

UCH-FC
Biotecnología
S 578
C.I.

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**“MEDAKA (*Oryzias latipes*) COMO MODELO DE
ASIMETRÍA CEREBRAL”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

ISKRA AILEN SIGNORE AHUMADA



Director Seminario de Título
DR. MIGUEL CONCHA NORDEMANN

Santiago de Chile, Septiembre 2007



“MEDAKA (*Oryzias latipes*) COMO MODELO DE ASIMETRÍA CEREBRAL”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

ISKRA AILEN SIGNORE AHUMADA

DR. MIGUEL CONCHA NORDEMANN
Director Seminario de Título

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Comisión de Evaluación Seminario de Título

DR. MIGUEL ALLENDE CONNELLY
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, written in a cursive style.

DR. ALVARO GLAVIC MAURER
Corrector

A handwritten signature in blue ink, appearing as a stylized 'G' followed by 'lavic'.

Santiago de Chile, 6 Septiembre de 2007







A mi Madre que es mi Fuerza y mi Historia

A mi dos Tierras unidas en mi en una pangea primigenia

A mi Padre y sus noche blancas

A mi Maestro y lo que un día será y seremos

Al Mundo grande y a los ojos anchos que tengo para él

A esta Niña triste y a la poesía que me regala

A mi Desear para que siempre arda

A mi en fin, a la Ailen que quiero ser

AGRADECIMIENTOS

Agradecer es siempre complicado y no quisiera hacer de esta página algo institucional... pero quizás "*sería bueno*" iniciar con las Instituciones...el Estado, La Universidad de Chile, La Facultad de Ciencias, el Laboratorio del Dr. Miguel Concha, Mi Familia....en riguroso orden general-particular.

Todas Instituciones que financian la Ciencia en Chile y que financian la Ciencia en mi vida...cosa no menor en esta era gris del Banco Mundial.

A mis compañeros de laboratorio, a todos: Aldo, Ale, Eugenia, Johnny, Karina, Lorena, Loreto, Luis, Luisa, Pablo, Paulina, Ricardo, Sole, Ximena, Yerko, Yoya, y en las noches de los tiempos Daniela, Judith y Pato...

A Néstor, mi Socio ahora y siempre; Alicia, por nuestros dinosaurios comunes; Germán, por restablecer a diario mi confianza en el género humano; Steffen, que llegó cual ángel a salvarme del abismo; Dina, por existir así exactamente como es; Jorge, por recordarme que los estereotipos están para destruirlos...

A mi hermano Claudio, por nuestra vida entera juntos y por la mayor sorpresa de esta época de mi vida: Giorgia porque a pesar de que no la esperaba, todo esto también es para ella...

A mi tío Gualo y a mi segunda mamá Paz.



A mis Amigos, muchos de los cuales no leerán jamás estas páginas y/o si las leyeron no las entenderían por idioma y por argumento....Tengo que decirles que ustedes me llevaron hasta aquí...y por alguna extraña razón que no entiendo son tantos que si los nombrara todos necesitaría otra tesis... lo bueno es que habrán efectivamente más...así que en esas los nombro a todos...

Por el momento gracias a los que más me han insultado en el camino hasta esta página: Silvia, Gaby, Juanu, Juan, Babe, Lucho, Simón, Leonardo, Leonora, Pedro, Carlos, Mauro, Allu, Anna, Marco, Luca, Dome, Valeria.....

Se que estarán contentos, por lo menos como yo....y algunos definitivamente más....Por ustedes es que mi vida al final es la de un niña con muchas esperanzas.....no se cansen, que yo no lo haré nunca y ustedes lo saben....

A mi Jefe, el Dr. Concha... Miguel... si pudiera agradecerte con cuatro palabras en esta hoja lo haría y diría que estas setenta páginas inauguran las muchas que vendrán.....pero palabras no hay, ni esas cuatro ni un millón de otras, así que confío en que ya sabes todo y más....

Bueno, aquí vamos...

A.





INDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Asimetría izquierda-derecha en vertebrados	2
1.2. Desarrollo de la asimetría izquierda-derecha	4
1.3. Asimetrías en el sistema nervioso: el epitálamo de pez cebra.	9
1.4. El modelo de Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	13
2. HIPOTESIS	14
3. OBJETIVO GENERAL	14
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. Materiales	16
5.2. Métodos	23
6. RESULTADOS	37
6.1. Asimetría molecular	37
6.2. Asimetría morfológica	38
6.3. Asimetrías de conectividad en el NIP	45
6.4. Clonamiento de genes de la familia KCTD de Medaka	48
7. DISCUSIÓN	51
8. CONCLUSIÓN	57
9. BIBLIOGRAFÍA	58
10. MATERIAL OPTATIVO	63

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1	
Tiempos de incubación con Proteinasa K (10µg/mL) según estadio.	31

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.2.1 Etapas en el establecimiento de la asimetría izquierda-derecha durante el desarrollo	4
Figura 1.2.2. La activación asimétrica de Nodal en la PLM es común a todos los modelos.	5
Figura 1.3.1 Asimetrías neuroanatómicas en cerebro de pez cebra.	10
Figura 1.3.2 Expresión de los genes KCTD en larva de pez cebra.	11
Figura 6.1.1. Análisis por Hibridación <i>in situ</i> de la expresión de Pitx2 en diencéfalo de Medaka.	38
Figura 6.2.1.1 Inmunofluorescencia indirecta en epitélamo de Medaka.	39
Figura 6.2.1.2 Análisis <i>in vivo</i> de larvas DE-GFP en estadio 39	40
Figura 6.2.1.3. Tinción de Nissl fluorescente en larvas DE-GFP st 39	42
Figura 6.2.1.4. Tinción de Nissl fluorescente en larvas de Medaka st39	43
Figura 6.2.2.1 Análisis <i>in vivo</i> en embriones de Medaka, cepa fRx2-GFP	44
Figura 6.2.2.2 El órgano parapineal proyecta exclusivamente a la habénula izquierda.	45
Figura 6.3.1 Esquema de los estudios de conectividad eferente en larvas de Medaka en st 39	46
Figura 6.3.2. Los eferentes habenulares izquierdos y derechos están segregados en el NIP.	47
Figura 6.4.1 Árbol sobre secuencias proteicas de los genes KCTD.	50
Figura 1MO Mapa del vector comercial pCRII (Invitrogen)	63
Figura 2MO Inmunofluorescencia indirecta anti tubulina- α acetilada/ anti GFP	64
Figura 3MO Secuencias nucleotídicas de los genes KCTD de Medaka.	65
Figura 4MO Árbol construido con secuencias nucleotídicas de los genes KCTD	66

ABREVIATURAS

I/D:	izquierda-derecha
TGFB:	factor de crecimiento transformante beta
PML:	placa del mesodermo lateral
NIP:	núcleo interpeduncular
KCTD:	dominio de tetramerización de canal de potasio
GFP:	proteína fluorescente verde
DNA:	ácido desoxirribonucleico
cDNA:	ácido desoxirribonucleico codificante
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero.
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PFA:	paraformaldehído
PBS:	solución tampón fosfato
TCA:	ácido tricloroacético
MEOH:	metanol
ST :	estadío

RESUMEN

Por asimetría cerebral entendemos una diferencia morfológica entre las mitades izquierda y derecha del sistema nervioso central (SNC). En los últimos años, el pez teleósteo cebra (*Danio rerio*) se ha establecido como un modelo muy ventajoso para el estudio del desarrollo de las asimetrías izquierda-derecha del SNC, las cuales son particularmente notorias en la región del epítalamo.

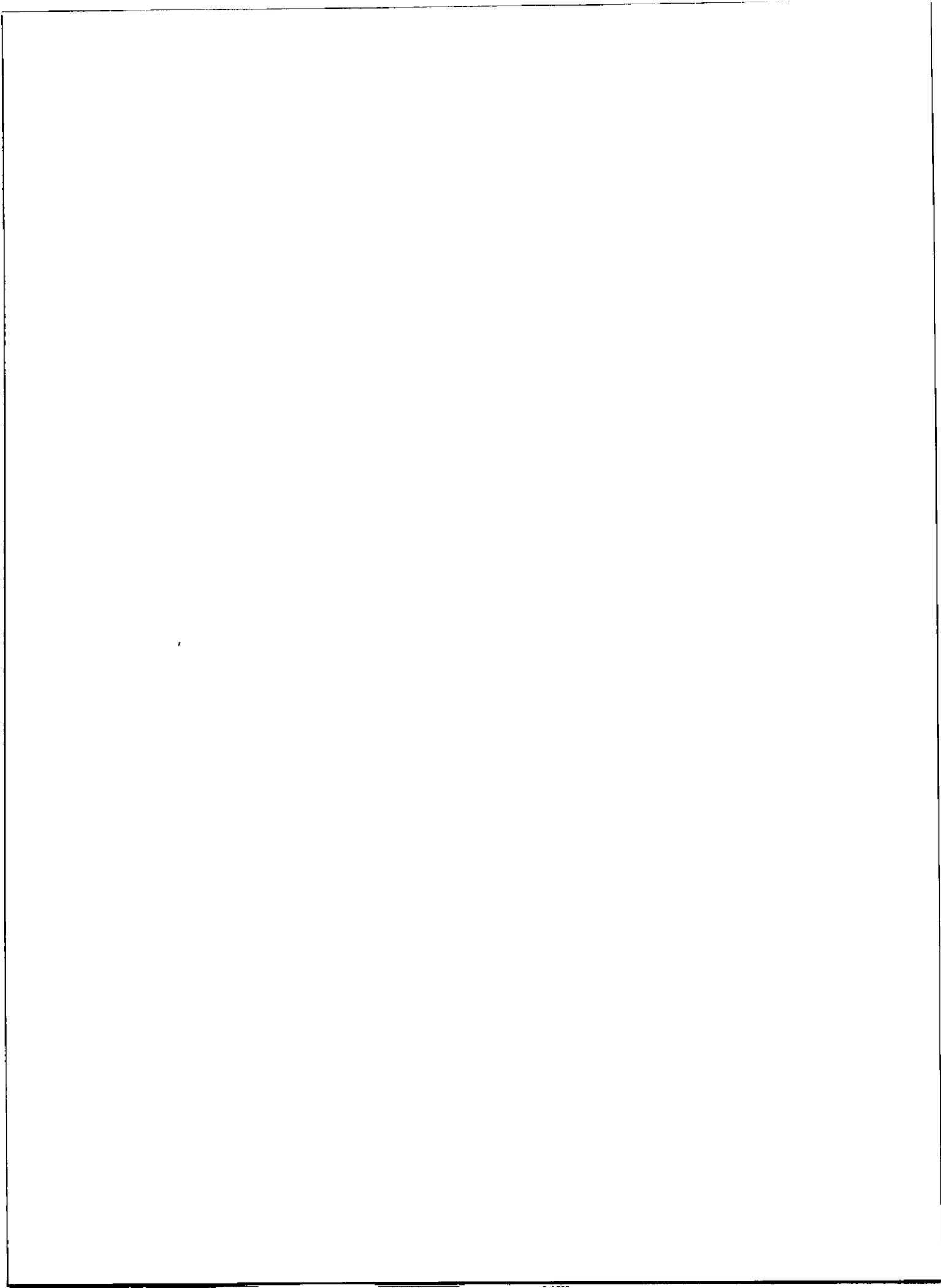
Las asimetrías del epítalamo en pez cebra se caracterizan inicialmente por la asimetría asimétrica de genes de la vía de señalización Nodal, y son seguidos de la migración asimétrica del órgano parapineal hacia la izquierda de la línea media, y por el desarrollo de diferencias en el contenido de neuropila y en el patrón de expresión de marcadores moleculares entre los núcleos habenuares derecho e izquierdo. Asimismo, el órgano parapineal proyecta en forma exclusiva a la habénula izquierda, y las eferencias habenuares izquierda/derecha experimentan una segregación dorso/ventral en el núcleo interpeduncular, respectivamente.

Medaka (*Oryzias latipes*), al igual que pez cebra, es un teleósteo y ha sido propuesto recientemente como modelo complementario a pez cebra debido a la historia evolutiva de estos dos euteleósteos, cuyos linajes divergieron hace cerca de doscientos millones de años. En este marco, propusimos investigar si Medaka sería además un buen modelo para el estudios de las asimetrías cerebrales.

En esta tesis, corroboramos por hibridación *in situ* la existencia de expresión asimétrica de *pitx2c* en la región del epítalamo de Medaka previo al desarrollo de las asimetrías morfológicas. Asimismo, verificamos la existencia de asimetrías morfológicas izquierda-derecha en el epítalamo mediante estudios de

inmunofluorescencia indirecta, tinción con trazadores lipofílicos, y análisis por microscopia confocal de Medaka transgénicos que expresan GFP en la habénula y en el complejo pineal. Finalmente, y con el fin de determinar en el futuro si la organización sub-nuclear de la habénula de Medaka es equivalente a la de pez cebra, se clonaron dos genes de Medaka pertenecientes a la familia KCTD, que en pez cebra muestran una expresión asimétrica diferencial en los sub-núcleos medial y lateral de la habénula.

Nuestros resultados muestran que el epitélamo de Medaka presenta asimetrías izquierda-derecha en términos de expresión génica, morfología y conectividad cuyo patrón general es sumamente conservado con respecto a pez cebra: expresión asimétrica de la vía Nodal, migración asimétrica del órgano parapineal, desarrollo de asimetrías habenulares y segregación de los eferentes habenulares en el núcleo interpeduncular. Medaka es por lo tanto un modelo posible de usar, junto a pez cebra, para estudiar los mecanismos genéticos y del desarrollo conservados y divergentes implicados en el establecimiento de las asimetrías cerebrales.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Asimetría izquierda-derecha en vertebrados

Por asimetría izquierda-derecha entendemos la diferencia morfológica entre los dos lados del cuerpo. En estructuras pares podemos tener diferencias de volumen y/o de organización entre izquierda y derecha mientras que las estructuras impares asimétricas se localizan a un solo lado de la línea media. Los vertebrados presentan marcadas asimetrías izquierda-derecha (I/D) a pesar de su aspecto exterior bilateralmente simétrico.

Las asimetrías I/D se clasifican en tres tipos: asimetría fluctuante, antisimetría y asimetría direccional (Boorman & Shimeld 2002; Palmer 2004). El primer tipo se refiere a una asimetría no heredable en el cual el desarrollo de la asimetría misma se correlaciona con factores ambientales o conductuales que determinan diferencias en el desarrollo de una parte con respecto de la otra; en ausencia de estos factores es posible que la asimetría no se desarrolle (Govind, 1992; Palmer, 2004). En la antisimetría existe un rasgo asimétrico conservado y heredable cuya lateralidad es randomizada, es decir que en una población el rasgo asimétrico se encuentra hacia el lado izquierdo o hacia el derecho con igual frecuencia. Por último, en la asimetría direccional no sólo es heredable la asimetría izquierda y derecha sino que además la lateralidad del rasgo es conservada en una población, determinando que uno de los dos fenotipos (izquierdo o derecho) sea mucho más frecuente que el otro (Palmer, 2004; Boorman & Shimeld, 2002). Esta tesis se enmarca en el contexto de este último tipo de asimetría.

Los rasgos asimétricos direccionales I/D más estudiados se observan en el corazón, vísceras y en el cerebro (Shier, 2003; Bisgrove y col, 2003; Hamada y col, 2002; Mercola & Levin, 2001; Capdevila y col, 2000; Burdine & Schier, 2000; Schier & Shen, 2000). En el cerebro humano un ejemplo clásico de asimetría I/D es la presencia de las áreas de Broca y Wernicke presentes exclusivamente en el hemisferio izquierdo y que están involucradas en las funciones del habla y de la comprensión de lenguaje (Sun & Walsh, 2006). Se ha propuesto que una morfología asimétrica y/o la lateralización de ciertas funciones sería ventajosa desde el punto de vista evolutivo porque permitiría mejorar la eficiencia en el procesamiento, evitando interferencias funcionales entre los hemisferios cerebrales (Sun & Walsh, 2006; Concha, 2004; Vallortigara y col, 1999; Bisazza y col, 1998; Kennedy y col, 1999; Strauss y col 1983; Carlson & Glick, 1989).

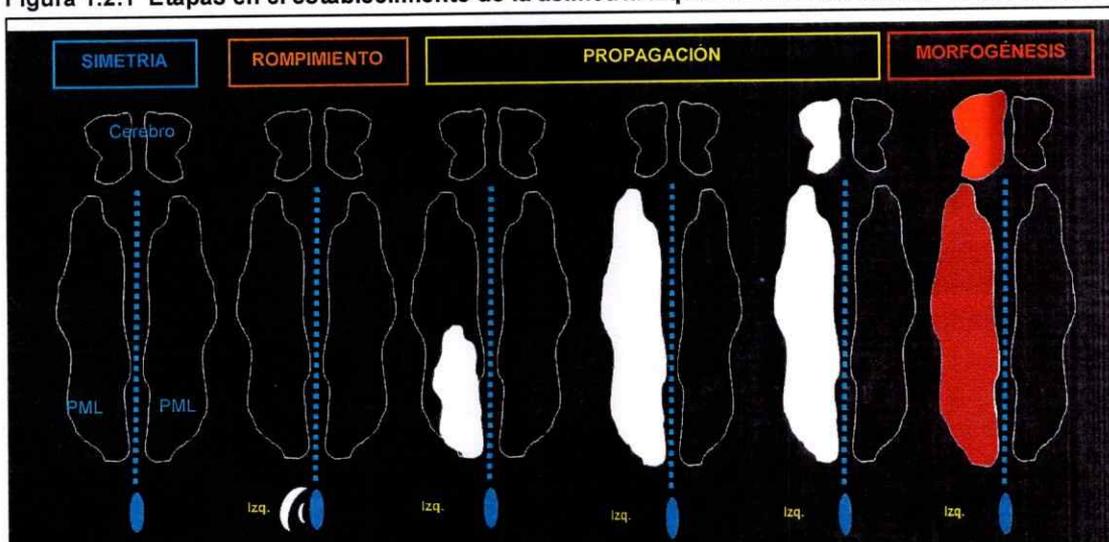
Se han descrito perturbaciones de origen genético en el establecimiento del eje I/D que llevan a fenotipos que difieren de la disposición normal de los órganos (*situs solitus*). Es posible que esta disposición se invierta completamente, llevando al fenotipo denominado *situs inversus*, que es viable y funcional aunque poco común. También es posible que se pierda la asimetría propiamente tal, produciendo un fenotipo idéntico a ambos lados de la línea media (imagen especular). Esta situación no es viable y se denomina isomerismo, y puede ser izquierdo o derecho de acuerdo al fenotipo duplicado en el lado contralateral. Finalmente, se describe la heterotaxia como una condición de *situs* de tipo ambigua en la cual órganos únicos ven afectada su disposición en el eje I/D, y su efecto sobre la viabilidad del organismo depende fundamentalmente del órgano afectado (Ryan y col, 1998).

Es importante, por lo tanto, que el eje I/D sea correctamente posicionado para el buen desarrollo del individuo. En los últimos años hemos aprendido que la diversificación entre el lado izquierdo y derecho del cuerpo de los vertebrados depende de mecanismos genéticos que operan durante el desarrollo embrionario (Palmer, 2004).

1.2. Desarrollo de la asimetría izquierda-derecha.

Del punto de vista teórico, se ha dividido el establecimiento de la asimetría I/D en tres etapas: rompimiento de la simetría y generación de la señal asimétrica, propagación de la señal asimétrica y morfogénesis asimétrica (ver Figura 1.2.1).

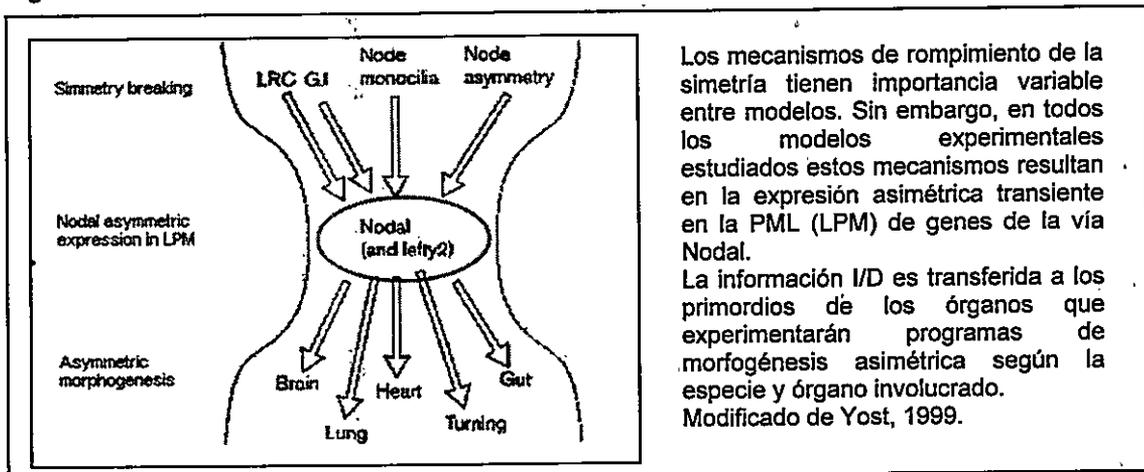
Figura 1.2.1 Etapas en el establecimiento de la asimetría izquierda-derecha durante el desarrollo.



Esquema ilustrativo de las etapas de establecimiento de la asimetría durante el desarrollo embrionario. El embrión es inicialmente simétrico (en azul se muestra la línea media embrionaria), luego la simetría se rompe y se forma una señal asimétrica local en el embrión. Esta señal local es transferida a la placa del mesodermo lateral (PML) en la cual es amplificada y propagada a lo largo del embrión hasta llegar al cerebro. En respuesta a esta señal asimétrica, el lado izquierdo experimenta una morfogénesis distinta al lado derecho.

La importancia relativa de los diferentes mecanismos propuestos para el rompimiento de la simetría así como los mecanismos de morfogénesis asimétrica son variables entre modelos experimentales, pero todos los modelos estudiados muestran una etapa común: la expresión asimétrica transiente de genes de la superfamilia TGF β como *nodal* y *lefty* en la placa del mesodermo lateral (PML) (Figura 1.2.2). La vía de señalización controlada por Nodal ha sido involucrada en el control genético de las asimetrías de vísceras y corazón (Tian & Meng, 2006; Schier, 2003; Bisgrove y col, 2003; Hamada y col, 2002; Mercola & Levin, 2001; Capdevila, 2000; Burdine & Schier, 2000; Schier & Shen, 1999; Yost, 1999).

Figura 1.2.2. La activación asimétrica de Nodal en la PLM es común a todos los modelos.



La activación de la vía Nodal en la PML izquierda proporcionaría información posicional a los primordios de los órganos que se ubican en esa zona durante ese estadio del desarrollo. Grupos celulares dentro de la PML, activarían un programa de morfogénesis asimétrica en respuesta a esta señal, lo que resulta en una organización o posicionamiento asimétrico de los órganos internos. Aún más, la asimetría de cada órgano es determinada de forma independiente, sugiriendo la existencia de un

mecanismo encargado de mantener la coherencia de las asimetrías a lo largo del cuerpo (Shiratori y col, 2006; Hackett, 2002; Burdine & Shier, 2000; Bisgrove y col, 2000).

1.2.1. Rompimiento de la simetría.

Los mecanismos propuestos para el rompimiento de la simetría del embrión son principalmente dos: la bomba de protones y el flujo nodal. A pesar de que existen pruebas experimentales que apoyan a cada uno de estos mecanismos como el evento más temprano de asimetría, ninguno de los dos cumpliría este rol en todos los modelos animales.

En el modelo de la bomba de protones, la diferencia entre el lado izquierdo y derecho del embrión sería el resultado de la distribución asimétrica de pequeñas moléculas con carga (probablemente Ca^{++}) a través de uniones comunicantes. Esta distribución obedecería a diferencias de voltaje producidas por la actividad diferencial asimétrica de la bomba $\text{ATPasa-H}^+ / \text{K}^+$. Este mecanismo es particularmente importante en pollo y rana y también tendría participación en etapas tempranas del establecimiento de las asimetrías en pez cebra (Raya y col, 2004; Mercola & Lévin, 2001; Lévin y col, 2002; Lévin, 2005). Sin embargo, su participación en mamíferos aún no ha sido verificada.

El modelo del flujo nodal contempla la existencia de un flujo extraembrionario producido por el movimiento de monocilios en la superficie de las células del nodo ventral de ratón o de su equivalente en otras especies (nodo de Hensen en pollo, zona ventral del labio dorsal del blastoporo en la rana, vesícula de Kupffer en peces

teleósteos). Este flujo neto hacia la izquierda distribuiría en forma asimétrica algún determinante que podría ser transportado en vesículas hasta la colisión con la superficie más izquierda del nodo mismo (Tanaka y col, 2005). La existencia de monocilios y de la proteína dineína relacionada con su movimiento se ha demostrado en todos los modelos estudiados hasta el momento, y la existencia del flujo nodal parecería también ser una característica común en las distintas especies. Sin embargo, el patrón de flujo nodal varía según la especie y aún no se ha determinado si el flujo Nodal es fundamental para el rompimiento de la simetría en todas ellas (Raya & Izpisua Belmonte, 2006; Hirokawa y col, 2006; Tabin, 2006; Hamada y col, 2002; Capdevila y col, 2000; Essner y col, 2002; Nonaka y col, 1998).

Los mecanismos de ruptura de la simetría anteriormente mencionados darían origen a una expresión génica asimétrica, a un solo lado de la línea media.

1.2.2. Propagación de la señal asimétrica.

Una vez que la señal asimétrica fue generada de forma localizada en la zona del nodo o perinodo, ésta es transferida a la PML a través de un mecanismo aún desconocido y que ha sido relacionado con diversas vías genéticas como Nodal, Fgf, Shh, Bmp. (Raya & Izpisúa Belmonte, 2006; Hamada, 2002; Capdevila y col, 2000). Después que la señal asimétrica es transferida a la PML, la vía Nodal es activada en toda la placa del mesodermo lateral izquierdo. Nodal induce la expresión de su inhibidor competitivo Lefty2 el cual participa en un *loop* regulativo del tipo reacción-difusión, que permite limitar espacial y temporalmente la expresión de Nodal (Raya & Izpisúa Belmonte, 2006; Mercola, 2003; Hamada, 2002; Mercola & Levin, 2001;

Wright, 2001; Capdevila y col, 2000; Hamada y col, 2002; Branford & Yost, 2004; Brown & Wolpert 1990).

En esta etapa los precursores de los órganos internos que están en contacto con la PML izquierda recibirían la información posicional I/D. La señal asimétrica también alcanzaría el cerebro ya que Nodal se expresa asimétricamente en la mitad izquierda del cerebro poco después de su expresión en la PML. La transferencia de señales asimétricas a la PML y cerebro parecería estar acoplada ya que defectos de asimetría a nivel de la PML se correlacionan con los defectos de asimetría en el cerebro (Concha y col, 2000; Liang y col, 2000; Long y col, 2003; Bisgrove y col, 2000).

1.2.3. Morfogénesis asimétrica.

Nodal activa la expresión de genes efectores de la vía, el más estudiado de los cuales es Pitx2. Este factor de transcripción homeobox tipo bicoide se expresa a la izquierda en la PML y cerebro de pez cebra (Concha y col, 2000; Ryan y col, 1998; Piedra y col, 1998), y está involucrado en los mecanismos de morfogénesis asimétrica.

Se ha descrito que el gen *pitx2* experimenta *splicing* alternativo y sus isoformas actuarían de forma diferencial durante la morfogénesis asimétrica. En particular, la isoforma de tipo c (*pitx2c*) tiene un efecto dosis-dependiente y genera respuestas de morfogénesis particulares en cada uno de los órganos involucrados. Además, existen evidencias en ratón que indican la coexistencia de eventos de morfogénesis asimétrica dependientes de *pitx2* (lobación de los pulmones y remodelación de los vasos sanguíneos) y otros eventos independientes de este factor de transcripción (curvatura del corazón, estómago y giro del embrión) pero dependientes de la activación izquierda

de Nodal (Shiratori y col, 2006; Essner y col, 2000; Liu y col, 2001; Gage y col, 1999). Los mecanismos por los cuales *pitx2c* y otros factores no descubiertos regulan la morfogénesis asimétrica son aún muy poco conocidos.

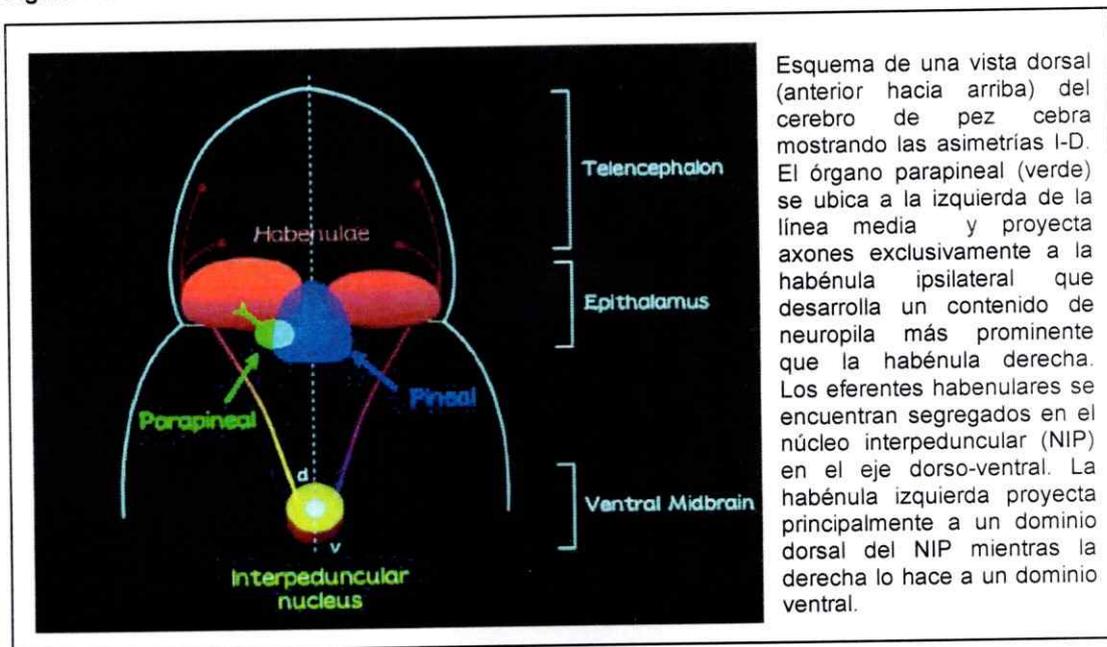
1.3. Asimetrías en el sistema nervioso: el epitálamo de pez cebra.

El entendimiento de los mecanismos involucrados en el posicionamiento y desarrollo de los órganos internos ha crecido de forma importante, sin embargo poco se sabe aún sobre el desarrollo de las asimetrías izquierda derecha en el sistema nervioso central (SNC).

En los últimos años el pez cebra ha surgido como un modelo fundamental en el cual se puede estudiar el desarrollo de las asimetrías cerebrales. En particular la zona del epitálamo localizada en el diencefalo dorsal presenta diferencias conspicuas en el eje izquierda-derecha a nivel morfológico y de conectividad. Estas diferencias son conservadas en los vertebrados (Concha & Wilson, 2001). El epitálamo está constituido por la habénula y el complejo pineal. La habénula es una estructura par en la cual se distinguen el núcleo habenular izquierdo y el núcleo habenular derecho, mientras que el complejo pineal está constituido por dos evaginaciones del techo del tubo neural: el órgano pineal de ubicación medial y que no presenta asimetrías relevantes y el órgano parapineal que se ubica al lado izquierdo de la línea media (Concha & Wilson, 2001). El órgano parapineal proyecta exclusivamente a la habénula izquierda y coordinadamente con este hecho el núcleo habenular izquierdo desarrolla un contenido de neuropila sensiblemente mayor que la habénula derecha (Concha y col, 2003 y 2000). La habénula proyecta al núcleo interpeduncular (NIP) en el cerebro medio a través del fascículo retroflexo. La asimetría morfológica izquierda-derecha de

la habénula se refleja a nivel de su conectividad eferente ya que en el NIP los eferentes habenulares izquierdo y derecho se encuentran segregados en el eje dorso-ventral (Aizawa y col, 2005) (Figura 1.3.1).

Figura 1.3.1 Asimetrías neuroanatómicas en cerebro de pez cebra.

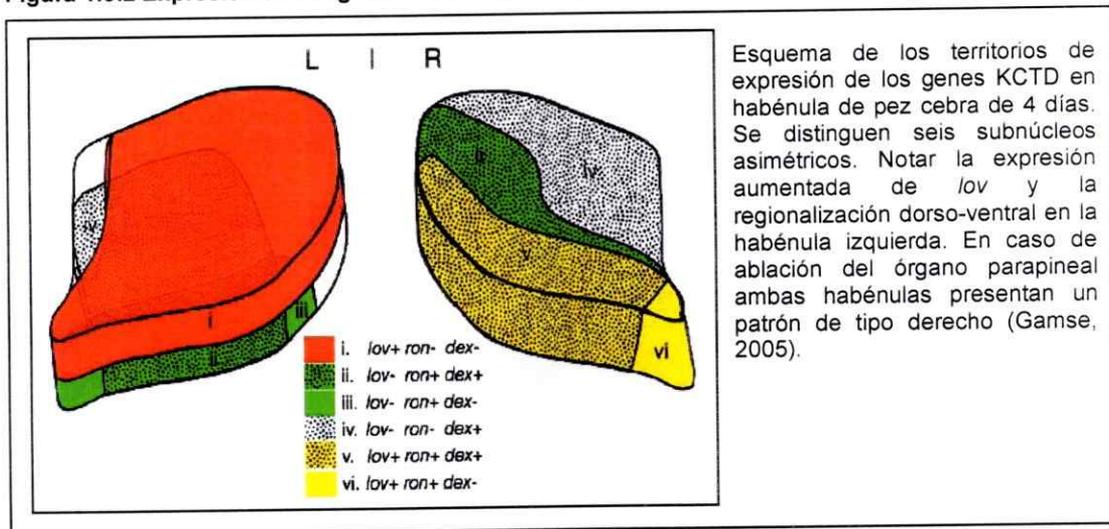


Esta "laterotopía" de los eferentes habenulares en el NIP sería regulada por la asimetría a nivel de la habénula que a su vez sería consecuencia de la migración asimétrica del órgano parapineal, como sugieren estudios en los cuales la asimetría habenular no se desarrolla después de la ablación por láser del órgano parapineal (Gamse y col, 2005).

La presencia del órgano parapineal induce en la habénula izquierda un patrón de expresión génica particular. Tres genes de la familia *KCTD* (proteínas que contienen un dominio de tetramerización de canales de potasio) se expresan en la habénula de

pez cebra en presencia del órgano parapineal. Estos genes son *leftover* (*lov*), *righton* (*ron*) y *dexter* (*dex*) y el análisis de su expresión permite distinguir seis subnúcleos asimétricos en la habénula de pez cebra (Gamse y col, 2005 y 2003) (Figura 1.3.2).

Figura 1.3.2 Expresión de los genes KCTD en larva de pez cebra.



La función de estos genes es aún desconocida, pero su expresión se correlaciona con la determinación izquierda-derecha del embrión. En el caso de ablación del órgano parapineal, ambas habénulas presentan un patrón de expresión de tipo "derecho", con *lov* disminuido y *ron* y *dex* aumentados (Gamse y col, 2005).

Se ha demostrado que la vía Nodal en el epítalamo controla la lateralidad de la asimetría y no sería necesaria para el surgimiento de la asimetría propiamente tal. Esto se ha demostrado mediante el análisis de mutantes que carecen de la vía Nodal o presentan una activación de la vía Nodal bilateral, en lugar de la expresión izquierda normal. Estos mutantes poseen un epítalamo asimétrico, pero la lateralidad de dicha asimetría se randomiza a nivel de la población (Concha y col, 2000). Coherentemente

con esto, el patrón asimétrico de expresión de los genes KCTD se mantiene, pero su lateralidad se randomiza (Gamse y col, 2003).

Desde el punto de vista funcional, la importancia de la asimetría izquierda-derecha del epitélamo es aún desconocida, pero el alto grado de conservación de la organización de esta región y de su circuito en los vertebrados (Concha & Wilson 2001; Concha, 2004) sugiere la presencia de mecanismos generales conservados en la especificación del eje izquierda-derecha en el SNC. Para estudiar los mecanismos generales y especie-específicos involucrados en procesos biológicos en general y en el establecimiento de la asimetría izquierda-derecha en particular, la comparación entre modelos experimentales resulta ser una estrategia esencial.

Los teleósteos ofrecen ventajas únicas desde este punto de vista, dada la abundancia de especies y su diversidad en cuanto a formas, ambiente y modos de vida. Además los teleósteos presentan una historia evolutiva particular, ya que su genoma experimentó una duplicación completa hace 345 millones de años, justo en la base de la radiación de este grupo (Christoffels y col, 2004). Como consecuencia de este fenómeno, los genes duplicados, más libres en término de presión selectiva, han adquirido nuevas funciones (neo-funcionalización) o han debido compartir su función con los genes originarios (sub-funcionalización). Entonces, es de esperar que dos especies de teleósteos difieran en el destino y función de los genes duplicados dada su evolución independiente, y la comparación entre especies puede proporcionar información sobre la evolución y plasticidad de las redes genéticas y del desarrollo involucradas en un proceso determinado. Aún más, la sub-funcionalización como resultado de la duplicación génica ofrece la ventaja de facilitar el estudio de genes esenciales para el desarrollo embrionario, ya que en estos casos la inactivación de la

función de un gen no resulta en un fenotipo letal que impida su análisis, como ocurre, por ejemplo, en los mamíferos (Furutani-Seiki & Wittbrodt, 2004).

Por todo lo anterior, la comparación entre pez cebra y un modelo teleósteo alternativo que haya experimentado una evolución independiente prolongada, como es el caso de Medaka, sería de gran utilidad para comenzar a entender los mecanismos genéticos y del desarrollo de tipo conservado y divergente que controlan el desarrollo de las asimetrías izquierda derecha en este grupo vertebrado.

1.4. El modelo de Medaka (*Oryzias latipes*)

Medaka (*Oryzias latipes*) es un teleósteo nativo de Asia que al igual que pez cebra presenta fertilización externa, embriones transparentes, ciclo de vida corto y una genética desarrollada. Globalmente el desarrollo de Medaka es similar al de pez cebra, sin embargo es posible notar diferencias interesantes entre estas dos especies, sobretodo en relación a la velocidad de desarrollo, ya que Medaka necesita tres veces más tiempo para eclosionar (nueve contra tres días aproximadamente) y posee un desarrollo del sistema nervioso adelantado en relación a la somitogénesis si lo comparamos con pez cebra (Furutani-Seiki & Wittbrodt, 2004).

Medaka ha sido propuesto recientemente como modelo complementario a pez cebra debido a la historia evolutiva de estos euteleosteos cuyos linajes divergieron hace cerca de doscientos millones de años (Furutani-Seiki & Wittbrodt, 2004). Para Medaka, así como para pez cebra, existen mutantes y peces transgénicos y en particular está disponible en nuestro laboratorio una cepa de Medaka de tipo transgénica que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) en la habénula y otra

cepa que la expresa GFP en el complejo pineal (para detalles referirse a la sección materiales y métodos). Un análisis preliminar de la morfología del epítalamo de Medaka sugiere la existencia de asimetrías izquierda-derecha incluso más notorias que en pez cebra.

De acuerdo a estos antecedentes planteamos la hipótesis siguiente:

2. HIPÓTESIS

El epítalamo de Medaka (*Oryzias latipes*) presenta asimetrías izquierda-derecha en términos de expresión génica, morfología y conectividad.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el epítalamo de Medaka y verificar la existencia de asimetrías izquierda-derecha en términos moleculares, morfológicos y de conectividad.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1. Determinar la presencia de asimetrías moleculares tempranas (previo a la morfogénesis asimétrica) en el epitálamo de Medaka, mediante hibridación *in situ* del gen *pitx2c*.

- 4.2. Estudiar las asimetrías morfológicas izquierda-derecha en el epitálamo de Medaka en relación a la morfología de los núcleos habenulares y posicionamiento del órgano parapineal.

- 4.3. Determinar la existencia de asimetrías en el patrón de conectividad eferente de la habénula hacia el núcleo interpeduncular de Medaka.

- 4.4. Clonar genes de la familia KCTD de Medaka, como posibles marcadores de sub-núcleos habenulares.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Cepas de Peces

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron peces de diferentes cepas de *Oryzias latipes* (Medaka): la cepa silvestre *Cab* y dos cepas transgénicas que expresan la proteína fluorescente verde GFP en el diencéfalo.

La cepa DE-GFP presenta fluorescencia en la habénula y la cepa fRx2-GFP en el complejo pineal. El transgénico DE-GFP fue generado por enhancer-trap y hasta el momento no ha sido rastreado el lugar exacto de la inserción (Grabher y col, 2003). En el caso del fRx2-GFP, la proteína fluorescente verde se encuentra bajo el control del promotor del gen Retinal homeobox protein (Rx2) de Fugu (*Takifugu rubripes*). Los peces Medaka fueron gentilmente proporcionados por el grupo del Dr. Jochen Wittbrodt, EMBL, Heidelberg, Alemania.

Todos los peces usados en esta tesis se encuentran en el vivero del Grupo de Biología Comparada y del Desarrollo, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

5.1.2. Cepas Bacterianas

Para el clonamiento de los genes de la familia KCTD se utilizaron bacterias electrocompetentes de la cepa TOP10F' de *Escherichia coli*.

5.1.3. Vector

Todos los insertos de DNA fueron ligados al vector pCRII (Invitrogen) para su clonamiento. Este vector contiene los promotores SP6 y T7 flanqueando una región de clonamiento con múltiples sitios de restricción. Esta región está contenida dentro de la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa. La inactivación de este péptido mediante la inserción de un fragmento de DNA en esta región, permite seleccionar las colonias que portan inserto al crecer las colonias transformadas en medio conteniendo X-Gal, sustrato de la β -galactosidasa. Las colonias bacterianas en presencia de un inserto de DNA sufren la inactivación de la enzima y por consiguiente serán de color blanco.

Además, el vector incluye la secuencia codificante de la enzima β -lactamasa, la que confiere resistencia a la ampicilina a las bacterias que portan el vector.

5.1.4. Partidores

Para amplificar los genes KCTD de Medaka, se diseñaron los siguientes partidores:

Scf105:

Sentido 5' – GCGCAGACCATGGCACTG – 3'

Antisentido 5'– ATTGTTTCTCCTGCTAGATTGTG - 3'

Scf263:

Sentido 5' GTGGACTATGGCTTTACCAGACAG - 3'

Antisentido 5' GCCGATAGTCTCACTCACGGTAG - 3'

Scf07:

Sentido 5' – CTTGAGAGCGCGAGTGCAG - 3'

Antisentido 5'– AGGGACAGCCGGACGATC -3'

Los controles positivos para los PCR se llevaron a cabo con β -actina de pez cebra, con los siguientes partidores (Barrallo y col, 1999):

β -actina (*Danio rerio*)

Sentido 5' – GCCGGTTTTGCTGGAGATGAT – 3'

Antisentido 5' – ATGGCAGGGGTGTTGAAGGT – 3'

5.1.5. Herramientas Bioinformáticas

Para identificar las posibles secuencias de los genes KCTD de Medaka, se consultó la base de datos de DNA genómico de Medaka del "Medaka genome Project" en <http://dolphin.lab.nig.ac.jp/medaka/>. Para poder localizar los genes en el DNA genómico y predecir la organización intrones/exones se usó el software GenScan desde el sitio <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>.

En el análisis de ortólogos por blastn y blastp se usaron las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y del TIGR (The Institute for Genomic Research), via web desde los sitios internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> y <http://tigrblast.tigr.org/tgi/>, respectivamente.

La búsqueda de dominios proteicos fue realizada consultando las bases de datos de InterPro vía web (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Los alineamientos de secuencias proteicas y nucleotídicas y los árboles respectivos fueron construidos con ClustalX v1.83, Mega 3.1 y Treeview.

5.1.6. Equipos de Microscopía y Fotografía Digital

En esta tesis se utilizaron los siguientes equipos de microscopía y fotografía digital:

- Lupas estereoscópicas con zoom Nikon SMZ645
- Microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500 con sistema de epi-fluorescencia
- Microscopio automatizado Nikon Eclipse E1000 (contraste de fase y fluorescencia) con cámara enfriada digital Hamamatsu C4742-95
- Microscopio Nikon Eclipse 80i para DIC-Nomarski

- Cámara digital Nikon Coolpix 4500
- Microscopio Confocal Zeiss LSM 5 Pascal

5.1.7. Soluciones hibridación *in situ*

- PBT: 1x PBS, 0,1% Tween-20, estéril. pH 7,5.
- PFA: 4% paraformaldehído en PBS
- HYB⁻: 50% formamida, 5xSSC 0,1% Tween-20, pH 6.0
- HYB⁺: HYB⁻, 5mg/mL RNA de tórula, 50µg/mL Heparina
- MAB: 100mM Ácido Málico, 150mM NaCl, estéril, pH 7,5.
- BCL: 0,1M TrisCl⁻-pH9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0,1% Tween-20
- Block: 2% Blocking Reagent (Roche) en MAB

5.1.8. Soluciones inmunofluorescencia indirecta

- PBTr: 1x PBS, 0,5% Triton.
- PBDTr: 1x PBS, 0,8% Triton, 1% Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Tris/PBS: 1x PBS, 0,25% Tripsina
- TCA: 2% Ácido tricloroacético en PBS
- DMSO/met: 20% Dimetilsulfóxido en metanol
- IB: 10% Suero de cabra en PBDTr

5.1.9. Anticuerpos y Trazadores Fluorescentes

Anticuerpos primarios

Anti_GFP_rabbit	(policlonal, ABcam)
Anti_GFP_mouse	(monoclonal, Chemicon)
Anti_acetylated α -tubuline_mouse	(monoclonal, Sigma)

Para todos los anticuerpos primarios la concentración de trabajo fue 1 en 1000.

Anticuerpos Secundarios

Alexa 488_antirabbit IgG	(Molecular Probes)
Alexa 488_antimouse IgG	(Molecular Probes)
Alexa 633_antimouse IgG	(Molecular Probes)

Para todos los anticuerpos secundarios la concentración de trabajo fue 1 en 200.

Trazadores:

Trazadores lipofílicos carbocianinas en cristales (Molecular Probes)

DiAsp verde-amarillo, láser 488, D-291

DiD rojo lejano, láser 633, D7757

NeuroTrace 530/615 red fluorescent Nissl stain (Invitrogen)

5.1.10. Kits y Reactivos particulares

MinElute Gel extraction Kit.	-- QIAGEN	(cat n° 28604)
QIAGEN Spin Miniprep Kit.	-- QIAGEN	(cat n° 27106)
TA Cloning Kit (pCRII)	-- Invitrogen	(cat n° K2050-01)
Probe Quant G-50 microcolumns	-- Amersham Bioscience	(cat n° 275335)
Trizol Reagent	-- Invitrogen	(cat n° 15586-026)
BMP Purple AP-substrate	-- Roche	(cat n° 11442074001)
DIG-RNA Labeling Mix	-- Roche	(cat n° 11277073910)
DNase I	-- Roche	(cat n° 10776785001)
Proteinasa K	-- Sigma	(cat n° P6556)
Tricaina	-- Sigma	(cat n° A5040)
RNasin	-- Promega	(cat n° N2615)

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Obtención, manejo y fijación de embriones de Medaka

Los embriones de Medaka fueron obtenidos de cruces espontáneos entre peces de un mismo estanque gracias a que las hembras mantienen los huevos fertilizados adheridos al vientre. Por este motivo la colecta se efectúa removiendo manualmente los huevos del abdomen de la hembra con los dedos o con la ayuda de un asa. Los embriones colectados fueron mantenidos en medio ERM (17.1 mM NaCl, 0,27 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4mM KCl, 0,66mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a una temperatura de 28°C hasta el estadio de interés. Los estadios fueron establecidos de acuerdo a Iwamatsu (2004).

Para las hibridaciones *in situ*, los embriones fueron fijados con corion en una solución al 4% de paraformaldehído (PFA) en PBS durante toda la noche a 4°C. Después de este tiempo los embriones fueron lavados brevemente en PBS, decorionados mecánicamente con fórceps, deshidratados en lavados sucesivos con etanol 30, 50 y 70% y luego mantenidos en metanol 100% a -20°C hasta su utilización.

Para los experimentos con trazadores (Di o Nissl fluorescente), los embriones no fueron deshidratados sino que mantenidos en 0,5% PFA en PBS a 4°C y oscuridad hasta por dos semanas.

Para los experimentos de inmunofluorescencia el agente fijador utilizado fue ácido tricloroacético (TCA) al 2% en PBS. Los embriones fueron fijados por 1,5hrs a temperatura ambiente (RT), luego se lavaron por 40 minutos en PBTr (0,5% Triton en PBS) reemplazando la solución cada 10 minutos. El corion fue removido mecánicamente. Los embriones fijados en TCA se conservaron hasta el momento de

su utilización en PBTr a 4°C. Una fijación alternativa fue utilizada especialmente para experimentos de inmunofluorescencia contra tubulina- α acetilada. Se fijaron los embriones en una solución 20% dimetilsulfóxido (DMSO) en metanol por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agregó agua oxigenada hasta obtener una solución al 10% y se incubó a 4°C por toda la noche. Los embriones fueron finalmente lavados en metanol, decorionados mecánicamente y conservados en metanol 100% a -20°C hasta su utilización.

Para los experimentos de microscopía confocal *in vivo* los embriones de Medaka fueron decorionados enzimáticamente, usando la enzima de eclosión (*Hatching enzyme*) propia de estos peces obtenida de acuerdo al protocolo indicado en la sección siguiente.

5.2.2. Decorionado enzimático de embriones de Medaka

El corion de Medaka está compuesto por dos capas: una interna dura y una externa más blanda y no es posible removerlo de forma mecánica. Para los análisis *in vivo*, el corion fue removido enzimáticamente con un protocolo de dos pasos que incluye primero la acción de la Proteinasa K y luego el empleo de una proteasa producida por el mismo embrión (Enzima de eclosión o *Hatching enzyme*) que degrada la capa interna del corion (Yasumasu y col, 1994).

5.2.2.1. Obtención de la Enzima de Eclosión

Se crecieron entre cien y doscientos embriones por aproximadamente una semana. En estos embriones cercanos a la eclosión es posible identificar las células productoras de la enzima de eclosión gracias a su color verde oscuro.

Una vez transferidos estos embriones a un eppendorf, se lavaron con agua destilada por 20 minutos cambiando la solución cada 5 minutos. Se retiró toda el agua y se sumergió el tubo en nitrógeno líquido y rápidamente se transfirió a un baño termostático a 37°C. Este ciclo de congelación/descongelación se repitió tres veces. Se homogeneizó energéticamente y luego se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos. Se recolectó el sobrenadante a un nuevo tubo mantenido en hielo.

Se volvió a homogeneizar, centrifugar y colectar dos veces, agregando en la segunda repetición 500µL de PBS frío a la parte sólida a homogeneizar. Finalmente se combinaron los sobrenadantes y se centrifugaron por 10 minutos a velocidad máxima. El sobrenadante colectado en esta última centrifugación contiene la *Hatching enzyme* y se mantiene a -80°C hasta su utilización.

5.2.2.2. Remoción del corion

Los embriones a decorionar se colectaron en una placa de 96 pocillos y lavados con agua destilada. Posteriormente se incubaron en Proteinasa K (20mg/mL) por 1 hora con agitación suave. Al cabo de este tiempo se lavaron los embriones con agua destilada por 15 minutos y se cubrieron con solución de *Hatching enzyme* poniendo

atención de que los huevos se encontraran en una sola capa. Se cubrió el pocillo con papel filtro húmedo para evitar la evaporación de la solución y se incubó a 28°C. La reacción se completa en aproximadamente 5 horas, dependiendo de la calidad de la enzima obtenida. Se monitoreó la reacción observando la formación de cráteres en la superficie del corion hasta que la capa interna se disolvió completamente y los residuos de la capa externas pudieron ser fácilmente removidos manualmente.

Una vez fuera del corion los embriones tienen que ser manipulados con reactivos y materiales estériles y tienen que ser protegidos del contacto con el aire.

5.2.3. Procedimientos de biología molecular

5.2.3.1. Electroforesis

Todas las electroforesis de DNA se llevaron a cabo en geles de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA) visualizado con bromuro de etidio. Para las electroforesis de RNA, se usó buffer TAE preparado con agua nanopura estéril.

5.2.3.2. Extracción de RNA total

El RNA total fue extraído desde embriones tardíos de Medaka, entre los estadios 36 y 39. De acuerdo a las indicaciones del fabricante, los embriones fueron homogeneizados enérgicamente en Trizol por 10 minutos. Se agregó cloroformo a esta mezcla, sometiéndola a agitación y centrifugación y rescatando el RNA en la fase acuosa superior. El RNA fue precipitado con isopropanol mediante centrifugación y posteriormente lavado con etanol 75%. Finalmente el RNA total fue resuspendido en

agua nanopura estéril. La integridad del RNA fue verificada por electroforesis en gel de agarosa y la concentración se midió por espectrofotometría. La calidad se evaluó mediante la síntesis de cDNA.

5.2.3.3. Síntesis de cDNA

El RNA fue usado como sustrato para la síntesis de cDNA de hebra simple mediante transcripción reversa en una reacción estándar, utilizando 200 U de la enzima Superscript II (Invitrogen) y 0,5 µg de partidor oligo dT (entre 12 y 18 nucleótidos). La calidad del cDNA resultante fue verificada mediante su utilización como sustrato para la amplificación de los genes de interés.

5.2.4. Clonamiento de genes de la familia KCTD de Medaka

El análisis de las bases de datos y el uso de las herramientas informáticas indicadas en 5.1.5 permitió identificar genes de Medaka pertenecientes a la familia KCTD en tres distintos *scaffolds*. Sobre las secuencias codificantes putativas de estos genes se diseñaron los partidores específicos indicados en 5.1.4.

El clonamiento de los genes de Medaka se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del kit TA Cloning Kit, (Invitrogen). Brevemente, se amplificaron con partidores específicos las secuencias correspondientes a los genes de interés, usando como templado el cDNA sintetizado previamente. El programa del PCR empezó con un minuto a 95°C y luego constó de 35 ciclos que incluyeron desnaturalización a 94°C por 50 segundos, alineamiento a 52°C por 50 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Se finalizó la reacción de PCR con 10 minutos a 72°C.

El producto de PCR obtenido se corrió en gel de agarosa y desde éste se purificó mediante kit MinElute de QIAGEN para proceder a la reacción de ligación.

La reacción de ligación contiene, además del producto de PCR y del vector pCRII, buffer de ligación, ligasa T4 (4 unidades Weiss) y agua hasta un volumen total de 10µL. La reacción fue incubada toda la noche a 4°C en un termociclador MJ Research PTC-100 v7.0.

Alícuotas de 2 µL de la reacción fueron agregadas a 50 µL de bacterias competentes *Escherichia coli* cepa TOP10F' y se procedió a la electroporación con un pulso de 1,8KV, incubando posteriormente las bacterias en medio TB estéril más sales (medio que contiene triptona y extracto de levadura más KH_2PO_4 y K_2HPO_4) a 37°C con agitación por 40 minutos. Al cabo de este tiempo las bacterias fueron sembradas sobre placas de LB-agar y ampicilina con adición de IPTG y X-gal e incubadas toda la noche a 37°C.

5.2.4.1. Selección de clones y PCR de colonias

Los transformantes con insertos de cDNA fueron seleccionados por su resistencia a ampicilina y por su incapacidad para degradar el X-gal, revelada por el color blanco de la colonia. Las colonias seleccionadas fueron crecidas en medio líquido LB con ampicilina toda la noche a 37°C. Las verificaciones de la presencia de un inserto en cada clon se llevaron a cabo mediante la digestión del DNA plasmidial con la enzima EcoRI que escinde el inserto desde el plásmido -en nuestro caso sin cortarlo- y mediante PCR de colonias. El PCR de colonias se llevó a cabo con el mismo programa que el PCR inicial salvo que el templado usado fue 1µL del cultivo líquido de

bacterias y que la temperatura inicial de 92°C fue mantenida por 5 minutos y no por 1 minuto como en el caso anterior. Desde el cultivo líquido del clon seleccionado se purificó el DNA plasmidial con el kit Qlaprep Spin Miniprep (QIAGEN) y se creó un stock de bacterias en glicerol para poder almacenar el clon elegido a -80°C.

Para obtener la secuencia de los genes clonados se enviaron los plásmidos purificados a la empresa Retrogen (San Diego, USA) que llevó a cabo las reacciones de secuenciación en un equipo ABI 3730, con partidores SP6 y T7, leyendo 850pb en promedio por cada reacción.

5.2.4.2. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa ClustalX en un alineamiento múltiple con genes de la familia KCTD, de acuerdo a los números de acceso publicados en literatura (Gamse y col, 2005). Se construyeron los árboles relativos con el programa MEGA v3.1.

5.2.5. Obtención de sondas para hibridación *in situ*

5.2.5.1. Linearización de DNA plasmidial

Para obtener el DNA templado para la transcripción *in vitro* del RNA antisentido de la sonda, es necesario linearizar el plásmido aislado desde el clon seleccionado con una enzima que corte el vector río-arriba del extremo 5' del gen pero que no tenga sitio de corte dentro del inserto. La reacción de linearización se llevó a cabo como se describe a continuación: a 5µg de DNA plasmidial se agregaron 10µL de Buffer

10x de la enzima de restricción, 2µL de la enzima de restricción y H₂O nanopura hasta completar un volumen de 100µL. Se incubó la reacción por cuatro horas a 37°C en baño termostático y luego se controló en un gel de agarosa la digestión completa del plásmido. Se agregó a la solución un volumen de Fenol/Sevag (25:24:1 Fenol:Cloroformo: Alcohol isoamílico), se mezcló en vortex por 2 minutos y se centrifugó a velocidad máxima por 5 minutos. La fase superior fue colectada en un nuevo tubo. El DNA fue precipitado agregando 1/10 de volumen de 3M NaOAc-pH=6 y 2 volúmenes de etanol 100% frío e incubando toda la noche a -20°C. Se procedió a centrifugar durante 10 minutos, a descartar el sobrenadante y a lavar el *pellet* con 500µL de etanol 70%. Se volvió a precipitar el *pellet* por centrifugación, se removió el sobrenadante, se dejó secar el *pellet* al aire por 15 minutos y finalmente se resuspendió en 10µL de agua nanopura.

De esta forma se generó el DNA templado que para generar la sonda antisentido de RNA. Este templado deberá ser transcrito con la polimerasa cuyo promotor se encuentre río abajo. Para más detalle se adjunta como material optativo el mapa del vector utilizado.

5.2.5.2. Transcripción *in vitro* de sondas marcadas con dioxigenina

La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo de la siguiente forma: en un volumen final de 20µL de agregaron 4µL de 5X Buffer de transcripción (Promega), 2µL 100mM DTT dithiothreitol (Promega), 0,5µL RNasin (Promega), 1µL 10X DNTP-DIG (DIG-RNA Labeling Mix, Roche), 1µL DNA linearizado, 9,5µL H₂O nanopura estéril, 1µL RNA polimerasa SP6/T7 según corresponda. La reacción se incubó por 4 horas a 37°C en baño termostático. Se procedió a remover el DNA templado con la adición

de 2 μ l (40 unidades) de DNase I (Roche). Esta reacción se prolongó durante 30 minutos a 37°C y se detuvo agregando 2 μ l de EDTA (0.2 M pH = 8.0). La sonda fue purificada pasándola por una columna Probe Quant G-50 según las indicaciones del fabricante.

5.2.6. Hibridación *in situ* en embriones enteros de Medaka

Las hibridaciones *in situ* en embriones enteros de Medaka se llevaron a cabo de acuerdo a protocolos descritos en literatura (Hauptmann, 1994; Loosli, 1998). Brevemente, los embriones en metanol son re-hidratados con una serie de lavados cortos en Metanol en PBT (75%; 50%; 25% MeOH/PBT; PBT). Posteriormente los embriones fueron blanqueados con 6% peróxido de hidrogeno en PBT por una hora y luego incubados con Proteinasa K (10 μ g/mL) para permeabilizarlos. El tiempo de incubación con Proteinasa K depende del estadio del embrión a tratar y se resume en la tabla 1.

Tabla 1 Tiempos de incubación con Proteinasa K 10 μ g/mL según estadio.

MEDAKA	
Estadio	Incubación
17-20	5 min
21-24	7 min
25-30	10-15 min
>30	> 20 min
H	60 min

Después de la permeabilización los embriones fueron re-fijados en PFA 4% , lavados nuevamente con PBT y pre-hibridados en HYB⁻ por 2hrs a 65°C. Al cabo de las dos horas se reemplazó la solución por HYB⁺ conteniendo la sonda a la concentración adecuada. Se hibridizó toda la noche a 65°C.

Los embriones fueron lavados por una hora en HYB⁻ y sucesivamente en soluciones de concentraciones decrecientes de en PBT siempre a 65°C. Terminado el lavado se equilibraron los embriones en MAB y se procedió a incubarlos por 3hrs en 2% Blocking Agent (Boehringer) en MAB. Transcurrido este tiempo se reemplazó esta solución con otra equivalente a la cual se le agregó el anticuerpo anti-DIG-AP (1:5000) para dejar incubando toda la noche a 4°C. Se lavaron por dos horas los embriones con MAB, reemplazando la solución cada 15min, trasladándolos en el último lavado a una placa *multiwell* en la cual se procedió a equilibrarlos en el Buffer del sustrato (BCL).

Finalmente, manteniendo el *multiwell* en oscuridad, se reveló agregando el sustrato para la enzima fosfatasa alcalina (BM Purple, Roche) y monitoreando la reacción cada media hora. Para detener la reacción se lavaron los embriones con PBT, se volvieron a fijar en PFA por 1 hora y se pasaron por soluciones de concentraciones crecientes de glicerol en PBS (25%, 50%, 75%). Finalmente se tomaron fotos de los embriones con un Microscopio Nikon Eclipse 80i para DIC-Nomarski con objetivo 40X, montándolos en cámaras llenas de glicerol 100% y removiendo el saco vitelino y los ojos cuando necesario.

5.2.7. Análisis *in vivo* de peces transgénicos

Para estudiar el desarrollo de la asimetría en diencéfalo de Medaka se analizaron por microscopía confocal embriones vivos de transgénicos DE-GFP y fRX2-GFP en diferentes estadios del desarrollo. Estos embriones fueron anestesiados con tricafina disuelta en el medio en una concentración de 160µg/mL. Los embriones fueron mantenidos en el medio entre 5 y 10 minutos o hasta que no mostraron movimientos musculares. A continuación fueron montados para la observación en el microscopio confocal. La cámara se construye gracias a un anillo de un diámetro aproximado de un centímetro, de vidrio o de otro material transparente que no interfiera con la visualización. Este anillo es adherido a un cubreobjeto formando de esta manera una cámara que es llenada con agarosa 2% de bajo punto de fusión. En esta agarosa es incluido el embrión vivo y decorionado que rápidamente es orientado con la parte de interés (habénula y complejo pineal) hacia abajo, hacia el cubreobjeto. Una vez solidificada la agarosa, la cámara es llenada con medio conteniendo anestésico y cerrada con un portaobjeto. Esto permite que el embrión sea montado cerca del cubreobjeto, evitando que una ubicación demasiado profunda dentro de la agarosa impida la observación en el microscopio. Todas las imágenes fueron tomadas con un objetivo de inmersión de agua, aumento 40X en el microscopio confocal del Centro FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

5.2.8. Inmunofluorescencia indirecta en embriones enteros

Después de la fijación en TCA o en DMSO/met los embriones fueron permeabilizados incubándolos en tripsina 0,25% en PBS frío por 15 minutos. Transcurrido este tiempo fueron lavados dos veces con PBTr por 10 minutos. La reacción de permeabilización y los lavados fueron llevados a cabo sobre hielo.

A continuación se procedió a bloquear los posibles sitios inespecíficos de unión para el anticuerpo incubando los embriones por 2 horas en IB y luego se reemplazó esta solución por IB conteniendo los anticuerpos primarios correspondientes dejando la reacción proceder por toda la noche a 4°C.

Luego de retirar la solución con los anticuerpos se procedió a lavar los embriones por 2 horas en PBTr, reemplazando la solución cada 30 minutos. Se procedió nuevamente a la reacción de bloqueo con IB por 2 horas y a reemplazar luego el IB por la solución conteniendo los anticuerpos secundarios correspondientes. Se mantuvieron los embriones en anticuerpo secundario durante toda la noche a 4°C. Desde este momento en adelante los embriones deben ser mantenidos en la oscuridad. Una vez retirada la solución con los anticuerpos se procedió a lavar los embriones de forma totalmente análoga a la descrita anteriormente. Los embriones fueron tratados con concentraciones crecientes de glicerol en PBS (30%, 50%, 70%, 100% durante 10 minutos cada una). Una vez en glicerol puro se procedió a montarlos en cámaras de visualización para confocal llenas de glicerol.

Tinción de Nissl fluorescente en embriones enteros

La tinción de Nissl permite distinguir cuerpos neuronales y fue llevada a cabo en embriones enteros de Medaka fijados como indicado anteriormente en estadio de eclosión (aproximadamente 8 días).

Se procedió inicialmente a la remoción de la piel de la cabeza y de los ojos con el cuidado de no dañar la zona de interés. Esto fue llevado a cabo manualmente con *forceps* y una aguja de tungsteno usando una lupa estereoscópica con zoom. Luego se lavaron los embriones con PBTr por 30 minutos cambiando la solución cada 10 minutos. Para aumentar la permeabilidad del tejido se incubaron los embriones por 10 minutos en proteinasa K 10µg/µL por 5 minutos y luego se lavaron con PBTr por 10 minutos, repitiendo el lavado tres veces. A continuación se diluyó doscientas veces con PBS el NeuroTrace 530/615 red y en esta solución se incubaron los embriones toda la noche a 4°C y en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo los embriones fueron lavados con PBTr por 3 horas cambiando la solución cada media hora.

Los embriones fueron montados para su observación en confocal en cámaras llenas de glicerol 100% o incluidos en agarosa.

5.2.9. Tinción axonal con trazadores lipofílicos de eferentes habenules

Para los estudios sobre la conectividad eferente de la habénula se realizaron marcajes diferenciales de habénula izquierda y derecha con trazadores lipofílicos. Se usaron larvas eclosionadas (st 39) de Medaka silvestres y transgénicos DE-GFP fijadas y posteriormente conservadas en 0,5% PFA en PBS (ver 2.1), cuyos ojos y piel

de la cabeza fueron removidos mecánicamente como en 2.8. De acuerdo a un protocolo modificado de Yáñez & Anadón 1996 (Aizawa y col, 2005) se aplicaron directamente cristales de trazadores DiAsp o DiD a los núcleos habenules derecho e izquierdo para la marcación diferencial de sus eferentes. Para ello se disuelven el DiD/DiAsp en 100% etanol (o cloroformo) hasta una concentración aproximada del 2% (m/V). Una gota de esta solución se vierte sobre un portaobjeto y se agita con una aguja de tungsteno hasta que se seque para recoger cristales. Usando un micromanipulador se llevan los cristales recogidos con la aguja y se depositan en la habénula correspondiente. Posterior a ello, se incuban los cerebros en 0,5%PFA a 4°C y en oscuridad por 1-2 días para permitir la difusión del trazador hasta el núcleo interpeduncular.

Una vez finalizado el periodo de incubación se procede al análisis por microscopía confocal montando en agarosa al 2% en PBS.

5.2.10. Reconstrucciones tridimensionales

Las imágenes obtenidas en el microscopio confocal para los diferentes experimentos fueron deconvolucionadas usando los programas Huygens Professional y Huygens Scripting. Los parámetros de deconvolución fueron elegidos de acuerdo a las características de cada una de las imágenes. Las series de imágenes deconvolucionadas fueron usadas para obtener las reconstrucciones tridimensionales usando la aplicación Volocity (Improvision), para Macintosh.

6. RESULTADOS

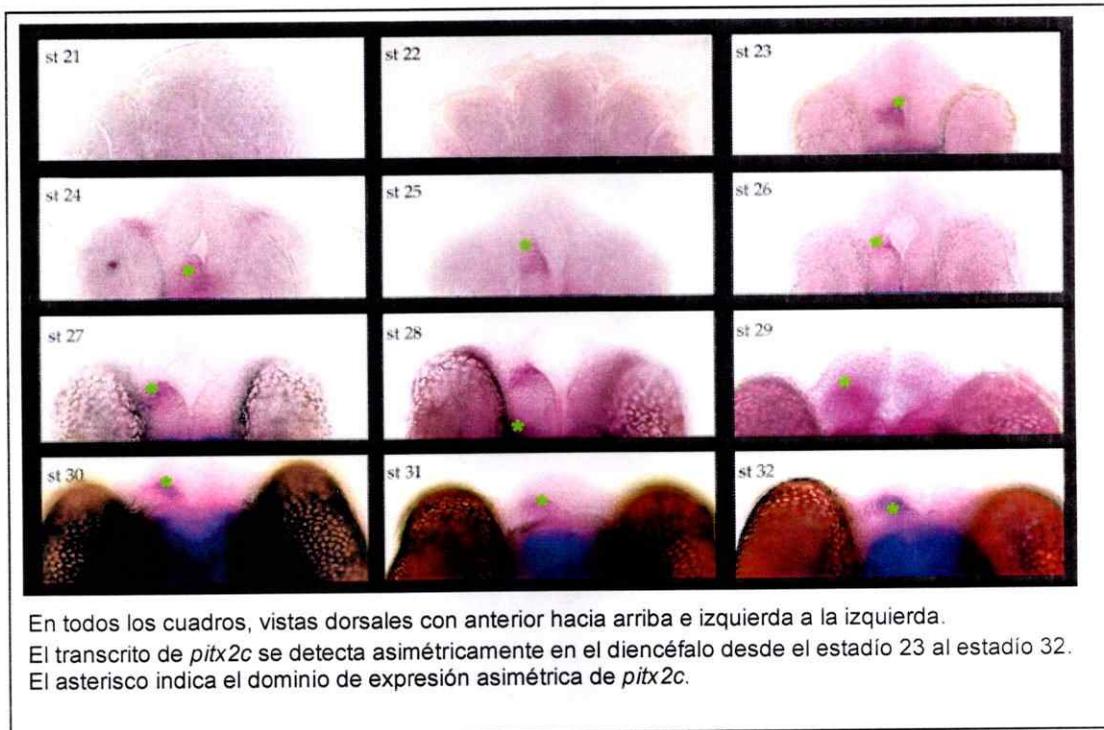
6.1. Asimetría molecular: expresión de Pitx2 en el diencéfalo de Medaka

De acuerdo a la literatura existente (Concha y col, 2000) y a estudios preliminares de nuestro laboratorio, *pitx2c*, el gen efector de la vía nodal, se expresa en forma asimétrica en el diencéfalo izquierdo de pez cebra previamente a la morfogénesis asimétrica. Con el fin de establecer si algo similar acontece en Medaka, examinamos el patrón de expresión de *pitx2* de Medaka durante el desarrollo, utilizando una ribosonda generada a partir de un cDNA presente en nuestro laboratorio.

A partir del estadio 22, *pitx2* se expresa en el diencéfalo y en el estadio 23 se nota claramente que esta expresión se localiza a la izquierda de la línea media. La expresión asimétrica de *pitx2* en el diencéfalo es mantenida por aproximadamente tres días, hasta el estadio 32, después del cual ya no es detectable (Figura 6.1.1).

Por lo tanto, la expresión asimétrica transiente de *pitx2* en el lado izquierdo del cerebro es concordante con lo descrito para pez cebra lo que indica que también en Medaka existe una asimetría molecular que empieza de forma previa al desarrollo morfológico diferencial izquierda-derecha y que se mantiene hasta etapas del desarrollo más avanzadas.

Figura 6.1.1. Análisis por Hibridación *in situ* de la expresión de Pitx2 en diencefalo de Medaka.



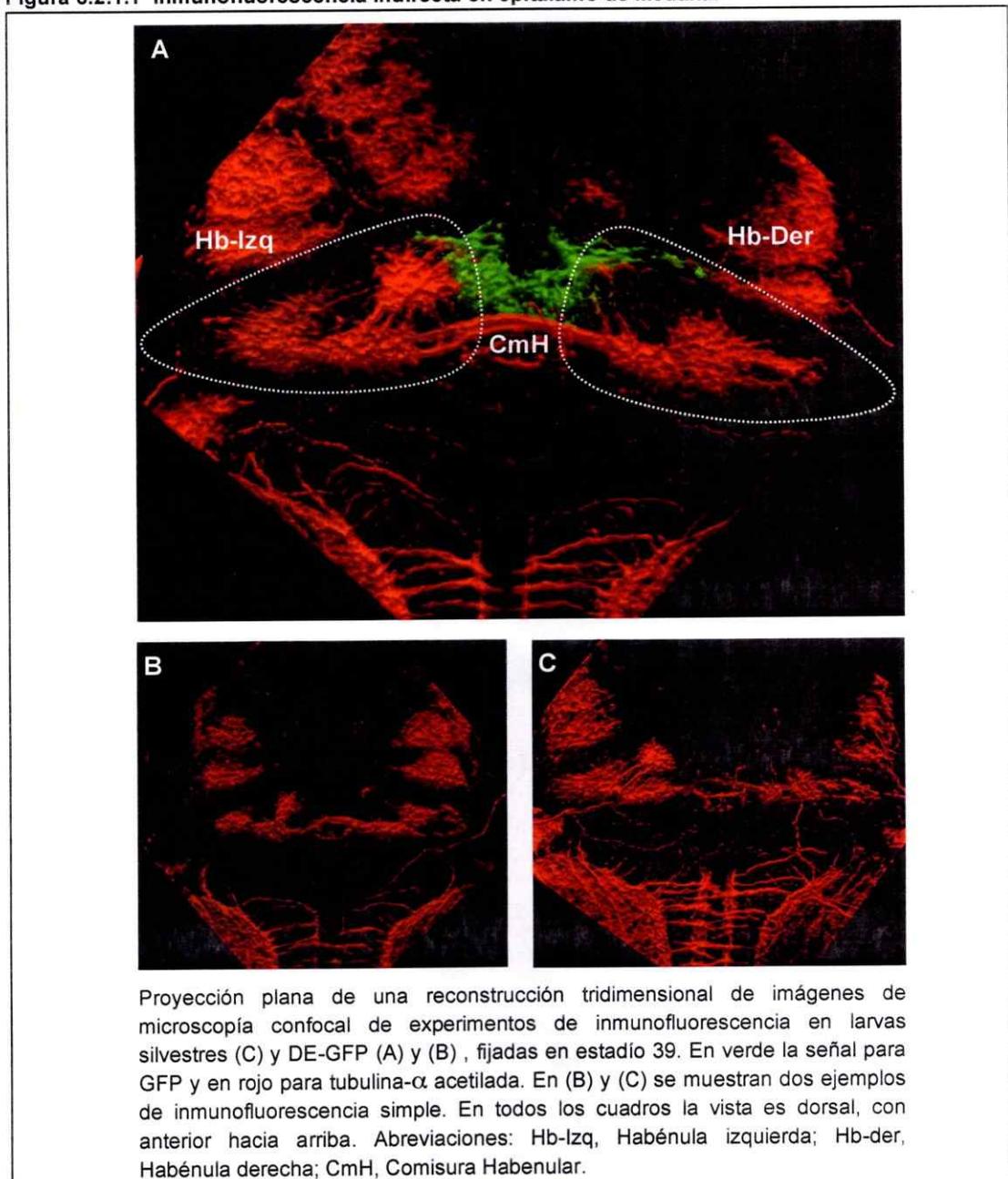
6.2. Asimetría morfológica

6.2.1. Habénula

El epitálamo de teleósteos presenta asimetrías anatómicas notables en el eje izquierda-derecha en relación a los núcleos habenulares y al órgano parapineal (Concha & Wilson, 2001; Concha y col, 2000; Concha y col, 2003; introducción de la presente tesis). En pez cebra se ha descrito que los núcleos habenulares derecho e izquierdo presentan una marcada asimetría en cuanto al contenido de neuropila (Concha y col, 2000; Concha y col, 2003). Con el fin de investigar la existencia de este tipo de asimetría en Medaka analizamos el contenido de neuropila habenular por inmunofluorescencia indirecta simple contra tubulina- α acetilada o doble contra tubulina- α acetilada y contra GFP en larvas DE-GFP en st 39 (ver 2.1).

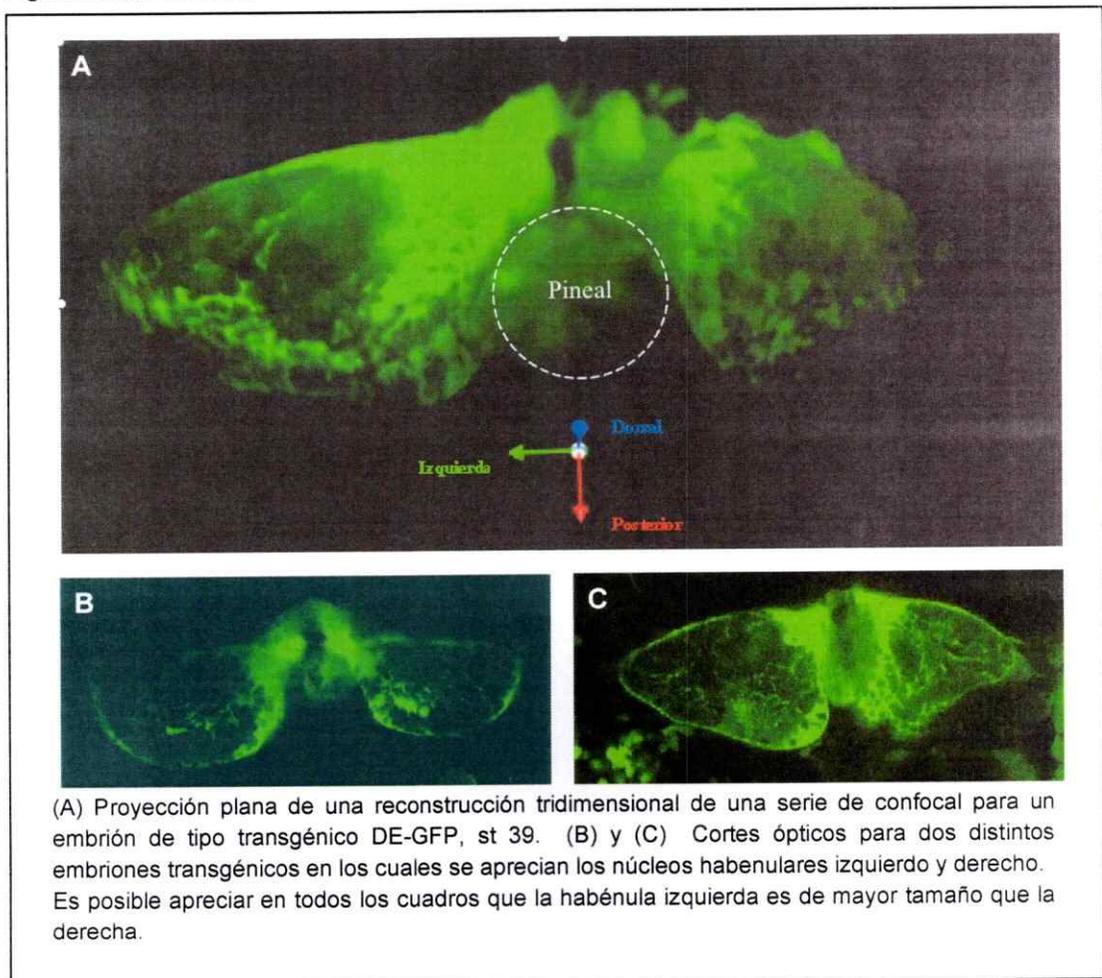
La figura 6.2.1.1 muestra que al igual que en pez cebra, existe una marcada diferencia en el contenido de neuropila entre la habénula izquierda y derecha de Medaka, la que es incluso más notoria que lo observado en pez cebra.

Figura 6.2.1.1 Inmunofluorescencia indirecta en epítalamo de Medaka.



Mediante la observación *in vivo* de larvas de la cepa transgénica DE-GFP, pudimos constatar que el tamaño del núcleo habenular izquierdo es mayor que el del núcleo habenular derecho, y que el arreglo neuronal y de circuitería axonal es también distinto en los dos núcleos habenulares (Figura 6.2.1.2).

Figura 6.2.1.2 Análisis *in vivo* de larvas DE-GFP en estadio 39



240

Para investigar si la existencia de arreglos distintos de neuropila en los núcleos habenules derecho e izquierdo se ve reflejado en una organización diferencial de los cuerpos celulares, realizamos una tinción de Nissl fluorescente en embriones enteros de la cepa DE-GFP, con el fin de poder visualizar al mismo tiempo el arreglo de los dominios de neuropila en verde y los cuerpos celulares en rojo. Como se observa en la Figura 6.2.1.3, la señal GFP de neuropila del transgénico y la tinción de Nissl son en gran medida complementarias. De hecho, es posible visualizar que existen aglomerados estrechos de neuropila que se encuentran rodeados de cuerpos celulares, y que ellos presentan marcadas asimetrías izquierda-derecha. La habénula izquierda presenta dos grandes zonas libres de cuerpos celulares en la parte dorsal donde se ubica una densa neuropila, mientras que la habénula derecha sólo presenta una. En zonas más ventrales, el núcleo izquierdo asimétrico medial y anterior no se encuentra y para ambas habénulas se distingue un solo núcleo, como se muestra en la Figura 6.2.1.4. Estos resultados sugieren, nuevamente, un arreglo diferente de los subnúcleos y circuitos habenules internos entre la izquierda y la derecha.

Figura 6.2.1.3. Tinción de Nissl fluorescente en larvas DE-GFP st 39

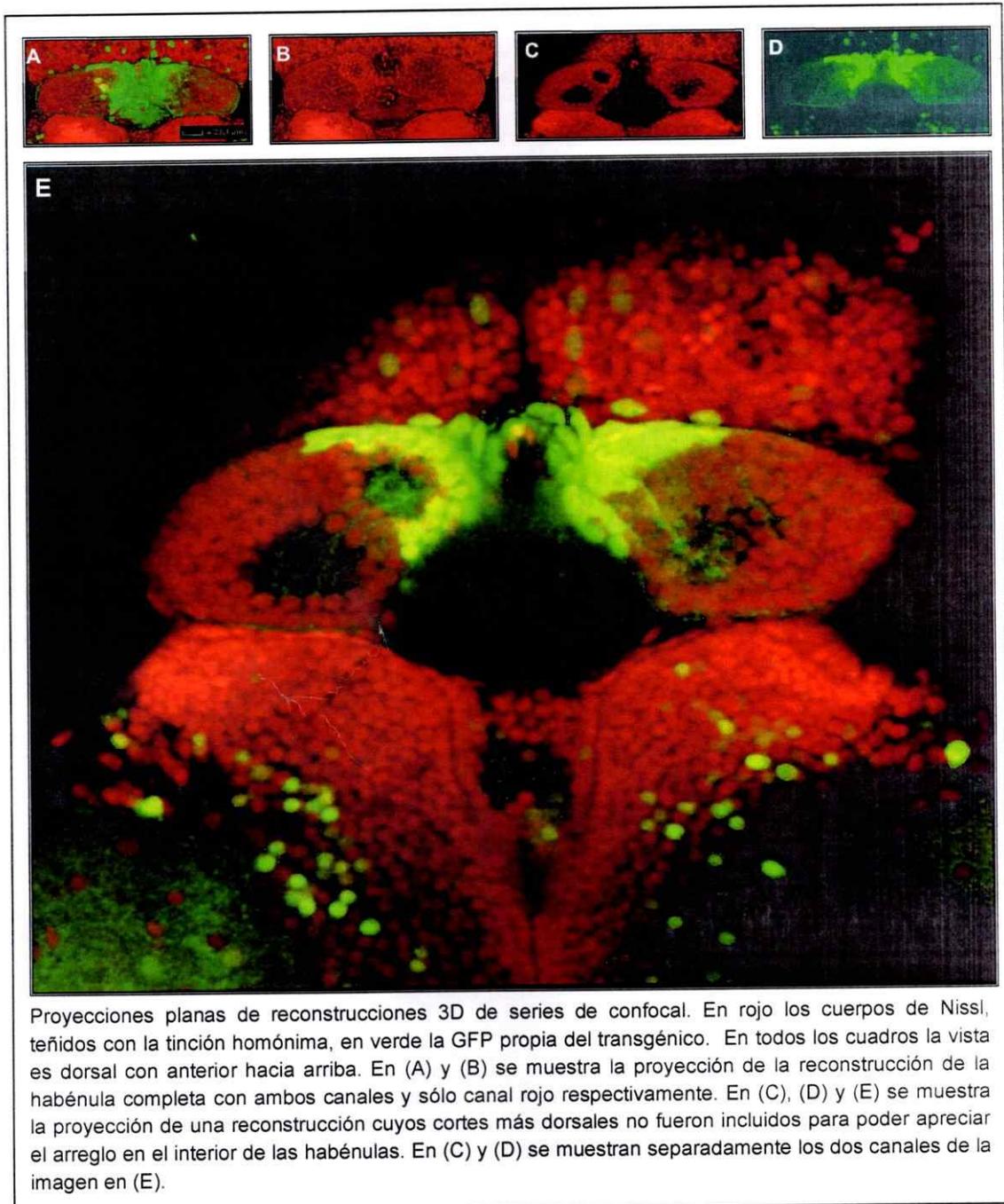
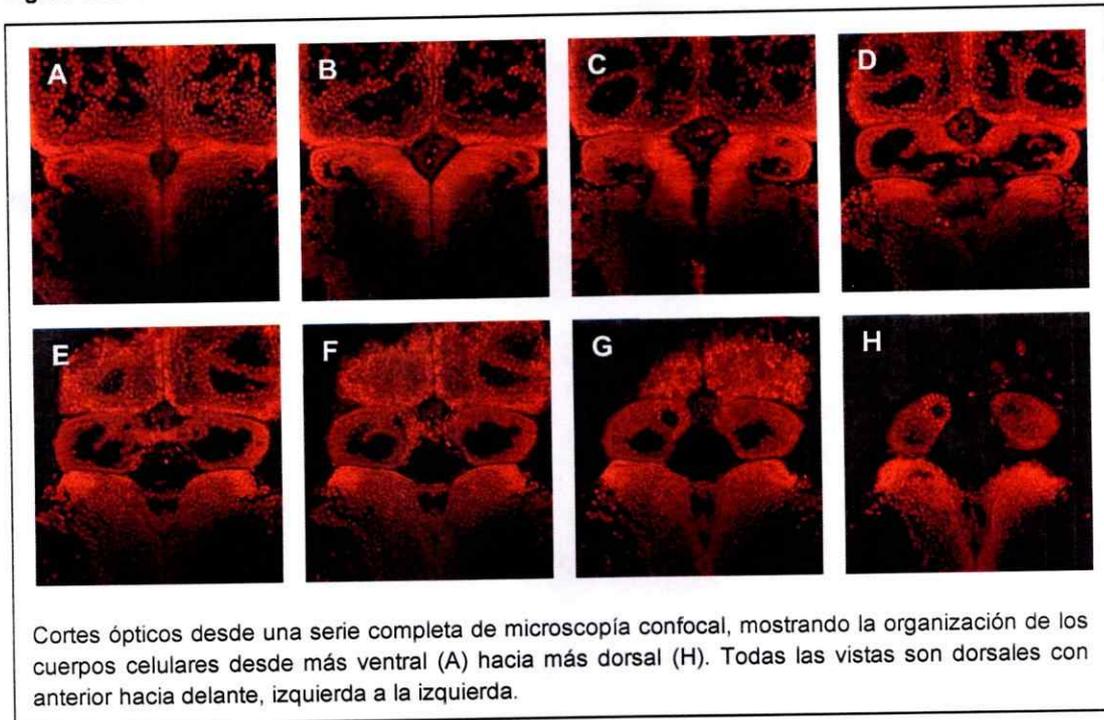


Figura 6.2.1.4. Tinción de Nissl fluorescente en larvas de Medaka st39

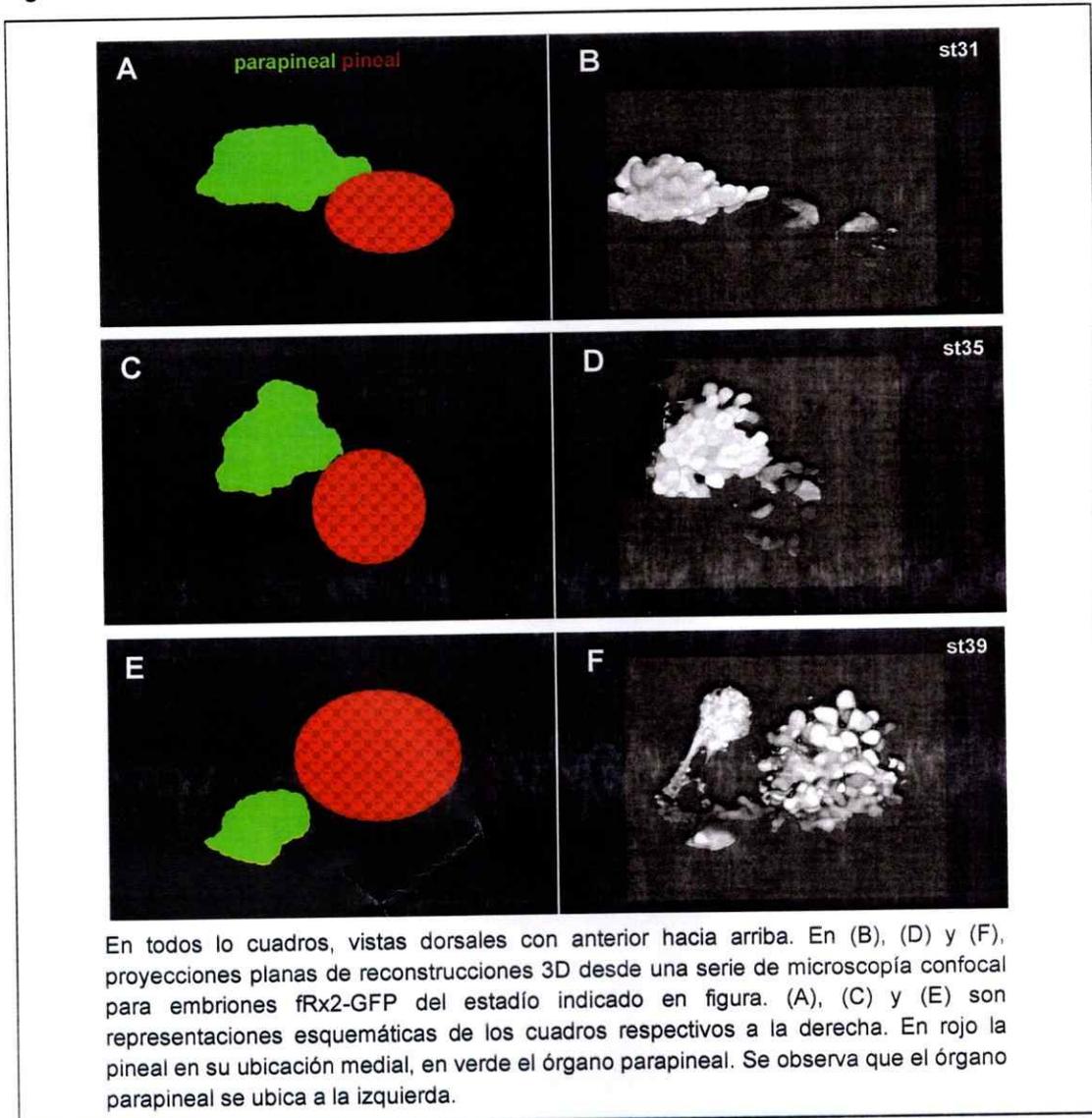


6.2.2. Órgano parapineal

El órgano parapineal en pez cebra se ubica a la izquierda de la línea media y establece conexiones exclusivamente con el núcleo habenular ipsilateral. Con el fin de estudiar la posición del órgano parapineal en Medaka y su eventual asimetría en la conectividad con la habénula realizamos observaciones *in vivo* de embriones transgénicos fRx2-GFP, los cuales expresan la GFP en forma específica en el complejo pineal (Figura 6.2.2.1).

En la figura es posible observar que el órgano parapineal de Medaka (en verde) se encuentra a la izquierda del órgano pineal (en rojo) y por lo tanto a la izquierda de la línea media, sugiriendo que la migración asimétrica del órgano parapineal está conservada en esta especie.

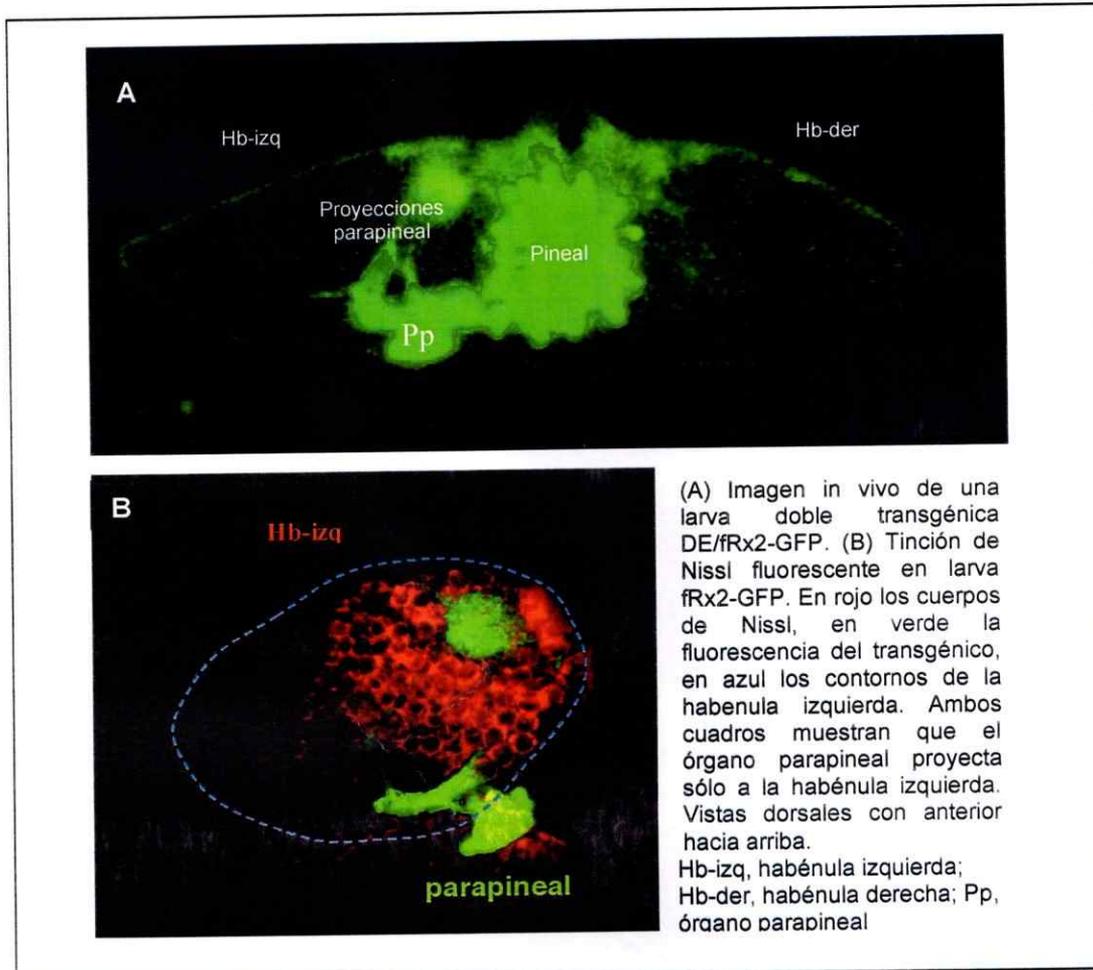
Figura 6.2.2.1 Análisis *in vivo* en embriones de Medaka, cepa fRx2-GFP



Con el fin de analizar la relación entre el órgano parapineal y la habénula se cruzaron peces transgénicos DE-GFP con fRX2-GFP para obtener dobles transgénicos que permitan visualizar habénula y parapineal al mismo tiempo. La imagen *in vivo* de una larva de este doble transgénico se muestra en la Figura 6.2.2.2. Es posible notar

que el órgano parapineal se ubica a la izquierda y que proyecta de forma ipsilateral a la habénula izquierda.

Figura 6.2.2.2 El órgano parapineal proyecta exclusivamente a la habénula izquierda.

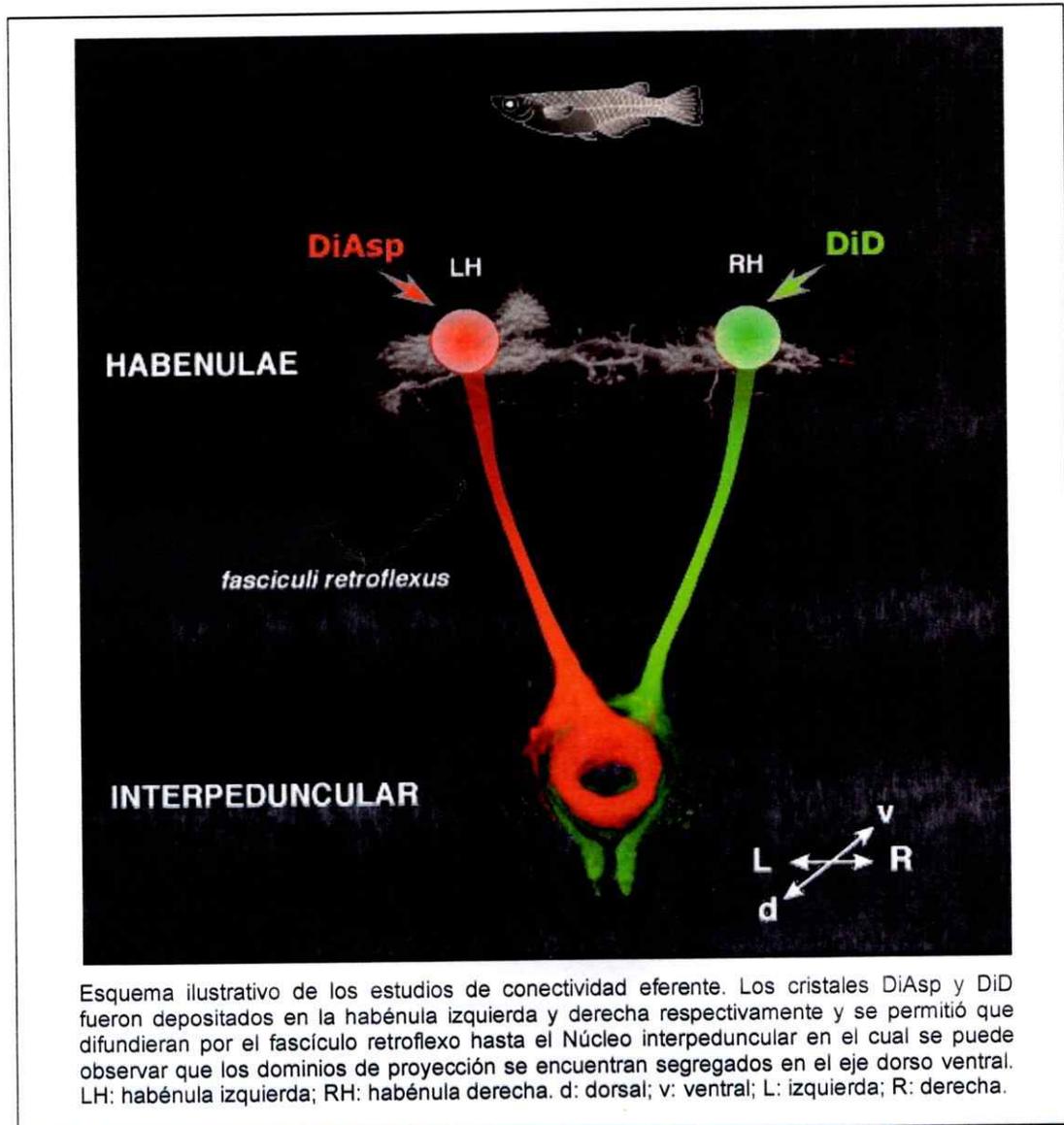


6.3. Asimetrías de conectividad en el NIP

Se ha descrito que la organización asimétrica izquierda-derecha de la habénula se traduce en una segregación dorsoventral en el arreglo de los eferentes habenulares en el núcleo interpeduncular (Aizawa y col, 2005; Gamse y col, 2005). Con este

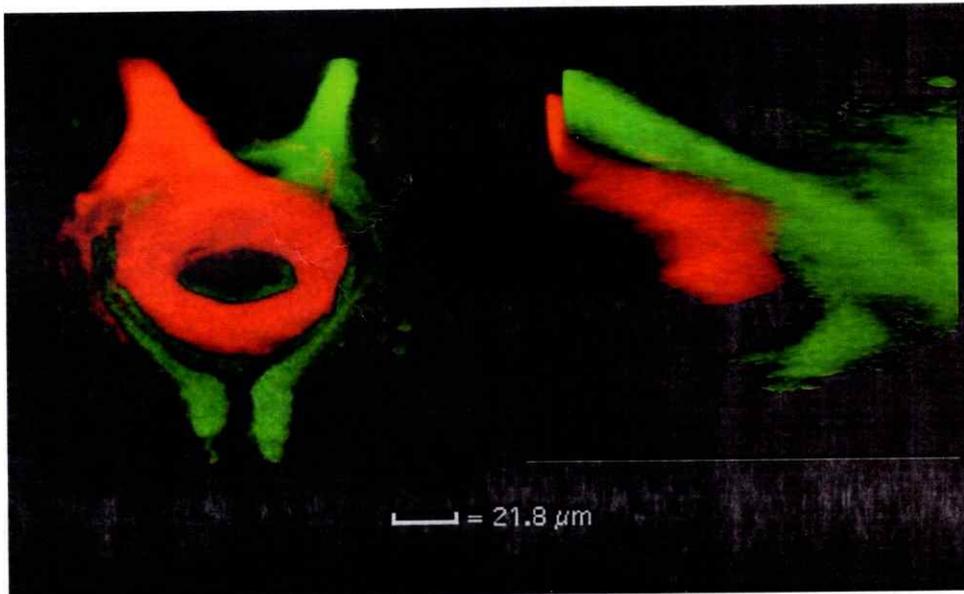
antecedente, quisimos investigar si esta segregación de la conectividad habenular eferente en el NIP se conserva en Medaka. Para esto realizamos marcaciones diferenciales de habénula izquierda y derecha con trazadores lipofílicos como fue descrito en 5.2.10. Para estos experimentos utilizamos larvas en estadio 39 y los resultados se muestran en el esquema de la Figura 6.3.1.

Figura 6.3.1 Esquema de los estudios de conectividad eferente en larvas de Medaka en st 39.



Nuestros resultados muestran que los eferentes habenulares izquierdos y derechos llegan al NIP en dominios segregados en el eje dorso ventral, tal como fue descrito para pez cebra. La habénula izquierda proyecta en un dominio dorsal mientras que los eferentes que provienen del núcleo habenular derecho llegan a la porción ventral del NIP. En la figura 6.3.2 se muestra una ampliación del resultado mostrado en la figura 6.3.1. Se aprecia como las marcaciones roja y verde no se sobreponen, indicando que los dominios son efectivamente segregados en el eje dorso ventral. Esto significa que en Medaka como en pez cebra, la información izquierda-derecha presente a nivel de la habénula es transformada en una información dorso-ventral a nivel de las proyecciones al cerebro medio.

Figura 6.3.2. Los eferentes habenulares izquierdos y derechos están segregados en el NIP.



Proyecciones planas de reconstrucciones 3D del NIP de Medaka st39. Los eferentes del núcleo habenular izquierdo y derecho se muestran en rojo y verde, respectivamente. En el cuadro de la izquierda una vista dorsal, con anterior hacia delante. A la derecha la misma reconstrucción en vista lateral, dorsal hacia la izquierda. Es posible visualizar que los eferentes habenulares llegan al NIP de forma segregada, formando dos anillos ordenados en el eje dorso-ventral. La habénula izquierda proyecta en dorsal, la derecha en ventral.

6.4. Clonamiento de genes de la familia KCTD de Medaka

De acuerdo a la literatura, la segregación de los eferentes habenulares en el NIP podría ser consecuencia de la existencia de una organización en sub-núcleos de la habénula misma (Aizawa y col, 2005; Gamse y col, 2005). De acuerdo a estudios en pez cebra, los subnúcleos de la habénula son posibles de identificar en estadios temprano del desarrollo por la expresión diferencial de genes de la familia KCTD: *leftover (lov)*, *righton (ron)*, y *dexter (dex)* (Gamse y col, 2003 y 2005; ver introducción de esta tesis). De esta forma, nos planteamos clonar los genes ortólogos de *lov*, *ron* y *dex* de Medaka, con el fin de, en el futuro, poder analizar la organización subnuclear de la habénula de Medaka y su relación con las proyecciones eferentes hacia el NIP. Los detalles experimentales del clonamiento de estos genes se entregan en Materiales y Métodos en las secciones 5.1.4, 5.1.5 y 5.2.4. y las secuencias nucleotídicas se incluyen como material anexo.

Con las secuencias obtenidas y traducidas a secuencias proteicas se construyó un árbol análogo al publicado por Gamse y col (2005), que incluye las secuencias para Medaka. De acuerdo a la literatura, estos genes contienen un dominio característico en el amino terminal homólogo a un dominio de tetramerización de canal de potasio sensible a voltaje pero carecen de otras características comunes a las proteínas de tipo canal (Gamse y col, 2005; Marchler-Bauer y col, 2003). Según los análisis de Gamse y col, (2005), los genes de la familia KCTD de pez cebra, ratón y humano se organizan en cuatro grupos. Nuestros genes se enmarcan en estos mismos cuatro grupos (Figura 6.1.1).

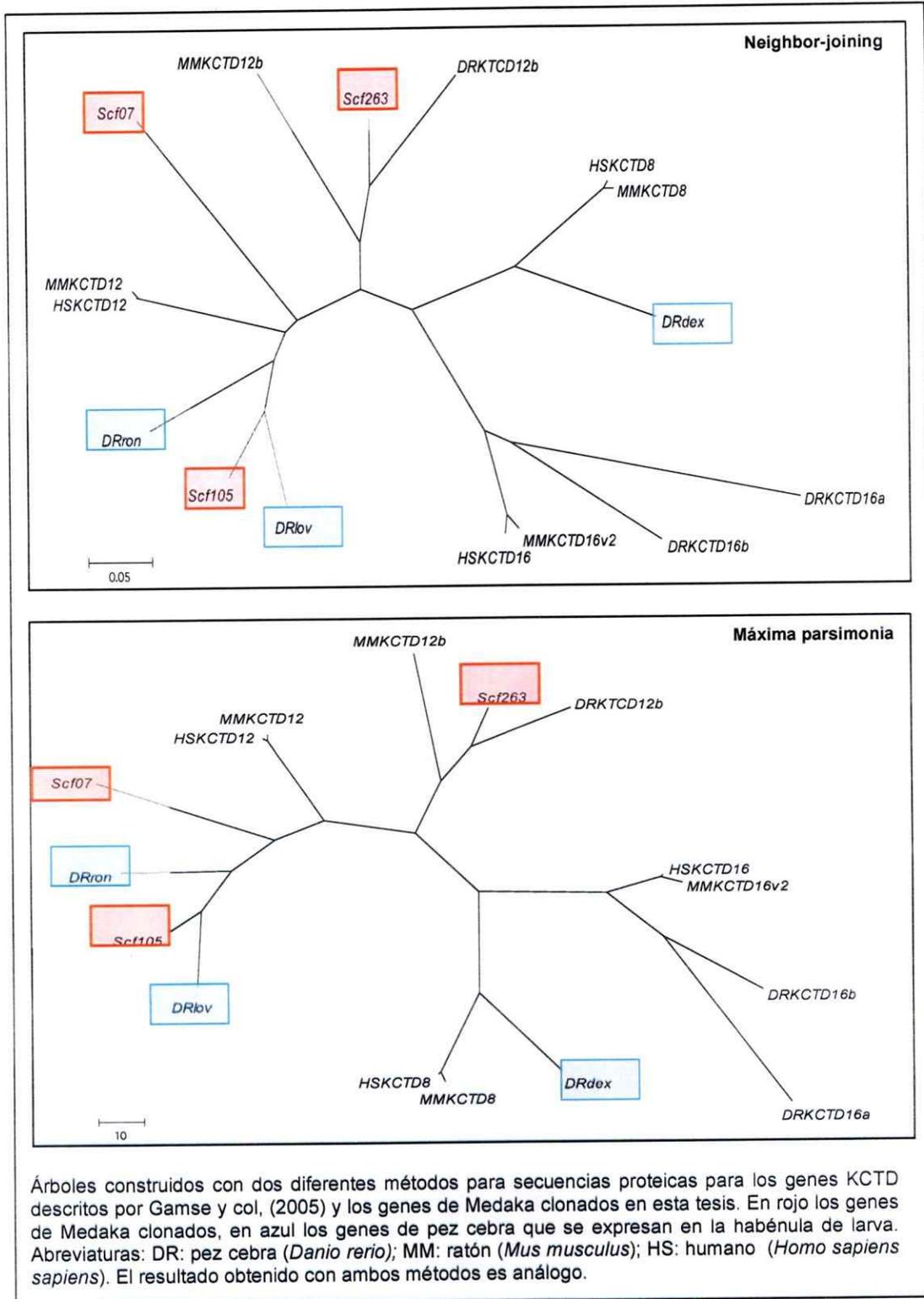
El alineamiento fue realizado con ClustalX 1.83 y los árboles con el programa Mega 3.1. Los árboles fueron construidos con los métodos Neighbor-joining y Máxima parsimonia con *bootstrap* de 1000 repeticiones. Los árboles resultantes son análogos. De acuerdo a estos análisis, dos de los tres genes de Medaka que clonamos se ubican en el mismo grupo de los genes *lov* y *ron* de pez cebra.

La proteína putativa codificada por el gen ubicado en el *scaffold* 105 (Scf105) muestra una identidad con *lov* de pez cebra del 80% y este resultado mantiene coherente con el análisis de la secuencia nucleotídica, sugiriendo fuertemente que se trata del ortólogo de este gen. El otro gen que se ubica en este grupo es el Scf07 que podría corresponder al ortólogo de *ron*, a pesar de que en este caso el resultado no es tan unívoco como en el caso anterior.

El tercer gen (Scf263) se ubica en el grupo compuesto por los genes KCTD12b de pez cebra y ratón, y también en este caso el análisis de la secuencia nucleotídica confirma el resultado mencionado. En pez cebra, este gen se expresa en la retina pero no en el diencéfalo.

No encontramos ningún gen perteneciente al grupo de *dex*, sin embargo es importante evidenciar que estos genes tienen un alto grado de similitud entre sí, por lo que el patrón de expresión de estos genes podría variar entre especies. De esta forma, los futuros experimentos de hibridación *in situ* proporcionarán información valiosa sobre las relaciones entre estos genes y sus ortólogos en pez cebra, en particular en relación a la organización sub-nuclear de la habénula..

Figura 6.4.1 – Árbol sobre secuencias proteicas de los genes KCTD.



Árboles construidos con dos diferentes métodos para secuencias proteicas para los genes KCTD descritos por Gamse y col, (2005) y los genes de Medaka clonados en esta tesis. En rojo los genes de Medaka clonados, en azul los genes de pez cebra que se expresan en la habénula de larva. Abreviaturas: DR: pez cebra (*Danio rerio*); MM: ratón (*Mus musculus*); HS: humano (*Homo sapiens sapiens*). El resultado obtenido con ambos métodos es análogo.

7. DISCUSIÓN

La mayor parte de los animales presenta un plan corporal bilateral basado sobre tres ejes: antero-posterior, dorso-ventral e izquierda-derecha. Es importante evidenciar que en realidad no existe un eje izquierdo-derecho único, sino que dos ejes medio-laterales - el "izquierdo" y el "derecho" - que se propagan desde la línea media en ambas direcciones (Palmer, 2004).

Del punto de vista teórico estos dos ejes son imágenes especulares y por lo tanto un cuerpo bilateralmente simétrico sería la consecuencia natural de un plan corporal con dos ejes establecidos. En realidad la mayoría de los animales, sino todos, presentan asimetrías morfológicas notorias entre el lado izquierdo y derecho del cuerpo, indicando que existen mecanismos adicionales que diferencian un eje medio-lateral del otro (Palmer, 2004). El hecho de que estas asimetrías sean conservadas entre especies y en algunos casos consistentes entre individuos de la misma especie, indica la existencia de mecanismos que establecen y controlan la asimetría izquierda-derecha y la lateralidad de ésta durante el desarrollo. Estos mecanismos se han estudiado intensamente en los últimos años en modelos experimentales bien establecidos (pez cebra, rana, pollo y ratón), sobretodo en relación al posicionamiento de los órganos internos (Tian & Meng, 2006; Bisgrove y col, 2003; Long y col, 2003; Horne-Badovinac y col, 2003; Mercola & Levin, 2001; Branford y col, 2000; Sampath y col, 1997;).

La información obtenida en estos estudios ha revelado grandes similitudes entre vertebrados pero también características más peculiares de alguna clase o especie. Cabe preguntarse entonces cuales son los aspectos del establecimiento de la

asimetría I/D que corresponden a mecanismos ancestrales conservados y cuales son variaciones especie-específicas. Además es interesante preguntarse a qué obedecen estas variaciones (p.e. morfología del embrión, tiempo de desarrollo, modo de vida). Para contestar estas preguntas es necesario ampliar el espectro de modelos utilizados avanzando hacia estudios comparados del establecimiento de la asimetría izquierda-derecha en el desarrollo.

Coherente con esta necesidad, el objetivo de ésta tesis fue proponer el pez teleosteo Medaka (*Oryzias latipes*) como modelo de asimetría izquierda-derecha, en particular en relación al desarrollo de la asimetría del sistema nervioso central. En apoyo a nuestra propuesta, durante el curso de esta tesis se publicaron dos artículos que exploran los mecanismos genéticos involucrados en el desarrollo de las asimetrías izquierda-derecha de los órganos internos de Medaka (Bajoghli y col, 2007; Soroldoni y col, 2007). Estos estudios indican que pez cebra y Medaka comparten vías genéticas similares en el control de las asimetrías izquierda-derecha, sin embargo, existen diferencias en el patrón de expresión espacial y/o temporal de ciertos componentes genéticos indicando la coexistencia de estrategias especie específicas.

De acuerdo a la literatura desarrollada fundamentalmente en pez cebra, existe una asimetría molecular previa al desarrollo de las asimetrías morfológicas la que se caracteriza por la expresión asimétrica izquierda de distintos componentes de la vía Nodal (Shiratori y col, 2006; Long y col, 2003; Burdine & Shier, 2000; Bisgrove y col, 2000; Rebagliati y col, 1998; Essner y col, 2000; Concha y col, 2000; Liang y col, 2000).

En nuestro primer objetivo analizamos el patrón de expresión del efector de la vía Nodal en el diencéfalo de Medaka, utilizando hibridación *in situ* en el embrión entero. Encontramos que *pitx2c* tiene expresión transiente y asimétrica en el diencéfalo izquierdo durante la somitogénesis. Esto significa que al igual que en pez cebra, la vía Nodal se activa en forma unilateral en el cerebro del embrión y que su señalización está presente en estadios anteriores al desarrollo de las asimetrías morfológicas del cerebro.

En relación a la morfología del epitálamo (segundo objetivo), nuestros resultados muestran que el patrón izquierda-derecha de asimetrías morfológicas en Medaka es similar al patrón descrito en pez cebra. La habénula izquierda tiene un contenido de neuropila más profuso que la habénula derecha y presenta una organización distinta, sobretodo en relación al arreglo de los cuerpos celulares en la zona más dorsal y anterior. Además la habénula izquierda es el único blanco de las proyecciones del órgano parapineal que se ubica a la izquierda de la línea media, tal como ocurre en pez cebra. Gracias a la observación de los transgénicos fRx2-GFP y fRx2/DE-GFP fue posible visualizar directamente e *in vivo* la organización del órgano parapineal y de sus proyecciones hacia el núcleo habenular izquierdo siendo este un acercamiento experimental importante, dado que no existe al momento en pez cebra un transgénico que permita visualizar la habénula completa.

Desde el punto de vista de la conectividad, el tercer objetivo de esta tesis, se estudió la topología de los eferentes habenulares en el núcleo interpeduncular. Tal como se observa en pez cebra, la habénula izquierda de Medaka proyecta a la zona dorsal del NIP mientras que la habénula derecha proyecta a la región ventral de este

núcleo. Los eferentes se encuentran por lo tanto segregados, confirmando la transmisión al NIP de las asimetrías epitalámicas.

Estos resultados muestran que en el epitalamo de Medaka existen asimetrías conspicuas en el eje izquierda-derecha y que el patrón general de estas asimetrías es conservado entre Medaka y el modelo tradicional de pez cebra. Además, desde el punto de vista molecular la expresión de *pitx2c* en el diencefalo izquierdo (Fig.6.1.1) apoya la hipótesis de mecanismos genéticos conservados que actuarían en todos los vertebrados.

La señalización de la vía Nodal sería uno de esos mecanismos y se ha demostrado su rol en regular la lateralidad de la asimetría en el cerebro de pez cebra (Concha y col, 2000). Existiría entre las dos mitades del cerebro una competencia para el desarrollo de las características morfológicas izquierdas dado que ambas mitades son en principio competentes para ello. Nodal estaría introduciendo en esta competencia una "ventaja competitiva" hacia el lado izquierdo, determinando una lateralidad consistente entre individuos de una población (Concha y col, 2003).

A pesar del alto grado de conservación en el patrón global de asimetría I/D encontrado entre estas dos especies relativamente cercanas (pez cebra y Medaka), es interesante destacar que existen diferencias notorias entre ambos modelos. En relación al contenido de neuropila en la habénula izquierda de Medaka, las asimetrías morfológicas son incluso más notorias que en pez cebra (Fig.6.2.1.1) siendo este un fenómeno interesante de explicar en relación a los posibles mecanismos especie-específicos mencionados anteriormente. Además la organización cito-arquitectónica de la habénula de Medaka, en relación a la disposición de los cuerpos celulares en la

zona dorsal, presenta un aspecto no descrito para pez cebra, siendo nuestra tinción de Nissl fluorescente en embrión completo (Fig.6.2.1.3) un acercamiento experimental novedoso.

Las variaciones existentes entre Medaka y pez cebra dan cuenta por lo tanto de los mecanismos especie-específicos en coacción con mecanismos más generales. Para poder identificar y estudiar de forma sistemática dichas variaciones es necesario estudiar la organización subnuclear de la habénula de Medaka, con el fin de evaluar el grado de conservación topológica real entre estos dos modelos.

El cuarto y último objetivo de este trabajo se planteó en acuerdo con esta necesidad. Se clonaron genes de Medaka pertenecientes a la familia KCTD. Se obtuvieron tres genes que según nuestro análisis de secuencias corresponden probablemente a los ortólogos de *lov* (*Scf105*), *ron* (*Scf07*) y del gen KCTD12b (*Scf263*) de pez cebra. En el caso de los genes *Scf105* y *Scf263* el análisis cladístico arrojó resultados claros, incluso confirmados por análisis de las secuencias nucleotídicas indicando que el *Scf105* correspondería al ortólogo de *lov* y *Scf263* al gen KCTD12b. De acuerdo a nuestro análisis, el gen *Scf 07* podría corresponder al ortólogo de *ron* ya que se ubicó en el grupo esperado en una posición cercana también a los genes KCTD12 de humano y ratón. Sin embargo se ha descrito expresión del gen KCTD12 en la habénula de ratón (Gamse y col, 2005) indicando que posiblemente este gen se expresaría en la habénula de Medaka como esperamos.

El estudio del patrón de expresión de los genes que se expresen en habénula proporcionará una visión más clara de la organización en territorios de esta estructura

en Medaka con la cual ampliar y profundizar las observaciones morfológicas incluidas en este trabajo.

La existencia de un modelo de asimetría izquierda-derecha alternativo y complementario a pez cebra, como lo es Medaka, abre la posibilidad de acceder a estudios comparados que permitan entender de forma más completa los mecanismos genéticos y morfogenéticos involucrados en el desarrollo de la asimetría I/D del embrión. En este sentido es interesante determinar como se establecen las diferencias antes mencionadas investigando por ejemplo si la relación entre el desarrollo de la neuropila de la habénula izquierda y la presencia del órgano parapineal tiene alguna relación con el tamaño relativo de estas estructuras, siendo el órgano parapineal de Medaka aparentemente más grande que el de pez cebra. Otro aspecto divergente es la organización cito-arquitectónica de la habénula en relación sobretodo a la zona dorsal de la habénula izquierda de Medaka. Determinar si existe una organización similar en pez cebra, y si ésta se ubica en territorios topológicamente y/o molecularmente equivalentes podría aportar información valiosa sobre la morfogénesis habenular.

Aún más, resultados de nuestro laboratorio indican que entre Medaka y pez cebra existe una diferencia notoria en la ubicación del dominio de la habénula izquierda que recibe las aferencias desde el órgano parapineal. Investigar como se desarrolla la conectividad entre el órgano parapineal y la habénula izquierda en términos temporales y topológicos podría permitirnos entender qué mecanismos están involucrados en el establecimiento de la conectividad parapineal-habenular, y de que manera estos mecanismos involucran, por ejemplo, expresión génica y migración celular en estas dos especies. Estudios de este tipo son la base para comenzar a

entender la naturaleza de la interacción el órgano parapineal y habénula durante el establecimiento de las asimetrías izquierda-derecha del epitálamo.

El objetivo de nuestro laboratorio es poder en el futuro enlazar los procesos morfogenéticos con el aspecto funcional a nivel de actividad neuronal y finalmente con la conducta del animal y los factores epigenéticos, los cuales vuelven a impactar sobre las redes génicas durante la evolución. Este marco conceptual se denomina "*bottom-up*": desde la genética a la conducta.

8. CONCLUSIÓN

El epitálamo de *Medaka* presenta asimetrías izquierda-derecha en términos de expresión génica, morfología habenular, posicionamiento del órgano parapineal y conectividad eferente cuyo patrón general es conservado con respecto a pez cebra.

Medaka es por lo tanto un modelo interesante para estudiar los mecanismos genéticos y del desarrollo implicados en el establecimiento de las asimetrías cerebrales.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aizawa H, Bianco IH, Hamaoka T, Miyashita T, Uemura O, Concha ML, Russell C, Wilson, SW, Okamoto H. 2005. Laterotopic representation of left-right information onto the dorso-ventral axis of a zebrafish midbrain target nucleus. *Curr Biol* 15: 238-43
- Bajoghli B, Aghaallaei N, Soroldoni D, Czerny T. 2007. The roles of Groucho/Tle in left-right asymmetry and Kupffer's vesicle organogenesis. *Dev Biol* 303: 347-61
- Barrallo A, Gonzalez-Sarmiento R, Garcia-Isidoro M, Ciudad P, Porteros A, Rodriguez RE. 1999. Differential brain expression of a new beta-actin gene from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur J Neurosci* 11: 369-72
- Bisazza A, Rogers LJ, Vallortigara G. 1998. The origins of cerebral asymmetry: a review of evidence of behavioural and brain lateralization in fishes, reptiles and amphibians. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 411-26
- Bisgrove BW, Essner JJ, Yost HJ. 2000. Multiple pathways in the midline regulate concordant brain, heart and gut left-right asymmetry. *Development* 127: 3567-79
- Bisgrove BW, Morelli SH, Yost HJ. 2003. Genetics of human laterality disorders: insights from vertebrate model systems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4: 1-32
- Boorman CJ, Shimeld SM. 2002. The evolution of left-right asymmetry in chordates. *Bioessays* 24: 1004-11
- Branford WW, Essner JJ, Yost HJ. 2000. Regulation of gut and heart left-right asymmetry by context-dependent interactions between xenopus lefty and BMP4 signaling. *Dev Biol* 223: 291-306
- Branford WW, Yost HJ. 2004. Nodal signaling: Cryptic Lefty mechanism of antagonism decoded. *Curr Biol* 14: R341-3
- Brown NA, Wolpert L. 1990. The development of handedness in left/right asymmetry. *Development* 109: 1-9
- Burdine RD, Schier AF. 2000. Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation. *Genes Dev* 14: 763-76
- Capdevila J, Vogan KJ, Tabin CJ, Izpisua Belmonte JC. 2000. Mechanisms of left-right determination in vertebrates. *Cells* 101: 9-21
- Carlson JN, Glick SD. 1989. Cerebral lateralization as a source of interindividual differences in behavior. *Experientia* 45: 788-98

- Christoffels A, Koh EG, Chia JM, Brenner S, Aparicio S, Venkatesh B. 2004. Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol Biol Evol* 21: 1146-51
- Concha ML, Burdine RD, Russell C, Schier AF, Wilson SW. 2000. A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron* 28: 399-409
- Concha ML, Wilson SW. 2001. Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J Anat* 199: 63-84
- Concha ML, Russell C, Regan JC, Tawk M, Sidi S, Gilmour D, Kapsimali M, Sumoy L, Goldstone K, Amaya E, Kimelman D, Nicolson T, Grunder S, Gomperts M, Clarke JDV, Wilson SW. 2003. Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality. *Neuron* 39: 423-38
- Concha ML. 2004. The dorsal diencephalic conduction system of zebrafish as a model of vertebrate brain lateralisation. *Neuroreport* 15: 1843-6
- Essner JJ, Branford WW, Zhang J, Yost HJ. 2000. Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by pitx2 isoforms. *Development* 127: 1081-93
- Essner JJ, Vogan KJ, Wagner MK, Tabin CJ, Yost HJ, Brueckner M. 2002. Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* 418: 37-8
- Furutani-Seiki M, Wittbrodt J. 2004. Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech Dev* 121: 629-37
- Gage PJ, Suh H, Camper SA. 1999. Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* 126: 4643-51
- Gamse JT, Kuan YS, Macurak M, Brosamle C, Thisse B, et al. 2005. Directional asymmetry of the zebrafish epithalamus guides dorsoventral innervation of the midbrain target. *Development* 132: 4869-81
- Gamse JT, Thisse C, Thisse B, Halpern ME. 2003. The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon. *Development* 130: 1059-68
- Govind CK. 1992. Claw asymmetry in lobsters: case study in developmental neuroethology. *J Neurobiol* 23: 1423-45
- Grabher C, Henrich T, Sasado T, Arenz A, Wittbrodt J, Furutani-Seiki M. 2003. Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. *Gene* 322: 57-66
- Hackett BP. 2002. Formation and malformation of the vertebrate left-right axis. *Curr Mol Med* 2: 39-66

- Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y. 2002. Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev Genet* 3: 103-13
- Hauptmann G, Gerster T. 1994. Two-color whole-mount in situ hybridization to vertebrate and Drosophila embryos. *Trends Genet* 10: 266
- Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S. 2006. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125: 33-45
- Horne-Badovinac S, Rebagliati M, Stainier DY. 2003. A cellular framework for gut-looping morphogenesis in zebrafish. *Science* 302: 662-5
- Kennedy DN, O'Craven KM, Ticho BS, Goldstein AM, Makris N, Henson JW. 1999. Structural and functional brain asymmetries in human situs inversus totalis. *Neurology* 53: 1260-5
- Levin M. 2005. Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mech Dev* 122: 3-25
- Levin M, Thorlin T, Robinson KR, Nogi T, Mercola M. 2002. Asymmetries in H+/K+-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* 111: 77-89
- Liang JO, Etheridge A, Hantsoo L, Rubinstein AL, Nowak SJ, Izpisua Belmonte JC, Halpern ME. 2000. Asymmetric nodal signaling in the zebrafish diencephalon positions the pineal organ. *Development* 127: 5101-12
- Liu C, Liu W, Lu MF, Brown NA, Martin JF. 2001. Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development* 128: 2039-48
- Long S, Ahmad N, Rebagliati M. 2003. The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. *Development* 130: 2303-16
- Loosli F, Koster RW, Carl M, Krone A, Wittbrodt J. 1998. Six3, a medaka homologue of the Drosophila homeobox gene sine oculis is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye. *Mech Dev* 74: 159-64
- Mercola M. 2003. Left-right asymmetry: nodal points. *J Cell Sci* 116: 3251-7
- Mercola M, Levin M. 2001. Left-right asymmetry determination in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 779-805
- Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, et al. 1998. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95: 829-37
- Palmer AR. 2004. Symmetry breaking and the evolution of development. *Science* 306: 828-33

- Piedra ME, Icardo JM, Albajar M, Rodriguez-Rey JC, Ros MA. 1998. Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* 94: 319-24
- Raya A, Belmonte JC. 2006. Left-right asymmetry in the vertebrate embryo: from early information to higher-level integration. *Nat Rev Genet* 7: 283-93
- Raya A, Kawakami Y, Rodriguez-Esteban C, Ibanes M, Rasskin-Gutman D, et al. 2004. Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination. *Nature* 427: 121-8
- Ryan AK, Blumberg B, Rodriguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Tamura K, et al. 1998. Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* 394: 545-51
- Sampath K, Cheng AM, Frisch A, Wright CV. 1997. Functional differences among *Xenopus* nodal-related genes in left-right axis determination. *Development* 124: 3293-302
- Schier AF. 2003. Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 589-621
- Schier AF, Shen MM. 2000. Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* 403: 385-9
- Shiratori H, Yashiro K, Shen MM, Hamada H. 2006. Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific morphogenesis of visceral organs. *Development* 133: 3015-25
- Soroldoni D, Bajoghli B, Aghaallaei N, Czerny T. 2007. Dynamic expression pattern of Nodal-related genes during left-right development in medaka. *Gene Expr Patterns* 7: 93-101
- Strauss E, Kosaka B, Wada J. 1983. The neurobiological basis of lateralized cerebral function. A review. *Hum Neurobiol* 2: 115-27
- Sun T, Walsh CA. 2006. Molecular approaches to brain asymmetry and handedness. *Nat Rev Neurosci* 7: 655-62
- Tabin CJ. 2006. The key to left-right asymmetry. *Cell* 127: 27-32
- Tanaka Y, Okada Y, Hirokawa N. 2005. FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* 435: 172-7
- Tian T, Meng AM. 2006. Nodal signals pattern vertebrate embryos. *Cell Mol Life Sci* 63: 672-85
- Vallortigara G, Rogers LJ, Bisazza A. 1999. Possible evolutionary origins of cognitive brain lateralization. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 164-75

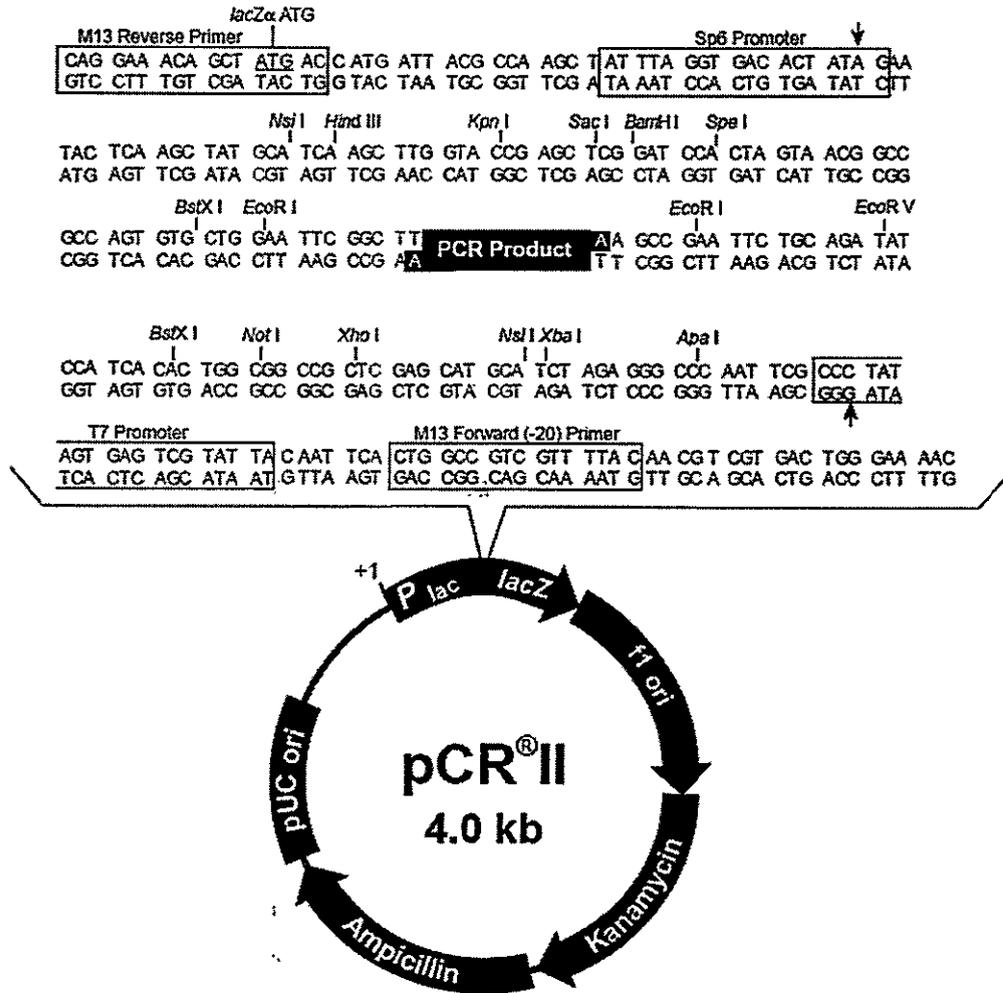
Wright CV. 2001. Mechanisms of left-right asymmetry: what's right and what's left? *Dev Cell* 1: 179-86

Yasumasu S, Iuchi, I., Yamagami, K. . 1994 Review: cDNAs and the genes of HCE and LCE, two constituents of the medaka hatching enzyme. *Dev Growth Differ* 36: 241-50

Yost HJ. 1999. Diverse initiation in a conserved left-right pathway? *Curr Opin Genet Dev* 9: 422-6

10. MATERIAL OPTATIVO

Figura 1MO – Mapa del vector comercial pCRII (Invitrogen)



 **Invitrogen™**
life technologies

Figura 2MO – Inmunofluorescencia indirecta anti tubulina- α acetilada/ anti GFP

Imágenes de microscopía confocal de experimentos de inmunofluorescencia en larvas DE-GFP, fijadas en st 27 en TCA. En verde la señal para GFP y en rojo para -tubulina- α acetilada. A la derecha se muestra exclusivamente el canal rojo de la imagen a la izquierda. En ambos cuadros la vista es dorsal, con anterior hacia arriba.

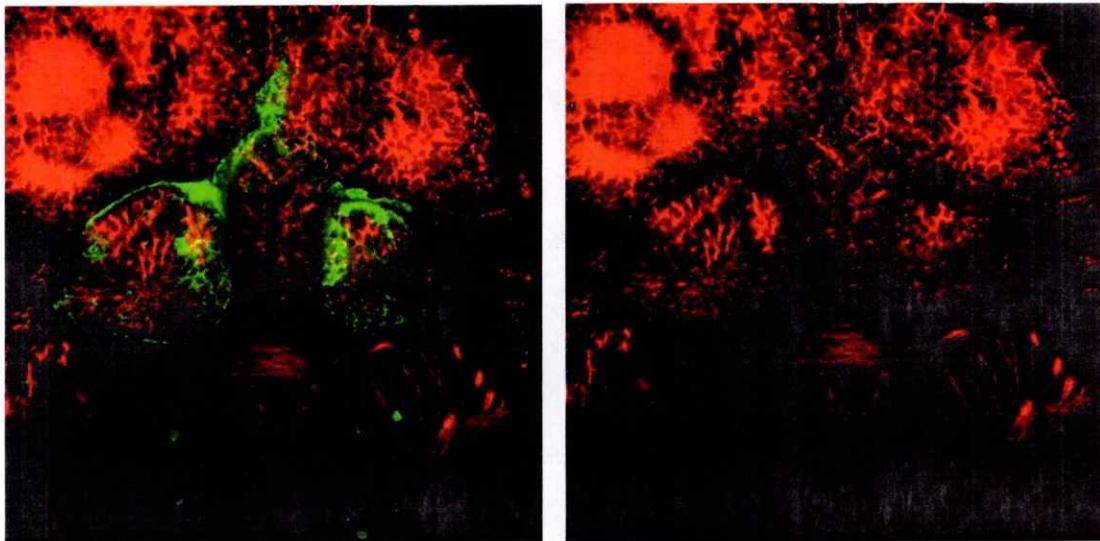


Figura 3MO – Secuencias nucleotídicas de los genes KCTD de Medaka.

En las secuencias se indica con negritas la secuencia que codifica para el gen y en subrayado los partidores utilizados para el clonamiento.

> Scaffold 105 Medaka- sense

gcgcagaccatggcactggccgacacggagcgcacagcgtccagctgcggggatccaagcgcgcgctttc
agagatcatcgagctgaacgtcggcggtcaggtctatgtgaccagacacaaaactctcgtcgcagctcccag
attcactcctgtggaacatgttcagcaagaagtcacccaaggagctggcgagagacagcaaggggcgcttc
ttcttgacagggatggccttctgttcgctacatcctcgactacctccgggacttgaacttggtactccc
ggactacttcccggagaaaagtcggctccagagggaggcggactttttccagctgcgagacctggcgaagc
gcctcagcccgcgggtgagtaaggacaactccatctgcgaggagatcatcaaccagagcgcacacggaggac
ggcgggctgcagtgctgctccacctccggggcatcgacactttacgcgcgcgctccgtcagcggagccat
gcgctccccgtccctggactccagaaaatccggctacatcacgtaggataccgagggctcgtacaccattg
gcagagacatccagactgacgccaaaatccggagagtgggcgcgcatcacctgtgctgggaagacctctctg
gccaaagaagtgtttggagagacgctgaacgagagcagggaccctgacaggcccccgagagatacacatc
ccgctactacctgaagtataatcttagagcaggcgtttgacaagctgacagaagcgggcttccacatgg
tggcctgcagctccacagggacctgcgctacaccagcaacgatccaaacgaggacaaaataggacaagc
tacctgaatatgtattctgcagagaaataccaaaaggggggcttattgtgtaaatataacatcacaatc
tagcaggagaaacaat'

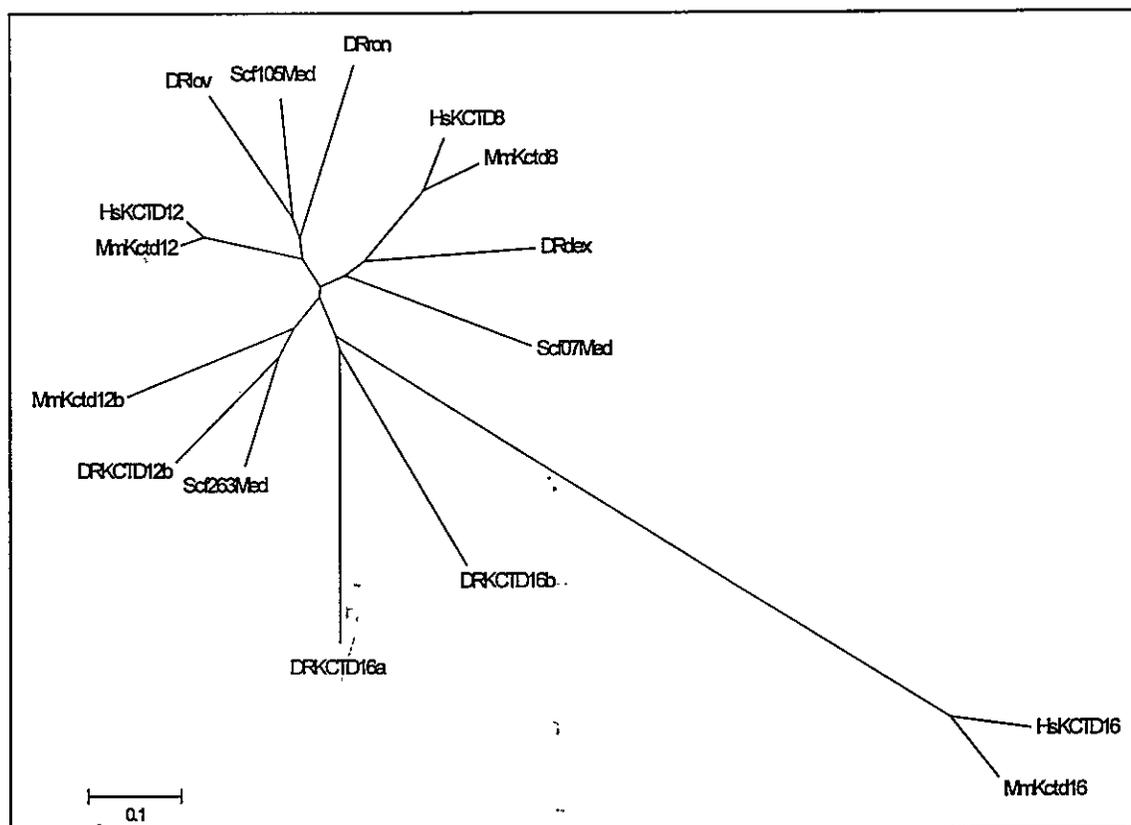
> Scaffold 07 Medaka- sense

cttgagagcgcgagtgagcagaccggcgggattggcacttcttgggggtcaaccgtcaactttcccggaggtag
tggagcttaacgttaggcggtcaggtgtatgtgaccgctctggagactctcacccgggtgcccactccctg
ctgtgggtccgctttaccagagttccccgtcagagctgcccagaccgccacggccgcttcttcttctga
ccgggacggacatctgttccgatacattctggattacttgcgggatacggagctgttccctgcggagtttt
tcaaagagaggaagcggctgcagagggaggcggacttctttcagctgcggagctggccaagcggctggcg
gaggccgctaccgggaagacggcggggaccggaggaagctgagctcggcagccccgtgtctcctccac
gtcctcggagcagccctccgctctccgggttccggctccgggtacatcacattgggtaccgaggcagct
acaccatcggcagggacattcaggcggagcgcaaaatccgcgggtggccaggataaccgtctgcagcaag
atctccctggctaaggagggtttccggggagaccctcaacgagagccgcgaccggaccggccgctgacaa
gtacacggccaggattaccctgaagtataactttctggagcaggcgttcgaccggctggccgaggctgggt
tccacatgggtggcctgcaactccaccgggacctgctacacggcagcaatgaccgggggaggacaaactg
tggaccagctacaccgagtagctcttctgcgggtgatcgtccggtgtccct

> Scaffold 263 Medaka- sense

gtggactatggctttaccagacagtgaggatttctggggaggaggtcccttcccagagataatcgaactca
atgttggtggtcaggtgtacataaccgctactccacctcacaagtgtgcccagactctctcctgtgggag
atgttcagtcagaagtctgcccagggtctggccagggaaccaagggcgcttttttggtagccgggatgg
ttcctgttccgcttacctggaactacatgagggaaccagcagttgggtcttccagaccacttcccagagc
gtggcgtctccagagggaggcagagttcttcaacctgcgggaacttgtcaagcagctggcaccacaaaatt
agtaagcagaactcgttgggtgacgagggatgtcagagtgatccagaggactcttccaccgggatggatc
cgtccgcagctcgggctcccttggagctacagctacctgttccagctcggggccagtagcattggatggca
aacgctccgggttcataccattggctatcggaggctcgtacacactgggcccgcagaccacacagatgcc
aaattccggcgtgtggcagggatcattgggtgtgtgggaagacctccttggccaaagagggtgttcggagagc
gttgaacgagagccgtgaccccgaccgacccctgagcgtacacatcccgtactatctgaagttcacct
ttctggagcaggcctttgacaagctggcagacgcaggcttccacatgggtggcctgtaactccacaggaacc
tgcgctttgcccattgagcagaccgacgacaagatctggaccagctacactgaatatgttttctaccgtga
gtgagactatcggc

Figura 4MO – Árbol construido con secuencias nucleotídicas de los genes KCTD



Se usó el método Neighbor-joining con bootstrap de 1000 repeticiones.