpf, los cuales fueron utilizados para ver la dinámica de nervio/primordio durante el proceso de formación de la LLP.

Los resultados obtenidos muestran que nervio y primordio presentaban un desacople parcial, debido a que existían proyecciones axonales que se extendían y retraían dinámicamente, aparentemente sin células del primordio que las acompañaran o guiaran. La relación nervio-primordio será abordada en el último capítulo de esta tesis.

Se observaron ligeras diferencias en comparación con peces transgénicos Tg[8.0cldnb:lynEGFP]^{zf106}. Por lo que fue necesario realizar un estudio más detallado del comportamiento celular del primordio mutante en cuanto a su morfología, proliferación y formación de protrusiones.

3.2 Estudio de la conformación del primordio migratorio de la LLP y de su comportamiento celular en peces mutantes.

3.2.1 Estudio del tamaño de primordios mutantes: evaluación de proliferación dentro del primordio migratorio

Al hacer un análisis de videos del proceso migratorio en peces silvestres y mutantes, uno de los hechos más evidentes es que la apariencia del primordio difería en varios aspectos. Uno de ellos fue el tamaño: el primordio mutante, en todos los casos parecía ser más pequeño comparado con el silvestre. Si bien este dato no fue cuantificado, quisimos estudiar si la proliferación del primordio se encontraba alterada en peces mutantes, lo cual podía tener directa relación con la variación de tamaño. Para este fin, realizamos experimentos de pulsos y caza de BrdU en peces Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{zj106}. El estadio escogido, coincide con el momento en el cuál el primordio se encontrara en plena migración a las 33hpf. Se cuantificaron células del primordio y células BrdU positivas (Figura 27) y se generó una razón entre ambos. Finalmente se compararon resultados obtenidos entre primordios silvestres y primordios mutantes de peces cldnB:GPF de 33hpf. Los resultados demuestran que la proliferación disminuye significativamente alrededor de un 15%. Como se sabe que la proliferación ocurre mayoritariamente en la *leading zone*, podría ser entonces que la ausencia de SFD1a en mutantes, estuviese interfiriendo en la organización interna del primordio, reorganizandose, lo que podría conllevar a que menos células tuviesen la identidad de *leading zone*, y por lo mismo, menos células estarían proliferando.

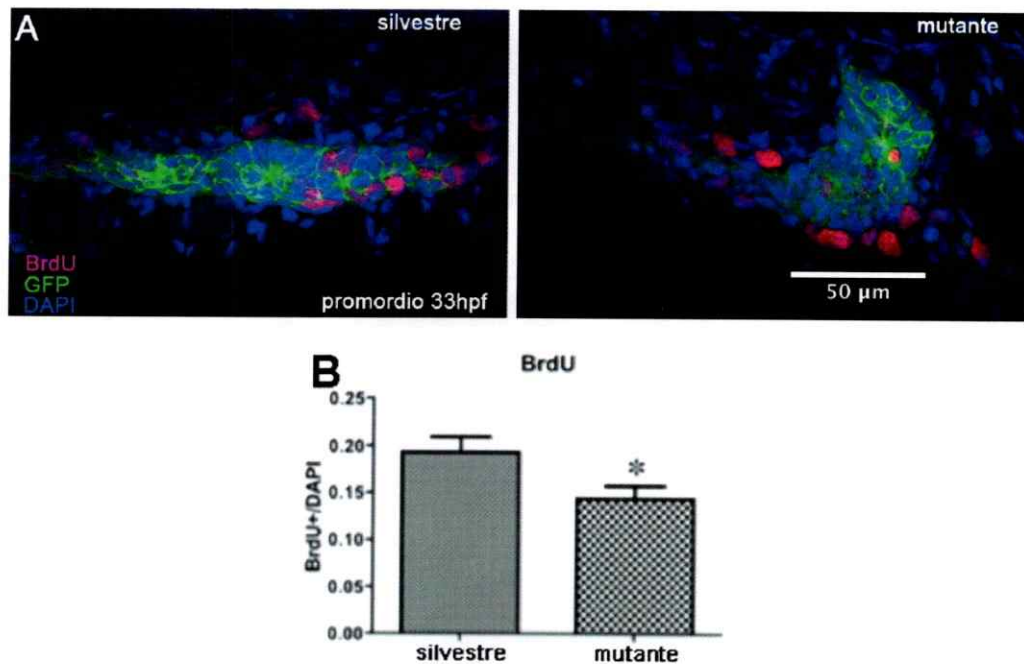


Figura 27: Proliferación en primordio migratorio. La proliferación de células del primordio migratorio de 33hpf fue estudiada mediante la incorporación de BrdU en peces $Tg[-8.0clnb:lynEGFP]^{z106}$, silvestres y mutantes. Células BrdU positivas fueron cuantificadas dentro del grupo de células GFP positivas. A) Se muestra un primordio silvestre a la izquierda, comparado con un primordio mutante a la derecha. B) Cuantificación de la relación de células BrdU+/GFP+, en donde se muestra la disminución significativa de células proliferando en primordios mutante. Silvestre n=7, mutante= 11.

3.2.2 Formación de protrusiones y dinámica citoesqueleto

Reportes previos (Haas y Gilmour, 2006) han mostrado que la migración celular dirigida requiere una polarización de las células, donde el frente líder presenta un grupo de células con características mesenquimáticas las cuales generan protrusiones que se extienden en el sentido de la migración y en su conjunto forman el vector que define la dirección del movimiento. Como la direccionalidad esta afectada en el primordio mutante, quisimos investigar si la falta de SDF1a se traducía en una pérdida de polaridad del grupo celular colectivo reflejada en la desorganización de la región líder. Entonces para esto decidimos observar la formación de protrusiones en

relación a su ubicación y dirección, relacionándolo a su vez con el sentido del movimiento del primordio. Como se observó durante el registro del proceso migratorio, el primordio evidencia formas irregulares, diferentes a la condición silvestre (Figura 28). En condiciones silvestres las células que forman parte de la *leading edge* del pLLP generan protrusiones que permiten al primordio avanzar, y es posible que la ausencia de SDF1a afectando este proceso particular, lo que ha sido sugerido en otros tipos celulares (Theveneau et al., 2010). Al analizar primordios de 33hpf de peces silvestres y mutantes ($n>5$), encontramos que para el caso de primordios silvestres las protrusiones sólo se observan en la región delantera, y están ausentes en otras regiones de éste, lo que esta de acuerdo con lo reportado por Haas y Gilmour, 2006. En cambio, en primordios mutantes, la formación de protrusiones ocurría en distintas regiones no restringidas al *leading edge*. Además, la formación de estas extensiones era en diversas direcciones. Por lo tanto estos datos sugieren que en ausencia de SDF1a la “identidad” de células líderes en la región delantera se pierde o se redistribuye (Figura 28).

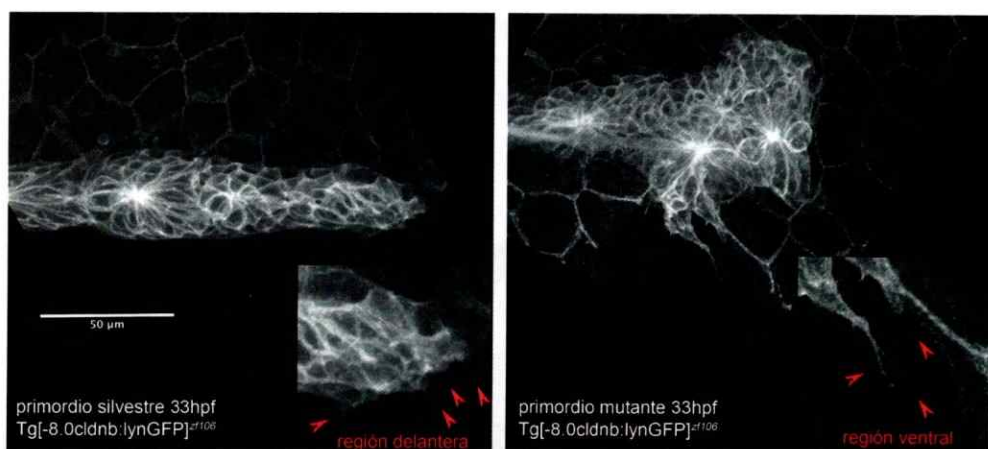


Figura 28: Se observa un primordio silvestre y un primordio mutante. Puntas de flechas rojas, muestran lugares donde se generan protrusiones. Se puede observar como la posición de las protrusiones en el primordio silvestre se restringe a la región delantera, mientras que en el primordio mutantes se encuentra en diferentes regiones.

Esta pérdida de identidad grupal podría tener su contraparte a nivel de célula única, y una manera de analizarlo sería ver si esto tenía relación con una alteración a nivel del citoesqueleto durante su polimerización. De esta forma, nos concentramos en analizar si *sdf1a* orquesta la direccionalidad de la formación de microtúbulos.

Se sabe que durante la formación de protrusiones en grupos de células que migran colectivamente, la tubulina se ensambla generando haces de microtúbulos en la zona de la protrusión. Por esta razón realizamos un seguimiento de este proceso mediante el uso de una fusión entre la proteína EB3 con GFP, la cual se une a la tubulina cuando se ensambla en el extremo positivo en crecimiento, permitiendo observar este proceso *in vivo* (Stepanova et al., 2003). El resultado de esta unión dinámica es que el GFP ensamblado en los microtúbulos se observa como una “formación de haces de partículas fluorescentes” que pueden ser seguidos y visualizados para analizar la dirección de la polaridad de las protrusiones.

Embriones Tg[*cxcr4b:mRFP*]^{*ump1*} fueron inyectados con mRNA codificante para EB3::GFP, con el fin determinar si el ensamblaje de microtúbulos se veía afectado en ausencia de SDF1a. El seguimiento *in vivo* se hizo en un microscopio confocal “*spinning disk*”, para obtener imágenes en fracciones de segundo y pudiendo seguir la dirección de los cometas. Fueron 3 peces silvestres y 3 mutantes (confirmados por genotipado) los que se visualizaron por aproximadamente 1 minuto en un objetivo de inmersión en aceite 60x. Las imágenes representativas eran como la de la Figura 29, donde se muestra sólo 1 tiempo, y 1 plano. En el gráfico de roseta en donde se muestra cómo se ve afectada la formación de cometas, polarizándose hacia distintas direcciones en el caso del primordio mutante, a diferencia del silvestre que muestra

una clara preferencia un mismo sentido de dirección en las distintas regiones del primordio.

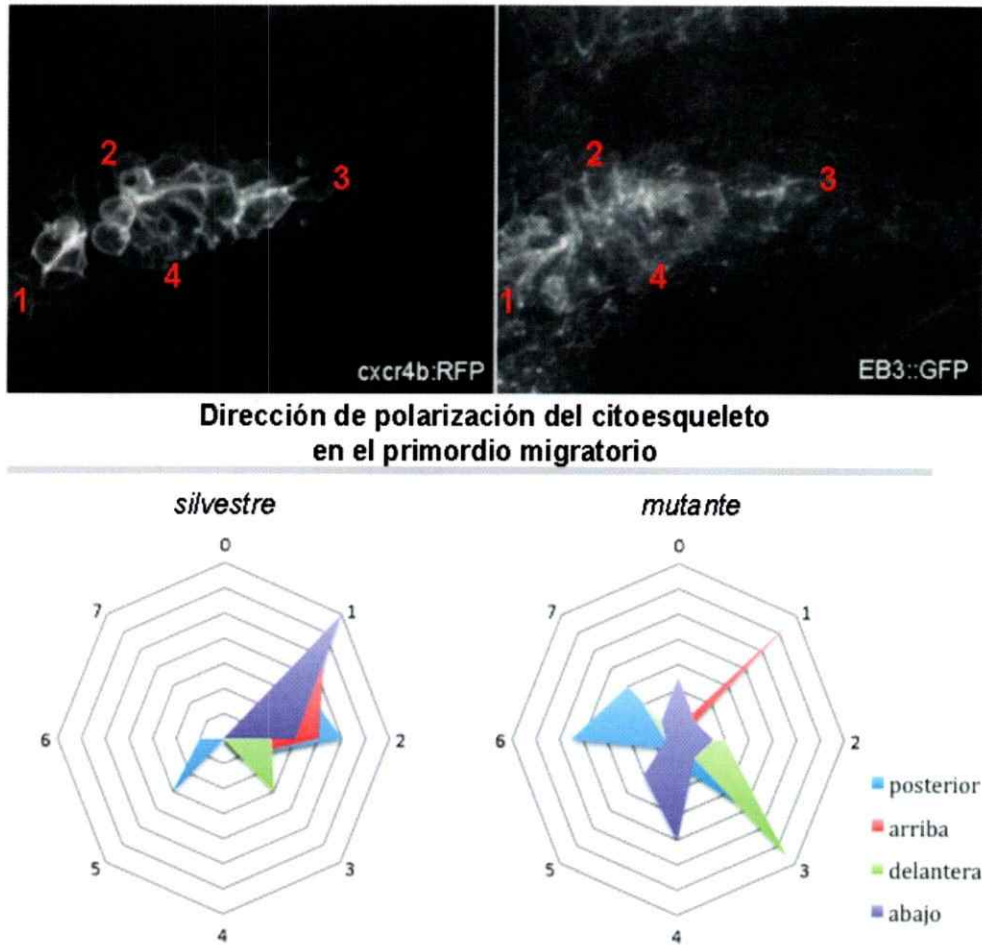


Figura 29: Cuantificación de la polarización de microtúbulos. Peces Tg[*cxcr4b:mRFP^{ump1}*] inyectados con ARN codificante para EB3::GFP. El primordio fue dividido en cuatro regiones designado con números rojos: 1.- posterior, 2.- arriba, 3.- delantera y 4.- abajo (con respecto al primordio), se eligieron dos células de cada una de estas regiones y se registró la dirección de formación de los cometas formados durante el registro. Esto se realizó en peces silvestres y mutantes. En la figura, en la parte superior se muestra una imagen de primordio mutante como ejemplo, la cual se descompuso en los dos canales: izquierda: *cxcr4b:mRFP* y derecha: EB3::GFP. Abajo se muestran los gráficos que resumen la dirección de los distintos cometas formados durante la polarización de microtúbulos, cada color resume una región: azul rostral, rojo dorsal, verde caudal y morado ventral. Y los números del gráfico definen la dirección de polarización, siendo 2: hacia caudal, 6: hacia rostral, 0 hacia dorsal y 4 hacia ventral. Objetivo 60x.

Por tanto podemos observar que en ausencia de SDF1a la ubicación de la formación de cometas, así como también la dirección del ensamblaje de microtúbulos se encuentra alterada, lo que estaría generando las protrusiones ectópicas observadas en los primordios de peces mutantes. Estos resultados nos llevaron a preguntarnos si la polaridad del primordio se encontraba alterada de alguna manera, por lo que decidimos estudiar tanto la morfología como su polaridad a través de un marcador molecular.

3.2.3 Descripción de la morfología y polaridad del primordio migratorio mutante.

Al estudiar el proceso migratorio del primordio durante la formación de la línea lateral, nos percatamos de manera macro que el primordio aparentemente se comportaba distinto en peces mutantes, con respecto a peces silvestres, que su morfología y tamaño parecían ser distintos también. Fue por esta razón, que luego de haber estudiado y caracterizado la ruta migratoria de esta línea lateral aberrante nos detuvimos a mirar con mayor detalle el primordio migratorio.

Un primer paso, fue estudiar la polaridad del primordio. De manera de verificar si ésta se encontraba afectada y los primordios mutantes presentaban desorganización de su estructura, analizamos la expresión de un marcador polarizado de primordio mediante hibridación *in situ*. Analizamos la expresión de *fgf10* cuyo dominio se restringe a la región delantera del primordio. Trabajamos con un grupo de más de 30 embriones mutantes previamente seleccionados, de los cuales utilizamos 5 en los que el primordio era inequívocamente identificable, 3 de éstos se encontraron en el vitelo, y 2 en la región ventral. En los 5 casos, la marca de la sonda era igual y se distribuía

en todo el primordio, lo que interpretamos como una pérdida de la polaridad de éste. Lo que sugiere que la estructura polarizada del primordio si se encontraba afectada, como se muestra en la Figura 30.

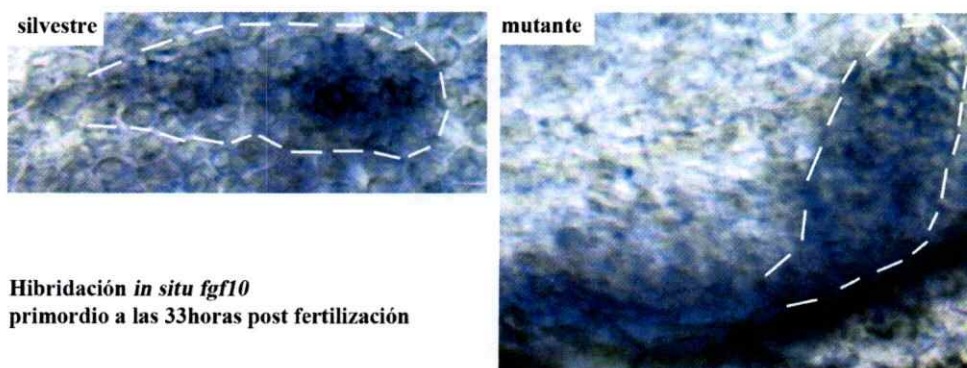


Figura 30: Hibridación *in situ* de la sonda *fgf10*, marcador delantero. En el caso del mutante se observa cómo la marca se distribuye a lo largo de todo el primordio de manera homogénea, a diferencia de la condición silvestre en la que se distribuye principalmente en la parte delantera.

Debido a que en los primordios mutantes previamente inspeccionados presentaban una apariencia mayormente disgregada, se estudió también si la cohesión del primordio se veía afectada, esto se realizó mediante inmunocitoquímica, en donde se utilizaron anticuerpos contra GFP y β -catenina, para tener una estimación de la cohesividad que existe entre las células (Whitfield, 2005). En primordios mutantes de 33hp se observó que existía una pérdida de inmunorreactividad en la parte delantera del primordio, mostrando una aparente pérdida de cohesividad en la región delantera del primordio mutante (Figura 31). Por lo tanto, este “desorden” del primordio puede deberse en parte a esta pérdida de cohesión del primordio, produciéndose una desorganización/reorganización interna que llevaría a que distintas regiones pudieran tener células que fuesen capaces de responder a señales en distintos puntos, lo que se reflejaría en una disgregación de la estructura global.

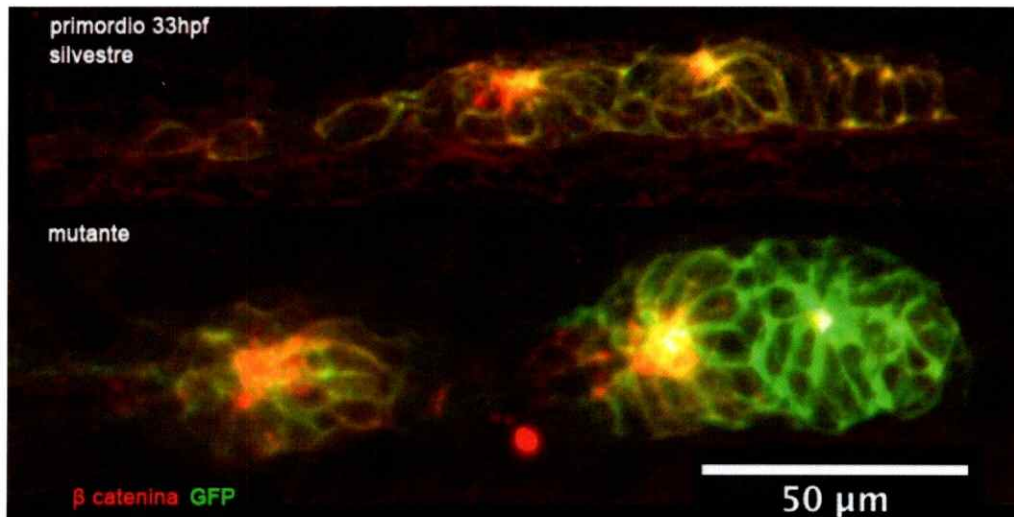


Figura 31: La adhesión celular estaría afectada. Inmunofluorescencia contra beta catenina muestra que en condiciones control (arriba) el primordio presenta mayor inmunoreactividad en los 2 tercios posteriores (región trasera organizada en rosetas), mientras que disminuye en la región líder donde las células no están organizadas y presentan características mesenquimáticas. En mutantes la región inmunoreactiva para beta catenina disminuye y la región con características mesenquimales se agranda hacia posterior.

Observamos además la morfología de primordios migratorios en peces vivos de 33hpf, en los que se observó: i) la pérdida de la morfología alargada en orientación rostral-caudal, ii) la pérdida de rosetas formadas definitivamente en la parte trasera, y iii) una invasión total del primordio por los conos axonales en crecimiento, Figura 32. Esta última observación será tema de estudio de la sección siguiente de esta tesis, ya que esta invasión fue algo anómalo e inesperado. Por consiguiente, se tratará el estudio del comportamiento del nervio en peces mutantes para *sdf1a*.

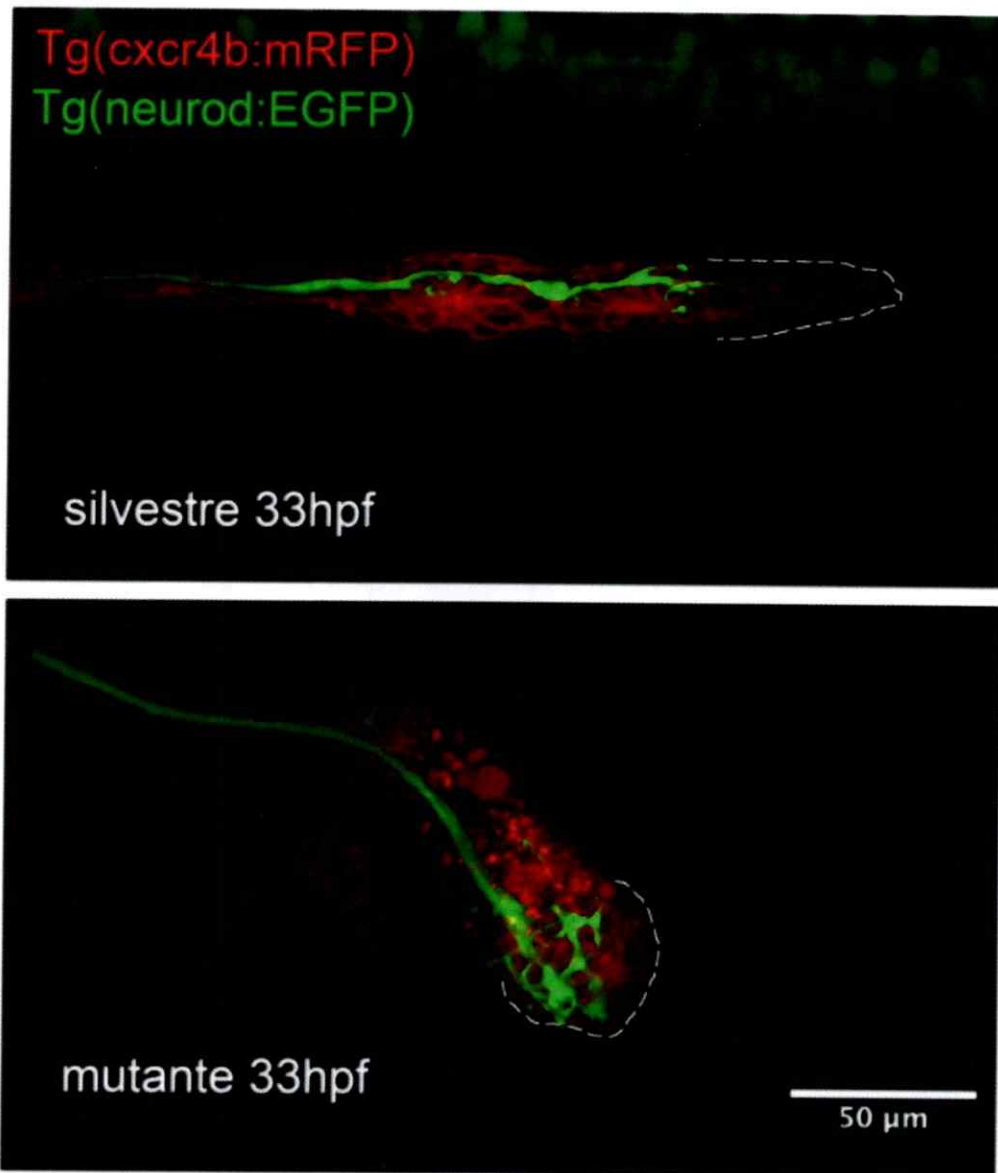


Figura 32: Morfología de primordios migratorios de 33hpf. Arriba se observa un primordio silvestre de Tg [neurod:EGFP^{nl}; cxcr4b:mRFP^{ump/l}]. Se observan tres características: en la parte trasera del primordio se pueden visualizar la agrupación de células formando rosetas; la dirección de migración ocurre siempre de rostral a caudal (izquierda a derecha); y los conos de crecimiento de axones nunca se adelantan a la porción delantera del primordio. En cambio en condiciones mutantes: no es posible visualizar la formación de rosetas; la dirección de migración del primordio se encuentra en todos los casos afectada y el nervio es capaz de invadir la región delantera del primordio. La región delantera del primordio es delimitada con una línea blanca punteada. Escala 50 μ m.

3.3 Estudio del comportamiento del nervio de la LLP en peces mutantes *sdf1a*^{u766}

3.3.1 Determinar los eventos de comportamiento anómalos producidos en el nLLP en mutantes *sdf1a*^{u766}

El primordio de la LLP ha sido descrito como la estructura que guía y dirige la extensión del nervio (Gilmour et al., 2004), lo que se debería a una guía dependiente por contacto donde la adhesión célula-célula permitiría que este cohorte de células en migración colectiva, extiende al nervio (Becker et al., 2001).

Como fue determinado en la primera parte de este trabajo, donde se estudió el comportamiento migratorio de la línea lateral y la morfología del primordio, el nervio presentó cambios con respecto a los peces silvestres, donde hubo un fenómeno de desacople del nervio y primordio, lo que llevó a preguntarnos si la relación o interacción nervio-primordio era regulada por *sdf1a*. La interacción nervio-primordio se restringe a la porción trasera del primordio, la que corresponde a dos tercios de esta estructura y como fue observado en el desarrollo de esta tesis, este comportamiento se veía alterado. Es por esta razón que en esta parte del trabajo se enfatizó en estudiar los diferentes eventos ocurridos en el nervio de la línea lateral, con el fin de determinar si debido a pérdida de función de SDF1a, existía alguna influencia sobre dicha estructura. Para esto, nos detuvimos a examinar en mayor detalle la morfología del nervio y su comportamiento durante el proceso migratorio. Observando el nervio durante el registro de la migración de primordios de peces de 33hpf, encontramos que en todos los casos, el nervio invadía totalmente las células del primordio, como muestra la Figura 32 (se muestra previamente), y que además los axones eran capaces de adelantarse varios micrones más allá de éste, en un comportamiento dinámico. Este evento lo llamaremos “*extensión anómala de axones*”

Como mencionamos previamente, los conos de crecimiento del nervio presentan una ubicación definida con respecto al primordio, esta es la porción trasera del primordio, la cual corresponde aproximadamente a 2/3 de su totalidad (Gilmour et al., 2004; Metcalfe et al., 1985). Por lo que dichos axones estarían presentando una mayor libertad con respecto a los axones de peces silvestres. Si bien no está descrito el mecanismo por el cual nervio y primordio se mantienen unidos durante la migración, se sabe que esta interacción es constante y restringida (Gilmour et al., 2004) y posiblemente podría estar dependiendo de la organización y cohesión del primordio. En condiciones silvestres, el nervio se extiende fasciculado en su totalidad, con todos sus axones unidos íntimamente formando el nervio que se extiende desde el ganglio hasta el final de la cola del pez; sólo en puntos específicos axones se desprenden de esta rama principal para inervar los neuromastos (Becker et al., 2001). Cuando observamos el nervio en peces en los que su LLP ya estuvo formada nos percatamos que ocurrían otros dos eventos destacables: “*desfasciculación*” Figura 33 y “*ramificación*” Figura 34 y Video 4.

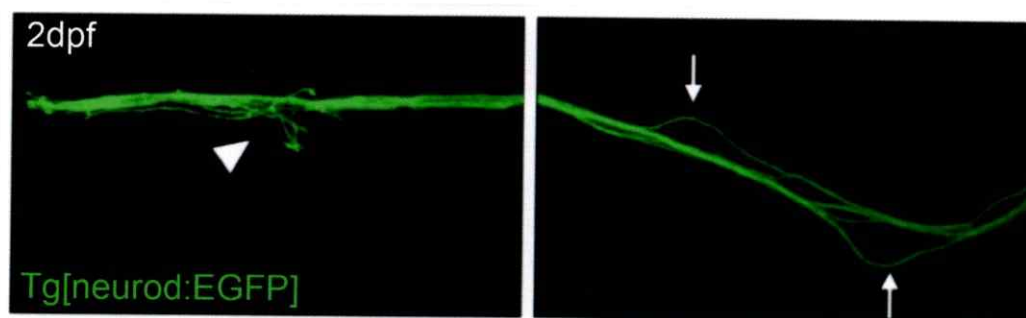


Figura 33: Desfasciculación en nLLP de peces $TgBAC[neurod:EGFP]^{nll}$ de 3dpf. A la izquierda se muestra un pez silvestre: La punta de flecha muestra uno de los únicos eventos de desfasciculación en condiciones silvestres, estos coinciden con la inervación de neuromastos. A la derecha se muestra el evento de desfasciculación en distintos puntos de la extensión del nervio de la LLP. Cada punto se muestra con una flecha blanca.

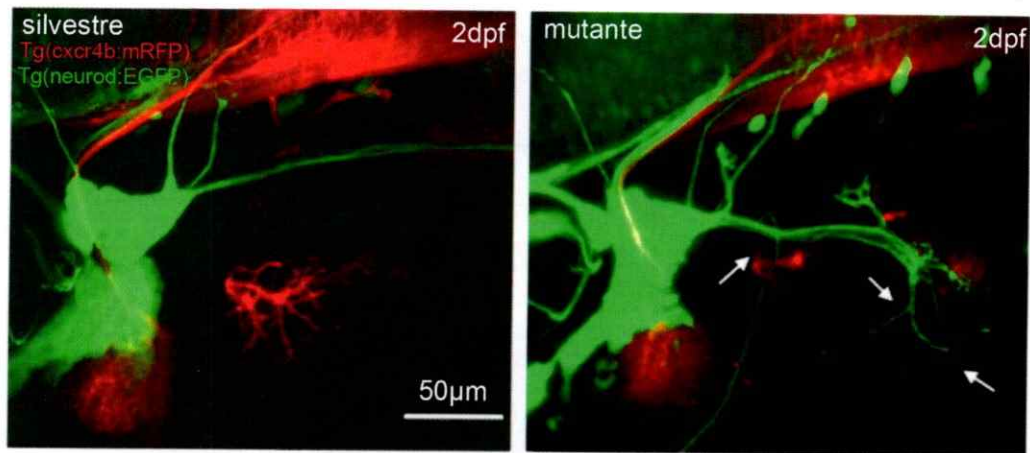


Figura 34: Ramificación. Observamos peces $Tg[cxcr4b:mRFP^{ump1}; neurod:EGFP^{nl}]$. A la izquierda se muestra la región del ganglio de la LLP en un pez silvestre: el nervio se extiende a partir del ganglio y en su extensión axones se encuentran empaquetados. A la derecha se muestra la región del ganglio de la LLP un pez mutante, donde se puede apreciar 3 puntos de ramificación indicados con flechas blancas, ausentes en la condición silvestre.

El estudio se realizó visualizando 17 peces $Tg[sdf1a^{u766}; cxcr4b:mRFP^{ump1}; neurod:EGFP^{nl}]$ de 3 dpf. Para cada evento la probabilidad de ocurrencia es superior al 55%, y ninguno de los eventos, presenta una correlación con ningún fenotipo en particular.

En conjunto, estos datos muestran que en ausencia de SDF1a el nLLP se encontraría alterado, presentando eventos de “extensión anómala de axones” dentro del primordio, “*desfasciculación*” y “*ramificación*”. Esto sugiere que SDF1 es necesario para que los axones del nervio se extiendan de manera coherente y formando una unidad empaquetada, junto con el primordio de la línea lateral. Sin embargo este efecto puede tener varias causas; el fenotipo podría ser un efecto directo sobre los conos axonales, o indirecto: a través del primordio o de las glías que recubren el nervio, ya que las glías son derivados de cresta neural, tipo celular que ya ha sido caracterizado en otras especies por responder a fuentes de SDF1 (Theveneau et al., 2010). Además se sabe que el nervio permanece en constante contacto con el

primordio a través de sus conos axonales (Gilmour et al., 2004), y que este se encuentra en toda su extensión recubierto por glías (Gilmour et al., 2002).

Estudios han demostrado que algunos axones poseen receptores y son capaces de responder a fuentes de SDF1 (Miyasaka et al., 2007; Knaut et al., 2005). Sin embargo en el nLLP no se ha reportado que exista expresión de receptores para este ligando, y se ha demostrado mediante experimentos de trasplante que axones silvestres en un pez mutante para uno de los receptores, *cxcr4b*, no son capaces de responder frente a una fuente de SDF1a, aunque cabe destacar que en estos experimentos se mantiene acoplado nervio y primordio (Gilmour et al., 2004).

Luego nuestro interés se enfocó en determinar si dichos eventos podrían tener relación con un efecto directo o indirecto. Para esto nuestro primer foco de atención fueron las glías.

3.3.2 Determinar la presencia de glías que recubren el nLLP en ausencia de SDF1a.

Como fue mencionado anteriormente, han sido estudiadas las señales que dirigen el movimiento de las crestas neurales, el tipo celular más mótil, ha sido estudiado en cuanto a las señales que dirigen su movimiento (Schuster et al., 2010; Gilmour et al., 2002). Es así como se ha responsabilizado a SDF1 como quimioattractante necesario para comandar el movimiento tanto de las CN en otros modelos (Theveneau et al., 2010). Además se ha demostrado que la migración de derivados de CN, como los melanóforos, son capaces de responder a SDF1a en pez cebra (Svetic et al., 2007). Las células gliales, al igual que los melanóforos, son derivados de cresta neural y hasta el momento no se ha reportado que estas células respondan a SDF1a.

Nos preguntamos si la desfasciculación y ramificación serían consecuencia de la ausencia o de aberraciones en estas células gliales, las que son derivados de CN. Este hecho podía ser factible debido a que estos dos fenotipos podían tener directa relación con la ausencia de este tipo celular, presentando alteraciones en el empaquetamiento del nervio.

Para este propósito, inyectamos morfolino contra *sdf1a* en peces Tg [*foxd3:GFP*]^{zfl5}, que expresan GFP en crestas neurales y sus derivados, entre ellos precursores gliales y glías (Gilmour et al., 2002).

En los morfantes que fenocopian la mutación, es posible ver cómo ramas anexas a la principal del nLLP, están recubiertas de principio a fin por glías Figura 35.

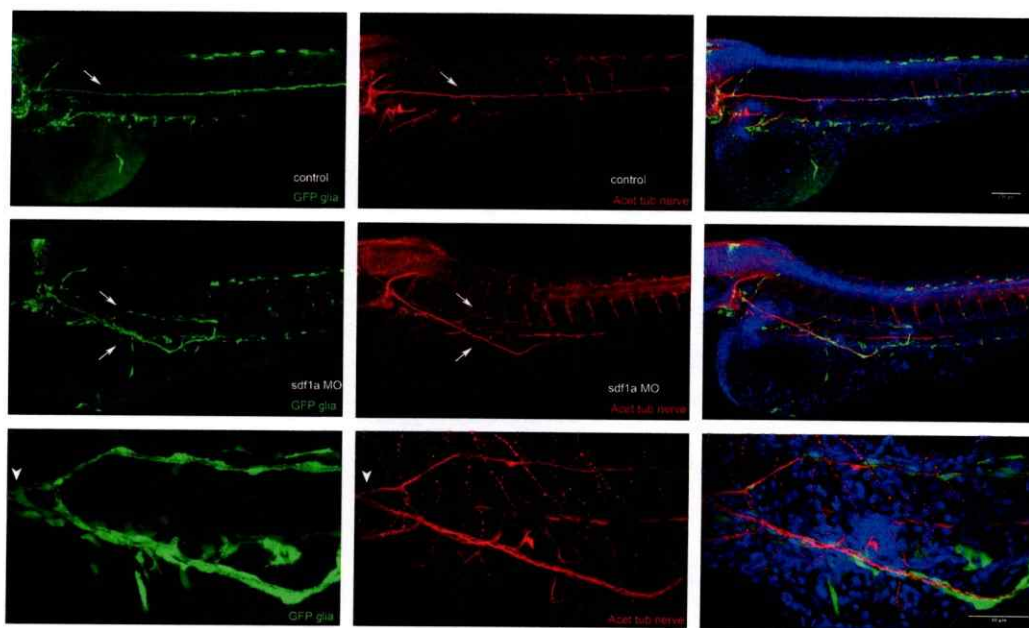


Figura 35: El fenotipo del nervio no es explicable por una ausencia de glía en una pérdida de función de *sdf1a*. En peces Tg [*foxd3:GFP*]^{zfl5} morfantes para SDF1a, se visualizó la presencia de la glía. Las células gliales no se veían afectadas en peces mutantes de 3dpf y además se encontraban recubriendo todas las ramas axonales. En rojo se observa la inmunotinción contra tubulina acetilada y en azul contratinción DAPI, la que marca los núcleos de todas las células del pez. Barra de escala 50µm.

Los datos muestran que las glías se encuentran presentes y recubriendo los axones del nervio de la LLP de manera aparentemente normal, por lo que los eventos ocurridos en el nervio que dan cuenta de una pérdida del empaquetamiento del mismo no se deberían a una ausencia de este tipo celular; las glías no sólo cubren el nervio en toda su extensión, sino que también las ramas de éste producidas de manera anexa. Por esta razón, nos preguntamos si debido a la presencia de glías en las ramas aberrantes, la glía serviría como un camino para la regeneración, estos datos aportarían como control regenerativo y reafirmarían que no habría problemas con la glía.

3.3.3 Estudiar regeneración de nervio post-axotomía en mutantes

Quisimos estudiar si el nervio era capaz de regenerar por el mismo camino luego de axotomía. Para esto se realizó una ablación en el nervio tal como fue descrito previamente (O'Brien et al., 2009). Peces de 3dpf TgBAC[neurod:EGFP]^{nl} silvestres y mutantes fueron axotomizados con un láser de dos fotones, en la región anterior del nLLP. El universo fue de 10 larvas, en 3 de los cuales ocurrió una ablación efectiva y completa (Figura 36B'). Los peces fueron fotografiados antes de la ablación (Figura 36A), post axotomía (Figura 36B), 6 horas después de la ablación (hpa; luego de la degeneración del axón) (Figura 36C), y 24 hpa (Figura 36D). En la Figura 36 se observa que la regeneración ocurre, y por la misma región previa al corte, regenerando además, las ramas ectópicas.

Por lo tanto, estos resultados en conjunto con los de la sección anterior sugieren que la presencia de la glía entrega al nervio en regeneración un soporte mecánico, y que la reextensión de los axones no requieren de SDF1a. Reafirmando además que no existen problemas con la presencia de glías sobre los axones del nervio.

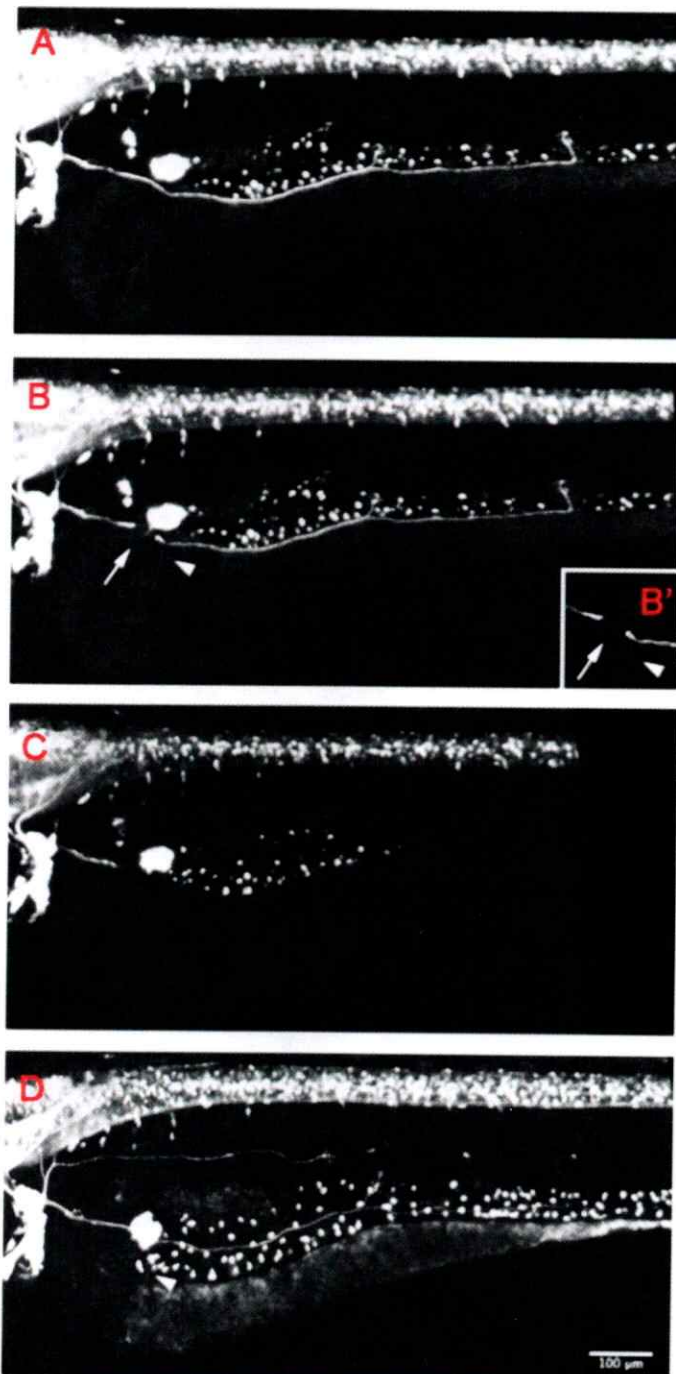


Figura 36: Regeneración del axón luego de axotomía en peces carentes de SDF1a. Se utilizaron peces mutantes $Tg[\text{neurod:EGFP}^{nll}]$. El nervio regeneró por el mismo sitio donde se encontraba previo al corte, así también las ramas ectópicas. A) pre-ablación. B) 0 horas post-ablación. B') Acercamiento de la región axotomizada, da cuenta del espacio pre y post corte. C) 6 horas post-ablación, degeneración axonal. D) 24 horas post-ablación, regeneración axonal. En esta última imagen se aprecia el nervio que acompaña el primordio de la línea lateral posterior secundaria.

3.3.4 Efecto local de SDF1a sobre el nLLP

Al descartar a la glía como responsable de la pérdida del empaquetamiento del nervio que llevaba a ver los eventos de desfasciculación y ramificación, existía la posibilidad de que SDF1a ejerciera un efecto directo sobre el nervio.

Para este fin generamos fuentes locales y ectópicas de SDF1a en embriones silvestre, inyectando 150pg de un constructor codificante para Hsp70:*sdf1a*::GFP , en estadios entre 1 y 4 células. A las 30hpf se realizó el *heatshock* y los embriones fueron fijados a las 54hpf. Luego se realizó inmunocitoquímica contra tubulina acetilada para visualizar el nervio y una contratinción con DAPI para ver el primordio. La región anterior del pez, por donde el primordio ya había migrado, fue visualizada para estudiar si una fuente ectópica local de SDF1 podía afectar el comportamiento del nervio, y estudiar si el nervio era capaz de alterarse sin que el primordio lo estuviese. En los peces sin el golpe término (*heatshock*), no hubo expresión visible de GFP por lo que no habrían fuentes ectópicas de SDF1a, mientras que en los peces tratados con el golpe de calor era posible ver expresión de GFP en distintas regiones del cuerpo del pez como se observa en la Figura 37, al igual que en Li et al., 2005. En los peces con *heatshock* estudiados el primordio se encontraba detenido prematuramente en su recorrido, posiblemente por la expresión local de SDF1a. Estos resultados se condicen de acuerdo con el reporte de Li et al., 2004 donde se mostró que frente a una fuente ectópica de SDF1 el primordio era atraído hacia ella, deteniéndose en ese lugar, lo que da cuenta de la capacidad atrayente de esta molécula.

En relación al nervio, se encontró 2 clases de fenotipos. En algunos especímenes, los axones se encontraban asociados con el primordio, mientras que en otros los axones

se extendían más allá de este (Figura 37). Sin embargo, y aunque no fue posible comprobar que células provenientes del primordio acompañaran estos axones, el hecho de que éstos se escaparan de la rama principal hacia direcciones alejadas del grupo de células del primordio daba cuenta de un grado de desorganización de este sistema. En cualquier caso no fue posible distinguir si dichos axones se dirigían a una fuente local de SDF1a o eran llevados por células provenientes del primordio, ya que se ha postulado al primordio como el medio necesario para extender sus axones a través de la interacción de los conos axonales con las células de la región trasera del primordio. Así, existe la posibilidad de que la interacción de atracción (con la parte trasera del primordio) y repulsión (con la parte delantera del primordio) los extienda por el camino correcto.

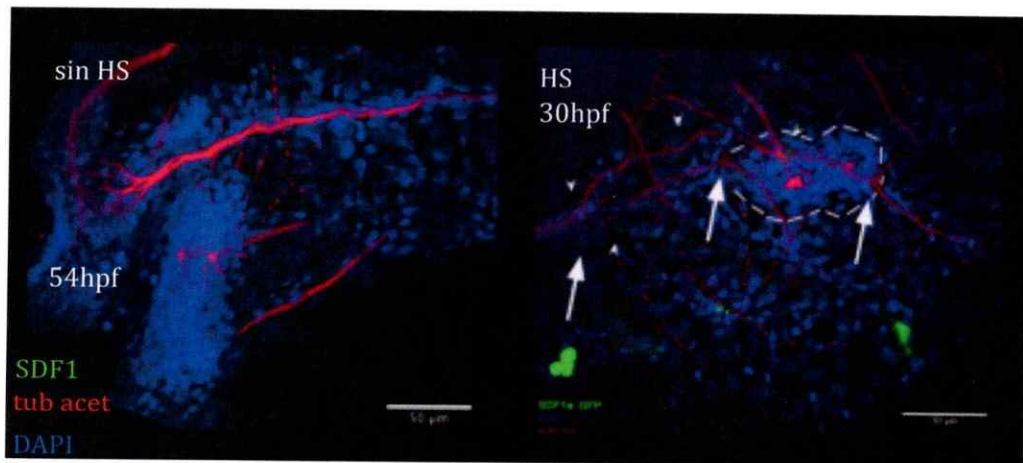


Figura 37: Respuesta del primordio/nervio frente a una fuente local de SDF1a exógeno. A la izquierda se muestra un pez sin *heatshock*, en donde se aprecia el nervio fasciculado. A la derecha un pez de 54hpf en el que se realizó un *heatshock* a las 30hpf, aquí se observa que se han diferenciado neuromastos sobre una región que expresa SDF1a (GFP positiva) y luego se extiende un axón que va más allá de este conglomerado de células. En rojo se muestra el nervio, inmunotinción contra tubulina acetilada, en azul contratinción DAPI que marca núcleos y en verde GFP. Este fenotipo de ramificación se observó en todos los casos estudiados, aunque sin poder diferenciar si esos axones iban acompañados de células provenientes del primordio. Barra de escala 50μm.

Fue así como en la búsqueda de posibles relaciones entre esta compartimentalización de funciones en el primordio respecto del comportamiento del nervio, fue que nos

preguntamos si posiblemente estas interacciones podían relacionarse con la complementariedad de expresión de los receptores para SDF1a.

3.3.5 Estudiar el comportamiento del nLLP en ausencia de los receptores para SDF1a.

Los experimentos anteriores sugieren que el nervio se encuentra alterado posiblemente debido a un efecto indirecto mediado por la falta de activación de vías transductoras dependientes de *sdf1a*.

Una de las alteraciones observadas fue que los conos axonales en crecimiento sobrepasan una región del primordio que en condiciones silvestres se encuentra libre de ellos. En esta región se expresa *semaforina 3aa*, un factor restrictivo y repelente para los axones, que ha sido descrita y se ha caracterizado su efecto sobre el nLLP (Shoji et al., 1998). El dominio de expresión de *sema3aa* aparentemente coincide con la zona libre de axones en peces silvestres (Shoji et al., 1998). En peces mutantes, no se ha estudiado el dominio de expresión de esta semaforina, pero como los axones pueden invadir esta región nos preguntamos si la alteración del comportamiento del nervio se podía deber a una alteración en la expresión de dicho repelente.

Para poder estudiar esta hipótesis, realizamos una aproximación en la que se sobreactivó la vía Wnt en peces transgénicos TgBAC[neurod:EGFP]^{nl}, mediante incubación con el agonista BIO, como se reportó previamente (Valdivia et al., 2011). Previamente fue reportado que cuando la vía Wnt era sobreactivada en peces mutantes para *apc*, la expresión del receptor CXCR7b era desplazada del primordio, es decir, sólo se expresaba el receptor CXCR4b (Aman y Piotrowski, 2008). Otra manera de sobreactivar la vía Wnt y que fenocopia el fenotipo del mutante *apc*, es

realizar incubaciones con BIO, agonista de la vía. Luego del tratamiento, se realizó un marcaje de las membranas celulares con el marcador lipídico BODIPY y los peces fueron observados en el microscopio. En todos los casos observados (n=5) existía una disociación entre el primordio (demarcado con una línea punteada blanca) y el nervio (verde) Figura 38. Por lo tanto, esta sobre-activación de la vía Wnt produjo esta disociación que puede deberse a la ausencia del receptor CXCR7b.

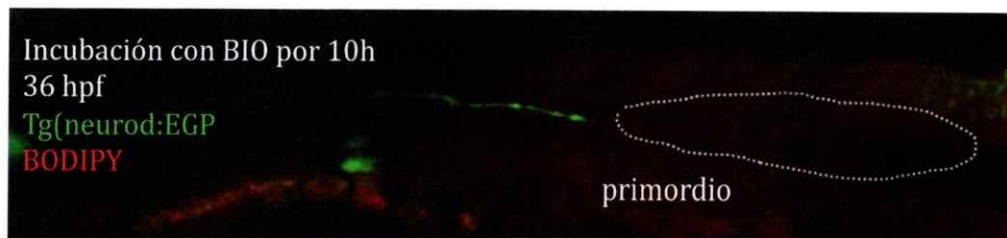


Figura 38: Sobreactivación de la vía Wnt mediante la incubación con BIO. Esta imagen es una fotografía representativa de los 5 casos observados, en la que se muestra la disociación nervio/primordio durante la migración del sistema de la línea lateral en un pez TgBAC[neurod:EGFP]^{+/+}. El primordio fue delimitado con una línea punteada blanca en base a un conjunto de planos tomados en el eje Z.

Sin embargo, en este punto no podríamos descartar que el fenotipo de disociación pueda deberse a que la sobreactivación de la vía Wnt podía estar generando un efecto sobre el nervio directamente.

Como una alternativa utilizamos una segunda aproximación visualizando el nervio en peces mutantes para *cxcr7b*. En estos peces presentan una mutación en el gen codificante para este receptor de SDF1, y ha sido caracterizado por presentar un pLLP que se detiene antes en su recorrido (Busch-Nentwich et al., 2010). Embriones mutantes fueron fijados a 30hpf y se les realizó una inmunotinción contra tubulina acetilada y tinción con DAPI. Con esta aproximación hubo dos casos observados: i) el primordio y nervio se encontraban asociados y el primordio detenido en una región previa con respecto a la condición silvestre, y ii) el primordio se encontraba detenido previamente y axones se “escapaban” del sistema, extendiéndose más allá

de las células del primordio Figura 39. En la Figura 40 muestra la misma situación que la figura anterior, pero en un estadio posterior (2dpf), lo cual confirma lo observado inicialmente: la ausencia del receptor CXCR7b, ubicado en la región trasera del primordio, produce la pérdida del empaquetamiento del nervio, ya que fueron visualizadas axones provenientes del gLLP que se dirigían en sentidos distintos, innervando o no neuromastos. Esto fue visualizado en dos oportunidades debido al bajo número de individuos.

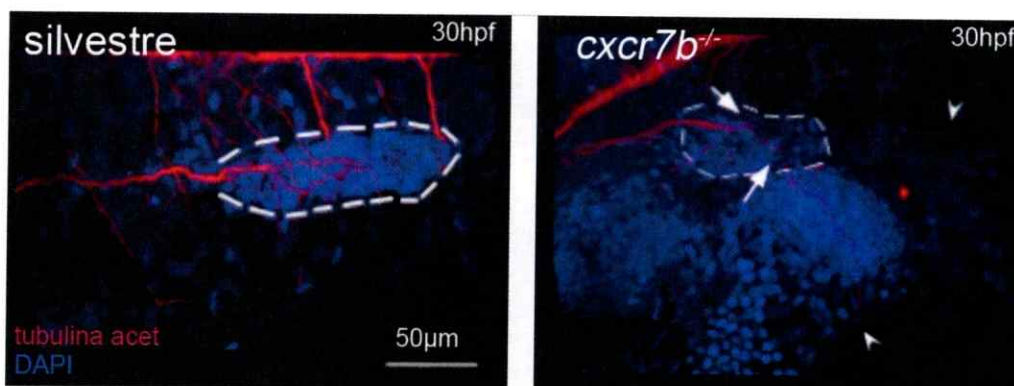


Figura 39: Nervio de la LLP en mutantes para *cxc7b*. Se observa el primordio marcado con DAPI y axones en rojo (tubulina acetilada). A la izquierda se muestra un embrión silvestre: se visualizó la región delantera de la LLP, esta región el primordio silvestre ya la había sobrepasado. Al medio se muestra uno de los casos: el primordio y nervio se encontraban en una región previa a la de condición silvestre, pero nervio y primordio se encontraban asociados. A la derecha el segundo caso: primordio se encontraba también en la región delantera del pez, pero axones fueron visualizados más allá de este primordio, dando cuenta de una parcial disociación N=5 (3 del primer fenotipo y 2 del segundo).

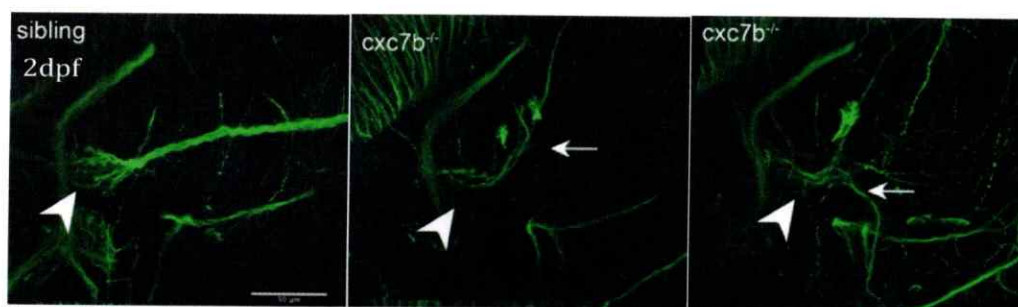


Figura 40: Nervio en mutantes para *cxc7b*. Otro ejemplo donde se muestra la ramificación observada en los peces anteriores de la Figura 39. N=4.

Estos resultados refuerzan la hipótesis que postula que SDF1a mediaría a través del receptor CXCR7b atracción entre nervio-primordio en la región trasera, lo que a su

ves estaría influyendo sobre el comportamiento empaquetado del nervio, lo que provocaría los eventos de ramificación y desfasciculación.

Observaciones en peces *odysseus*, los que presentan el otro receptor mutado, a los 3dpf, mostraron que en el nervio de estos peces también existían ramas que aparentemente no estarían innervando neuromastos (al menos sin diferenciación de células ciliadas, ya que no se visualizaron con tubulina acetilada). De 50 mutantes estudiados, 13 embriones presentaron el fenotipo representado en la Figura 41. Los demases fenotipos correspondían a la LLP detenida tempranamente en su recorrido.

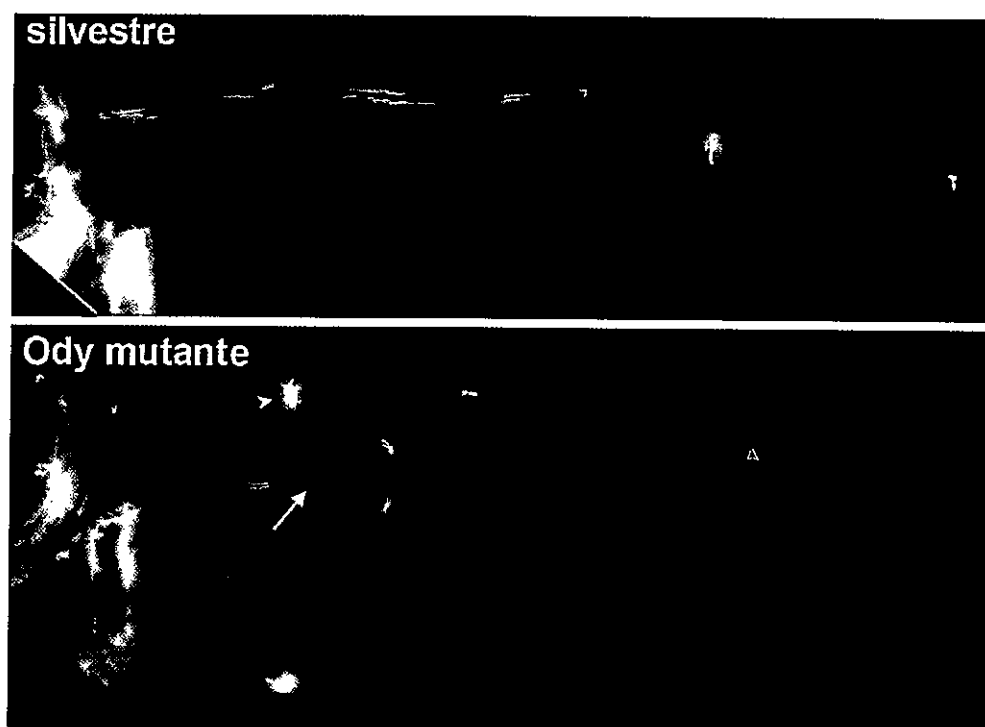


Figura 41: Nervio en mutantes *ody* (*cxcr4b*). Se muestra la ramificación observada en los peces *ody*, mutantes para *cxcr4b*, de 3dpf en 13 especímenes de un total de 50. Inmunotinción con contra tubulina acetilada muestra el nLLP, con una flecha roja se marca el punto de ramificación, y con cabezas de flechas se marcan los neuromastos (cilios de células ciliadas).

Estos últimos resultados dan luces de que en ausencia de los receptores para SDF1a existen de igual forma alteraciones del nervio, por lo que el efecto visualizado como

desfasciculación, elongación aberrante y ramificación puede deberse a un defecto del sistema de señalización CXCR/SDF1a, más que en la ausencia del ligando. Por lo que SDF1a no sería el responsable directo de éste efecto. Mayores estudios, que involucren una caracterización del nervio y el primordio en mutantes para ambos receptores con fondos transgénicos que marquen estas estructuras, debieran ser realizados para corroborar este tópico.

4.- DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó la caracterización molecular de una mutación en el gen *sdf1a* de pez cebra, que fue aislada en un rastreo de mutaciones que tuviesen fenotipo en la línea lateral. El fenotipo se debía a una mutación puntual encontrada en dicho gen, el cual codifica para un ligando que se le ha involucrado como quimioquina en la migración de diversos tipos celulares (Doitsidou et al., 2002; Mizoguchi et al., 2008; Sapède et al., 2005; Svetic et al., 2007; Tiveron et al., 2008). Una mutación nula en *sdf1a* ya había sido previamente descrita, con un fenotipo dramático en la migración del pLLP (Valentin et al., 2007).

Nosotros encontramos que existía migración en ambos mutantes, lo que contrastaba con los resultados previamente publicados. Éstos muestran una migración nula del primordio mutante, concluyendo que *sdf1a* es necesario para que se produzca la migración del PLL (Valentin et al., 2007). Este contraste además fue confirmado en experimentos de complementación génica entre ambos mutantes, por lo que se descartó que el mutante *sdf1a*^{u766} tuviera alguna variante de *splicing* que rescatara el fenotipo en mutantes *medusa*, confirmando que no había una función del transcrito pequeño de tres exones, encontrado al clonar *sdf1a*, durante la migración. Para descartar además que todo podía deberse a una diferencia en el fondo genético de las cepas en las que se encontraba la mutación, analizamos la mutación en cepas distintas para corroborar que la mutación presentaba el mismo fenotipo, así mediante cruces entre la cepa mutante y cepas transgénicas, la mutación fue transmitida a

distintas cepas de peces provenientes de diferentes laboratorios, con diferentes fondos transgénicos y en todos los casos los fenotipos eran el mismo. Esto nos hace sospechar que el grupo previo pudo haber seleccionado el fenotipo más drástico de migración, que era el del primordio detenido, y no el mayoritario que era el fenotipo de movimiento hacia la región ventral del embrión. Esta evidencia nos llevó a plantear la idea de que *SDF1a* no es indispensable para ocurra migración del pLLP como previamente ya había sido reportado, sino que confiere direccionalidad a éste proceso.

La línea lateral mutante presentaba neuromastos y estos eran capaz de incorporar la tinción vital DiAsp, lo que sugería que éstos eran funcionales. Estos neuromastos a su vez eran inervados y permanecían en el tiempo. Estos resultados indican que la formación y mantención de los neuromastos de la línea lateral son propiedades intrínsecas del primordio y que la migración colectiva y dirigida a través del miosepto, y mediada por *sdf1a*, no es un pre-requisito para la diferenciación.

La velocidad de migración de este primordio mutante era más lenta que en condición silvestre. La razón de esto se puede deber a que proyecciones polarizan en distintas direcciones generando vectores de direccionalidad que van en diferentes sentidos, lo que disminuiría el vector final de velocidad. Además fue observado que este primordio era de menor tamaño, una de las razones que explicaría esto sería que la proliferación se encontraba significativamente disminuida en peces mutantes. Ya ha sido estudiado que la zona proliferativa coincide con las células de la región delantera del primordio, estas son las que se encuentran en constante producción de células que generarán los neuromastos manteniendo el primordio con un número constante de células (Aman et al., 2011). Esta baja en la tasa proliferativa no se

debería a que en ausencia de SDF1a estaría generando defectos en la vía de señalización Wnt, ya que un estudio previo demostró que en peces morfantes para *sdf1a*, un blanco para esta vía, *axin2*, presentaba una expresión normal y por lo tanto la activación de la vía Wnt no sería regulado por *sdf1a*. Estudios en mutantes para *sdf1a* son necesarios para confirmar esta observación y obtener conclusiones certeras sobre la relación de *sdf1a* sobre la vía Wnt y la proliferación.

Luego de verificar si la polaridad del primordio se encontraba alterada mediante un marcador molecular de la región delantera *fgf10*, observamos que este marcador ya no se encuentra en la región delantera sino que uniformemente expresado en el primordio migratorio, lo que sugería que la estructura del primordio estaba alterada, y que la región delantera y trasera ya no tenían límites bien definidos, lo que producía una pérdida de la identidad y especificidad de dichas células. Posiblemente este cambio de polaridad se deba a que la ausencia de SDF1 podría estar generando una reorganización celular interna en esta estructura que se traduce en una pérdida de polaridad.

En el estudio de la formación de protrusiones en peces mutantes, comparadas con la de primordios silvestres, observamos que la posición y dirección de éstas estaba alterada. En primordios silvestres es posible observar protrusiones en las células delanteras del primordio, ubicadas más caudal con respecto al pez, y éstas se dirigen hacia rostral, paralelo al miosepto horizontal, es decir, en la dirección de migración. Pero en primordios mutantes éstas se encontraban en todo su perímetro y presentaban orientaciones distintas a la caudal, por lo que puede explicar que el primordio se dirija en otras direcciones. Esto puede deberse a que el primordio es atraído en distintas direcciones en ausencia de SDF1a en el miosepto horizontal. Luego

estudiamos este fenómeno de formación de protrusiones en mayor detalle a nivel celular observando la formación de microtúbulos. Estos, se ensamblan en la dirección de migración y en primordios mutantes los microtúbulos se ensamblan en direcciones diversas en distintas regiones del primordio, es decir, a nivel celular, moléculas son orientadas en distintas direcciones, posiblemente de manera aleatoria en la búsqueda de un quimioattractante que estabiliza dicha polimerización.

Ya que el primordio mutante tenía mayor desorganización que en condiciones silvestres y su estructura tenía una apariencia menos cohesionada, estudiamos si la adhesión celular estaba afectada en primordios migratorios de peces *sdf1a^{u766}*, mediante inmunorreactividad contra β -catenina que da cuenta de la unión célula-célula. Esta molécula se acompleja con cadherinas, moléculas encargadas de que se produzca la unión (Kemler, 1993). Los resultados mostraron que primordios mutantes presentaban menor reactividad, es decir, β -catenina se encontraba disminuido en dichos primordios, lo que da cuenta de una disminución de la adhesión celular. Esta pérdida de adhesión puede explicar que la morfología del primordio se vea alterada, perdiéndose la apariencia de estructura compacta característica.

En su conjunto estos resultados enfocados en el primordio mutante, muestran que SDF1 tendría un rol en conferir direccionalidad al sistema, ya que en mutantes si bien hay un destino preferente, ni el camino ni la dirección son la misma. Además la adhesión celular se vio disminuida, condición permisiva para que se generara una desorganización de la estructura, y se alterara su polaridad, lo que se condice también con la formación de protrusiones ectópicas. Esto último se relaciona con un

trabajo en *Xenopus*, en el que se ha demostrado que la participación de SDF1 se relaciona con la estabilización de protrusiones celulares (Theveneau et al., 2010).

Por otro lado, observaciones del nLLP utilizando peces mutantes en fondo transgénico Tg[neurod:EGFP], nos permitieron visualizar que el nervio presentaba ramificaciones y bifurcaciones en su recorrido, lo que no fue visualizado en peces con fondo transgénico Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{z106}, para estudiar ambas estructuras simultáneamente la mutación *sdf1a*^{u766} en un fondo transgénico que expresaba RFP en el primordio y GFP en el nervio. Así pudimos ver en los video realizados con microscopía de tiempo extendido, como existía un desacople parcial de nervio y primordio, en donde ramas axonales se desprendían de éste y tomaban un rumbo diferente. Por otro lado, durante el estudio del comportamiento de la línea lateral en formación en peces mutantes, el nervio presentó alteraciones, los que clasificamos como tres eventos: *desfasciculación, ramificación y extensión anómala de axones*. Los dos primeros podían estar estrechamente relacionados con alteraciones en la presencia de la glía, las que recubren el nervio durante toda su formación. Experimentos con peces morfantes para *sdf1a* confirmaron que las células gliales se encontraban presentes y no parecían tener diferencias con respecto a peces silvestres, ya que recubrían el nervio durante toda su extensión y en todas las ramas ectópicas. Estas ramas, en observaciones de peces dobles transgénicos, Tg[*sdf1a*^{u766}; *cxcr4b*:mRFP^{ump1}; *neurod*:EGFPⁿ¹¹], no siempre se desplazaban acompañadas de células del primordio, y en la mayoría de los casos, finalmente no inervaban neuromastos ectópicos. Estas evidencias nos llevaron a pensar que posiblemente en ausencia de SDF1a, axones podrían estar respondiendo de manera autónoma a una fuente de algún otro quimioattractante y de esa forma, su extensión no estaría

condicionada por el desplazamiento del primordio, como había sido previamente descrito (Gilmour et al., 2004). Es así como descartamos que estos eventos podrían deberse a defectos en las células gliales sino más bien sería consecuencia de alteraciones en el primordio.

Ya que estas ramas ectópicas se encontraban recubiertas por glías, al igual que el nLLP en condición silvestre, nos preguntamos si en peces mutantes estaría alterada la regeneración del nervio post-axotomía. Pudimos observar que el nervio era capaz de regenerar al igual que en condiciones normales, por lo que esta regeneración no dependería de SDF1a, y además las ramas ectópicas fueron capaces de regenerar al igual que el nervio principal siguiendo el mismo camino previo a la axotomía. Esto se puede deber a la presencia de las glías, las que podrían estar señalando el camino durante la regeneración.

El evento de extensión anómala del nervio, se traducía en que conos axonales invadía la región delantera, libre de éstos en condiciones silvestres, y además, axones sobrepasaban el primordio, extendiéndose varios micrones con respecto al primordio. Cabe señalar que estos tres eventos fueron dinámicos, es decir que no todos los eventos producidos se mantenían hacia el final de la migración, unos se generaban y luego se revertía su formación, pero en todos los casos, al final de la migración al menos un evento era mantenido y podía distinguirse en la LLP aberrante.

Ya ha sido reportado que conos axonales en crecimiento se ven limitados por la expresión de repelentes axonales, uno de éstos es *sema3aa*, el cual se expresa en la región delantera del primordio, y en somitos dorsales y ventrales (Shoji et al., 1998). Debido a la libertad que presentan nervios de la LLP en peces mutantes, nosotros postulamos, que esto posiblemente se deba a la ausencia de éste repelente en la

región delantera del primordio, lo que permite que axones invadan y sobrepasen esta región. Sin embargo, esta posibilidad debe ser estudiada y analizada en mayor detalle, en condiciones de pérdida de función de *sema3aa*.

En una primera instancia determinamos que: la polaridad del primordio estaba afectada; que la anomalía del nervio no se debía a alteraciones en glías, sino más bien que eran efectos mediados por el primordio; y que la extensión anómala de conos axonales con respecto al primordio podía ser debido a una ausencia de la expresión de *sema3aa*, generamos un modelo hipotético en el cual la alteración del primordio dada por la pérdida de función de SDF1a, llevaba a que se produjera una menor repulsión en la región delantera y una menor atracción en la región trasera. Esto lo relacionamos con la complementariedad de expresión de los receptores CXCR, ya que *cxcr4b* es expresado en la región delantera donde hay repulsión, y *cxcr7b* es expresado en la región trasera donde el nervio interactúa parcialmente, o hay atracción (Dambly-Chaudière et al., 2007; Valentin et al., 2007).

Estudiamos además el comportamiento del nervio en ausencia del receptor CXC7b, para comparar básicamente con los resultados obtenidos en mutantes para SDF1a, comparar el fenotipo observado y así poder avalar o rechazar la hipótesis del modelo propuesto. En estos resultados nos encontramos con que el nervio se comporta de manera anormal. Experimentos en ausencia del otro receptor, CXCR4b, mostraron resultados similares lo que avalaría en parte nuestra hipótesis.

Sobre la interacción nervio y primordio, poco es sabido, pero existe un estudio en el que se muestra que cuando esta interacción está afectada, a través de la inyección de un anticuerpo que bloquea el glicopeptido de HNK1 el cual se relaciona con la unión de axones y de éstos con el primordio (Becker et al., 2001). Éste es altamente

expresado en neuronas de la LLP, aquí el nervio pierde su empaquetamiento, desfascicula y genera ramificaciones, muy similar a nuestros resultados (David et al., 2002), lo que podría sugerir que en ausencia de SDF1 también podría encontrarse alterada esta interacción de manera parcial. Es necesario encontrar mutantes en que esta interacción esté por completo desacoplada para poder estudiar más profundamente las moléculas que comandan este proceso.

Además, observamos el comportamiento del nervio frente a una fuente exógena de SDF1a, para corroborar que éste era incapaz de responder a una fuente exógena sin la influencia de células del primordio, como fue previamente sugerido (Gilmour et al., 2004). Para esto inducimos la expresión de SDF1a en una región donde el primordio ya había pasado en su recorrido, y estudiamos si el nervio era capaz de desviarse. Con los resultados obtenidos no pudimos ni comprobar ni descartar la influencia directa de SDF1a por el nervio, y esto fue debido a la metodología utilizada: inducción de SDF1 acoplado a GFP mediante un choque térmico. Para esto inyectamos un constructo codificante para Hsp70:SDF1a::GFP, el cual contiene el promotor Hsp70, que se expresa mediante un choque térmico, el problema fue que este promotor es fácilmente inducible por otros tipos de estrés y casi siempre cuenta con una expresión basal, que interfiere con el resultado. De esa forma es difícil descartar la influencia de SDF1a sobre el nervio mediada por células del primordio, de las cuales se sabe, responden a dicho quimioattractante. Experimentos con expresión ectópica de SDF1 a través del implante de esferas embebidas con SDF1 recombinante son nuestra alternativa para dar una conclusión más robusta.

En conjunto nuestros datos nos permiten decir que SDF1a tiene un efecto sobre el primordio que si bien se relaciona con su capacidad migratoria, es responsable de su

direccionalidad y la cohesión de éste, lo cual también se relaciona con su capacidad proliferativa y la formación de protrusiones. Además SDF1a actúa indirectamente sobre el nervio mediado por el primordio, confiriéndole su aspecto empaquetado característico, posiblemente actuando a través de los receptores que se expresan complementariamente entre sí dentro del primordio. Experimentos en donde se estudie el nervio en ausencia del receptor *cxcr4b* en peces mutantes, y en ausencia de *sema3aa*, son necesarios para aprobar el modelo hipotético.

Así, este trabajo contribuye a favor de profundizar el conocimiento que se tiene a cerca del rol de SDF1 en la migración celular y formación de la línea lateral. Hasta la fecha ha sido constante el estudio de la participación de esta molécula en dicho proceso, y a su vez en distintos procesos que involucren migración celular en diferentes modelos, debido a que toda la información básica que se obtenga es clave en el estudio de situaciones más complejas como lo es el estudio del cáncer.

Un interesante y novedoso escenario sería que la polarización de los receptores de quimioquina en el primordio pudiese traducirse en una dinámica de atracción/repulsión hacia los axones del nervio de la línea lateral. SDF1a al interactuar con CXCR4b en la región delantera podría de alguna forma inducir la expresión Sema3aa, mientras que SDF1a al interactuar con CXCR7b en la región trasera, podría producir la atracción constante de nervio-primordio, ocurrido en esta región. Y que en ausencia del ligando, no se produciría ni la activación de la expresión de *sema3aa*, lo que produciría la extensión anómala de los axones y al mismo tiempo, no se produciría la atracción nervio-primordio en la región trasera, lo que podría producir una mayor laxitud del nervio, traducida en desfasciculación y ramificación. Un esquema de esta hipótesis es graficado en la Figura 42.

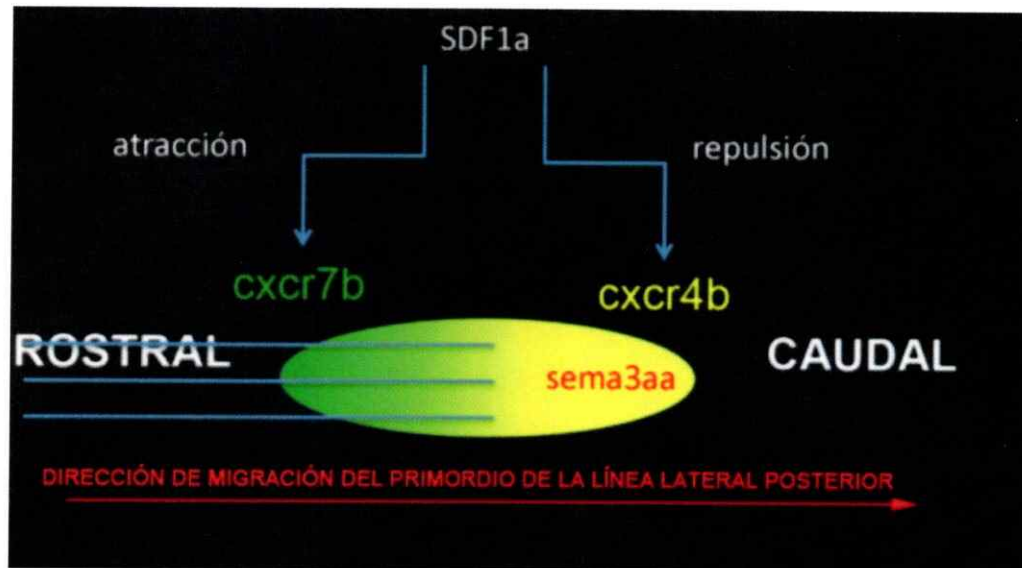


Figura 42: Esquema de posible rol de SDF1a sobre el nervio mediado indirectamente por el primordio. En a región delantera SDF1a produciría la expresión de Sema3aa mediado por el receptor CXCR4b produciendo repulsión sobre los conos axonales, mientras que en la región trasera, SDF1a produciría atracción con dichos conos axonales, mediado por el receptor CXCR7b.

5.- CONCLUSIÓN

- En este trabajo identificamos la naturaleza molecular de una nueva mutación en *sdf1a* en el pez cebra y encontramos nuevos roles de este gen en la formación de la línea lateral posterior.
- SDF1a sería dispensable para que ocurra la migración del pLLP, y tendría un rol previamente no descrito sobre la formación de dicha estructura, otorgando direccionalidad en el proceso migratorio.
- Este rol sería a través del ensamblaje de microtúbulos unidireccionalmente, y a la formación de protrusiones en un mismo sentido, con el fin de potenciar el movimiento dirigido y colectivo. Un rol específico sobre el citoesqueleto queda por identificarse.
- SDF1a contribuiría a la coherencia de la extensión axonal del nervio de la LLP y al establecimiento de una interacción polarizada entre sus conos de crecimiento y el primordio, manteniendo su extensión restringida a la región trasera de éste.
- No pudimos descartar un efecto directo de SDF1a sobre el nervio.

6.- BIBLIOGRAFÍA

- Aman, A, M Nguyen, y T Piotrowski. 2011. "Wnt/ β -catenin dependent cell proliferation underlies segmented lateral line morphogenesis." *Developmental biology* 349(2):470–82.
- Aman, A, y T Piotrowski. 2008. "Wnt/ β -catenin and Fgf signaling control collective cell migration by restricting chemokine receptor expression." *Developmental cell* 15(5):749–61.
- Aman, A, y T Piotrowski. 2011. "Cell-cell signaling interactions coordinate multiple cell behaviors that drive morphogenesis of the lateral line." *Cell adhesion & Migration* (December):1–10.
- Artemenko, Y, K Swaney, y PDevreotes. 2011. "Assessment of Development and Chemotaxis in Dictyostelium discoideum Mutants." *Methods in Molecular Biology*, vol. 769, edited by Claire M. Wells and Maddy Parsons. Totowa, NJ: Humana Press Retrieved March 20, 287–309
- Balabanian, K. "The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes." *The Journal of biological chemistry* 280(42):35760–35766.
- Becker, T, C Becker, M Schachner, and R Bernhardt. 2001. "Antibody to the HNK-1 glycoepitope affects fasciculation and axonal pathfinding in the developing posterior lateral line nerve of embryonic zebrafish." *Mechanisms of development* 109(1):37–49.
- Blaser, H, M Reichman-Fried, I Castanon, K Dumstrei, F Marlow, K Kawakami, L Solnica-Krezel, C Heisenberg, y E Raz 2006. "Migration of Zebrafish Primordial Germ Cells: A Role for Myosin Contraction and Cytoplasmic Flow." *Developmental Cell* 11:613–627.
- Bleul, C, R Fuhlbrigge, J Casanovas, A Aiuti, y T Springer. 1996. "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." *The Journal of experimental medicine* 184(3):1101–9.
- Boldajipour, B, M Doitsidou, K Tarbashevich, C Laguri, S Yu, J Ries, K Dumstrei, S Thelen, J Dörries, E-M Messerschmidt, Ms Thelen, P Schwille, M Brand, H Lortat-Jacob y E Raz "Cxcl12 evolution - subfunctionalization of a ligand through altered interaction with the chemokine receptor." *Development* 138(14):2909–2914.
- Boldajipour, B, H Mahabaleswar, E Kardash, M Reichman-Fried, H Blaser, S Minina, D Wilson, Q Xu, y E Raz. 2008. "Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration." *Cell* 132(3):463–73.
- Brösamle, C, y Marnie E Halpern. 2009. "Nogo-Nogo receptor signalling in PNS axon outgrowth and pathfinding." *Molecular and cellular neurosciences* 40(4):401–9.
- Burns, J,B Summers, Y Wang, A Melikian, R Berahovich, Z Miao, M. Penfold, M-J Sunshine, D Littman, C Kuo, K Wei, B McMaster, K Wright, M Howard, y T Schall1. 2006. "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." *The Journal of experimental medicine* 203(9):2201–13.
- Busch-Nentwich, R Kettleborough, F Fenyves, C Herd, J Collins, y D Stemple. 2010. "Sanger Institute Zebrafish Mutation Resource targeted knock-out mutants phenotype and image data submission." *ZFIN Direct Data Submission*.
- Chalasani, S, F Baribaud, C Coughlan, M Sunshine, V Lee, R Doms, D Littman y J Raper. 2003. "The chemokine stromal cell-derived factor-1 promotes the survival of embryonic retinal ganglion cells." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(11):4601–12.
- Chitnis, Ajay B, Damian Dalle Nogare, y Miho Matsuda. 2011. "Building the posterior lateral line system in zebrafish." *Developmental neurobiology*.
- Collazo, A, S Fraser, y P Mabee. 1994. "A dual embryonic origin for vertebrate mechanoreceptors." *Science (New York, N.Y.)* 264(5157):426–30.
- Dambly-Chaudière, C, D Sapède, F Soubiran, K Decorde, N Gompel, y A Ghysen . 2003. "The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates." *Biology of the Cell* 95(9):579–587.
- Dambly-Chaudière, Christine, Nicolas Cubedo, y A Ghysen. 2007. "Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1." *BMC developmental biology* 7:23.
- David, N, D Sapède, L Saint-Etienne, C Thisse, B Thisse, C Dambly-Chaudière, F Rosa, y A Ghysen. 2002. "Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor

- CXCR4 and of its ligand, SDF1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(25):16297–302.
- Doitsidou, M, J Stebler, J Dörries, M Reichman-Fried, M Köprunner, D Meyer. 2002. "Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1." *Cell* 111(5):647–59.
- Dormann, D, y C J Weijer. 2001. "Propagating chemoattractant waves coordinate periodic cell movement in Dictyostelium slugs." *Development (Cambridge, England)* 128(22):4535–43.
- Driever, W, L Solnica-Krezel, A Schier, S Neuhauss, J Malicki, D Stample, D Stainier, F Zwartkruis, S Abdelilah, Z Rangini, J Belak, y C Boggs. 1996. "A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish." *Development (Cambridge, England)* 123:37–46.
- Dufourcq, P, y S Vríz. 2006. "Mechano-sensory organ regeneration in adults: the zebrafish lateral line as a model." *Molecular and cellular neurosciences* 33(2):180–7.
- Friedl, P, y D Gilmour. 2009. "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer." *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(7):445–57.
- Gamba, L, N Cubedo, AGhysen, G Lutfalla, y C Dambly-Chaudière. 2010. "Estrogen receptor ESR1 controls cell migration by repressing chemokine receptor CXCR4 in the zebrafish posterior lateral line system." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(14):6358–63.
- Ghysen, A, y C Dambly-Chaudière. 2004. "Development of the zebrafish lateral line." *Current opinion in neurobiology* 14(1):67–73.
- Ghysen, A, y C Dambly-Chaudière. 2007. "The lateral line microcosmos." *Genes & development* 21(17):2118–30.
- Gilbert, S 2010. *Developmental Biology*. 9th ed. edited by Scott Gilbert. Sunderland, Massachusetts, Usa: Sinauer Associates, Inc.
- Gilmour, D, H Knaut, H-M Maischein, y C Nüsslein-Volhard. 2004. "Towing of sensory axons by their migrating target cells in vivo." *Nature neuroscience* 7(5):491–2.
- Gilmour, D, H-M Maischein, y C Nüsslein-Volhard. 2002. "Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system." *Neuron* 34(4):577–88.
- Gompel, N. 2001. "Pattern formation in the lateral line of zebrafish." *Mechanisms of Development* 105(1-2):69–77.
- Haas, P, y D Gilmour. 2006. "Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line." *Developmental cell* 10(5):673–80.
- Harper, C, y C Lawrence. 2010. *The Laboratory Zebrafish*. Harper, Cl.
- Heisenberg, C, M Brand, Y-J Jiang, R Warga, D Beuchle, F van Eeden, M Furutani-Seiki, M Granato, P Haffter, M Hammerschmidt, D Kane, R Kelsh, M Mullins, J Odenthal y C Nüsslein-Volhard. 1996. "Genes involved in forebrain development in the zebrafish, Danio rerio." *Development (Cambridge, England)* 123:191–203.
- Janowski, M. 2009. "Functional diversity of SDF-1 splicing variants." *Cell adhesion & migration* 3(3):243–9.
- Kemler, R. 1993. "From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion." *Trends Genet.* 9(9):317–21.
- Kimmel, C , W Ballard, S Kimmel, B Ullmann, y T Schilling. 1995. "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Developmental dynamics* 203(3):253–310.
- Knaut, H, P Blader, U Strähle, y A Schier. 2005. "Assembly of trigeminal sensory ganglia by chemokine signaling." *Neuron* 47(5):653–66.
- Knaut, H, C Werz, R Geisler, y C Nüsslein-Volhard. 2003. "A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor." *Nature* 421(6920):279–82. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12508118>).
- Lee, J-S, RRay, y C-B Chien. 2001. "Cloning and expression of three zebrafish roundabout homologs suggest roles in axon guidance and cell migration." *Developmental dynamics* 221(2):216–230.
- Li, Q, K Shirabe, C Thisse, B Thisse, H Okamoto, I Masai y J Kuwada. 2005. "Chemokine signaling guides axons within the retina in zebrafish." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(7):1711–7. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15716407>).
- Li, Q, K Shirabe, y J Kuwada. 2004. "Chemokine signaling regulates sensory cell migration in zebrafish." *Developmental biology* 269(1):123–36.
- Matsuda, M, y A Chitnis. 2010. "Atoh1a expression must be restricted by Notch signaling for effective morphogenesis of the posterior lateral line primordium in zebrafish." *Development (Cambridge, England)* 137(20):3477–87.

- Metcalf, W, C Kimmel, y E Schabtach. 1985. "Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish." *Journal of Comparative Neurology* 233(3):377-389.
- Miyasaka, N, H Knaut, y Y Yoshihara. 2007. "Cxcl12/Cxcr4 chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system." *Development (Cambridge, England)* 134(13):2459-68.
- Mizoguchi, T, S Togawa, K Kawakami, y M Itoh. 2011. "Neuron and sensory epithelial cell fate is sequentially determined by Notch signaling in zebrafish lateral line development." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(43):15522-30.
- Mizoguchi, T, H Verkade, J Heath, Atsushi Kuroiwa, and Yutaka Kikuchi. 2008. "Sdf1/Cxcr4 signaling controls the dorsal migration of endodermal cells during zebrafish gastrulation." *Development (Cambridge, England)* 135(15):2521-9.
- Moreira, C, J Regan, A Zaidman-Rémy, A Jacinto, y S Prag. 2011. "Drosophila Hemocyte Migration: An In Vivo Assay for Directional Cell Migration." Pp. 249-260 in *Methods in Molecular Biology*, edited by Claire M. Wells and Maddy Parsons. Totowa, NJ: Humana Press.
- Nüsslein-Volhard, C, y Ralf Dahm. 2002. *Zebrafish: Practical Approach*. 1st Edition. edited by C Nüsslein-Volhard and Ralf Dahm.
- Oberlin, E, A Amara, F Bachelier, C Bessia, JL Virelizier y F Arenzana-Seisdedos. 1996. "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." *Nature* 382:833-835.
- Obholzer, N, S Wolfson, J Trapani, W Mo, A Nechiporuk, E Busch-Nentwich, C Seiler, S Sidi, C Söllner R Duncan, A Boehland y T Nicolson. 2008. "Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(9):2110-8.
- O'Brien, G, S Rieger, S Martin, A Cavanaugh, C Portera-Cailliau, y A Sagasti. 2009. "Two-photon axotomy and time-lapse confocal imaging in live zebrafish embryos." *Journal of visualized experiments : JoVE* (24):4-6.
- Pichon, F, y AGhysen. 2004. "Evolution of posterior lateral line development in fish and amphibians." *Evolution & development* 6(3):187-193.
- Prasad, M, X Wang, L He, y D Montell. 2011. "Border Cell Migration: A Model System for Live Imaging and Genetic Analysis of Collective Cell Movement." Pp. 277-286 in *Methods in Molecular Biology*, edited by Claire M. Wells and Maddy Parsons. Totowa, NJ: Humana Press.
- Pujol, F, P Kitabgi, y H Boudin. 2005. "The chemokine SDF-1 differentially regulates axonal elongation and branching in hippocampal neurons." *Journal of cell science* 118(Pt 5):1071-80.
- Raz, Erez. 2004. "Guidance of primordial germ cell migration." *Current opinion in cell biology* 16(2):169-73. Retrieved March 15, 2012
- Sapède, D, N Gompel, C Dambly-Chaudière, y A Ghysen. 2002. "Cell migration in the postembryonic development of the fish lateral line." *Development (Cambridge, England)* 129(3):605-15.
- Sapède, D, M Rossel, C Dambly-Chaudière, y A Ghysen. 2005. "Role of SDF1 chemokine in the development of lateral line efferent and facial motor neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(5):1714-8.
- Schuster, K, C Dambly-Chaudière, y A Ghysen. 2010. "Glial cell line-derived neurotrophic factor defines the path of developing and regenerating axons in the lateral line system of zebrafish." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(45):19531-6.
- Shoji, W, C Yee, y J Kuwada. 1998. "Zebrafish semaphorin Z1a collapses specific growth cones and alters their pathway in vivo." *Development (Cambridge, England)* 125(7):1275-83.
- Solnica-Krezel, L, A Schier, y W Driever. 1994. "Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline." *Genetics* 136(4):1401-20.
- Stepanova, T, J Slemmer, C Hoogenraad, G Lansbergen, B Dortland, C De Zeeuw, F Grosveld, G van Cappellen, A Akhmanova, y N Galjart. 2003. "Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein)." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(7):2655-64.
- Streichan, S, G Valentin, D Gilmour, y LHufnagel. 2011. "Collective cell migration guided by dynamically maintained gradients." *Physical biology* 8(4):045004.
- Svetic, V, G Hollway, S Elworthy, T Chipperfield, C Davison, R Adams, J Eisen, P Ingham, P Currie, y R Kelsh. 2007. "Sdf1a patterns zebrafish melanophores and links the somite and melanophore pattern defects in choker mutants." *Development (Cambridge, England)* 134(5):1011-22.

- Sánchez-Sánchez, Ana Virginia et al. 2010. "Nanog regulates primordial germ cell migration through Cxcr4b." *Stem cells (Dayton, Ohio)* 28(9):1457-64.
- Tamamura, H, H Tsutsumi, H Masuno, y N Fujii. 2007. "Development of low molecular weight CXCR4 antagonists by exploratory structural tuning of cyclic tetra- and pentapeptide- scaffolds towards the treatment of HIV infection, cancer metastasis and rheumatoid arthritis." *Current Medicinal Chemistry* 14:93-102.
- Theveneau, Eric L Marchant, S Kuriyama, M Gull, B Moepps, M Parsons, y R Mayor. 2010. "Collective Chemotaxis Requires Contact-dependent Cell Polarity." *Developmental Cell* 19(1):39-53.
- Tiveron, M-C, y H Cremer. 2008. "CXCL12/CXCR4 signalling in neuronal cell migration." *Current opinion in neurobiology* 18(3):237-44.
- Valdivia, L, R Young, T. Hawkins, HStickney, F Cavodeassi, Q Schwarz, L Pullin, R Villegas, E Moro, F Argenton, M Allende, y S Wilson. 2011. "Lef1-dependent Wnt/ -catenin signalling drives the proliferative engine that maintains tissue homeostasis during lateral line development." *Development* 138(18):3931-3941.
- Valentin, G, P Haas, y D Gilmour. 2007. "The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b." *Current biology : CB* 17(12):1026-31.
- Vicente-Manzanares, M, y A Rick. 2011. "Cell Migration: An Overview." Pp. 1-24 in *Methods in Molecular Biology*, edited by Claire M. Wells and Maddy Parsons. Totowa, NJ: Humana Press.
- Whitfield, T. 2005. "Lateral Line: Precocious Phenotypes and Planar Polarity." *Current biology : CB* 15(2):R67-70.
- Wong, M-C, M Martynovsky, y J Schwarzbauer. 2011. "Analysis of Cell Migration Using *Caenorhabditis elegans* as a Model System." Pp. 233-248 in *Methods in Molecular Biology*, edited by Claire M. Wells and Maddy Parsons. Humana Press.

7.- ANEXOS

- I. Secuencia de RT-PCR para las diferentes bandas (L,M y H) de un pez silvestre y otro mutante en distintos replicados.

1.-Sibling Light1

TCGATTCTTTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATG
CTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTGCGGA
TCTCTTCTTCACTGCAAACATGGATCTCAAAGTGATCGTAGTAGTCGCTCT
GATGGCGGTTCGCCATTCATGCACCGATTTC AACGCCAAGCCCATCAGCCTG
GTAGAGAGATGCTGGTGCCGTTCCACAGTCAACACAGTCCCACAGAGAAGC
ATTCGCGAGCTCAAGTTCCTCCACACACCCAACTGCCCTTCCAAGTCATAA
TGAAAAAAGCCCAACAGCAGCAGGTCTAAGATGTCTGCCAGATGACAAGGA
AATCTGACAGCCCACCGTCACAGATATGTACCAAGGGCGAATTCCAGCACA
CTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGC
TTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCT
GTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCC
GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA
TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCA
GCTGCATTAATGAATCGGCAACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTTGCGTATTGGG
CGCTCTTCGC

2.-Sibling Light2

TCGAATTCAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGC
TCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTGCGGAT
CTCTTCTTCACTGCAAACATGGATCTCAAAGTGATCGTAGTAGTCGCTCT
GATGGCGGTTCGCCATTCATGCACCGATTTC AACGCCAAGCCCATCAGCCTG
GTAGAGAGATGCTGGTGCCGTTCCACAGTCAACACAGTCCCACAGAGAAGC
ATTCGCGAGCTCAAGTTCCTCCACACACCCAACTGCCCTTCCAAGTCATAA
TGAAAAAAGCCCAACAGCAGCAGGTCTAAGATGTCTGCCAGATGACAAGGA
AATCTGACAGCCCACCGTCACAGATATGTACCAAGGGCGAATTCCAGCACA
CTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGC
TTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCT
GTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCC
GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTACTCACAT
AATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCAGCTG
CATTATGAATCGGCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTC
GCTTC

3.- Sibling Medium4

TGAATGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCT
CGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTGCGGATC
TCTTCTTCACTGCAAACATGGATCTCAAAGTGATCGTAGTAGTCGCTCTG
ATGGCGGTTCGCCATTCATGCACCGATTTC AACGCCAAGCCCATCAGCCTGG
TAGAGAGATGCTGGTGCCGTTCCACAGTCAACACAGTCCCACAGAGAAGCA
TTCGCGAGCTCAAGTTCCTCCACACACCCAACTGCCCTTCCAAGTCATTGCC
AAACTGAAGAACAACAAGGAGGTGTGCATTAACCCAGAGACCAATGGCTT

CAGCAGTACCTGAAGAACGCCATCAACAAAATGAAAAAGCCCAACAGCAG
CAGGTCTAAGATGTCTGCCAGATGACAAGGAAATCTGACAGCCCACCGTCA
CAGATATGTACCAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGG
ATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCA
CCTAAATAGCTTGGCGTATCATGGTATAGCTGTTCTGTGTGAATTGTATCGC
TCACATTCACACACATACGAGCCGGAGCATAAGTGTAAGCTGGGGTGTATG
AGTGAGCTACTCACATAATGCGTGCGCTCACTGC

4.- Sibling Medium5

TGAATGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCT
CGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGGTACATAT
CTGTGACGGTGGGCTGTCAGATTCCTTGTCTGTCATCTGGCAGACATCTTAGACCT
GCTGCTGTTGGGCTTTTTTCATTTTGTGATGGCGTTCTTCAGGTAAGTGTGA
AGCCATTTGGTCTCTGGGTTAATGCACACCTCCTTGTGTTCTTCAGTTTGGC
AATGACTTGGGAAGGGGCGAGTTGGGTGTGTGGAGGAACTTGAGCTCGCGAAT
GCTTCTCTGTGGGACTGTGTTGACTGTGGAACGGCACCAGCATCTCTCTACC
AGGCTGATGGGCTTGGCGTTGGAAATCGGTGCATGAATGGCGACCGCCATC
AGAGCGACTACTACGATCACTTTGAGATCCATGTTTGCAGTGTGAAGAAGAG
ATCCGCACAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCG
AGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAA
ATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAATTGTTATCCGC
TCACAATTCCACACAACATACGAGCCGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGT
GCTATGAGTGAGCTACTCACATTATTGCGTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTC
GAAAC

5.- Sibling Hight3

TGATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCT
CGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTGCGGATC
TCTTCTTCACACTGCAACATGGATCTCAAAGTGATAGTAGTACGCTCTG
ATGGCGGTGCCATTCATGCACCGATTTCCAACGCCAAGCCCATCAGCCTGG
TAGAGAGATGCTGGTGCCGTTCCACAGTCAACACAGTCCCACAGAGAAGCA
TTCGCGAGCTCAAGTTCCTCCACACACCCAACTGCCCTTCCAAGTCATTGCC
AAACTGAAGAACAACAAGGAGGTGTGCATTAACCCAGAGACCAAATGGCTT
CAGCAGTACCTGAAGAACGCCATCAACAAAATGAAAAAGCCCAACAGCAG
CAGGTCTAAGATGTCTGCCAGATGACAAGGAAATCTGACAGCCCACCGTCA
CAGATATGTACCAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGG
ATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCA
CCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAATTGTT
ATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGAAGCATAAAGTGTAAGCC
TGGGGTGCCAATGAGTGAGCTACTCACATTATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCG
CT

6.- Sibling Hight4

TGATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCT
CGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTACATATCT
GTGACGGTGGGCTGTCAGATTCCTTGTCTGTCATCTGGCAGACATCTTAGACCTG
CTGCTGTTGGGCTTTTTTCATTTTGTGATGGCGTTCTTCAGGTAAGTGTGA

GCCATTTGGTCTCTGGGTTAATGCACACCTCCTTGTTGTTCTTCAGTTTGGCA
ATGACTTGGAAGGGGCAGTTGGGTGTGTGGAGGAACTTGAGCTCGCGAATG
CTTCTCTGTGGGACTGTGTTGACTGTGGAACGGCACCAGCATCTCTACCA
GGCTGATGGGCTTGGCGTTGGAAATCGGTGCATGAATGGCGACCGCCATCA
GAGCGACTACTACTATCACTTTGAGATCCATGTTTGCAGTGTGAAGAAGAGA
TCCGCACAAGGGCGAATCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGA
GCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAA
TAGCTTGGCGTATCATGGTCATAGCTGTTCTGTGTGAATTGTATCCGCTACA
TCCCCACACATACGACCGGAGCATAAGTGAAAGCTGGGTGCTATGAGTGAG
CTACTACATAATTGCGTGCGCTACTGCCGTTTCAGC

7.- Mutant Light1

GGGATACGTATACGACTCCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATG
CTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTGCGGA
TCTCTTCTTCACACTGCAAACATGGATCTCAAAGTGATCGTAGTAGTCGCTCT
GATGGCGGTGCGCATTTCATGCACCGATTTCCAACGCCAAGCCCATCAGCCTG
GTAGAGAGATGCTGGTGCCGTTCCACAGTCAACACAGTCCCACAGAGAAGC
ATTGCGGAGCTCAAGTTCCTCCACACACCCAACTGCCCTTCCAAGTCATAA
TGAAAAAAGGCCAACAGCAGCAGGTCTAAGATGTCTGCCAGATGACAAGGA
AATCTGACAGCCCACCGTCACAGATATGTACCAAGGGCGAATTCCAGCACA
CTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGC
TTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCT
GTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCC
GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA
TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCGTGA
GCTGCATTAATGAATCGGCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCGTATTGGG
CGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT

8.- Mutant Light2

TAGATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGC
TCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTGCGGAT
CTTCTTTCACACTGCAAACATGGATCTCAAAGTGATCGTAGTAGTCGCTCT
GATGGCGGTGCGCATTTCATGCACCGATTTCCAACGCCAAGCCCATCAGCCTG
GTAGAGAGATGCTGGTGCCGTTCCACAGTCAACACAGTCCCACAGAGAAGC
ATTGCGGAGCTCAAGTTCCTCCACACACCCAACTGCCCTTCCAAGTCATAA
TGAAAAAAGGCCAACAGCAGCAGGTCTAAGATGTCTGCCAGATGACAAGGA
AATCTGACAGCCCACCGTCACAGATATGTACCAAGGGCGAATTCCAGCACA
CTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGC
TTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCT
GTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCC
GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA
TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCGTGCCA
GCTGCATTAATGAATCGGCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCGTATTGG
GCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCG

9.- Mutant Medium1

TGATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCT
CGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTACATATC
TGTGACGGTGGGCTGTCAGATTTCCCTTGTTCATCTGGCAGACATCTTAGACCT
GCTGCTGTTGGGCTTTTTTCATTTTGTGATGGCGTTCTTCAGGTACTGCTGA
AGCCATTTGGTCTCTGGGTTAATGCACACCTCCTTGTGTTCTTCAGTTTGGC
ATTGGAAGGGAGAAGTGTACATTTCCATTATATCCTGTGATATGACTTGGAA
GGGGCAGTTGGGTGTGTGGAGGAACTTGAGCTCGCGAATGCTTCTCTGTGGG
ACTGTGTTGACTGTGGAACGGCACCAGCATCTCTCTACAGGCTGATGGGCTT
GGCGTTGGAAATCGGTGCATGAATGGCGACCGCCATCAGAGCGACTACTAC
GATCACTTTGAGATCATGTTGCAGTGTGAAGAAAGATCCGACAGGCGATTCC
GCCACTGCACCGTACTGTGATCGACTGGACAGCTGATCAACTGGATCATGTG
ACTAATGCTGCGATAGGATGCTGTCTGGGATGTTG

10. - Mutant Medium4

TGAATGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCT
CGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGGTACATAT
CTGTGACGGTGGGCTGTCAGATTTCCCTTGTTCATCTGGCAGACATCTTAGACCT
GCTGCTGTTGGGCTTTTTTCATTTTGTGATGGCGTTCTTCAGGTACTGCTGA
AGCCATTTGGTCTCTGGGTTAATGCACACCTCCTTGTGTTCTTCAGTTTGGC
ATTGGAAGGGAGAAGTGTACATTTCCATTATATCCTGTGATATGACTTGGAA
GGGGCAGTTGGGTGTGTGGAGGAACTTGAGCTCGCGAATGCTTCTCTGTGGG
ACTGTGTTGACTGTGGAACGGCACCAGCATCTCTCTACCAGGCTGATGGGCT
TGGCGTTGGAAATCGGTGCATGAATGGCGACCGCCATCAGAGCGACTACTA
CGATCACTTTGAGATCCATGTTTGCAGTGTGAAGAAGAGATCCGCAAAGGGC
GAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAG
CTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAAT
CATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACA
ACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTG

11. - Mutant Medium5

TGAATGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCT
CGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTGCGGATC
TCTTCTTCACACTGCAAACATGGATCTCAAAGTGATCGTAGTAGTCGCTCTG
ATGGCGGTGCGCATTTCATGCACCGATTTCCAACGCCAAGCCCATCAGCCTGG
TAGAGAGATGCTGGTGCCGTTCCACAGTCAACACAGTCCCACAGAGAAGCA
TTCGCGAGCTCAAGTTCCTCCACACACCCAACTGCCCTTCCAAGTCATAAC
AACAAGGAGGTGTGCATTAACCCAGAGACCAAATGGCTTCAGCAGTACCTG
AAGAACGCCATCAACAAAATGAAAAAAGCCCAACAGCAGCAGGTCTAAGAT
GTCTGCCAGATGACAAGGAAATCTGACAGCCCACCGTCACAGATATGTACC
AAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGT
ACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTG
GCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAATTGTTATCCGCTCACATTT
CACACAACATACGAGCCGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAG
TGAGCTACTCACATTATTGCGTG

12. - Mutant Medium6

TGAATGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCT
CGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTGCGGATC
TCTTCTTCACACTGCAAACATGGATCTCAAAGTGATCGTAGTAGTCGCTCTG
ATGGCGGTGCGCCATTCATGCACCGATTTCCAACGCCAAGCCCATCAGCCTGG
TAGAGAGATGCTGGTGCCGTTCCACAGTCAACACAGTCCCACAGAGAAGCA
TTCGCGAGCTCAAGTTCCTCCACACACCCAACTGCCCTTCCAAGTCATAAC
AACAAGGAGGTGTGCATTAACCCAGAGACCAAATGGCTTCAGCAGTACCTG
AAGAACGCCATCAACAAAATGAAAAAGCCCAACAGCAGCAGGTCTAAGAT
GTCTGCCAGATGACAAGGAAATCTGACAGCCCACCGTCACAGATATGTACC
AAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGT
ACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTG
GCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAT
TCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAA
TGAGTGAGCTACTCACATTATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGG
AACCTGTCGTGCCAGCTG

13. - Mutant Medium8

TGGATTGAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCT
CGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTGCGGATC
TCTTCTTCACACTGCAAACATGGATCTCAAAGTGATCGTAGTAGTCGCTCTG
ATGGCGGTGCGCCATTCATGCACCGATTTCCAACGCCAAGCCCATCAGCCTGG
TAGAGAGATGCTGGTGCCGTTCCACAGTCAACACAGTCCCACAGAGAAGCA
TTCGCGAGCTCAAGTTCCTCCACACACCCAACTGCCCTTCCAAGTCATAAT
GAAAAAGCCCAACAGCAGCAGGTCTAAGATGTCTGCCAGATGACAAGGAA
ATCTGACAGCCAACCGTCACAGATATGTACCAAGGGCGAATTCCAGCACACT
GGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTT
GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG
TTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCG
GAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACAT
TAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCGTGCAGC
TGCATAATGAATCGGCCACGCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTC
TCCGCTTC

II. Secuencia del gen en el genoma (L13): Primero se muestra en verde la secuencia 5' (upstream). En mayúscula se observan los exones, en azul y minúscula los intrones. Las secuencias codificantes de cada exón son: rojo (1), amarillo (2), verde claro (3), rosado (4).

.....tagagggtttggaccggagccttgcgaatttaactcggaggcagtttgctgtctcacagttgctcctggattctacacagtgccggatctctttcacactgcacaaacat**TTGGA**
TTCTCAAAGTATCGTAGTTCGGCTCTGATGGCGGGTGGCCATTCAITGACCCGATTTCCAACCGgtaagtttaattgcaaatgtt.....tgagtticttaattctctccag**CCAAGCCCC**
ATCAGCCTGGTAGAGAGATGGTGGTGGCGTTCCAGAGTCCACAGAGTCCCAAGAGATTCGGGAGCTCAAGTTCCTCCACAGAGCCCAAGCTGGCCCT
TTCCAAAGTCAIfgagtafctgcacttctctctcg.....ggaaatgtaactctccctccag**TGCCAAACTGAAGAACAACAAGGAGGTGTGCA**TTAACCCAGAGACCAAATGGCTTCA
GCAGTACCTGAAGAAGCCCAITCAACAAgtaagaanaaaatctgaaana.....aacatttccattcttctctcag**AATGAAAAAAGCCCCACAGCAGGCTCTAA**GATGTCTGCCA
GATGACAAGGAAATCTGACAGCCCCCGTCCACAGATATGTACCAATATAGTCTCTGGCATGTGTCAGCCACAGCATTAACCTGCCAAATATGCCGTCCCAGTAA
ATGAAAAGACCCACAGACCACCCATGCCACCCATGTAGTCTCTGTTAGGCCCAAGTCAATATAATATGTATGACTGTGTTGTTTTTATTTTTACGTATGAT
ATGTATACAAATGTTTTTATATCGTCTCAAAAATCAGTAAAGATATTTTTGGAGTCTGTTCCTGGTGTATCTTGGGTAGGCAGAAAAAC
ATTGGGACAAGAGAGGTGTTGGAGCAACCTGAAATATGCACCTTAAAAATAAAGGTGCTTATCAGCATTGACGGTCTACGAAGATACATA
GAACATTTTCATCCCAATGTTTGTTCCTATTAAACATGCTTAAAGACAATGGGACCAAATAATTAGGGACCAAACAAGAGAAGTCAATCCCTTCCGATTT
CCATGGCACCTTTATTTTTAGGAGTGTACTCTAATTTAGAAAGGATATATGAAGTCTGAAAACCTATAATGACTGCAAGTCTTGGACAAAAAAGAGGCATT
GATTTATCTTTCATATGTAATTTACTAGTTCATAATTTAGATAATTTGTAACAGCATGTTAAAGTTATACAACATATAGAGAACAACAAAAAATAAGAGATCAC
TTGTTTTTGTGTTTTGGAAAGGCAGGGTTACTTTGCCAAACAACATGAACCTATTTAGACCTCACATAACCCCTAATGTATTTCCGAATGATTTGGGAATGCA
ATTGGCTCACCTGAAGGTGATGAGATTTTGCATGCTTTGTAGGCATTAATCACTGTGTTTTGTAATGACCGATCAGAGCGTGTAAAGAACTCAGCG
TCACAACACACTGTTCTCACGCTCAGCAGAATCAGGTCAATAACAGAGACTGTCAGCCCTCAAAGAACTCAAATTAACAAGAAAAAAGAAACAAGTCCGAAT
ATAGAGAACTCTGAACGAGCGGAATTAATTTACTCAATCATGAAAACCTGAATCTAAGCATTTAGGTATGATAACCTTTAAAAAATCAAGTtagataaacatccaaggttagattttgacac
aaacta.....

4 EXONES (secuencias codificantes), secuencias agrupadas:

SIBLINGS MEDIUM 4:

ATGGATCTCAAAGTGATCGTAGTAGTCGCTCTGATGGCGGTGGCCATTTCATGCAACCGATTTCCAACGGCAAGCCCATCAGCCCTGGTAGAGAGATGCTGGTGGCCGT
TCCAGAGTCAACACAGTCCACAGAGAGAGCATTCGGGAGCTCAAGTCTCCACACAGCCAACTGGCCCTTCCAAAGTCAATGCCAAACTGAAGAACAACAAGGA
GGTGTGCATTAACCCAGAGACCAAATGGCTTCAGCAGTACCTGAAGAACGCCCATCAACAATAATGAAAAAAGCCCCAACAGCAGCAGGTCTAA

MUTANTE MEDIUM 4:

ATGGATCTCAAAGTGATCGTAGTAGTCGCTCTGATGGCGGTGGCCATTTCATGCAACCGATTTCCAACGGCAAGCCCATCAGCCCTGGTAGAGAGATGCTGGTGGCCGT
TCCAGAGTCAACACAGTCCACAGAGAGAGCATTCGGGAGCTCAAGTCTCCACACAGCCAACTGGCCCTTCCAAAGTCAATGCCAAACTGAAGAACAACAAGGA
CCAAACTGAAGAACAACAAGGAGGTGTGCAATTAACCCAGAGACCAAATGGCTTCAGCAGTACCTGAAGAAGCCCATCAACAATAATGAAAAAAGCCCCAACAGCA
GCAGGTCTAAGATGTCTGCCAGATGACAAGGAAATCTGACAGCCACCGTCACAGATATGTACCAAGGGGAATTTGCAGATATCCATCACACGGCGGCCGT
CGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAAATTCGGCCCTATAGTGAGTCTGATTACATTA

III. Secuencia de proteínas predichas para las secuencias obtenidas de las diferentes bandas (L, M y H) de un pez silvestre y otro mutante.

SILVESTRE

Medium: **M**DLKVIVVVAL**M**AVAIHAPI**S**NAK**P**ISLVER**C**WRSTVNTVPQRSIREL**K**FLHT**P**NC**P**FQVI**A**KL**K**NN**K**EV**C**IN**P**ET**K**W**L**Q**Q**Y**L**K**N**A**I**N**K****M**K**A**Q**Q**Q**Q**V**S**t**o**p

Light : **M**DLKVIVVVAL**M**AVAIHAPI**S**NAK**P**ISLVER**C**WRSTVNTVPQRSIREL**K**FLHT**P**NC**P**FQVI**M**K**A**Q**Q**Q**Q**V**S**t**o**p

MUTANTES D17

Medium : **M**DLKVIVVVAL**M**AVAIHAPI**S**NAK**P**ISLVER**C**WRSTVNTVPQRSIREL**K**FLHT**P**NC**P**FQVI**T**TRRCAL**T**Q**R**P**N**G**F**S**S**T**S**t**o**p

Light : **M**DLKVIVVVAL**M**AVAIHAPI**S**NAK**P**ISLVER**C**WRSTVNTVPQRSIREL**K**FLHT**P**NC**P**FQVI**M**K**A**Q**Q**Q**Q**V**S**t**o**p

SECUENCIA AMINOACÍDICA PROVENIENTE DE LA BANDA DE TAMAÑO MEDIO → EN SILVESTRE, SECUENCIA DE PROTEÍNA CODIFICADA POR LA VARIANTE DE SPLICING 1

SECUENCIA AMINOACÍDICA PROVENIENTE DE LA BANDA DE MENOR TAMAÑO → SECUENCIA DE PROTEÍNA CODIFICADA POR LA VARIANTE DE SPLICING 2

C CISTEINAS FUNDAMENTALES EN LA FORMACIÓN DE PUENTES DISULFUROS, NECESARIOS PARA LA FORMACIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA PROTEINA

AMINOÁCIDOS DE LA PORCIÓN TERMINAL POSTERIOR A LA CODIFICADA POR LOS EXONES 1 Y 2

AMINOÁCIDOS CODIFICADO POR EL EXÓN 4

- IV. Leyenda video 1. Migración de un primordio silvestre. Se observa un *timelapse* de un pez silvestre Tg[-8.0cldnb:lynEGFP]^{z/106} realizado mediante microscopía de fluorescencia bajo un objetivo 10x, donde se visualizan 24 tiempos con una hora entre cada uno. El video es un conjunto de planos en el eje Z agrupados. El primordio de la línea lateral posterior se desplaza de rostral a caudal a través del miosepto horizontal, depositando neuromastos a intervalos regulares.
- V. Leyenda video 2. Migración de un primordio mutante. Se observa un *timelapse* de un pez silvestre Tg[sdf1a^{u766}; -8.0cldnb:lynEGFP]^{z/106} realizado mediante microscopía de fluorescencia bajo un objetivo 10x, donde se visualizan 24 tiempos con una hora entre cada uno. El video es un conjunto de planos en el eje Z agrupados. El primordio de la línea lateral posterior se desplaza por una ruta aberrante, a través de la región ventral del pez. Fenotipo mayoritario.
- VI. Leyenda video 3. Migración de un primordio mutante. Se observa un *timelapse* de un pez mutante Tg[sdf1a^{u766}; -8.0cldnb:lynEGFP]^{z/106} realizado mediante microscopía de fluorescencia bajo un objetivo 10x, donde se visualizan 24 tiempos con una hora entre cada uno. El video es un conjunto de planos en el eje Z agrupados. El primordio de la línea lateral posterior se desplaza por una ruta aberrante, a través del vitelo del pez. Nótese cómo el primordio del otro lado del pez sigue una ruta distinta.
- VII. Leyenda video 4. Detalle de un primordio mutante con fenotipo de defasciculación y ramificación. Se observa un *timelapse* de un pez mutante Tg[sdf1a^{u766}; cxcr4b:mRFP^{ump1}; neurod:EGFPⁿ¹¹] realizado mediante microscopía de fluorescencia bajo un objetivo 20x, donde se visualizan 43 tiempos con media hora entre cada uno. El video es un conjunto de planos en el eje Z agrupados. Se observa que a partir de la rama principal del nLLP se extienden ramas laterales las cuales son dinámicas en su formación y posición. Así también se ve al nervio más defasculado en comparación a condiciones controles en las que el nervio se encuentra empaquetado en su totalidad.