

UCH-FC
DOC-BMCN
g162
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS



LA LINEA LATERAL POSTERIOR DEL PEZ CEBRA: UN PARADIGMA PARA EL ESTUDIO DE LA MIGRACION CELULAR

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

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



Facultad de Ciencias

Viviana Elizabeth Gallardo Mendieta

Noviembre, 2008

Director de Tesis: Dr. Miguel Allende Connelly

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

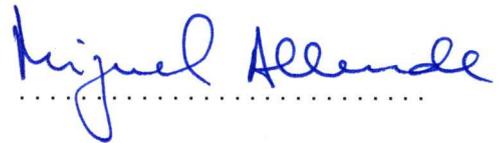
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

VIVIANA E. GALLARDO MENDIETA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 23 de Octubre de 2008.

Director de Tesis:

Dr. Miguel Allende

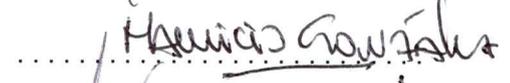

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

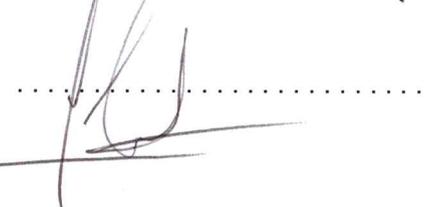
Dr. Mario Rosemblatt


.....

Dr. Christian González


.....

Dr. Mauricio González


.....

Dr. Miguel Concha





A mis padres Jaime y Gaby, por su amor, apoyo y confianza...



Recuerdo que la primera pregunta que me hicieron en la entrevista personal para entrar al programa de doctorado de la Facultad de Ciencias fue Qué es la Ciencia?, para mi difícil pregunta mas aún difícil respuesta; no se si hoy puedo dar una respuesta rápida y/o fácil a esa pregunta, pero de lo que si estoy absolutamente segura, luego de 10 años, que la ciencia es lo que me apasiona, lo que me mueve y lo que quiero.

Es por eso que luego de estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular no dude en entrar a un doctorado. Fueron años llenos de vivencias, algunas complicadas, otras peculiares, otras divertidas, en fin; 5 años en los cuales compartí con muchas personalidades diferentes ayudándome a madurar y a ser un poco más tolerante en esta vida, y tiempo en el cual encontré a grandes amigos que se que conservaré durante toda mi vida.

Es difícil pensar en dejar de ser estudiante, sin embargo estoy orgullosa de lo que he logrado hasta ahora y gracias al apoyo incondicional de mi familia y de mi laboratorio, ahora sé que todos estos años me enseñaron mucho y me dejaron preparada para enfrentar los cambios y nuevos desafíos que vendrán, tanto en mi vida personal como profesional.



AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Miguel Allende, por haberme dado la oportunidad de formar parte del laboratorio de Biología del Desarrollo, que más que un grupo de trabajo considero que somos una gran y linda familia. "Jefe" gracias por tu amistad, guía, apoyo, confianza, dedicación, paciencia, por estar siempre presente y por preocuparte siempre por nosotros no sólo a nivel académico como un excelente tutor sino también a nivel personal como un gran amigo.

A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente a mis amigos Pedro, Undu, Eduardo, Sharo, Leo, Javi, Carmen, Pablo, Andrés, Vivi, Claudia, Cata, Floro y Juanito por su apoyo, compañía, discusiones, tiempo de ocio y esparcimiento, viajes, paseos, congresos, etc. Gracias a todos uds. por su ayuda y complicidad en momentos difíciles y por la alegría y fuerza necesarias para enfrentar cada día durante estos 5 años de mi vida.

Al laboratorio del Dr. Shawn Burgess, especialmente a Martine y Jin, por recibirme en su laboratorio, por su apoyo, ayuda y amistad, y por darme la posibilidad de realizar parte importante de esta tesis.

A mis amigas Pochi, Maca, Andre, Dani y Marce por seguir siendo parte importante de mi vida después de tantos años.

A mis amigos de la U y del doctorado, algunos lejos otros cerca, gracias por todas aquellas horas compartidas estudiando, carreteando o simplemente conversando.

A mi familia por su amor, apoyo, entusiasmo y por ser una familia maravillosa, unida, achoclonada, curiosa, divertida y estar siempre presente.

INDICE DE CONTENIDO



	Página
INDICE GENERAL	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
INDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCION	1
II. HIPOTESIS	28
III. OBJETIVOS	29
IV. MATERIALES Y METODOS	30
V. RESULTADOS	54
VI. DISCUSION	108
VII. CONCLUSIONES	127
VIII. REFERENCIAS	128
IX. ANEXOS	145

INDICE DE FIGURAS



		Página
Figura 1	Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	4
Figura 2	Línea lateral del pez cebra	7
Figura 3	Desarrollo de la línea lateral posterior en el pez cebra	9
Figura 4	Primordio migratorio de la LLP del pez cebra	11
Figura 5	Expresión del receptor de quimioquinas <i>cxcr4b</i> en el primordio de la LLP.	13
Figura 6	Expresión del receptor de quimioquinas <i>cxcr7b</i> en el primordio de la LLP.	15
Figura 7	Quimioquinas y sus receptores	17
Figura 8	Desarrollo de la hematopoesis en vertebrados	20
Figura 9	Desarrollo de sistema hematopoiético en el pez cebra	23
Figura 10	Esquema del experimento de microarreglos	40
Figura 11	Esquema de la generación del constructo <i>ccr7-egfp</i>	52
Figura 12	Disección de embriones transgénicos <i>CldnB::GFP</i>	56
Figura 13	Análisis de hibridación <i>in situ</i> y RT-PCR en colas de embriones transgénicos de pez cebra	57
Figura 14	Análisis de citometría de flujo de células purificadas de primordios de pez cebra	59
Figura 15	Purificación de células del primordio de la LLP mediante ensayos FACS	61
Figura 16	Purificación de células GFP+ de embriones transgénicos mediante ensayos de FACS	62
Figura 17	Visualización de células GFP+ luego de su purificación	64



	por ensayos de FACS	
Figura 18	Análisis de PCR en tiempo real de mRNAs derivados de células purificadas por cell sorting	65
Figura 19	Análisis de la calidad y concentración del RNA extraído de células purificadas por cell sorting	67
Figura 20	Análisis de expresión global de genes que se expresan en el primordio de la LLP desarrollado por microarreglos	69
Figura 21	Diagrama de flujo que resume el análisis de los experimentos de microarreglos	72
Figura 22	Perfil de expresión génica del primordio de la LLP	73
Figura 23	Perfil de expresión génica del primordio de la LLP	74
Figura 24	Perfil de expresión génica del primordio de la LLP	75
Figura 25	Perfil de expresión génica del primordio de la LLP	76
Figura 26	Perfil de expresión génica del primordio de la LLP	77
Figura 27	Análisis de hibridación <i>in situ</i> del conjunto de genes seleccionados	87
Figura 28	Análisis de PCR en tiempo real de mRNA derivado de células GFP+ y GFP- purificadas	89
Figura 29	Perdida de función de los genes <i>cd9l</i> y <i>f11r</i>	92
Figura 30	Análisis filogenéticos de múltiples alineamientos de CCR7 entre especies	96
Figura 31	Análisis filogenéticos de múltiples alineamientos de CCR9 entre especies	98
Figura 32	Expresión de <i>ccr9</i> en el pez cebra	100
Figura 33	Expresión de <i>ccr7</i> en el pez cebra	101
Figura 34	Inhibición de CCR7 disminuye la expresión de <i>rag1</i> en el timo	103

Figura 35	Inhibición de CCR7 disminuye la expresión de <i>ikaros</i> en la región ICM	105
Figura 36	Análisis de la función <i>in vivo</i> de <i>ccr7</i> en el desarrollo del pez cebra	107





NDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Lista de los partidores utilizados para la síntesis de sondas de RNA antisentido	32
Tabla 2	Lista de los partidores utilizados para los análisis de expresión génica del primordio de la LLP	33
Tabla 3	Lista de sondas de RNA antisentido utilizadas en los ensayos de hibridación <i>in situ</i>	34
Tabla 4	Lista de los morfolinós utilizados en los ensayos funcionales <i>in vivo</i> de migración celular	36
Tabla 5	Concentración de proteinasa K y tiempo de tratamiento para los distintos estadios del pez cebra	45
Tabla 6	Genes de expresión conocida en el primordio de la LLP, que se encuentran diferencialmente expresados en la muestra GFP+	80
Tabla 7	Genes de expresión conocida en el primordio de la LLP, que no se encuentran diferencialmente expresados en las muestra GFP+	81
Tabla 8	Genes de expresión conocida que se encuentran diferencialmente expresados en la muestra GFP-	82
Tabla 9	Genes de expresión desconocida en el primordio de la LLP que mostraron un razón GFP+/GFP- mayor a 2	83
Tabla 10	EST de expresión desconocida en el primordio de la LLP que mostraron un razón GFP+/GFP- mayor a 2	85

ABREVIATURAS

2-Di-4-Asp	4-(4-Diethylaminostyryl)-1-methylpyridinium iodide
AGM	Aorta-gónada-mesonefros
AP	Fosfatasa alcalina
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BSA	Albúmina sérica de bovino
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
CaCl ₂	Cloruro de calcio
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CHT	Tejido caudal hematopoiético
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DEPC	Diethylpirocarbonato
DIG	Digoxigenina
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos Trifosfato
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EST	Expressed sequence tag
EtOH	Etanol
FACS	Fluorescent-activated cell sorting
FBS	Suero fetal bovino
FM1-43	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-[dibutylamino]pyridinium) dibromide
GFP	Proteína fluorescente verde



H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Acido clorhídrico
HSC	Células troncales hematopoiéticas
ICM	Masa celular intermedia
KCl	Cloruro de potasio
kDa	kiloDalton
LiCl	Cloruro de litio
LLP	Línea lateral posterior
MAB	Maleic Acid Buffer
MetOH	Metanol
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
mRNA	RNA mensajero
Mo	Morfolino
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
PBI	Posterior blood island
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PBST	PBS – Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RBI	Rostral blood island
PFA	Paraformaldehído
PTU	Tyrosinase inhibitor 1-phenyl-2-thiourea
SDS	Dodecil sulfato de sodio



SSC	Saline-Sodium Citrate
TAE	Tris acetato EDTA
Tween 20	Polioxietilensorbitan monolaurato
tRNA	RNA de tórula



RESUMEN

La migración celular juega un papel esencial en el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares. Muchas de las características de la migración celular, ya sea de cómo este proceso es regulado y cuales son las moléculas relevantes para este evento son, en su mayoría, desconocidas. La complejidad y heterogeneidad de los territorios por los cuales las células se mueven y el gran número de factores que son potencialmente relevantes en este proceso hacen que los análisis *in vitro* sean irreales y los *in vivo* sean difíciles de realizar.

Recientemente, la línea lateral posterior (LLP) del pez cebra ha emergido como un buen sistema para el análisis genético de la migración celular y de cómo ésta es controlada. La línea lateral es un sistema mecanosensorial que responde a estímulos mecánicos producidos por el medio externo y está compuesta por un grupo de órganos sensoriales superficiales llamados neuromastos, que se encuentran distribuidos en la superficie del cuerpo en patrones especie-específicos. En el pez cebra, la LLP se compone de 7 a 8 neuromastos y su desarrollo comienza a las 20 hpf con la migración de un primordio de células a lo largo del miosepto horizontal. El primordio durante su migración deposita 5 grupos de aproximadamente 20 células, denominados pro-neuromastos en intervalos regulares, y una vez alcanzada la punta de la cola, el primordio se fragmenta y forma 2 a 3 neuromastos terminales.

Uno de los aspectos esenciales en la migración del primordio es la organización interna que debe tener este grupo de células para la migración colectiva. Actualmente es sabido que el primordio de la LLP está organizado en 2 a 3 grupos de células polarizadas, denominados rosetas, cada una correspondiente a un pro-neuromasto, y

que ésta organización interna es esencial para el patrón y la migración del primordio, y por ende, para el correcto depósito de los neuromastos.

El control de la direccionalidad migratoria del primordio ha sido ampliamente estudiada. Diversos estudios ~~han~~ recientes han demostrado la importancia de los receptores de quimioquinas CXCR4 y CXCR7 y de su ligando la quimioquinas SDF1, en guiar la dirección de la migración del primordio de la LLP. La inhibición de estas moléculas produce alteraciones en la vía por la cual el primordio migra, sugiriendo que la señalización mediada por este sistema es importante para guiar al primordio a través del miosepto horizontal, y al mismo tiempo, alude la presencia de otras moléculas quimioattractantes que estarían guiando al primordio por vías alternativas; las cuales pueden ser, al igual que en otros sistemas, receptores de quimioquinas, moléculas de adhesión, integrinas, etc.

La comprensión de la bases moleculares de la morfogénesis, organización y migración de las células del primordio, requiere entonces la identificación de la expresión y función de los genes expresados en estas células. Además, la identificación de nuevas moléculas que contribuyen al movimiento direccional del primordio permitiría lograr un mejor conocimiento del proceso de migración celular durante el desarrollo .

Para identificar los genes que se expresan en el primordio migratorio de LLP, se realizó, en esta tesis, un análisis de expresión global basado en la construcción de una librería de cDNAs a partir de células purificadas del primordio. A partir de esta colección de genes de expresión específica, se realizó una selección de un conjunto de ellos para un análisis de expresión y función en las células migratorias del primordio.

ABSTRACT

Cell migration is an essential event for the entire life of organisms. Many of the features of cell migration, including the regulatory mechanisms and the identity of the molecules important for this event are mostly unknown. The complexity and heterogeneity of the territories in which the cells move and the large numbers of factors that are potentially relevant in this process make *in vitro* analyses unrealistic and *in vivo* analyses difficult to perform.

Recently, the posterior lateral line of zebrafish (PLL) has emerged as an attractive system for genetic analysis of cell migration and how it is controlled. The lateral line is a mechanosensory system that responds to water movements and is comprised of a number of discrete sense organs, the neuromasts, distributed over the body in species-specific patterns. In the zebrafish, the embryonic PLL comprises 7-8 neuromasts and its development begins at 20 hpf with the migration of a primordium of cells along the horizontal myoseptum. During its journey, the primordium deposits five groups of 15-20 cells (pro-neuromasts) at regular intervals, and upon reaching the tip of the tail, the primordium fragments and forms two to three terminal neuromasts.

One of the essential aspects of the migrating primordium is the organization that this group of cells must undergo for collective migration. Today, it is known that the primordium of the LLP is organized in 2 to 3 groups of polarized cells, called rosettes, each corresponding to a pro-neuromast, and that this internal organization is essential for patterning and migration of the primordium and, therefore, for efficient neuromast deposition.

The control of migration directionality of the primordium has been widely studied. The main molecular participants in guiding the direction of migration of the

lateral line primordium are the chemokine SDF1a and its receptors CXCR4b and CXCR7b. These studies have shown that inactivation of both *cxcr4b* and *cxcr7b* produce alterations in migration of the primordium, confirming that this signaling system is essential for proper guidance of these cells. However, since only directionality is compromised when the chemokine system is inactivated, these results allude to the presence of other molecules that are allowing cell movement, possibly other chemokines, adhesion molecules, integrins, etc.

The understanding of the molecular basis of morphogenesis, migration and organization of the primordium cells requires the identification of the expression and function of genes expressed in these cells. Furthermore, the identification of new molecules that contribute to the directional movement of the primordium would achieve a better understanding of the process of cell migration during development.

In this study, we describe an approach to globally analyze gene expression in the PLL primordium. We have taken advantage of the CldnB::GFP transgenic zebrafish line in which primordium cells express EGFP protein. We demonstrate that it is possible to isolate these cells from CldnB::GFP embryos using fluorescence activated cell sorting (FACS). We show that comparison of expression profiles from GFP+ and GFP- cells by microarray analysis allows identification of genes expressed exclusively in primordium cells. Furthermore, we also demonstrate the utility of this functional genomics approach to identify new genes whose products are involved in the morphogenesis, organization and migration of the PLL migrating primordium in the zebrafish.

I. INTRODUCCION

La migración celular es un evento esencial para todos los organismos vivos, ya que juega un papel fundamental en una variedad de procesos fisiológicos como morfogénesis, diferenciación celular, regeneración y reparación de tejidos, angiogénesis y en el desencadenamiento de la respuesta inmune; y patológicos como metástasis, arteriosclerosis y artritis (Franz CM. y col., 2002; Webb DJ. y col., 2005)

El movimiento coordinado de células conduce la morfogénesis durante el desarrollo embrionario. Durante la gastrulación, por ejemplo, un gran grupo de células migra colectivamente para formar las 3 capas germinales del embrión (endodermo, mesodermo y ectodermo) (Montero JA. y Heisenberg CP., 2004). Movimientos celulares activos son a su vez, fundamentales para la correcta formación de los tejidos y órganos. Durante la organogénesis, algunas células recorren largas distancias dentro de un organismo, como es el caso de las células germinales primordiales, las que migran desde una posición relativa donde fueron especificadas hasta la región donde las gónadas se desarrollan (Kunwar PS. y col., 2006; Raz E. y Reichman-Fried M., 2006). Otras en cambio, interactúan localmente con células vecinas para inducir cambios globales en el ordenamiento y la forma de los tejidos.

La migración dirigida de células, no sólo ocurre durante el desarrollo de los organismos, sino que también en sistemas que funcionan durante la vida adulta como es el caso del sistema inmune (Gunzer M., 2008). Las respuestas del sistema inmune dependen del tráfico regulado de sus componentes. Es por esto, que las propiedades migratorias de macrófagos, linfocitos y células dendríticas, entre otros, esenciales para la homeostasis y función del sistema inmune, son reguladas por la acción combinada de una variedad de moléculas, tales como integrinas, moléculas de adhesión y

quimioquinas (Pribila JT. y col., 2004; Esche C. y col., 2005; Smith CW., 2008; Villablanca EJ. y col., 2008).

Por otra parte, la migración celular es un evento altamente complejo e integrado que requiere una interacción regulada de numerosas moléculas y la activación de vías de señalización específicas (Ridley AJ. y col., 2003).

Muchas de las características de la migración celular, que incluyen los mecanismos de regulación y la identidad de las moléculas relevantes para este evento son, en su mayoría, desconocidas. La complejidad y heterogeneidad de los territorios por los cuales las células se mueven y el gran número de factores que son potencialmente relevantes en este proceso hacen que los análisis *in vivo* sean difíciles de realizar.

Hasta la fecha, la mayor parte de los conocimientos sobre migración celular se basa en estudios *in vitro* de movimientos rápidos de células ameboides y de movimientos lentos de células en cultivos de dos dimensiones (Chung CY. y col., 2001; Iijima M. y col., 2002; Ridley AJ. y col., 2003; Van Haastert PJ. y Devreotes PN., 2004). Estos trabajos han aportado grandes avances sobre los eventos intracelulares que ocurren durante la motilidad celular, elucidando detalles de la maquinaria del citoesqueleto que maneja la migración (Borisy GG. y Svitkina TM., 2000; Pollard TD. y Borisy GG., 2003).

A su vez, análisis de expresión génica han permitido la identificación de numerosas moléculas requeridas para guiar la migración de células durante procesos de morfogénesis, tales como proteínas de la familia de FGF (Affolter M. y Weijer CJ., 2005), EGF (Mine N. y col., 2005) y quimioquinas (Tran PB. y Miller RJ., 2003).

Recientemente, se han comenzado estudios de migración celular en cultivos celulares de tres dimensiones, imitando condiciones fisiológicas de células en los

tejidos (Friedl P. y Broker EB., 2000; Even-Ram S. y Yamada KM., 2005). Esta técnica ha surgido como un buen modelo en 3D que emula la organización y función de las células en su ambiente natural y ha permitido una mayor comprensión de la relación célula/tejido en condiciones normales y situaciones patológicas.

Sin embargo, para los estudios de inflamación, metástasis y enfermedades autoinmunes, se necesita un sistema modelo *in vivo* que cuente con una mayor similitud de sus componentes y que permita una observación directa, para así tener un mayor entendimiento del comportamiento migratorio que tienen las células en los organismos multicelulares (Grabher C. y col., 2007).

Trabajos en modelos de anfibios, ratón y pollo han estudiado movimientos celulares *in vivo*; sin embargo, en estos sistemas-modelos se hace difícil la visualización de los tejidos debido a su opacidad; y por lo tanto, presentan inconvenientes para el estudio de la migración celular en tiempo real.

Recientemente, sin embargo, la línea lateral del pez ha emergido como un buen sistema para el análisis genético de la migración celular y de cómo ésta es controlada.

1.1 Ventajas del pez cebra

Uno de los sistemas-modelos de estudio más utilizados actualmente es el pez cebra (Figura 1).



Figura 1. Pez cebra (*Danio rerio*). a) Embriones de pez cebra de 1 día post-fertilización (dpf). b) Un ejemplar adulto de pez cebra de aproximadamente 3 meses de vida.

Dentro de las ventajas que presenta este organismo están: la fertilización externa de sus huevos, por lo que todas las etapas del desarrollo pueden ser estudiadas; la transparencia de las células en el estado embrionario y larvario, facilitando así la visualización de estructuras internas; una gran cantidad de embriones por cruce; un tiempo de generación relativamente corto (aproximadamente 3 meses), fácil mantenimiento y generación de líneas transgénicas y mutantes gen específicos sin mayor dificultad. Su mantención es de bajo costo, lo que permite contar con un gran número de líneas transgénicas, de mutantes y especies silvestres. A su vez, es posible la inhibición específica de la actividad génica mediante el uso de oligonucleótidos antisentido denominados morfolidos.

Es por estas características que el pez cebra se ha propuesto para el estudio de la organogénesis (Thisse C. y Zon LI., 2002), estudio del sistema inmune (Hansen

JD. y Zapata AG., 1998; Yoder JA. y col., 2002; Traver D. y col., 2003; Trede NS. y col., 2004; Langenau DM. y Zon LI., 2005; Levraud JP. y col., 2008; Sullivan C. y Kim CH., 2008), estudio del envejecimiento y neurodegeneración (Tomasiewicz HG. y col., 2002; Kishi S. y col., 2003; Keller ET. y Murtha JM., 2004; Gerhard GS., 2007), estudio de enfermedades cardiovasculares (North TE. y Zon LI., 2003; Jagadeeswaran P., 2005; Heideman W. y col., 2005), estudio del sistema hematopoiético (Bahary N. y Zon LI., 1998; Amatruda JF. y Zon LI., 1999; Davidson AJ. y Zon LI., 2004; de Jong JL. y Zon LI., 2005; Burns CE. y Zon LI., 2006; Carradice D. y Lieschke GJ., 2008), estudio y comprensión de la metástasis y del desarrollo del cáncer (Amatruda JF. y col., 2002; Langenau DM. y col., 2003; Sapède D., 2003; Stern HM. y Zon LI., 2003; Berghmans S. y col., 2005; Norrby K., 2006; Goessling W. y col., 2007; Feitsma H. y Cuppen E., 2008) y para el estudio de toxicidad por drogas (Chiu L. y col., 2008).

A la fecha, se han identificado cientos de mutaciones que afectan el desarrollo del pez cebra, siendo muchos de sus fenotipos similares a desórdenes clínicos en humanos. Además, dado que en ratón la detección de mutaciones mediante perfiles de expresión génica requiere de un gran número de requerimientos, y por ende de un alto costo económico, se espera que el uso del pez cebra como sistema-modelo permita descubrir las bases genéticas y moleculares de las enfermedades humanas y/o desarrollar agentes farmacológicos que inhiban o corrijan la progresión de estos desórdenes durante el desarrollo.

1.2 Sistema mecanosensorial de la línea lateral

El pez cebra presenta, al igual que otros peces y anfibios, un sistema mecanosensorial llamado línea lateral. Este sistema sensorial responde a estímulos mecánicos producidos por el medio externo y está involucrado en una variedad de comportamientos que van desde la sincronización de los movimientos, la orientación en relación a las corrientes de agua, la detección de la presa, la prevención de los depredadores, el nado en cardumen y el cortejo sexual (Ghysen A. y Dambly-Chaudière C., 2007). Es por estas características que se ha propuesto a la línea lateral como el sistema ancestral del sistema auditivo de mamíferos (Dambly-Chaudière C. y col., 2003).

La línea lateral está compuesta por un grupo de órganos sensoriales individuales denominados neuromastos, que se encuentran espaciados en la superficie del cuerpo en patrones especie-específicos (Figura 2). Cada neuromasto está compuesto por un núcleo de 15 a 20 células ciliadas rodeado por dos tipos de células accesorias: células de soporte y células del manto. Las células de soporte sostienen y rodean a las células ciliadas, y son a su vez, rodeadas por las células del manto, las que delimitan al neuromasto (Figura 2). Estos órganos a su vez, son inervados por aferencias de neuronas sensoriales cuyos somas se ubican en el ganglio de la línea lateral, las cuales extienden sus axones al cerebro posterior (Ghysen A. y Dambly-Chaudière C., 2004; Goodrich LV., 2005).

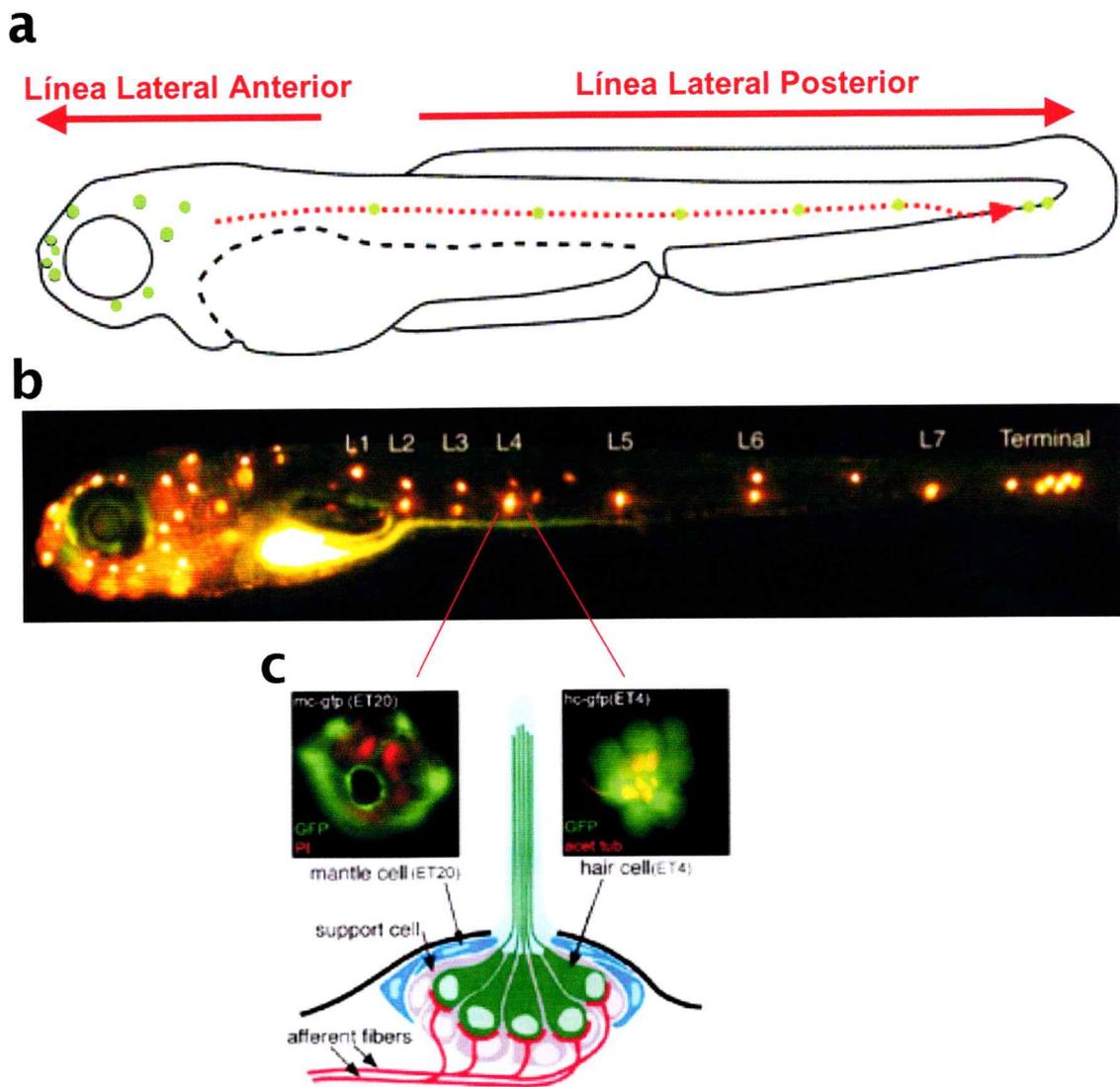


Figura 2. Línea lateral del pez cebra. a) Diagrama de la línea lateral del pez cebra. b) Visualización *in vivo*, de los neuromastos de la línea lateral del pez cebra mediante tinción Daspei. c) Esquema de un neuromasto maduro. Se observa las células ciliadas mecanosensoriales (color verde), células de soporte (color gris) y las células del manto (color azul). Además, se muestra la expresión de GFP en las células del manto de la línea transgénica sqET20 y la expresión de GFP en las células ciliadas de la línea transgénica sqET4.

Los neuromastos al estar generalmente expuestos en la superficie del cuerpo, son fácilmente visibles con microscopia de Nomarski y con tinciones fluorescentes como el marcador vital 2-Di-4-Asp (Collazo A. y col., 1994), el marcador FM1-43 (Nishikawa S. y Sasaki F., 1996) y el marcador Yo-Pro-1 (Santos F. y col., 2006); los que se acumulan específicamente en las células ciliadas funcionales. Además, actualmente existe una gran variedad de líneas transgénicas de pez cebra, las cuales expresan GFP en los diferentes tipos celulares de la línea lateral (Figura 2C).

En el pez cebra, el patrón embrionario de la línea lateral es relativamente simple y su desarrollo comprende procesos de migración celular y axonal, proliferación, neurogénesis y diferenciación celular. Los neuromastos ubicados sobre la cabeza forman la denominada línea lateral anterior (LLA), mientras que los neuromastos ubicados sobre el tronco y la cola, incluyendo la aleta caudal, forman la línea lateral posterior (LLP) (Ghysen A. y Dambly-Chaudière C., 2004) (Figura 2A).

La línea lateral posterior del pez cebra se compone de 7 a 8 neuromastos y su desarrollo comienza a las 18-20 horas post-fertilización (hpf) con la formación de una placoda de aproximadamente 120 células que se encuentran bajo la epidermis y justo posterior a la vesícula ótica. Una vez formada la placoda de la LLP, ésta se divide en un pequeño compartimiento anterior de alrededor de 20 células, las que luego se diferencian a neuronas sensoriales formando el ganglio de la LLP; y en un compartimiento mayor de aproximadamente 100 células, las que formaran el primordio de la LLP (Ghysen A. y Dambly-Chaudière C., 2007) (Figura 3a-c).

A las 20-21 hpf comienza la migración del primordio a lo largo del miosepto horizontal desde la cabeza hacia la cola a una velocidad aproximada de 150 $\mu\text{m}/\text{h}$ (1.7 somitos/hora) (Figura 3d). Las células del primordio tienen un tamaño aproximado de 7 μm de diámetro y pueden ser distinguidas fácilmente por su tamaño y forma. A medida

que el primordio migra, éste es acompañado por los axones que se extienden desde del ganglio (Metcalf WK., 1985; Gilmour D. y col., 2004). Las células gliales en cambio, migran a lo largo de los axones (Gilmour D. y col., 2002) para formar el nervio de LLP mielinizado (Brösamle C. y Halpern ME., 2002).

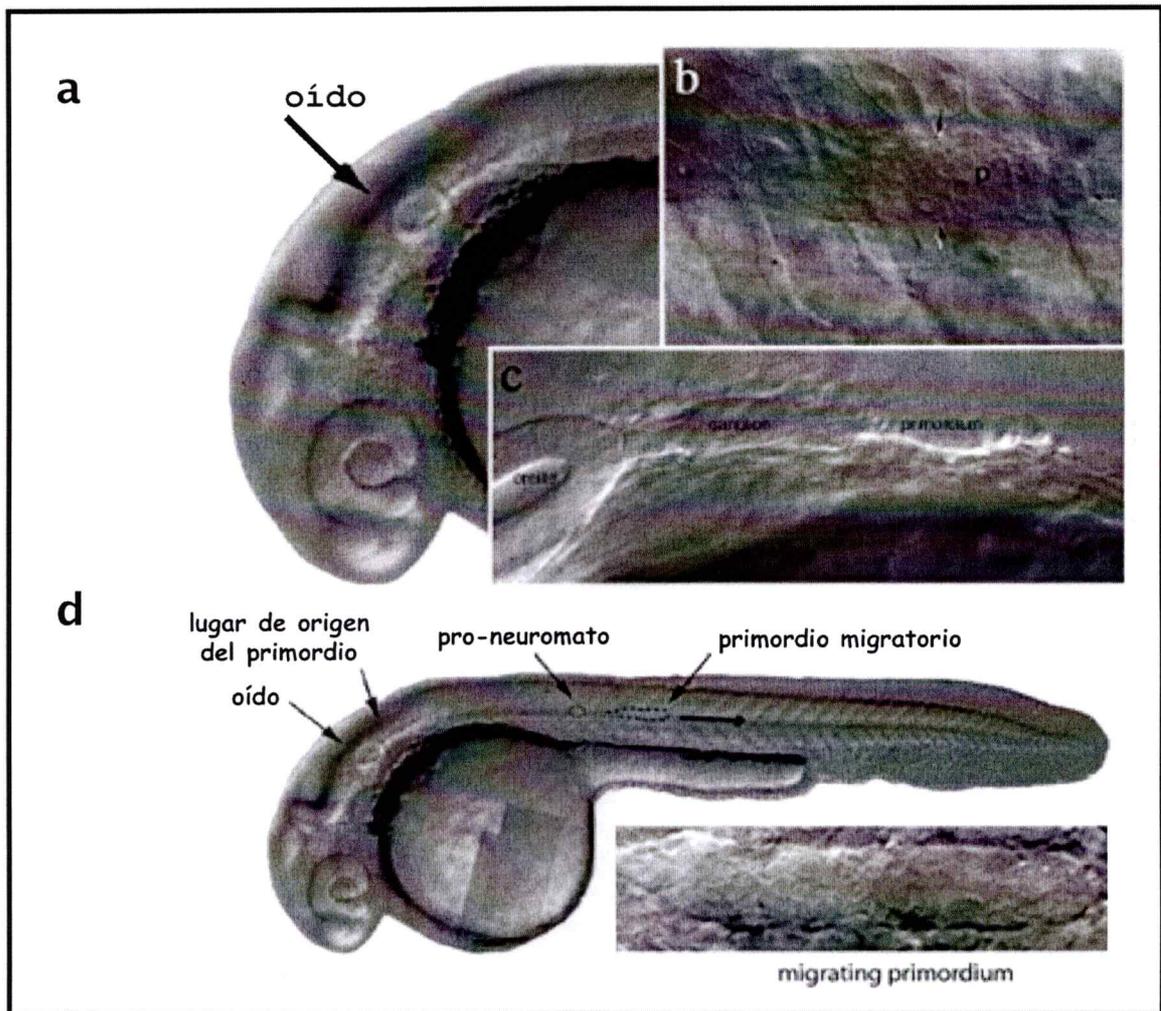


Figura 3. Desarrollo de la línea lateral posterior en el pez cebra. a) Vista lateral de la cabeza de un embrión de 24 horas post-fertilización (hpf). b) Origen del primordio migratorio, las flechas indican el punto donde se separan las células que darán origen al ganglio de la LLP de las células migratorias que formaran el primordio de la LLP. c) Comienzo de la migración del primordio y formación del ganglio de la LLP. d) Migración del primordio a través del miosepto horizontal y depósito de los pro-neuromastos. Imágenes obtenidas por microscopía Nomarski.

El primordio durante su migración deposita 5 grupos de aproximadamente 20 células, denominados pro-neuromastos; los cuales están completamente diferenciados al final de la embriogénesis (Ghysen A. y Dambly-Chaudière C., 2004) (Figura 4).

El depósito de los neuromastos resulta de una concertada desaceleración y posterior arresto migratorio de las células localizadas en la parte posterior del primordio. Dos genes han sido implicados en este proceso. El primero de ellos es *tacstd*, el que codifica para una glicoproteína de membrana, y es altamente expresado por el grupo de células que va a ser depositado (Villablanca EJ. y col., 2006). El segundo gen, *met*, codifica para un receptor tirosina kinasa y es expresado por las células de la región anterior del primordio (Haines L. y col., 2004). La inactivación tanto de *tacstd* como de *met* no tiene efecto en la migración del primordio pero si interfiere con el depósito de los pro-neuromastos; por lo que los autores postulan que ambos genes están envueltos en el recambio entre la migración y la diferenciación de este grupo de células. Por último, el proceso de migración del primordio finaliza aproximadamente a las 40 hpf, donde una vez alcanzada la punta de la cola, el primordio se fragmenta y forma 2 a 3 neuromastos terminales (Ghysen A. y Dambly-Chaudière C., 2004).

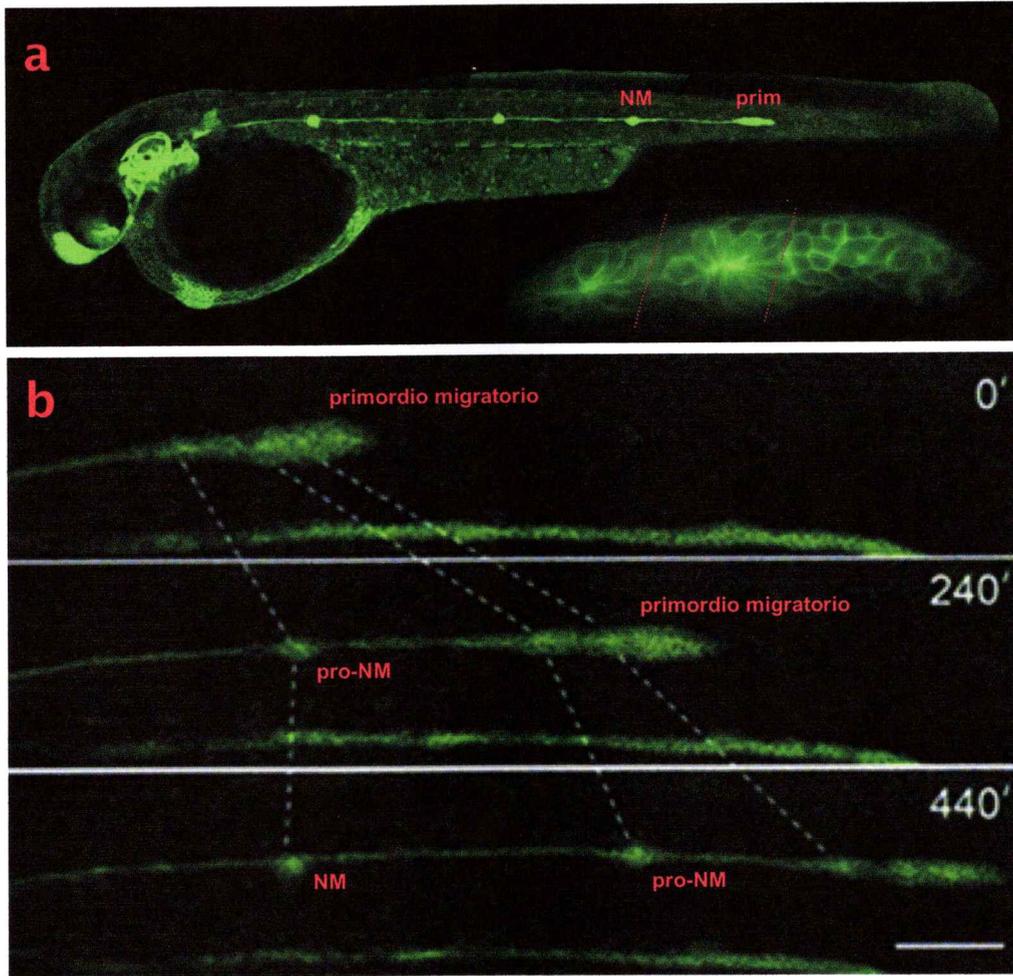


Figura 4. Primordio migratorio de la LLP del pez cebra. a) Embrión de pez cebra transgénico *CldnB::GFP*. Se observa la expresión de GFP en el primordio, neuromastos y células interneuromásticas. Las líneas punteadas indican la organización en rosetas que presenta el primordio de la LLP. b) Se muestra el depósito de los pro-neuromastos por el primordio migratorio a lo largo de su trayecto por el miosepto horizontal en diferentes etapas de la migración. Escala de barras; b) 20 μ m (Haas P. y col., 2004).

1.3 Migración celular en el desarrollo de la LLP

El primer paso en el desarrollo de la LLP es la migración del primordio a lo largo del miosepto horizontal.

Uno de los aspectos esenciales en la migración del primordio es la organización interna que debe tener este grupo de células para la migración colectiva. Actualmente es sabido que el primordio de la LLP está organizado en 2 a 3 grupos de células polarizadas, denominados rosetas (Figura 4, líneas punteadas), cada una correspondiente a un pro-neuromasto (Ghysen A. y Dambly-Chaudière C., 2007). A medida que el primordio deposita los pro-neuromastos durante su migración, se van formando nuevas rosetas a partir de un conjunto de células progenitoras localizadas en la parte anterior del primordio (Nechiporuk A. y Raible DW., 2008).

El nivel de organización interna del primordio puede ser observado por la incorporación del marcador de proliferación BrdU (Laguerre L. y col., 2005) y por la expresión de diversos marcadores. Es el caso del gen pro-neural *atoh1a*, de los genes neuronales *delta* y *notch* (Itoh M. y Chitnis AB., 2001; Sarrazin AF. y col., 2006) y del gen *tacstd* (Villablanca EJ. y col., 2006).

A su vez, trabajos recientes (Lecaudey V. y col., 2008; Nechiporuk A. y Raible DW., 2008), han demostrado que la actividad de dos ligandos de la familia de factores de crecimiento fibroblásticos, *fgf3* y *fgf10*, es fundamental para la organización interna, el patrón y la migración del primordio, y por ende para el correcto depósito de los neuromastos de la LLP del pez cebra.

Por otra parte, las señales que dirigen la migración del primordio de la LLP en el pez cebra son, en su mayoría, desconocidas. Sin embargo, diversos estudios han evidenciado la importancia de la expresión del receptor de quimioquina CXCR4 en las

células del primordio migratorio, así como también la expresión de su ligando, la quimioquina CXCL12 (SDF1) por la células del miosepto horizontal, ruta por la cual el primordio migra (David NB. y col., 2002; Schier AF., 2003; Li Q. y col., 2004). Estos estudios han demostrado que la inhibición tanto de *sdf1 α* como de *cxcr4b* produce errores en la migración del primordio y en la posterior formación de los neuromastos (David NB. y col., 2002; Li Q. y col., 2004).

Por una parte, en peces morfantes para *sdf1 α* se observa un retraso o una detención en la migración del primordio. A su vez, la sobreexpresión de su homólogo *sdf1 β* produce una alteración en la migración del primordio, el cual sigue por una vía ventral alternativa (Li Q. y col., 2004). Alternativamente, peces morfantes y mutantes de *cxcr4b* también presentan errores en la migración, donde el primordio migratorio puede retrasarse y/o detenerse; o en algunos casos puede seguir por vía dorsal o ventral alternativa, dirigido por alguna otra molécula quimioattractante (David NB. y col., 2002; Li Q. y col., 2004) (Figura 5).

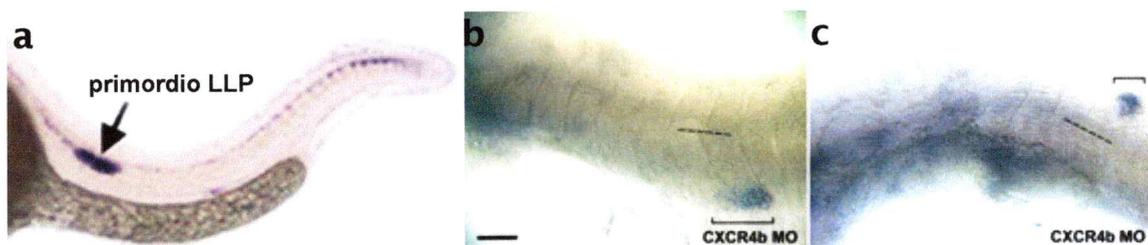


Figura 5. Expresión del receptor de quimioquinas *cxcr4b* en el primordio de la LLP. a) Análisis de hibridación *in situ* que muestra la expresión del mRNA de *cxcr4b* en el primordio migratorio. b-c) Embriones morfantes para *cxcr4b* muestran una migración aberrante del primordio ya sea siguiendo una vía ventral (b) o dorsal (c) al miosepto horizontal. Escala de barras; b-c) 50 μ m (Li Q. y col., 2004).

El control de la direccionalidad migratoria del primordio ha sido ampliamente estudiada y hoy en día se sabe que solo un pequeño número de células que expresan *cxcr4b* en la parte anterior del primordio es suficiente para dirigir su migración (Dambly-Chaudière C. y col., 2007; Ghysen A. y Dambly-Chaudière C., 2007; Valentin G. y col., 2007). En estos trabajos los autores proponen que el movimiento de estas células ejerce una fuerza que polariza el citoesqueleto de las células vecinas y les confiere la capacidad para migrar. Sin embargo, estos estudios también muestran que estas células son capaces de migrar incluso en la ausencia de *cxcr4b*, pero no lo hacen producto de que no reconocen el camino ni la dirección por la cual deben seguir.

Una posible explicación para la polarización intrínseca que presenta el primordio, y que es necesaria para la migración, ha sido recientemente propuesta y se basa en la expresión del receptor de quimioquinas *cxcr7b*. Este receptor es expresado por las células de la parte posterior del primordio y su inactivación produce alteraciones en la migración (Dambly-Chaudière C. y col., 2007; Valentin G. y col., 2007) (Figura 6a). En estos trabajos, ambos autores postulan que la actividad de CXCR7 es requerida específicamente por las células de la parte trasera del primordio para garantizar la migración. A su vez, concluyen que CXCR4 y CXCR7 son suficientes para mediar la señalización inducida por SDF1 en diferentes regiones dentro del primordio migratorio (Figura 6b).

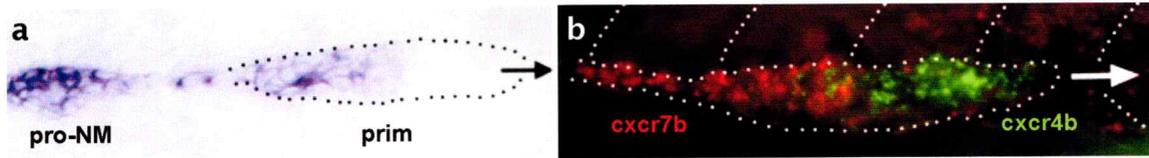


Figura 6. Expresión del receptor de quimioquinas *cxcr7b* en el primordio de la LLP. a) Análisis de hibridación *in situ* muestra la expresión del mRNA de *cxcr7b* en la parte posterior del primordio migratorio. b) Expresión de *cxcr4b* (verde) y *cxcr7b* (rojo) en las regiones anterior y posterior del primordio, respectivamente (Dambly-Chaudière C. y col., 2007).

Sin embargo, los autores difieren en la forma en que *cxcr4b* y *cxcr7b* ejercen sus efectos. Por una parte, Dambly-Chaudière C. y col., proponen que ambos receptores actúan antagónicamente, donde la activación de CXCR4 por SDF1, en las células de la parte anterior del primordio reprime la expresión de *cxcr7b*, mientras que la presencia de CXCR7 en las células de la parte posterior del primordio inhibe la activación de CXCR4 mediante el secuestro de su ligando. Valentin G. y col., en cambio, concluyen que si bien CXCR4 y CXCR7 son necesarios en conjunto para dirigir la migración del primordio, ambos actúan independientemente uno del otro para llevar a cabo este proceso.

Si bien estos estudios han demostrado que la inactivación tanto de *cxcr4b* como de *cxcr7b* produce alteraciones en la vía por la que el primordio migra, confirmando que el sistema de señalización mediado por SDF1-CXCR4-CXCR7 es esencial para guiar la migración del primordio de la LLP a través del miosepto horizontal, al mismo tiempo aluden a la presencia de otras moléculas quimioattractantes que estarían guiando al primordio por vías alternativas en ausencia de estas moléculas.

Sobre la base de estos antecedentes es posible pensar entonces que existen otras moléculas involucradas en conjunto con *sdf1* α -*cxcr4b*-*cxcr7b* en la migración del

primordio, las cuales pueden ser, al igual que en otros sistemas, receptores de quimioquinas, moléculas de adhesión, etc. Además, la identificación de nuevas moléculas que contribuyen al movimiento direccional del primordio permitiría lograr un mejor conocimiento del proceso de migración celular durante el desarrollo.

1.4 Quimioquinas y sus receptores

Las quimioquinas (citoquinas quimiotácticas) son una familia de proteínas secretadas de bajo peso molecular (8–14 kDa) cuya función es la quimioatracción. Estas proteínas ejercen sus efectos mediante la interacción con receptores específicos de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G que se encuentran en una variedad de tejidos.

Hoy en día, mucho es lo que se sabe sobre la función de esta familia de proteínas, donde los mayores trabajos se han realizado en mamíferos. A su vez, muchos de estos genes también se han encontrado en el genoma de pollo, pez cebra, tiburones, entre otros (Zlotnik A. y col., 2006; Peatman E. y Liu Z., 2007). Sin embargo, debido a que múltiples quimioquinas pueden unirse a un mismo receptor y a su vez, un receptor puede unir a más de un tipo de quimioquina, es necesario un análisis cuidadoso de los miembros de esta familia para conocer la organización genómica y la función de estas moléculas durante la evolución.

En humanos, hasta la fecha, se han identificado al menos 46 quimioquinas y 19 receptores de quimioquinas, los que se han clasificado en 4 grupos de acuerdo al número y espaciamiento de residuos de cisteína que presentan en su estructura (Figura 7).

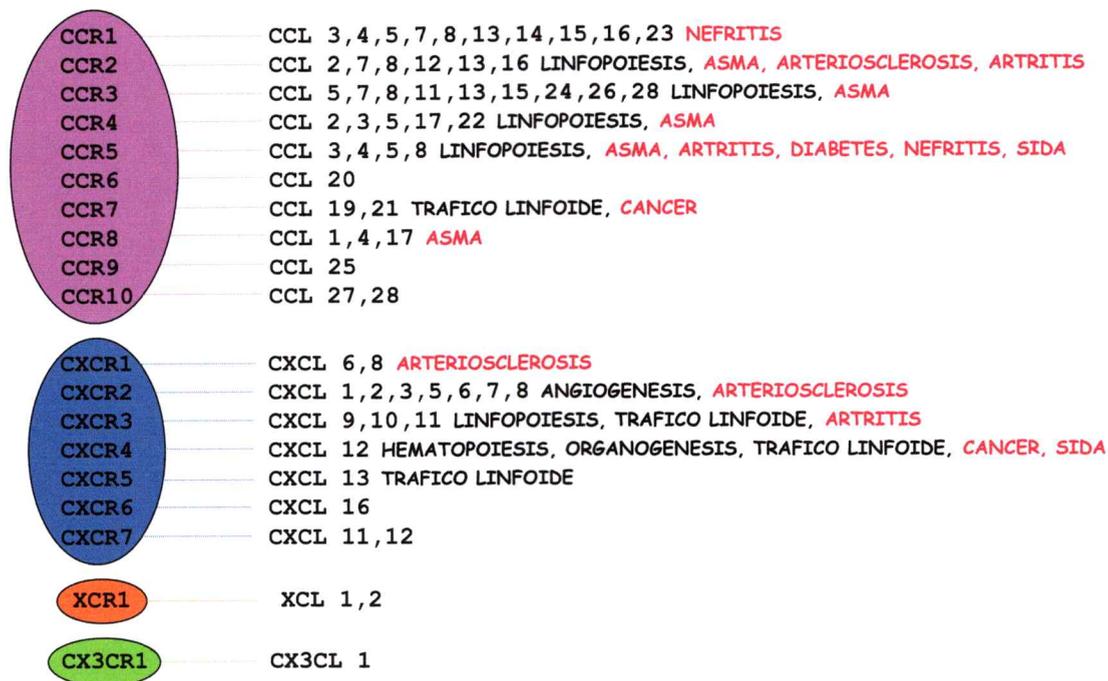


Figura 7. Quimioquinas y sus receptores. Los receptores de quimioquinas están agrupados en 4 familias (CC, CXC, C y CX3C) de acuerdo al número y posición relativa de sus residuos de cisteína. Las quimioquinas están representadas por su número de ligando. A su vez, se muestra el papel que juegan algunos de estos receptores en procesos fisiológicos (texto negro) como patológicos (texto rojo).

Inicialmente los receptores de quimioquinas fueron reconocidos por su papel en la migración de linfocitos y células dendríticas durante la respuesta inmune (Sallusto F. y Lanzavecchia A., 2000; Esche C. y col., 2005; Villablanca E.J. y col., 2008); sin embargo, hoy en día se sabe que estas proteínas tienen un rol en una variedad de procesos tales como organogénesis, angiogénesis, hematopoiesis, proliferación celular, apoptosis y metástasis en el cáncer (Rosenkilde MM. y Schwartz TW., 2004; Koizumi K. y col., 2007; Broxmeyer HE., 2008) (Figura 7).

Diversos estudios han mostrado la importancia del sistema SDF1/CXCR4 en una variedad de eventos migratorios durante el desarrollo de los organismos (Ratajczak MZ., 2006). En mamíferos, este sistema tiene un rol en una variedad de procesos, como por ejemplo en el desarrollo y en la destinación linfocitaria del sistema inmune, en la formación de metástasis en el cáncer y en la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida HIV (Busillo JM. y Benovic JL., 2007; Raman D. y col., 2007; Broxmeyer HE., 2008; Zlotnik A., 2008). A su vez, defectos en el desarrollo del sistema nervioso central de ratones knock-out de *cxcr4* han sido relacionados con alteraciones en la migración celular (Zou YR. y col., 1998; Lu M. y col., 2002).

En el pez cebra, el sistema SDF1/CXCR4 tiene un papel importante en el desarrollo de la LLP (David NM. y col., 2002; Sapède D., 2003), en el patrón de migración de células neuronales (Tiveron MC. y Cremer H., 2008) y en la migración de células germinales primordiales (Doitsidou M. y col., 2002). Finalmente, estos antecedentes en conjunto sugieren que existe un rol conservado del sistema ligando-receptor en una variedad de contextos en los vertebrados.

1.5 Hematopoiesis en el pez cebra

El pez cebra ha emergido como un sistema-modelo ideal para el estudio de la hematopoiesis, proceso por el cual todos los elementos celulares de la sangre son formados (Traver D. y col., 2003).

El desarrollo de las células de la sangre, incluyendo eritrocitos, granulocitos, monolitos, linfocitos, entre otros, depende de la expresión de numerosos genes y de la activación de vías de señalización complejas (Figura 8). Peces, anfibios, aves y mamíferos comparten tipos de células sanguíneas similares y utilizan cascadas de señalización comunes para regular la producción de las distintas poblaciones celulares de la sangre (Amatruda J. y Zon LI., 1999; de Jong JL. y Zon LI., 2005).

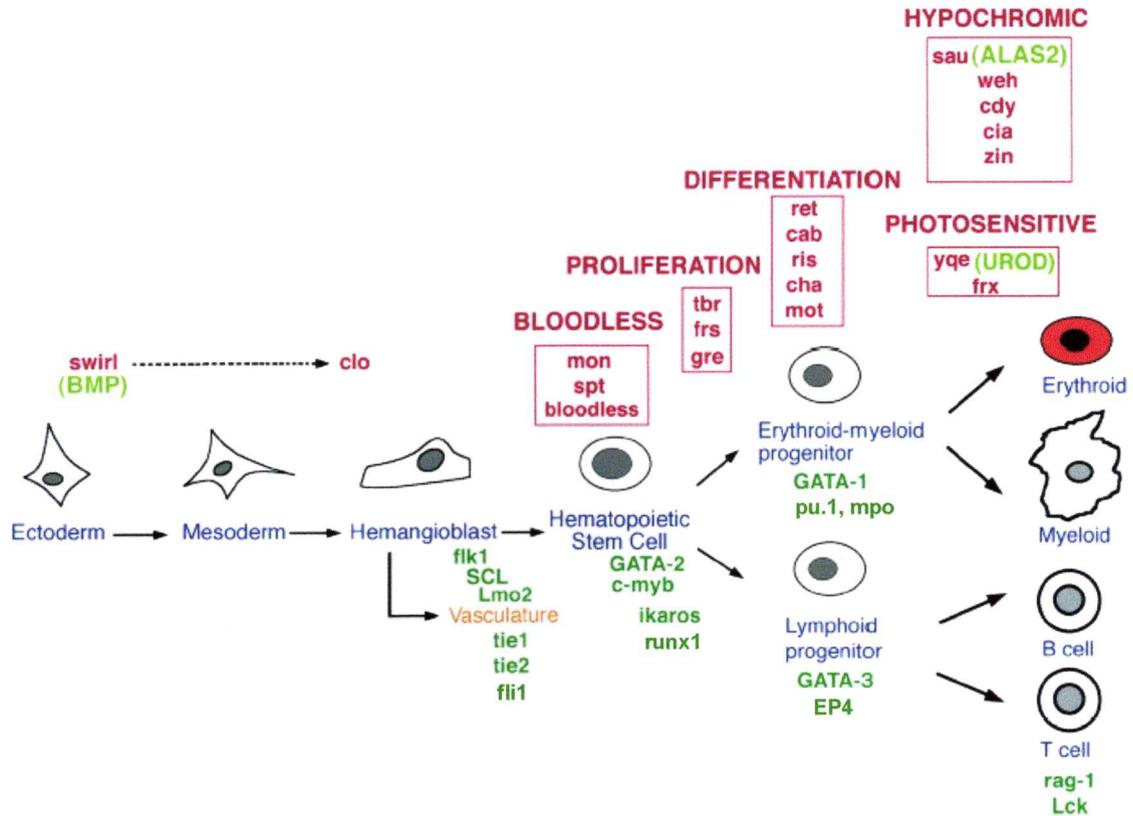


Figura 8. Desarrollo de la hematopoesis en vertebrados. El desarrollo de la sangre en vertebrados comienza con la inducción de una porción del mesodermo ventral denominada "hemangioblasto". La expresión de factores de transcripción específicos es fundamental para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células troncales hematopoiéticas.

En el pez cebra se han aislado y caracterizado una serie de marcadores de los distintos tipos celulares de la sangre (en verde) y se han generado diversos mutantes, los que están agrupados en base a su fenotipo (en rojo).

En vertebrados, la generación del sistema sanguíneo comienza con la inducción del mesodermo ventral y se divide en dos etapas durante el desarrollo (Amatruda J. y Zon LI., 1999). La primera etapa, llamada primitiva o embrionaria, es una etapa transitoria y produce principalmente eritrocitos y algunos macrófagos. Esta etapa es rápidamente reemplazada por la fase definitiva, donde se empiezan a

producir las células troncales hematopoiéticas (HSC) en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM). Los subsecuentes órganos donde se realiza hematopoesis, incluyendo el hígado fetal, el timo y la médula ósea, son poblados por la migración de las HSCs a través de la circulación y es en esta etapa donde todos los elementos de la sangre son formados.

El intercambio de los lugares donde ocurre hematopoesis durante la embriogénesis es una estrategia en común que utilizan un amplia variedad de especies, tales como moscas, sapos, peces y mamíferos; lo que les permite la maduración y la mantención de la población de HSCs.

La hematopoyesis en el pez cebra, al igual que en el resto de los vertebrados tiene dos etapas. La etapa embrionaria de la hematopoesis se origina a las 6 hpf y ocurre principalmente en una zona llamada masa intermedia celular (ICM), la que se encuentra en la región ventral del mesodermo; y en una zona denominada RBI (rostral blood island), la que proviene del mesodermo cefálico (de Jong JL. y Zon LI., 2005). Dentro del ICM, las células troncales se diferencian en células endoteliales vasculares (Lawson ND. y Weinstein BM., 2002) y en pro-eritroblastos, los que entran a la circulación a las 24 hpf (de Jong JL. y Zon LI., 2005). Esta es la etapa denominada del "hemangioblasto", donde poblaciones paralelas de angioblastos (precursores del sistema vascular) y HSCs se encuentran en la región posterior del mesodermo y se desarrollan independientemente.

A medida que los HSCs comienzan a diferenciarse en la región del ICM, comienzan a expresar algunos marcadores tales como los factores de transcripción *scf* (Qian F. y col., 2007; Zhang XY. y Rodaway AR., 2007), *gata2* (Yang Z. y col., 2007), *lmo2* (Zhu H. y col., 2005) e *ikaros* (Willett C. y col., 2001; Schorpp M. y col., 2006). A su vez, es en esta etapa donde los progenitores eritroides comienzan a expresar el

factor de transcripción *gata1* (Long Q. y col., 1997), los progenitores mieloides expresan los marcadores *pu.1* (Hsu K. y col., 2004), *lyzC* (Hall C. y col., 2007) y *mpo* (Berman JN. y col., 2005); y los progenitores linfoides expresan *gata3* (Trede NS. y col., 2001; Bertrand JY. y col., 2008) y *ep4* (Villablanca EJ. y col., 2007), respectivamente (Figura 9).

La etapa definitiva o adulta de la hematopoesis en cambio, se inicia aproximadamente a las 25 hpf y se origina con la generación de las HSCs en la región AGM (de Jong JL. y Zon LI., 2005; Burns CE. y Zon LI., 2006). Sin embargo, recientes estudios han demostrado que existe otra región, independiente de la región AGM, denominada PBI (posterior blood island), en la que se generan transitoriamente entre las 24 y 48 hpf progenitores eritro-mieloides (EMP) (Bertrand JY. y col., 2007).

En esta etapa la expresión de los marcadores *gata1*, *gata2* y *scl* se mantiene, y a su vez comienzan a expresarse otros marcadores como los factores de transcripción *runx1* (Burns CE. y col., 2005) y *c-myb* (Thompson MA. y col., 1998); y las integrinas *cd41* (Lin HF. y col., 2005) y *cd45* (Bertrand JY. y col., 2008) (Figura 9).

A la pocas horas de haberse iniciado el proceso de la hematopoesis definitiva en las regiones AGM y PBI, la región CHT (tejido hematopoiético caudal) (Burns CE. y Zon LI., 2006; Murayama E. y col., 2006) y la región de los túbulos pronéfricos (Bertrand JY. y col., 2008) aparecen como nichos transitorios para la expansión y maduración de las HSCs en el pez cebra (Figura 9). Finalmente, similar a la médula ósea en mamíferos, el riñón en el pez cebra aparece como el sitio definitivo de hematopoesis (Traver D. y col., 2003), donde se provee durante toda la vida de los organismos con HSCs con capacidad ilimitada de auto renovación y con la capacidad de generar todas las líneas celulares de la sangre.

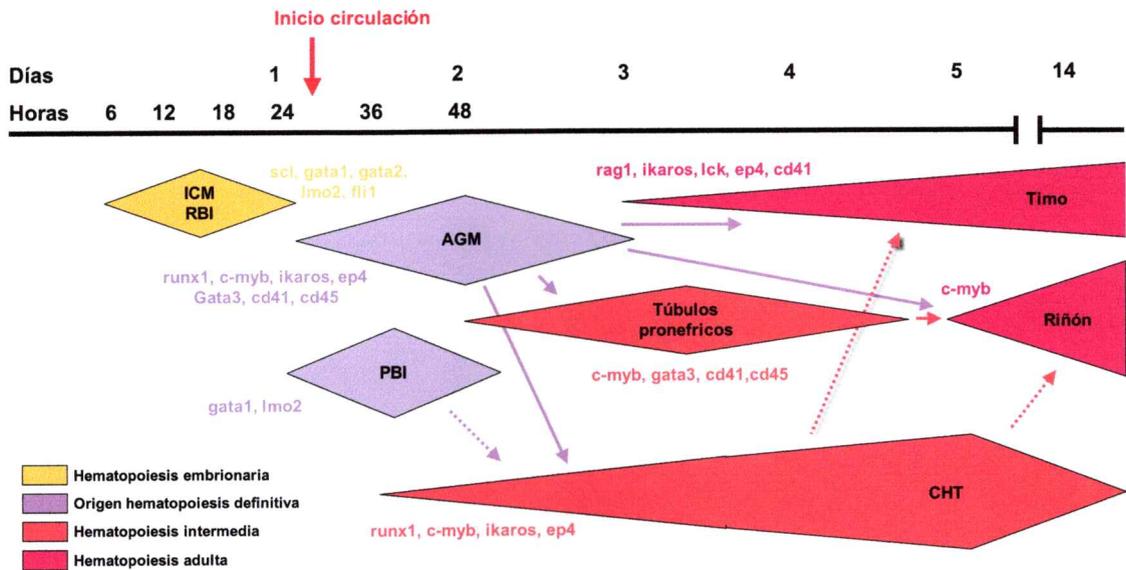


Figura 9. Desarrollo del sistema hematopoiético en el pez cebra. Esquema que ilustra la cronología de los diferentes sitios durante la hematopoyesis en el pez cebra.

Hoy en día, el pez cebra está siendo considerado como un potencial modelo para el estudio genético de la respuesta inmune, como es el caso del desarrollo y función de linfocitos T (Lam SH. y col., 2004; Trede NS. y col., 2004; Langenau D. y col., 2004; Langenau D. y Zon LI., 2005). La linfopoyesis depende de una variedad de factores de transcripción, integrinas, moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas, los que en conjunto orquestan el destino celular, el compromiso y la diferenciación de los linfocitos.

Al igual que en mamíferos y otros vertebrados, el pez cebra posee un complejo sistema inmune adaptativo con linfocitos B expresando inmunoglobulinas (Danilova N. y col., 2000; Danilova N. y col., 2002) y linfocitos T expresando marcadores tales como los genes activadores de recombinación 1 y 2 (*rag1* y *rag2*) (Willett C. y col., 1997), el receptor de células T alfa (*tcr α*) (Haire RN. y col., 2000; Trede NS. y col., 2001) y el factor de transcripción *lck* (Trede NS. y col., 2001; Langenau D. y col., 2004).

La maduración de células T al igual que en el resto de los vertebrados tiene lugar en el timo, el que es considerado un órgano clave en el desarrollo y función del sistema inmune (Boehm T. y col., 2003).

El desarrollo, maduración y activación de linfocitos T depende fundamentalmente de la migración de estas células, la que es controlada por una acción concertada de diversos receptores de quimioquinas. En mamíferos, los receptores de quimioquinas CXCR4, CCR7 y CCR9, entre otros, juegan un papel esencial en la migración celular durante el desarrollo de linfocitos T, como también en la migración de las células dendríticas durante la respuesta inmune adaptativa (Sallusto F. y Lanzavecchia A., 2000; Schaerli P. y Moser B., 2005; Johansson-Lindbom B. y Agace WW., 2007).

En el pez cebra, poco es lo que se sabe sobre la expresión y el papel de los receptores de quimioquinas en el desarrollo de las células T. Basado en la importancia que tienen estas moléculas en la linfopoiesis en mamíferos y el papel conservado del sistema SDF1/CXCR4 en una variedad de contextos en los vertebrados, es necesario caracterizar la expresión y el rol de estas proteínas en el desarrollo y función de los linfocitos T en el pez cebra.

1.6 Análisis genético en el pez cebra

Para la identificación de genes diferencialmente expresados o para detectar la presencia de genes en un tejido o estadio dado son de gran utilidad los análisis de microarreglos.

Los experimentos con microarreglos proveen una tecnología que permite la detección simultánea y en paralelo de miles de genes dentro de una misma muestra (Bier FF. y col., 2008). Es por estas características que estos experimentos han sido utilizados para realizar análisis de expresión global, genotipos, análisis de mutaciones puntuales, poliformismos (SNP), entre otros (Aitman T., 2001).

Por otra parte, estos ensayos están siendo ampliamente utilizados para la caracterización y análisis de la transcripción génica, la que juega un papel esencial en muchos aspectos del desarrollo embrionario en vertebrados. A su vez, en los años recientes esta tecnología esta usada para la comprensión de enfermedades como la diabetes, obesidad (Su G., 2007; Vlacich G. y col., 2007) y el cáncer (Reymond MA. y Schlegel W., 2007; Virtanen C. y Woodgett J., 2008; Voduc D. y col., 2008).

El pez cebra al ser un excelente sistema modelo para el desarrollo de vertebrados, diversos estudios utilizando microarreglos han comenzado a ser utilizados para desarrollar perfiles de expresión génica (Ton C. y col., 2002; Mathavan S. y col., 2005; Douglas SE., 2007). Algunos trabajos han usado esta tecnología para estudiar procesos relacionados con el desarrollo embrionario y la formación de los tejidos (Douglas SE., 2007). Otros estudios por su parte, han utilizado ensayos de microarreglos para la identificación de genes específicos de los diferentes tipos celulares (Covassin L. y col., 2006) y para la identificación de vías de señalización específicas a través de la comparación combinatoria de múltiples líneas mutantes

(Weber GJ. y col., 2005).

En el pez cebra existe la ventaja de contar con un número importante de técnicas genéticas, que permite, entre otras metodologías, obtener mutantes. Estos mutantes, generados químicamente o por mutaciones insercionales, son de gran utilidad en la determinación de la función de un gen y su posición en una vía regulatoria. A su vez, otra herramienta para la inhibición de un gen es el uso de oligonucleótidos antisentido, denominados morfolinós (Egger SC., 2000). Los morfolinós se utilizan para inhibir específicamente la traducción de un mRNA, constituyendo una buena alternativa para estudiar efectos de pérdida de función.

Finalmente, otra herramienta ampliamente utilizada en la actualidad es la transgénesis. De esta forma, se pueden generar líneas transgénicas, que expresan marcadores moleculares (GFP, YFP, RFP) en ciertas células u órganos de interés *in vivo*. Además, se han creado estrategias para sobreexpresar genes en tejidos específicos. De esta manera, es posible realizar análisis genéticos en los órganos deseados, visualizando su desarrollo, gracias a estos marcadores celulares. Una de las tecnologías más utilizadas actualmente para facilitar la transgénesis es la tecnología de transposición basada en el sistema Tol2 (Kawakami K. y Noda T., 2004), que aumenta significativamente la eficiencia de integración de vectores en el genoma. Estos vectores se han combinado con el sistema de clonación Gateway, la que se basa en la recombinación sitio-específica de los sitios *att* del fago lambda (Kwan KM. y col., 2007; Villefranc JA. y col., 2007), permitiendo una transferencia rápida y eficiente de fragmentos de DNA entre plasmidios y la posterior construcción de vectores de expresión con un definido orden y orientación.

Mientras que se han realizado grandes progresos en la identificación de factores determinantes para la dirección por la cual las células migran, los mecanismos

que regulan los movimientos celulares coordinados, donde cada célula debe adoptar una posición para su función determinada, continúan sin elucidarse.

La comprensión de la bases moleculares de la morfogénesis, organización y migración de las células del primordio, requiere entonces la identificación de la expresión y función de los genes expresados en estas células.

Para identificar los genes que se expresan en el primordio migratorio de LLP, se realizó, en esta tesis, un análisis de expresión global basado en la construcción de una librería de cDNAs a partir de células purificadas del primordio. A partir de esta colección de genes de expresión específica, se realizó una selección de un conjunto de ellos para un análisis de expresión y función en las células migratorias del primordio.

II. HIPOTESIS

Dado que el primordio de la línea lateral posterior del pez cebra presenta características conservadas con otros sistemas de migración celular en vertebrados, este tejido es un atractivo sistema-modelo para la identificación de genes y el consiguiente estudio de las bases moleculares y celulares de la migración celular *in vivo*.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer los genes expresados en el primordio de la LLP en el pez cebra

Objetivos específicos

1. Purificación de células del primordio migratorio de la LLP del embrión de pez cebra.
2. Identificación de genes candidatos involucrados en la migración del primordio mediante la construcción de una librería de cDNAs a partir de células purificadas del primordio migratorio.
3. Selección de genes que codifican para proteínas involucradas en la migración del primordio de la LLP y que se encuentren conservados en procesos de migración celular en otros organismos, como es el caso de integrinas, moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas.
4. Análisis de expresión y de función de un grupo de genes identificados a partir de la librería específica de primordio migratorio.
5. En paralelo, se estudiará la expresión y función de genes de pez cebra ortólogos de aquellos involucrados en la migración de linfocitos y células dendríticas en otros organismos, como es el caso de los receptores de quimioquinas.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Material biológico

Como modelo experimental se utilizó embriones de *Danio rerio* (pez cebra) obtenidos mediante cruces espontáneos.

Los peces usados en este estudio se mantuvieron en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, 28°C, en agua desionizada tratada con 60mg/L de Instant Ocean a pH 6,5 en el vivero del Edificio Milenio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Las condiciones de alimentación, cuidados y reproducción se realizaron de acuerdo a lo descrito en Westerfield M. (1994). Los embriones y larvas se mantienen en medio E3 (5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33mM CaCl₂, 0.3mM MgSO₄, 0.1% azul de metileno) en placas petri a 28°C. Los estadios embrionarios y larvales se expresan en horas post fertilización (hpf) o días post fertilización (dpf), respectivamente.

En esta tesis se usaron peces silvestres de la cepa AB y tres líneas transgénicas. La primera es CldnB::GFP que posee las regiones reguladoras del gen *claudinB* y el gen de la proteína fluorescente verde GFP (Haas P. y Gilmour D., 2006). La segunda es Rag1::GFP, que expresa la proteína fluorescente bajo el control del promotor de *rag1* (Jessen JR. Y col., 1999); y la tercera es Fli1::GFP, que expresa la secuencia codificante para la proteína fluorescente bajo el control del promotor de *fli1* (Lawson ND. y Weinstein BM., 2002).

A su vez, se utilizó bacterias *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) y bacterias *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen) para la transformación de los plasmidios utilizados.

4.1.2 Reactivos

Generales: Acido cítrico, BSA, DMSO, glicerol, Heparina, LiCl, MgCl₂, NaOH, pronasa, PTU, rojo fenol, sacarosa, sulfato de amonio, Tris base, Tween-20 (Sigma). Cloroformo, Isopropanol, Metanol (Mallinckrodt). EDTA, H₂O tratada con DEPC, HCl, MAB, NaCl, SDS, TAE (Quality Biological). Etanol (The Warner-Graham Company). H₂O₂ (Fisher Scientific). Paraformaldehído (Electron Microscopy Science). PBS (Cellgro).

Cultivo celular: Suero fetal bovino, medio Hank's, medio L-15, tripsina 0.25%-EDTA (Gibco).

Anticuerpos: Anticuerpo anti-Digoxigenina (Roche), Anticuerpo monoclonal anti-GFP (Invitrogen).

Biología Molecular: Agarosa (SeaKem), BCIP, buffer Transcripción 5X, DIG RNA labeling mix (UTP), DNAsa libre de RNAsas, NBT, RNA polimerasas SP6, T3 y T7, RNasein, UTP-digoxigenina (Roche). Buffer Taq polimerasa, buffer Taq polimerasa High Fidelity, buffer T4 DNA ligasa, buffer Transcriptasa Reversa, marcador de peso molecular de DNA 1kb, proteinasa K, SSC 20X, T4 DNA ligasa, Taq polimerasa, Taq polimerasa High Fidelity, Transcriptasa reversa SUPERScript II, Trizol (Invitrogen). Formamida (Fluka). Pronasa, tRNA (Sigma).

4.1.3 Oligonucleótidos

Amplificación de cDNAs para la síntesis de sondas de RNA antisentido.

Nombre partidador	Plasmidio	Secuencia
T7	pExpress-1 pBluescript SK+/-	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
T3	pBluescript SK+/-	5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3'
SP6	pExpress-1	5' TAC GAT TTA GGT GAC ACT ATA G 3'
pME18SF2	pME18S-FL3	5' CT GTT CTG CGC CGT TAC AGA TCC 3'
pME18SR4	pME18S-FL3	5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGG GTT CAG GGG GAG GTG TGG G 3'

Tabla1: Lista de los partidores utilizados para la síntesis de sondas de RNA antisentido utilizadas en los ensayos de hibridación *in situ*.

Análisis de PCR en tiempo real.

Nombre partidor	Secuencia (Forward= F, Reverse= R)
cldnb	F 5' GAA GGA ATT TGG ATG AGC TGC GTG G 3' R 5' CGA CAG CAT GAT TCC CAT CAG TCC G 3'
cd9l	F 5' GTG ATT GGA GGA GTC GGC ATC G 3' R 5' CAC TCG CGC ACA TTC ACA AAC G 3'
egfp	F 5' GAC CCT GAA GTT CAT CTG CAC CAC C 3' R 5' GCG GGT CTT GTA GTT GCC GTC GTC C 3'
klf12	F 5' CCA CAG CCA AGA GAA ATC GGT C 3' R 5' GTG TGC GTC TAT GGG CTT TCA G 3'
lect1	F 5' GAG TGA AAG CTG AGG TGG CGT C 3' R 5' CTG GCG TCT CAT TCG TGT CGC 3'
myod	F 5' ATG ACA CAC CAA ATG CTG ACG CAC 3' R 5' TCT CTG TGG AAA TTC GCT CCA CGA 3'
pecaml	F 5' CGT TGG CCG GAT GGT TAA ATC C 3' R 5' GCA GCG ATG GGA ACT TTC ACT C 3'
ptgs2	F 5' CAT GTT TGC TTT CTT CGC CCA GC 3' R 5' GTG TTG AAC CTC CAG CGT CTC TC 3'
ptgds	F 5' CCT GAA GAG TGA TGG TTC CTG CTG 3' R 5' GTC AAC CAC GCG CAT GTC ATT G 3'
ptgisl	F 5' GAA CAA CCT CCG CCT GCT TAT G 3' R 5' GCT TGT CAA ACC GGC GAA ACT C 3'
scyba	F 5' GAT GAA TCG CTG TAG TAC GGC CGC 3' R 5' CCG GAT CTT CGG CCC TTT TCT TG 3'
sema3d	F 5' CAG GTG TCA CTG CAC AGG TGC C 3' R 5' GTG TCC CAA CAA TGG CTG GAT G 3'
similar cd205	F 5' GTG CGT CAG ATC TCA GTA GTT TGA G 3' R 5' GCT AAA GCA GTG CAC CGA GTG CTG 3'
similar cxcr6	F 5' GAA GAA TGG CTG GAA CCT GCA AC 3' R 5' CCG ACT ATG CCA GTC ACA ACC 3'
sox8	F 5' GAA CGC GTT TAT GGT TTG GGC TC 3' R 5' CCT CCA CGA ACG GCC TCT TCT C 3'
stauflen	F 5' CCA ACA GCT GGA GTA CTT GGC TC 3' R 5' CAA TGC CGT GAA AGG TCA TCT GC 3'

Nombre partididor	Secuencia (Forward= F, Reverse= R)
facstd	F 5' ATG GCC AGC CAT TTG AGG TTG ATG 3' R 5' GCC GTG CAA GAA AGA ACA GAA CCA 3'

Tabla 2: Lista de los partidores utilizados para los análisis de expresión génica del primordio de la LLP mediante PCR en tiempo real.

4.1.4 Sondas

El cDNA utilizado para la transcripción de las sondas de RNA antisentido se linearizó con enzimas de restricción o se amplificó mediante ensayos de PCR con partidores específicos para cada gen. La siguiente tabla detalla las sondas que se utilizaron en esta tesis.

Nombre	Enzima de restricción	RNA Polimerasa
ccr7	Apal	Sp6
ccr9	EcoR1	T7
cd9l	-	T3
cldn7	EcoR1	T7
c-myb	-	T7
cxcr4b	EcoR1	T3
dkk1	-	T3
dlx6	EcoR1	T7
eya1	EcoR1	T7
f11r	-	T7
ikaros	-	T7
lrf7	-	T7
klf2b	-	T7
klf12	-	T7

Nombre	Enzima de restricción	RNA Polimerasa
lect1	EcoR1	Sp6
mmp9	-	T7
pecaml	-	T7
ptgs2	Sma1	T7
ptgds	Kpn1	T3
ptgisl	-	T3
rag1	Sma1	T7
sema3ab	-	T7
sema3d	-	T7
scl	-	T7
similar cd99	-	T7
similar cd205	-	T7
similar cxcr6	SacII	T7
similar glicoproteína a33	-	T7
similar tumor protein d52	-	T7
sox8	-	T3
sox17	-	T7
squint	Not1	Sp6
stauflen	-	T3
tlr3	-	T3
thbs3a	-	T3

Tabla 3: Lista de sondas de RNA antisentido utilizadas en los ensayos de hibridación *in situ*.

4.1.5 Morfolinos antisentido

Nombre Mo	Secuencia
<i>Mof11r</i>	5' AGCACACAAAGGCGAAGGTCAACAT 3'
<i>Mocd9l</i>	5' TTTATGAGGAGAAACCCAAGACTGA 3'
<i>Mosquint</i>	5' ATGTCAAATCAAGGTAATAATCCAC 3'
<i>Modkk1</i>	5' GAGAGCATGGCGATGTGCATCATGT 3'
<i>Moccr7</i>	5' GCGTGCATGTTTGCAGATGACTTTC 3'

Tabla 4: Lista de los morfolinos utilizados en los ensayos funcionales *in vivo* de migración celular.

4.1.6 Otros

Filtro 100µm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Kit Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification, kit MEGAclean™, kit mMESSAGE mMACHINE (Ambion). Kit QIAprep Spin Miniprep, kit QIAGEN Plasmid Maxi, kit MiniElute Gel Extraction, kit MiniElute PCR Purification (QIAGEN), kit SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen).

4.2 METODOS

4.2.1 Obtención de células del primordio de la LLP

Para obtener células del primordio migratorio, inicialmente se aisló el primordio de embriones de pez cebra a partir de disecciones de colas de peces transgénicos *CldnB::GFP*, los cuales expresan GFP en distintos tipos celulares de la línea lateral

(Figura 4). Las disecciones se realizaron aproximadamente a las 36 hpf, etapa en la que el primordio ha migrado mas allá de la prolongación del vitelo. Se realizaron disecciones de aproximadamente 200 embriones a la vez. Una vez obtenidos los fragmentos de colas que contienen los primordios, el tejido fue disgregado enzimática y mecánicamente, por 30 minutos con tripsina 0,25% en medio Hank's hasta obtener una suspensión de células individuales. A continuación las células fueron filtradas con un filtro de 40 μ m y luego colectadas por centrifugación a 6000xg por 2 min. Posteriormente, el pellet celular se lavó con PBS y las células fueron nuevamente colectadas por centrifugación a 6000xg por 2 min.

4.2.2 Análisis de citometría de flujo

La detección de las células GFP+ del primordio migratorio del pez cebra se realizó mediante análisis de citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en el paso de células de forma individual por un haz de luz generado por un láser. El impacto de cada célula con el haz de luz produce señales (dispersión o fluorescencia) que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por diferentes detectores para su posterior análisis.

Las células previamente obtenidas por disgregación fueron fijadas en PFA 4% y analizadas en base a su fluorescencia para GFP en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciencias, San Diego, CA, USA) utilizando el programa CellQuest. Se analizaron células provenientes de colas disectadas de embriones silvestres (control) y de embriones CldnB::GFP.

4.2.3 Análisis de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

La purificación de las células del primordio de la LLP se realizó mediante análisis de FACS. Células provenientes de colas de peces transgénicos *CldnB::GFP* fueron resuspendidas en medio L-15 10% FBS y purificadas a temperatura ambiente utilizando un equipo de cell sorting BD FACSAria (Becton Dickinson, San José, CA) utilizando el programa BD FACSDiva.

La técnica de separación celular o “cell sorting” es una variante de la citometría de flujo tradicional que permite la separación física de las células analizadas (FACS).

Esta separación se basa en la división del flujo continuo, mediante vibración, en pequeñas gotas de diferentes tamaños. Se puede controlar el tamaño y frecuencia de las gotas hasta conseguir que en cada gota se encuentre una célula única. En el momento que se forma la gota, se aplica una descarga que deja la gota con carga positiva o negativa de acuerdo a los criterios establecidos por el operador. A la salida del flujo continuo, se encuentran unas placas cargadas, que harán que la gota se desplace hacia uno u otro lado, para recogerlas en placas de cultivo o tubos estériles.

Inicialmente, las células fueron analizadas en base a su tamaño (FSC) vs. granulosidad (SSC). A continuación, para la purificación por fluorescencia de GFP, se seleccionó una población celular contenida en la región P1 del gráfico dot-plot de FSC vs. SSC. (Figura 15). Se aislaron dos poblaciones celulares: GFP positivas y GFP negativas (control). Para especificar las regiones de células GFP- y GFP+ a purificar, se utilizó como control negativo células obtenidas de peces cebra silvestres del mismo estadio con el fin de sustraer el background de fluorescencia.

4.2.4 Extracción de RNA de células purificadas

EL RNA de las células purificadas mediante FACS fue extraído utilizando el método de "Trizol Reagent" según instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del RNA fue determinada utilizando el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology).

4.2.5 Amplificación de RNA

EL RNA de las células purificadas mediante FACS fue amplificado utilizando el método de "Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit" (Ambion) según instrucciones del fabricante.

4.2.6 Análisis de Microarreglos

Para identificar los genes que se expresan en el primordio migratorio de LLP, se realizó un análisis de expresión global basado en la construcción de una librería de cDNAs a partir de células purificadas del primordio.

Esta estrategia se basó en la transcripción reversa de RNA a cDNA, donde este último fue marcado con sondas fluorescentes e hibridado contra un microarreglo que contiene una librería de 33.241 oligos de pez cebra (Microarray Facility, National Human Genome Research Institute, Bethesda, EEUU).

El chip de microarreglos de cDNA de pez cebra utilizado (33K NHGRI-NIH) contiene oligonucleótidos específicos para 19.000 genes de pez cebra. Son en total 33.241 oligos en el arreglo, y esta conformado por 3 sets: Compugen (16.512 oligos,

60 mers), MWG (14.240 oligos, 50 mers) y Operon (3.479 oligos, 40 mers). El microarreglo contiene además, controles positivos (genes housekeeping), controles negativos (random sequences) y duplicados de la mayoría de los genes para controlar la homogeneidad y especificidad de la hibridación. El proceso de hibridación comparó dos muestras de cDNA: células GFP+ vs. GFP- de embriones CldnB::GFP marcados con fluoróforos diferentes, permitiendo así la detección de genes de alta expresión en el primordio migratorio relativo a los demás tejidos (Figura 10).

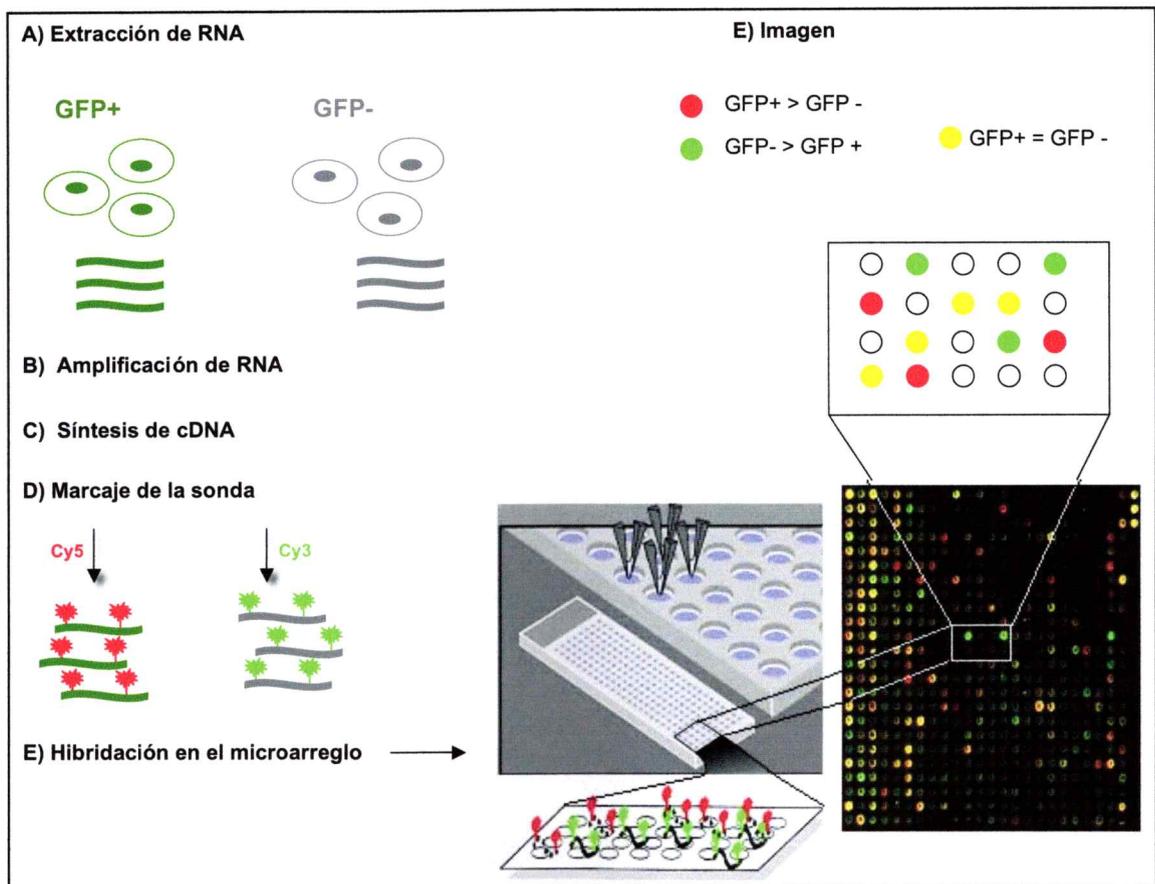


Figura 10. Esquema de la metodología empleada para el análisis de expresión global de los genes del primordio de la LLP.

La intensidad de fluorescencia obtenida de los diferentes spot de los microarreglos fue determinada utilizando un láser confocal (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). A continuación, los datos crudos obtenidos fueron procesados con el programa DeArray (Scanalytics Inc.). El procesamiento de los valores consistió inicialmente en la transformación logarítmica de los datos (\log_2) y en un posterior análisis estadístico de confiabilidad de la hibridación. Este análisis se realizó con el método de Lowess, el que se basa en la normalización de la intensidad total para cada gen, asignando valores entre 0 y 1.0 a cada spot, luego de incorporar correcciones de "background" y de controles negativos.

Posteriormente, los datos ajustados fueron trasladados para su análisis a los programas FileMaker Pro 9.0 y GeneSifter. Estos programas permiten realizar búsquedas dirigidas de datos basándose en una serie de criterios establecidos por el operador. El criterio más relevante es aquel que selecciona puntos de hibridación (spots, correspondientes a un mRNA o gen) de acuerdo a las diferencias de intensidad de hibridación presentadas por las diferentes muestras.

Finalmente, estos valores fueron sujetos a análisis estadístico T-test para generar los p-value (valor p asociado), con el fin de determinar la significancia estadística de los cambios de nivel observados para cada gen.

4.2.7 RT-PCR

El RNA de colas disectadas de embriones de pez cebra de 36 hpf se extrajo utilizando "Trizol Reagent". Brevemente, se resuspendió las disecciones en 200 μ l de Trizol y luego se le agregó 40 μ l de cloroformo. Posteriormente, se centrifugó por 15 min. a 12000xg a 4°C. La fase acuosa fue traspasada a un tubo estéril y el RNA fue

precipitado con 100 μ l de Isopropanol por al menos 30 min. a -20°C . A continuación, se centrifugó por 15 min. a 12000xg a 4°C y el precipitado de RNA fue lavado con ETOH 70%. Finalmente, el RNA fue resuspendido en 11 μ l de H_2O libre de nucleasas. La concentración del RNA fue determinada utilizando el equipo "NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer".

El cDNA se sintetizó a partir de 1 μ g de RNA utilizando la enzima Transcriptasa Reversa SuperScript según instrucciones del fabricante. La primera hebra de cDNA fue amplificada a continuación por PCR usando el siguiente protocolo:

2,5 μ l Buffer 10X
1 μ l MgSO_4
1 μ l Partidor Forward 10 μ M
1 μ l Partidor Reverse 10 μ M
0,5 μ l dNTPs mix 10mM
1 μ l cDNA
0,1 μ l Taq Polimerasa
 H_2O hasta 25 μ l

1. 2min. 94°C
2. 30seg. 94°C
3. 30seg. 60°C
4. 1min. 72°C
5. 7min. 72°C

35 ciclos

Los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 1%.

4.2.8 Transformación de bacterias competentes

La transformación de los plasmidios se realizó mediante el método de choque térmico. Brevemente, a 100 μ l de bacterias competentes se le agregó 100 ng de DNA plasmidial y se incubó en hielo durante 30 min. A continuación, se dio un choque térmico de 45 seg. a 42°C. Posteriormente, la mezcla se incubó nuevamente en hielo por 10 min., para luego agregar 800 μ l de medio SOC e incubar en un agitador a 37°C por 1 hora. Pasado este tiempo, el cultivo de bacterias fue sembrado en placas de agar con el antibiótico apropiado e incubado a 37°C durante toda la noche.

4.2.9 Extracción de DNA plasmidial

EL DNA plasmidial fue purificado utilizando los kit "QIAprep Spin Miniprep", "QUIAGEN Plasmid Maxi", "MiniElute Gel Extraction" y "MiniElute PCR Purification" (QUIAGEN), según instrucciones del fabricante. La concentración del DNA fue determinada utilizando el equipo "NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer".

4.2.10 Extracción de DNA genómico

El DNA genómico de embriones de pez cebra se purificó con un buffer de lisis (Tris-HCl 10mM pH 8, NaCl 100mM, EDTA 10mM, SDS 0.4%, 100 μ g/ml de Proteinasa K) por 2 horas a 55°C. Luego del tiempo de incubación, se centrifugó la muestra a máxima velocidad para coleccionar el material no digerido. Se recuperó el sobrenadante, se agregó 60 μ l de Isopropanol y se centrifugó a 3000 r.p.m por 5 min. a 4°C. El DNA

precipitado fue lavado con 100 μ l de EtOH 70%. El DNA genómico fue secado a temperatura ambiente aproximadamente por 15 min. y luego resuspendido en 50 μ l de H₂O libre de nucleasas. La concentración del DNA fue determinada utilizando el equipo "NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer".

4.2.11 Síntesis de Sonda para hibridación *in situ*

La síntesis de sondas se llevó a cabo en todos los casos de la siguiente forma:

0.5 μ g DNA linearizado o producto de PCR

2 μ l DIG RNA labeling mix 10X

2 μ l buffer transcripción 10X

2 μ l RNA polimerasa (T3, T7 o SP6)

0,5 μ l inhibidor de RNAsa (40U/ μ l)

H₂O hasta 20 μ l

La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas. Luego se le agregó 2 μ l de DNAsa e incubó 15 min. adicionales. A continuación, se precipitó el RNA con LiCl durante toda la noche a -20°C. Finalmente, se midió la concentración del RNA en un gel de agarosa con el fin de guardar la sonda a una concentración stock de 10 μ g/ml en buffer de hibridación.

4.2.12 Hibridación *in situ*

Se utilizó el protocolo descrito por Thisse C. y Thisse B., (2008) con algunas modificaciones. Embriones y/o larvas de pez cebra fueron decorionados con pronasa, fijados en PFA 4% v/v en PBS a 4°C durante toda la noche y almacenados en metanol 100% por un máximo de 6 meses. Al iniciar la hibridación *in situ* se realizó una rehidratación de los embriones, la que consta de 3 lavados sucesivos de 5 min. en metanol 75%, 50% y 25% v/v en PBST, respectivamente. Luego se lavó 2 veces durante 5 min. con PBST. Posteriormente, la permeabilización de los embriones se realizó por digestión con proteinasa K 10µg/ml a temperatura ambiente por los tiempos indicados en la siguiente tabla:

Estadio de desarrollo	Concentración de proteinasa K	Duración del tratamiento
24 hpf	1µg/µl	5 min.
30-36 hpf	1µg/µl	10 min.
48 hpf	1.5µg/µl	10 min.
72 hpf	2µg/µl	10 min.
5 dpf	2.5µg/µl	10 min.

Tabla 5. Concentración de proteinasa K y tiempo de tratamiento para los distintos estadios de desarrollo del pez cebra.

Inmediatamente después, se fijaron nuevamente los embriones en PFA 4% durante 30 min., para luego lavarlos 5 veces durante 5 min. con PBST. A continuación, se incubaron los embriones en buffer de hibridación (Formamida 50%, SSC 5X, Heparina 50µg/ml, tRNA 500µg/ml, Acido cítrico 1M pH 6.0, Tween 20 0.1%) durante al menos 4 horas a 65°C, y luego se agregó la ribsonda diluida a la concentración de 1µg/ml en buffer de hibridación durante al menos 16 hrs. Posteriormente, se realizó el lavado de la sonda con 3 incubaciones sucesivas de 10 min. cada una con Formamida

50%, Formamida 25%, SSC 2X y con 2 incubaciones sucesivas de SSC 0.2X por 30 min. a 65°C, respectivamente. Después del lavado de la sonda, se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos para anticuerpos con solución de bloqueo (PBS 1X, Tween 20 0.1%, BSA 0.2%, DMSO 1%) por al menos 4 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizado el bloqueo, se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina 1/4000 en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 5 lavados de 20 min. cada uno con PBST para eliminar el exceso de anticuerpo.

Finalmente, previo al revelado de la fosfatasa alcalina, los embriones se ambientaron en solución AP (Tris 100mM pH 9.5, MgCl₂ 50mM, NaCl 100mM, Tween 20 0.1%) con 3 lavados de 5 min. cada uno, para luego incubarlos en solución NBT/BCIP en ausencia de luz a temperatura ambiente o 4°C hasta ver la aparición de marca.

4.2.13 PCR en tiempo real

Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron utilizando el kit SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen), según instrucciones del fabricante. La purificación de las células del primordio de LLP y la posterior extracción del RNA de éstas se realizó como fue descrito anteriormente.

Previo a el análisis de PCR en tiempo real de los genes respectivos, se construyó una curva de calibración con diluciones seriadas de RNA (40-20-10 y 5 ng) para cada partidor en particular, con el fin de comprobar su especificidad. Además, estas curvas de calibración con concentraciones conocidas de RNA se utilizaron para el posterior análisis cuantitativo de la expresión génica.

Las variaciones en la expresión de los genes se analizaron utilizando

cantidades iguales de muestra normalizadas según los niveles de expresión de *βactina*.

Las condiciones de la reacción de PCR fueron:

- 1μl Fluoresceína 0.25uM
- 12.5μl Buffer SYBR Green mix 2X
- 0.5μl Partidor Forward 10μM
- 0.5μl Partidor Reverse 10μM
- 0,5μl SuperScript™ III RT / Platinum Taq
- 4μl RNA (20 ng)
- 6uL H₂O

- 1. 15min. 60°C
 - 1. 3.30min. 60°C
 - 2. 15seg. 95°C
 - 3. 30seg. 60°C
 - 4. 1min. 95°C
 - 5. 10seg. 95°C
- 40 ciclos
- 140 ciclos

4.2.14 Microinyección de embriones

Para la microinyección de embriones se usó una placa de Petri con medio E3 para ubicar los embriones. Los embriones en estadio de una célula fueron ordenados en 3 filas paralelas en el borde de un portaobjeto, para luego ser inyectados con 10 nl de una solución de DNA o morfolinós (Mo) en rojo fenol al 1% en agua, usando un inyector de presión de nitrógeno (Narishige).

4.2.15 Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos fueron realizados en base a alineamientos múltiples de secuencias aminoacídicas. Los alineamientos fueron realizados mediante análisis de ClustalW, para determinar posibles relaciones de ortología entre los genes. Los árboles filogenéticos por su parte, se realizaron utilizando el programa Phylip.

4.2.16 Constructo *ccr7-egfp*

Inicialmente, se amplificó el promotor de *ccr7* de DNA genómico de embriones de pez cebra de 24 hpf. Los partidores utilizados se muestran a continuación:

pccr7F4attB1 5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC TGA
TGT GGT GAC CCC TGA GAT AAG 3'

pccr7R2attB5r 5' GGG GAC AAC TTT TGT ATA CAA AGT TGT CTG GGG
TCT GTT CAC GAC AC 3'

Las condiciones de la reacción de PCR fueron:

Mix

2,5µl Buffer 10X

1µl MgCl₂

1µl Partidor F2 10µM

1µl Partidor R2 10µM

0,5µl dNTP mix 10mM

100ng cDNA

0,1µl Taq Polimerasa

H₂O hasta 25 µl

1. 2min. 94°C

2. 30seg. 94°C

3. 30seg. 60°C

4. 1.5min. 72°C

35 ciclos

Para la generación del constructo *ccr7-egfp* se utilizó el sistema Tol2kit (MultiSite Gateway® Pro Technology) (Invitrogen) según instrucciones del fabricante.

La tecnología de clonación del sistema Gateway se basa en el sistema de recombinación sitio-específica de los sitios *att* del fago lambda (Kwan KM. y col., 2007; Villefranc JA. y col., 2007), permitiendo una transferencia rápida y eficiente de fragmentos de DNA entre plasmidios y la posterior construcción de vectores de expresión con un definido orden y orientación. Este sistema utiliza dos reacciones de

recombinación diferentes, la reacción BP para construir los denominados vectores de entrada ($\text{attB} \times \text{attP} \rightarrow \text{attL} \times \text{attR}$) y la reacción LR, para la construcción del vector de expresión final ($\text{attL} \times \text{attR} \rightarrow \text{attB} \times \text{attP}$). Estas reacciones son catalizadas por una mezcla de enzimas que se unen a los sitios att y median la recombinación homóloga de los diferentes productos lineales de DNA entre los plasmidios. El esquema de la metodología utilizada en la generación del constructo *ccr7::GFP* se muestra en la figura 11.

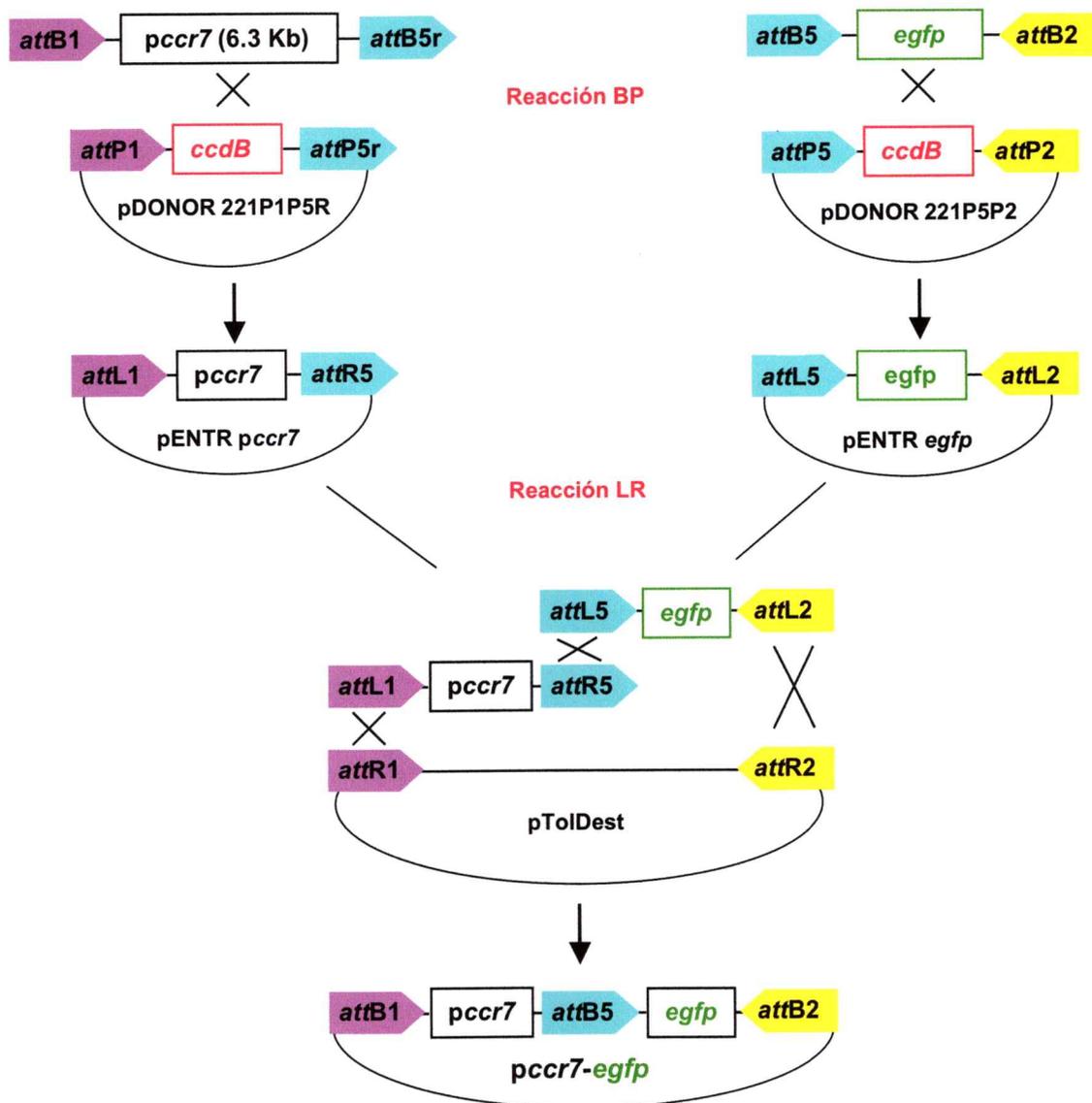


Figura 11. Esquema de la metodología empleada para la generación del constructo del promotor de *ccr7* fusionado a la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente mejorada *egfp*.

El DNA correspondiente al promotor de *ccr7* fue clonado en el vector *pDonor221P1P5r* y el DNA de *egfp* en el vector *pDonor221P2P5*, respectivamente, mediante la reacción BP. Estos plasmidios a continuación, fueron transformados en

bacterias competentes Top10. De cada transformación se aislaron 3 colonias, se purifico el DNA plasmidial y se realizó ensayos de PCR con los partidores apropiados para comprobar si contenían el inserto esperado. Una vez que se obtuvo los vectores de entrada, se realizó la doble ligación entre pEntccr7, pEntegfp y el vector de expresión pTol2Dest, para luego transformar en bacterias competentes Top10. De esta transformación se aislaron 5 colonias, se extrajo el DNA plasmidial y se realizó ensayos de PCR con los partidores respectivos para comprobar si contenían el inserto esperado.

Una vez obtenido el constructo se procedió a inyectarlo en conjunto con el mRNA de la transposasa Tol2. La síntesis y posterior purificación del mRNA de la transposasa se realizó con los kit mMMESSAGE mMACHINE y MEGAclear™ (Ambion), respectivamente, según instrucciones del fabricante.

Finalmente, el mix de inyección utilizado fue:

50ng DNA
25ng mRNA
0.1% Rojo fenol
H₂O hasta 10µl

V. RESULTADOS

Nuestro diseño experimental se baso en la identificación de nuevos genes involucrados en la migración del primordio de la línea lateral posterior (LLP) del pez cebra, mediante la construcción de una librería de cDNAs a partir de células purificadas del primordio migratorio.

De esta manera, proponemos al primordio de la LLP del pez cebra como un atractivo sistema-modelo, versátil, accesible y de fácil manipulación para el estudio de la migración celular *in vivo*.

5.1 Purificación de células del primordio migratorio de la LLP del embrión de pez cebra

Como modelo experimental en esta tesis se utilizó peces cebra transgénicos CldnB::GFP, obtenidos en el laboratorio del Dr. Darren Gilmour, EMBL, Alemania. Brevemente, esta línea transgénica fue generada situando la secuencia codificante para la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) de membrana (lynEGFPpA) bajo el control del promotor de claudin b (CldnB) (Haas P. y Gilmour D., 2006).

CldnB es una proteína de transmembrana de unión estrecha ("tight junction"), miembro de la familia de las tetraspaninas. Esta proteína participa en procesos de adhesión y migración celular, y es altamente expresada en órganos derivados de las placodas sensoriales incluyendo al primordio de la línea lateral posterior (Kollmar R. y col., 2001; López-Schier H. y col., 2004). Un fragmento de ocho kilobases del promotor de CldnB fue suficiente para dirigir la expresión de GFP a todas las células del primordio migratorio de la LLP, como también a los neuromastos y las células

interneuromásticas (Figura 4) (Haas P. y Gilmour D., 2006).

Dada la expresión restringida de EGFP en sólo algunos tejidos, incluyendo las células del primordio migratorio, se decidió usar esta línea transgénica para purificar células progenitoras del sistema de la línea lateral posterior (LLP).

Para llevar a cabo este objetivo, fue necesario aislar las células del primordio de la LLP a partir de colas de embriones disectadas, para evitar así contaminación con células positivas para GFP provenientes de otros tejidos. La disección de las colas se realizó a las 36 hpf, etapa en la que el primordio se encuentra en la mitad de su trayecto a través del miosepto horizontal y ya ha migrado más allá de la prolongación del vitelo (Figura 12).

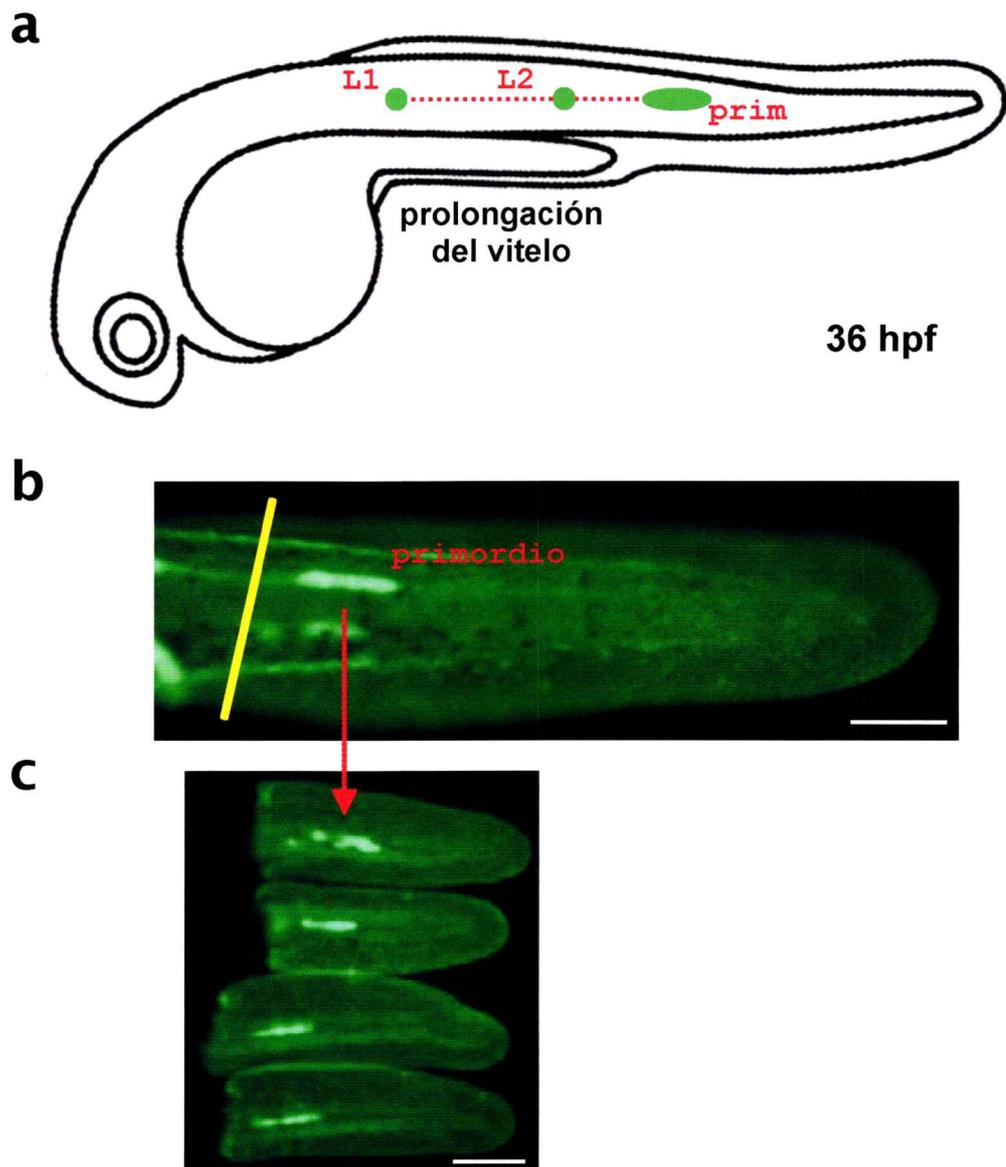


Figura 12. Disección de embriones transgénicos *CldnB::GFP*. a) Esquema de un embrión de 36 hpf. El primordio de la LLP se encuentra en la mitad de su trayecto a lo largo del miosepto horizontal. b) Embrión *CldnB::GFP* de 36 hpf. En este estadio se realizó la disección de los embriones (línea amarilla). La flecha muestra al primordio migratorio. c) Colas de embriones transgénicos que contienen los primordio de la LLP. L1: neuromasto 1, L2: neuromasto 2, prim: primordio de la LLP. Escala de barras; b-c) 50 μ m.

Se efectuaron tres ensayos para demostrar que, luego de la disección de los embriones, se recuperó el primordio migratorio. Primero, se visualizaron los fragmentos de cola bajo fluorescencia para confirmar la presencia de células GFP positivas (Figura 12c). Segundo, se realizaron ensayos de hibridación *in situ* para genes de expresión específica en el primordio de la LLP, entre ellos *eya1* (Figura 13a). Finalmente, realizamos experimentos de RT-PCR para genes de expresión conocida en el primordio de la LLP. En este caso, se aisló el RNA de los fragmentos de colas y se analizó la expresión de los genes *tacstd*, *cldnb* y *cxcr4b* (Figura 13b).

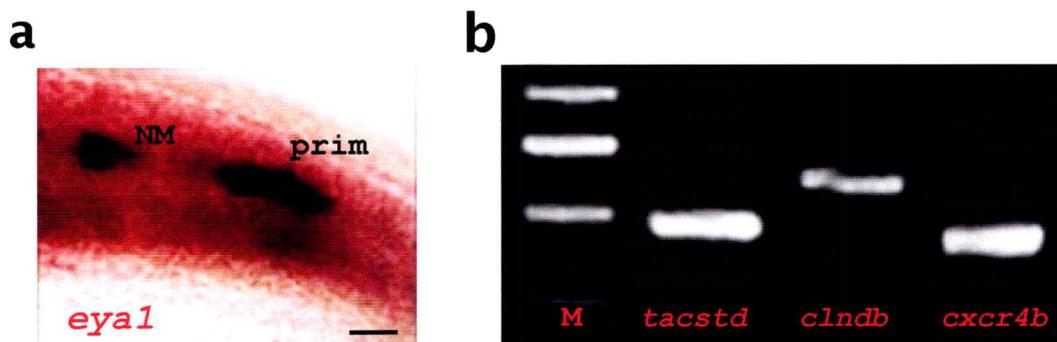


Figura 13. Análisis de hibridación *in situ* y RT-PCR en colas de embriones transgénicos de pez cebra. a) Vista lateral de una cola de un embrión de 36 hpf. Se observa la expresión del mRNA de *eya1* en el primordio (prim) y en los neuromastos (NM) de la LLP. b) Análisis de RT-PCR de colas de embriones CldnB::GFP. La pureza de las disecciones fue analizada mediante la expresión génica de los marcadores de la LLP *tacstd*, *cldnb* y *cxcr4b*. M: marcador de peso molecular. Escala de barras; a) 10 μ m.

Los resultados obtenidos, tanto por RT-PCR como por hibridación *in situ*, confirman que los primordios de la LLP están contenidos en las colas de embriones de pez cebra disectadas, quedando además demostrada la efectividad de las disecciones. A su vez, estos resultados nos permitieron verificar la buena calidad del RNA luego de la disección de los embriones.

Una vez comprobado que los fragmentos de embriones contenían los primordios de la LLP, procedimos a purificar células del primordio migratorio. Se realizaron disecciones de aproximadamente 200 embriones a la vez, lo que permite recuperar alrededor de 800.000 células totales por muestra. A medida que se disectaban las colas, éstas fueron almacenadas en medio Hank's en hielo, para luego ser disgregadas enzimáticamente por 30 min. a temperatura ambiente con un paso de disgregación mecánica con pipeta Pasteur hasta obtener una suspensión de células única. Finalmente, las células fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en medio L-15 suplementado con suero fetal bovino para su posterior uso.

A continuación, las células fueron usadas para análisis de citometría de flujo para evaluar la posibilidad de separar las células GFP+ del primordio de la LLP para una posterior purificación de éstas por ensayos de FACS (Figura 14). Para esto, disectamos colas de embriones silvestres (control) y de embriones transgénicos CldnB::GFP. Luego, una vez disgregadas las células de ambas muestras, éstas fueron fijadas en paraformaldehído 4% PBS y la presencia de GFP en la población celular fue detectada en el citómetro.

Para los análisis de expresión de GFP, se seleccionaron las células contenidas en la Región 1 (R1) del gráfico dot-plot de tamaño (FSC) vs. granulosidad (SSC) celular que muestra la figura 14a.

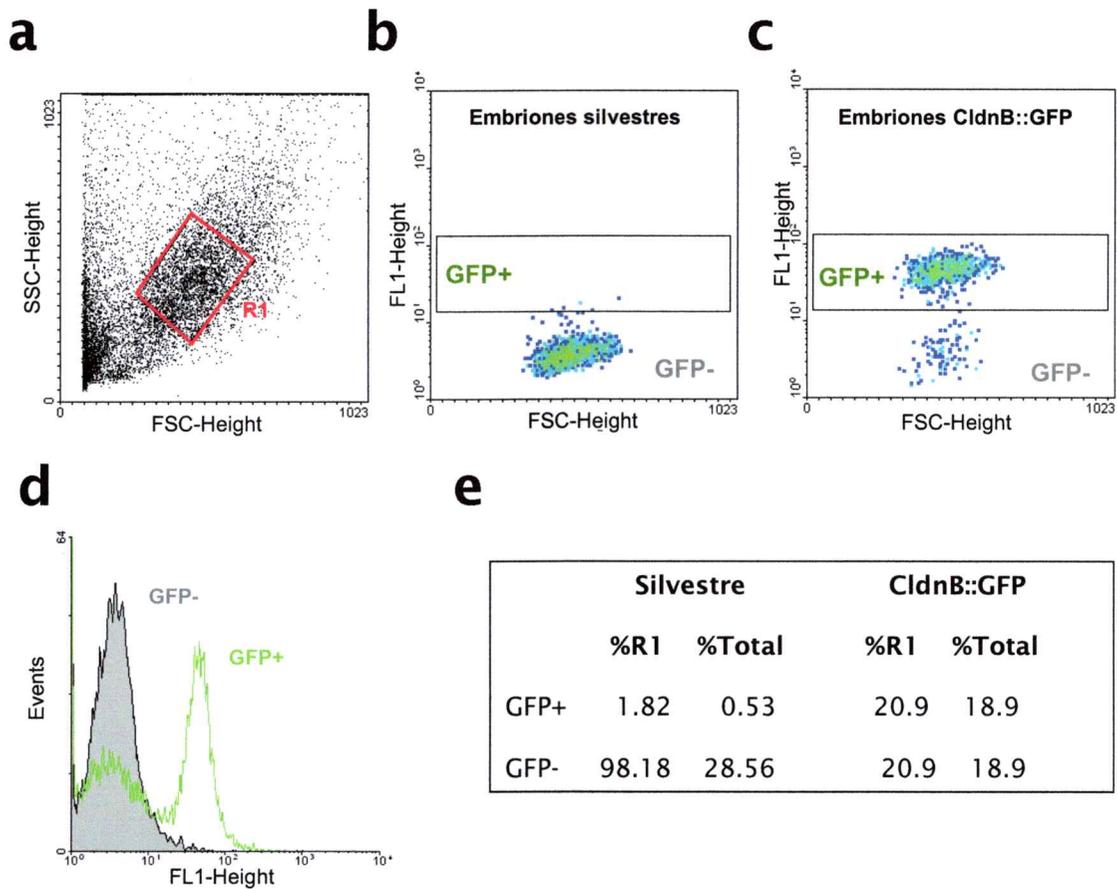


Figura 14. Análisis de citometría de flujo de células purificadas de primordios de pez cebra. a) Se muestra un gráfico de tamaño celular (FSC) vs. granulosidad (SSC). R1: población de células analizadas en el citómetro. b) Gráfico de intensidad de embriones silvestres. Se observa que un 1.82% de la región R1 son células GFP+. c) Detección de células GFP+ purificadas de embriones transgénicos CldnB::GFP. Se observa que un 75.54% de la región R1 son positivas para GFP. d) Histograma que muestra la cantidad de eventos por intensidad de fluorescencia de embriones control (línea gris: células GFP-) vs. embriones transgénicos (línea verde: células GFP+). e) Tabla resumen de los porcentajes obtenidos de las poblaciones celulares analizadas.

Como se aprecia en la figura, la población seleccionada consiste en un 23.47% de células GFP+ del total celular para los embriones CldnB::GFP, en comparación con un 0.53% detectado en embriones silvestres (Figura 14e). A su vez, el histograma de la

figura 14d muestra la intensidad de fluorescencia asociada a la proteína GFP en la población celular de embriones control (línea gris con relleno) vs. embriones transgénicos (línea verde). Estos resultados confirmaron que mediante esta técnica es posible identificar células GFP+ a partir del primordio migratorio de embriones CldnB::GFP, por lo que el protocolo utilizado para la obtención de las células es adecuado.

A continuación, se repitió el experimento descrito (corte de embriones y disgregación de las células) esta vez cargando las células en un Cell Sorter para su separación física mediante ensayos de FACS. Esta técnica ha sido utilizada previamente en el pez cebra, ya sea para purificar células hematopoiéticas (Long Q. y col., 1997), para separar diferentes tipos celulares de la sangre (Traver D. y col., 2003), para el estudio *in vivo* del desarrollo de linfocitos T (Langenau DM. y col., 2004), y para la identificación de genes específicos de los diferentes tipos celulares (Covassin L. y col., 2006), entre otros.

En los ensayos de FACS, se realizaron disecciones de aproximadamente 200 embriones a la vez, y las células obtenidas de los primordios fueron resuspendidas en medio L-15 10% FBS, para luego ser purificadas a temperatura ambiente utilizando un equipo de cell sorting BD FACSAria y el programa BD FACSDiva (BD Bioscience).

Para cada experimento, separamos dos poblaciones celulares: GFP positivas y GFP negativas (control), respectivamente (Figura 15); las que fueron purificadas directamente en Trizol, para así preservar la estabilidad del RNA. Para la purificación de las dos poblaciones, se seleccionaron las células contenidas en la región P1 del gráfico dot-plot de tamaño (FSC) vs. granulosidad (SSC) celular que se muestra en la figura 15a.

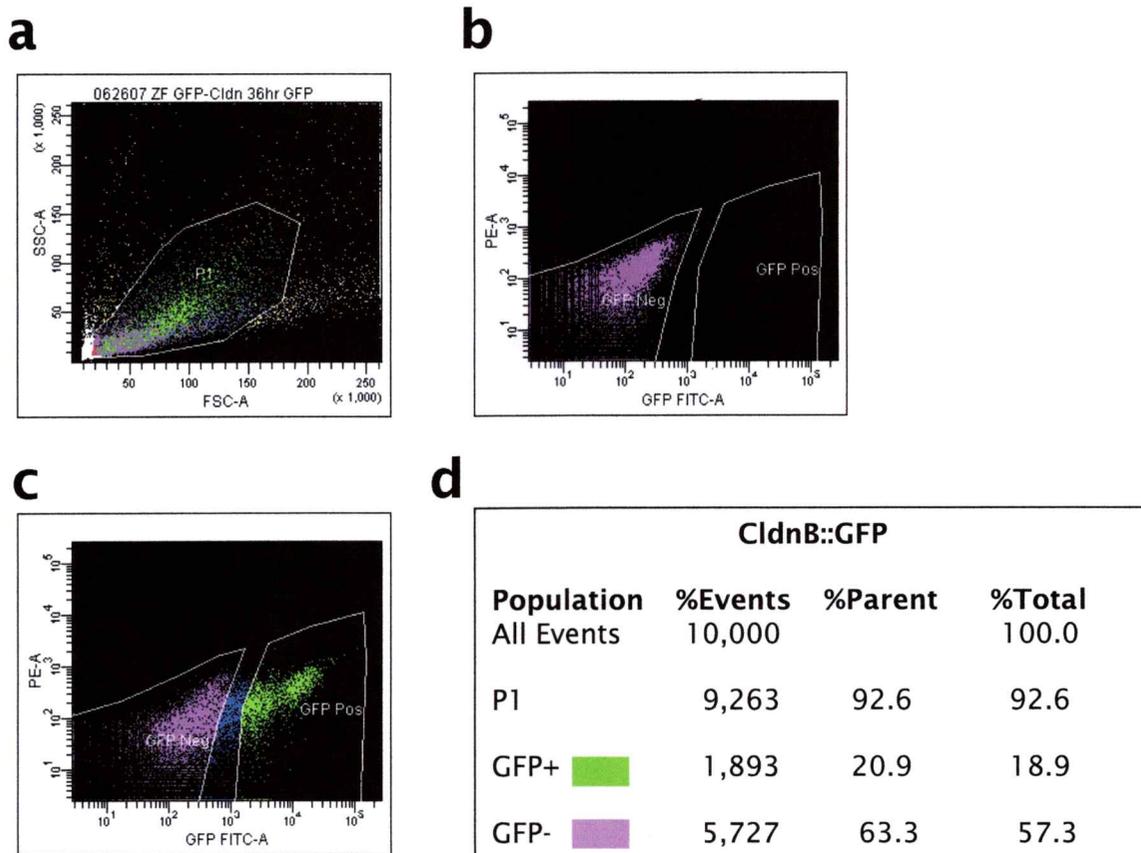


Figura 15. Purificación de células del primordio de la LLP mediante ensayos de cell sorting. a) Se muestra un gráfico de tamaño celular (FSC) vs. granulosidad (SSC). P1: población total de células a purificar. b) Análisis de cell sorting de embriones silvestres de pez cebra (control). c) Células GFP+ y GFP- (control) purificadas de primordios de embriones transgénicos CldnB. d) Tabla resumen de los porcentajes obtenidos de las poblaciones celulares purificadas.

Del total de células purificadas (P1) en promedio por experimento, un 60% de las células recuperadas correspondió a células GFP- y un 20% a células GFP+ (Figura 15d). Por esta razón, fue necesario realizar 2 a 3 purificaciones de células GFP+ y consolidarlas para obtener una cantidad de células equivalente a una muestra control.

Luego, con el fin de discriminar entre células GFP+ del primordio y de otros tejidos que pudieran expresar la proteína fluorescente, realizamos análisis de FACS de

células obtenidas de colas de embriones transgénicos *CldnB::GFP* de 24 hpf. En este estadio el primordio esta comenzando a migrar por lo que no debíamos encontrar células del primordio en las colas seccionadas y, por lo tanto, la población de células GFP+ provendrá de otros tejidos (Figura 16).

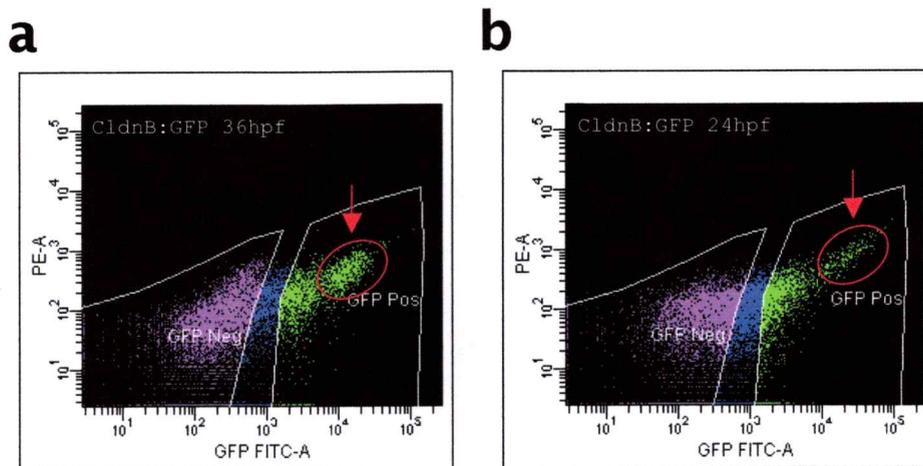


Figura 16. Purificación de células GFP+ de embriones transgénicos mediante ensayos de cell sorting. Se observa una población homogénea de células GFP+ presente en embriones *CldnB::GFP* de 36 hpf (a) (flecha roja) que no se encuentra en embriones de 24 hpf.

Como se aprecia en la figura, observamos un población definida de células GFP+ de embriones de 36 hpf (círculo rojo, figura 16a) que no se encuentra en embriones de 24 hpf (figura 16b), lo cual indica que ésta es la población de células del primordio migratorio de la LLP. Este experimento demuestra además, que existen células que expresan GFP en la línea transgénica *CldnB::GFP* que corresponden a otros tejidos. La proteína ClaudinB tiene una expresión preferencial en el oído, línea lateral y regiones del sistema nervioso, pero es posible que se encuentre en otros tipos celulares. Por lo tanto, el sistema de detección presente en el Cell Sorter es más sensible que la lupa de fluorescencia, ya que en ella, no se observan otras regiones

con alta expresión de GFP. Por otro lado, dado que la población celular específica de primordio es pequeña (10.000 eventos a partir de 200 embriones) y no es posible aislar suficiente RNA de ellas para un experimento de microarreglos, se tomó la decisión de purificar todas las células GFP+ para la preparación de RNA. Además, la contribución de células GFP+ no pertenecientes al primordio es minoritaria y el diseño del experimento permitió a posteriori discriminar a los genes específicos de primordio por hibridación *in situ* (ver a continuación).

Debido a que la metodología utilizada para obtener las células del primordio abarcó diversos pasos y cambios de temperatura, es posible que muchas células murieran durante el proceso, lo que generaría problemas con la posterior obtención de mRNA de buena calidad. Es por esto que en algunos casos como control, utilizamos yoduro de propidio (PI) para determinar el porcentaje de células vivas que obteníamos luego de la disección de los embriones (dato no mostrado). En promedio sólo un 5% de células mueren durante el desarrollo del experimento, por lo que estos resultados nos permitieron verificar lo apropiado de la metodología empleada para la posterior preparación del RNA.

Finalmente, en algunas ocasiones como control interno, las células fueron purificadas en medio de cultivo L-15 y luego fueron observadas al microscopio para confirmar la pureza y calidad de la separación (Figura 17).

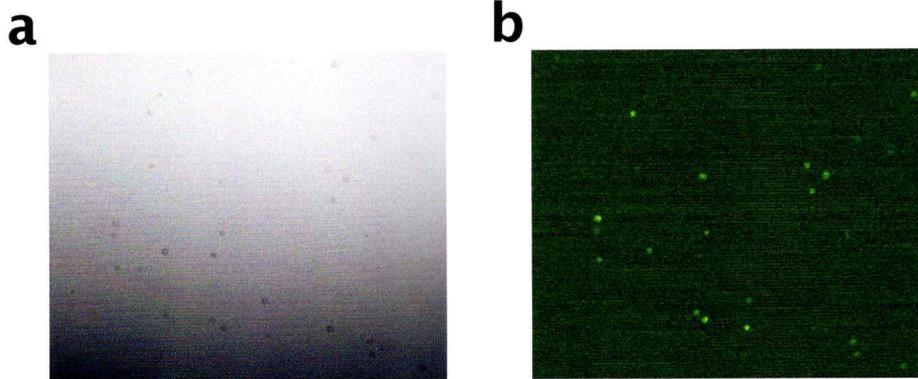


Figura 17. Visualización de células GFP+ luego de su purificación por análisis de FACS. Se observa que la mayoría de las células purificadas en este campo (a) expresan GFP (b).

Como se observa en la figura, las células purificadas mediante análisis de FACS expresan, en su mayoría, GFP, descartando así posibles contaminaciones de la muestra con células.

A continuación, mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real confirmamos la pureza de las células purificadas. Para esto, una vez obtenidas las células, se realizó la extracción de RNA de células GFP+ y GFP-, respectivamente, de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos. Utilizamos partidores de los genes *tacstd* y *cldnb*, de expresión conocida en el primordio de la LLP, y de *egfp*, como controles positivos. Como control negativo usamos el gen *myod*, el cual se expresa en células musculares (Figura 18). Los valores relativos de expresión se determinaron como valores relativos a un control interno (β actina).

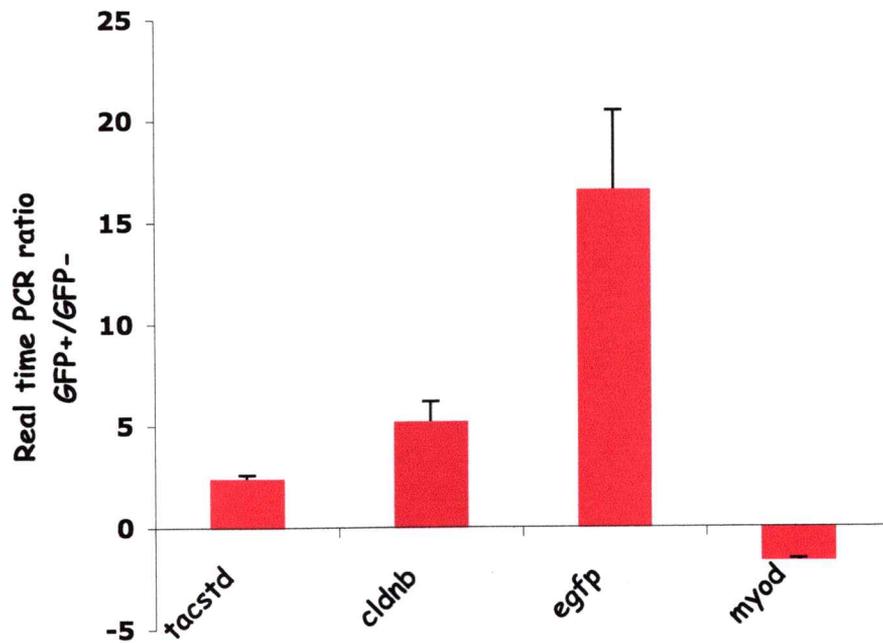


Figura 18. Análisis de PCR en tiempo real de mRNAs derivados de células purificadas por cell sorting. La pureza de las células obtenidas de embriones *CldnB::GFP* fue determinada mediante el análisis de expresión de los genes *tacstd*, *cldnb*, *egfp* y *myod*. Se muestra la razón de GFP+/GFP- obtenida de los genes. Los niveles de expresión relativa fueron determinados por normalización a β actina.

Como se observa en la figura, la expresión relativa de los genes se comporta de acuerdo a lo esperado, es decir, *tacstd*, *cldnb* y *egfp* se detectan en una proporción mayor en el RNA purificado de las células GFP+ comparado con los niveles encontrados en el RNA de las células GFP-. En cambio, lo inverso ocurrió con el gen *myod*, el que se detectó en mayor proporción en el RNA purificado de las células GFP-. Estos resultados confirman que las células GFP+ separadas mediante análisis de FACS, están altamente enriquecidas en células que expresan marcadores moleculares del primordio migratorio y por lo tanto esta población de células es representativa del primordio de la LLP del pez cebra. Más aún, se establece que muestras de RNA

aisladas de cada una de estas poblaciones celulares, son útiles para efectuar una hibridación simultánea en un microarreglo. Por lo tanto, en esta hibridación debiera ser posible detectar genes diferencialmente expresados en el primordio migratorio (hibridación substractiva).

5.2 Construcción de una librería de cDNAs a partir de células purificadas del primordio.

A continuación se generó una librería de cDNA a partir de células del primordio de la LLP. Para esto, se extrajo el RNA de la células GFP+ y GFP- previamente purificadas y la calidad y la concentración de RNA en estas muestras fue determinada (Figura 19).

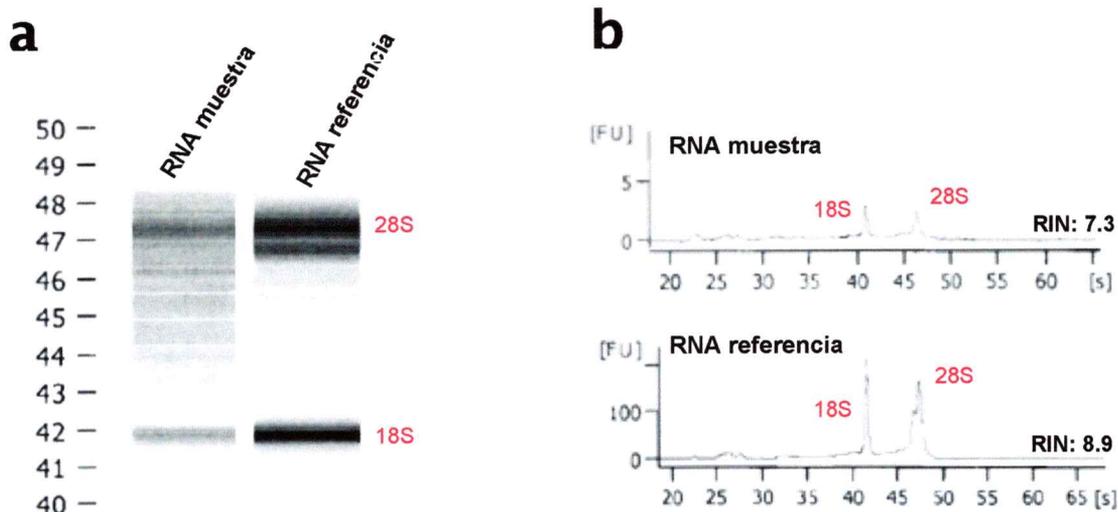


Figura 19. Análisis de la calidad y concentración del RNA extraído de células purificadas por cell sorting. La integridad y la cuantificación del RNA fue determinada mediante el “Bioanalyzer Agilent 2100”. a) Se muestra una electroforesis en gel denaturante donde se observan las bandas de rRNA 28S y 18S, respectivamente. La cuantificación estimada de la calidad del RNA se determinó con el número de integridad del RNA (RIN) (b). El número RIN es independiente de la concentración del RNA, y del equipo utilizado, y se calcula a través de la razón de intensidad de las bandas 28S vs.18S.

En promedio, se obtuvo 500 ng de RNA totales por muestra, con una razón de absorbancia 260/280 mayor a 1.7 para todos los casos. Cabe recalcar, que fue necesario realizar 2 a 3 purificaciones de células GFP+ y GFP-, respectivamente, mediante análisis de FACS para obtener una muestra biológica de mRNA de cada población celular. Esto se debió a la baja concentración de RNA que obteníamos en cada ensayo de purificación por separado.

Una vez que confirmamos la calidad de las muestras de RNA, se realizó transcripción reversa incluyendo en la reacción nucleótidos dUTP AminoAllyl modificados y se procedió a la amplificación de éstas producto de la baja concentración de mRNA que se obtuvo de la extracción (kit Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA

Amplification). Finalmente, una vez que contamos con la cantidad necesaria de cDNA se procedió a realizar las marcaciones de éste para luego hibridarlo contra los microarreglos.

El chip de microarreglos de cDNA de pez cebra utilizado (33K NHGRI-NIH (Bethesda, EEUU)) contiene oligonucleótidos específicos para 19.000 genes de pez cebra de un total de 33.241 oligos en el arreglo. Además, el microarreglo contiene controles positivos (genes housekeeping), controles negativos (random sequences) y duplicados de la mayoría de los genes para controlar la homogeneidad y especificidad de la hibridación.

Se hibridaron las dos muestras biológicas de RNA proveniente de células GFP+ (marcada con Cy5, color rojo) y GFP- (marcada con Cy3, color verde), respectivamente, por triplicado y además se efectuó una hibridación con los colores invertidos respecto a la muestra. El grado de expresión diferencial de un gen se estimó en base a la razón de los niveles de expresión de las sondas Cy5 y Cy3.

La figura 20a muestra una imagen representativa de un chip de microarreglos hibridado. Los puntos de color rojo indican que la señal de intensidad en ese spot es mayor en el canal rojo (Cy5) lo que se traduce en una razón de $GFP+ > GFP-$; por el contrario, los puntos de color verde indican que la señal de intensidad en ese spot es mayor en el canal verde (Cy3), es decir, una razón de $GFP+ < GFP-$. Finalmente, los puntos de color amarillo indican que la señal de intensidad en ese spot para ambos canales es similar. A su vez, la figura 20b muestra la distribución de las intensidades de fluorescencia generadas por la hibridación de ambas sondas (GFP+ vs. GFP-) de uno de los experimentos realizados. Cada punto en el gráfico representa un oligonucleótico específico en el microarreglo, graficado en función de la intensidad de señal que presenta para ambos canales.

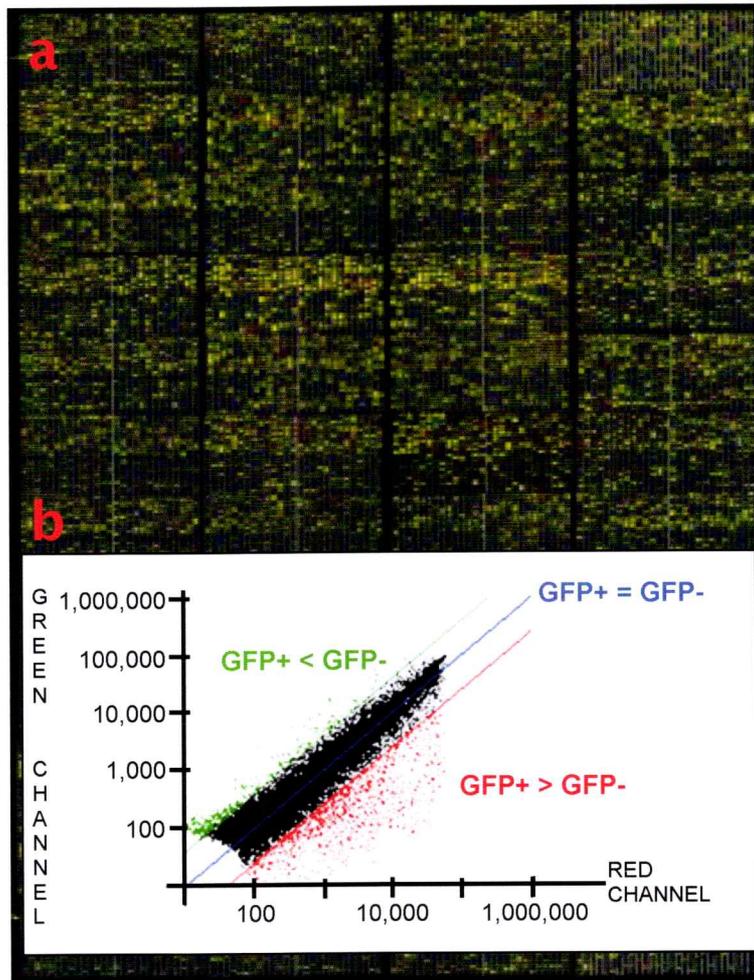


Figura 20. Análisis de expresión global de genes que se expresan en el primordio de la LLP desarrollado por microarreglos. a) Imagen representativa de un chip de microarreglos hibridado. Los puntos rojos indican una razón de $GFP+ > GFP-$, los puntos verdes una razón de $GFP+ < GFP-$ y los puntos amarillos una razón $GFP+ = GFP-$, respectivamente. b) Distribución de las intensidades de fluorescencia generadas por la hibridación de ambas sondas (experimental y control). Cada punto en el gráfico representa un oligo/spot en el microarreglo, graficado en función de su nivel de expresión en ambas muestras. La línea azul representa un nivel de expresión equivalente en células $GFP+$ y $GFP-$. La línea roja representa un nivel de expresión mayor a 2 veces en las células $GFP+$ vs. $GFP-$, mientras que la línea verde representa un nivel de expresión menor de 2 veces en las células $GFP+$ vs. $GFP-$.

Los datos crudos obtenidos fueron procesados con el programa DeArray (Scanalytics Inc.). Básicamente este programa extrae y procesa las imágenes adquiridas de los microarreglos para así generar valores de intensidades normalizados para ambos colores para cada oligonucleótido (gen) en particular. Cabe recalcar que el análisis crudo de las imágenes obtenidas de los microarreglos fue realizado por el Microarray Core del NHGRI-NIH.

Posteriormente, los datos ajustados fueron trasladados para su análisis a los programas FileMaker Pro 9.0 y GeneSifter. En estos análisis, inicialmente se calculó el promedio de intensidad obtenido de tres muestras que emitió cada spot en los canales Cy5 y Cy3 para comparar ambas condiciones, GFP+ y GFP-. A continuación, utilizamos el método del cambio de nivel o "fold change" usando un punto de corte ("threshold") de 2 (GFP+ vs. GFP-) para seleccionar los genes diferencialmente expresados.

Luego, estos valores fueron sujetos a análisis estadístico, con el fin de determinar la significancia estadística de los cambios de nivel observados para cada gen. Se considero diferencias significativas partiendo de valores de $p < 0.05$, es decir, donde la probabilidad que efectivamente haya expresión diferencial fuese mayor al 99.95%.

A su vez, producto de que el microarreglo presenta duplicados de la mayoría de los genes, también realizamos una sustracción de los oligos con números de acceso repetidos utilizando un programa *ad hoc* escrito en lenguaje PERL (Practical Extraction and Report Language).

Finalmente, se considero que un gen fue diferencialmente expresado cuando la señal de sus niveles de expresión en promedio difería en más de un factor de 2 en la dos muestras con una calidad de la señal igual a 1.

Realizamos dos experimentos de hibridación en microarreglos en paralelo, con 2 sets de muestras biológicas de mRNA diferentes (microarreglo I y microarreglo II, respectivamente). Se preparó 3 cDNAs de cada una de estas muestras, para luego hibridarlas en los microarreglos.

Inicialmente, se realizó el análisis de los resultados utilizando el programa GeneSifter. Los datos arrojados de estos experimentos mostraron que de las 33.241 secuencias de oligos presentes, 5.148 (microarreglo I) y 7.465 (microarreglo II), presentaron cambios superiores a 2 veces, ya sea aumento o disminución de la expresión, cuando se compararon las muestras de las células GFP+ versus las GFP-.

Para facilitar el análisis de resultados, se intersectó las listas de genes arrojadas por los dos experimentos y seleccionamos las secuencias presentes en ambas hibridaciones, descartando aquellas presentes en sólo una de ellas. De estos análisis, obtuvimos 3.038 secuencias con un nivel de expresión que varía en más de un factor de 2 entre las dos muestras (células GFP+ versus células GFP-) (Figura 21).

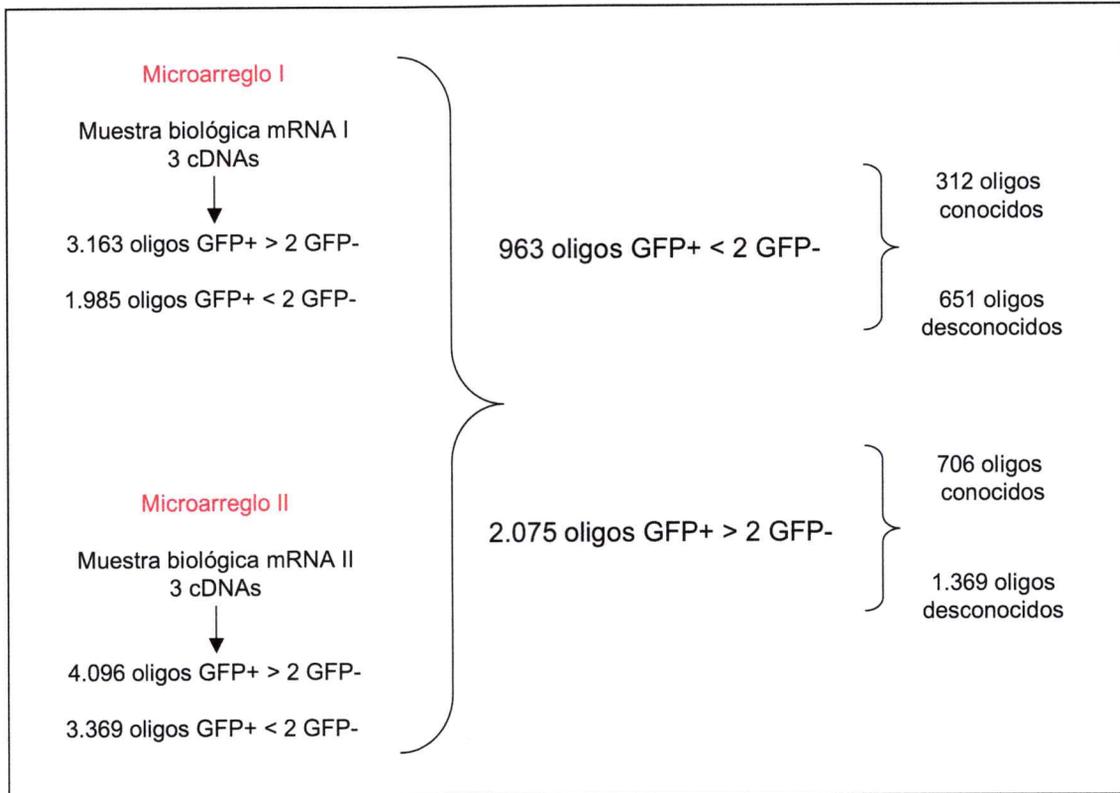


Figura 21. Diagrama de flujo que resume la metodología empleada para el análisis de los resultados de los microarreglos, de acuerdo al programa GeneSifter.

De los oligos diferencialmente expresados (3.038) un 68.3% de ellos (2.075) presentaron un nivel diferencial de intensidad de hibridación mayor a 2 veces comparando células GFP+ con las células GFP- (Figura 22a). (La lista de estos oligos, con los genes correspondientes se encuentra en el Anexo 1). El resto de los oligos (genes) corresponde a expresión menor a dos veces en la muestra GFP+ comparada con la GFP-, y por lo tanto, se expresan de preferencia en tipos celulares distintos a aquellos del primordio migratorio.

A su vez, de los 2.075 oligos identificados como altamente expresados en primordio, un 34.02% (706) corresponden a genes anotados, es decir, que han sido

identificados en la base de datos del genoma de pez cebra (GenBank y/o Ensembl) u otras con un nombre o con similitud a genes de otras especies determinado por la curación de los datos genómicos (Zebrafish Genome, Ensembl versión 7.0). Por otra parte, un 65.98% (1.369) son genes desconocidos, es decir, no están anotados ni asignados a grupos de ortología (su cuya única identificación es un número de acceso) (Figura 22b).

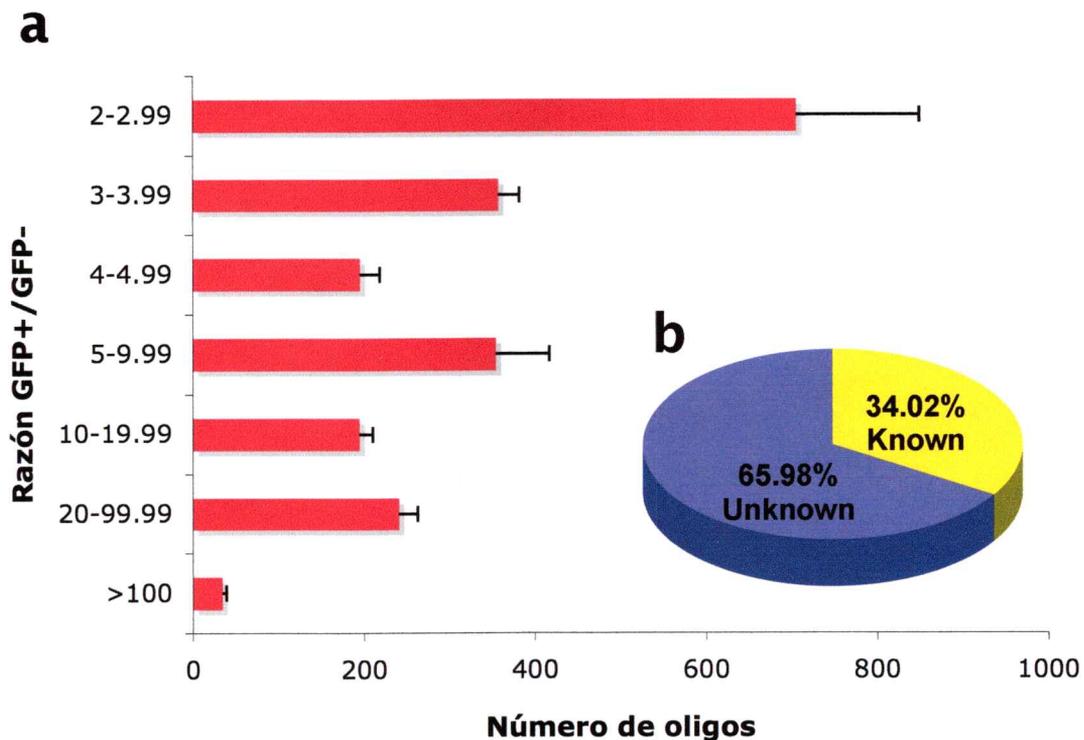


Figura 22. Perfil de expresión génica del primordio de la LLP. a) Gráfico que muestra el número de oligos diferencialmente expresados en las células GFP+ en los experimentos de microarreglos. Los oligos están clasificados de acuerdo a la razón GFP+/GFP- que presentaron en los experimentos. b) Gráfico de torta que ilustra el porcentaje de oligos anotados (34.02%) y desconocidos (65.98%) de los 2.075 oligos diferencialmente expresados obtenidos de los análisis de microarreglos.

La base de datos ZFIN (zfin.org) es un recurso comunitario que contiene información de todos los genes identificados del pez cebra, incluyendo ubicación cromosómica, secuencias, expresión del mRNA, función biológica, mutantes y publicaciones asociadas. Con esta información, se clasificó el conjunto de 706 genes identificados y de expresión alta en el primordio migratorio de acuerdo a categorías funcionales definidas por su papel en diversos procesos biológicos tales como migración celular, localización subcelular, adhesión celular, desarrollo embrionario, respuesta inmune, entre otros, definidos por el programa GeneSifter (Figura 23).

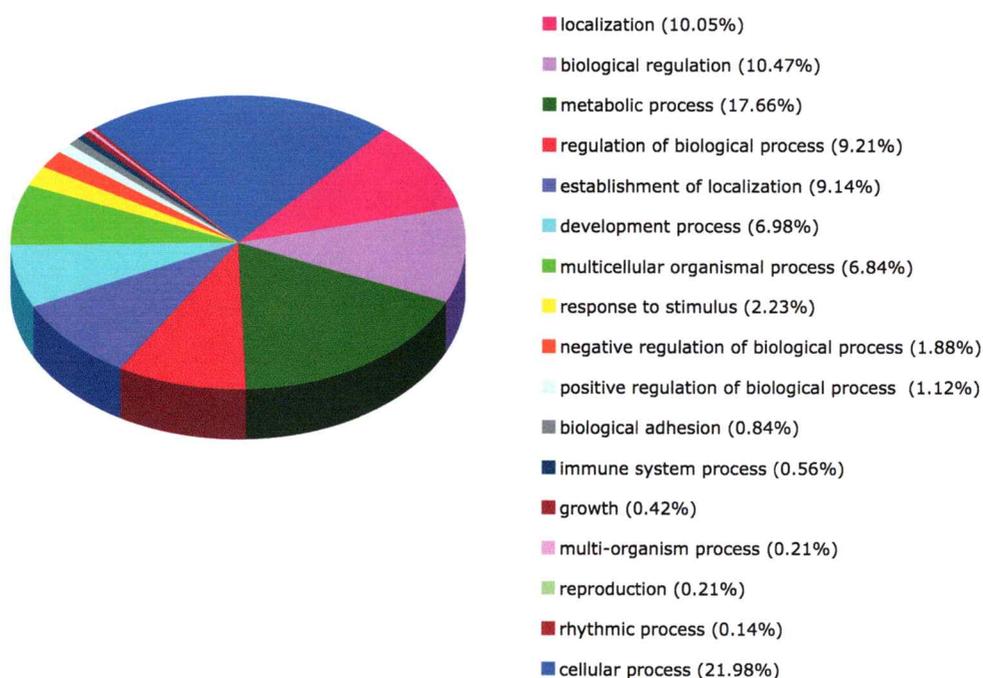


Figura 23. Perfil de expresión génica del primordio de la LLP. Se observa un gráfico resumen de las diferentes categorías funcionales de los genes diferencialmente expresados en los microarreglos, asignadas por el programa GeneSifter.

De estos datos podemos observar que el mayor número de oligos (21.98%), corresponden a genes que están asignados a categorías funcionales relacionadas con

procesos celulares básicos (housekeeping), en comparación con un 0.56% de genes relacionados con función del sistema inmune y un 6.98% relacionados con desarrollo embrionario, respectivamente. A su vez, determinamos que dentro del grupo de genes relacionados con procesos celulares básicos, encontramos un 9.68% que participan en procesos de comunicación celular, un 2.18% en migración celular, un 1.49% en adhesión celular y un 4.12% están relacionados con procesos celulares durante el desarrollo, respectivamente (Figura 24).

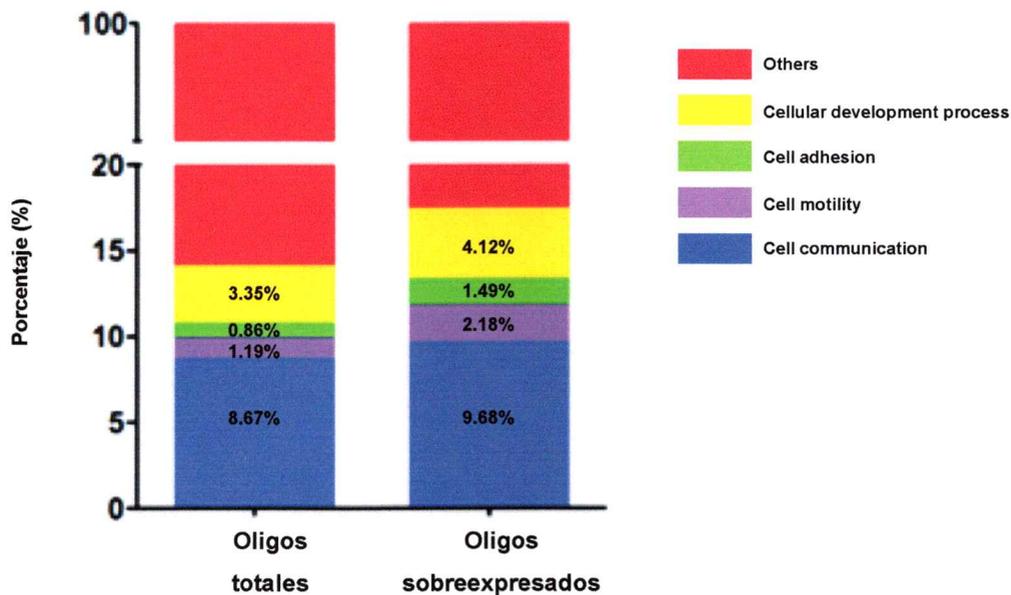


Figura 24. Perfil de expresión génica del primordio de la LLP. Se observa un gráfico resumen que compara diferentes categorías funcionales entre los genes totales presentes en los microarreglos y aquellos diferencialmente expresados en las células GFP+ purificadas.

Por otra parte, obtuvimos 963 oligos (31.7%) que presentaron un nivel diferencial de intensidad de hibridación menor a 2 veces comparando células GFP+ con las células GFP- (Figura 25a) De esta lista, 312 (32.4%) corresponden a genes

anotados y 651 (67.6%) son desconocidos (Figura 25b). La figura 26 muestra un gráfico resumen de las categorías funcionales asignadas a los genes anotados definidas por el programa GeneSifter.

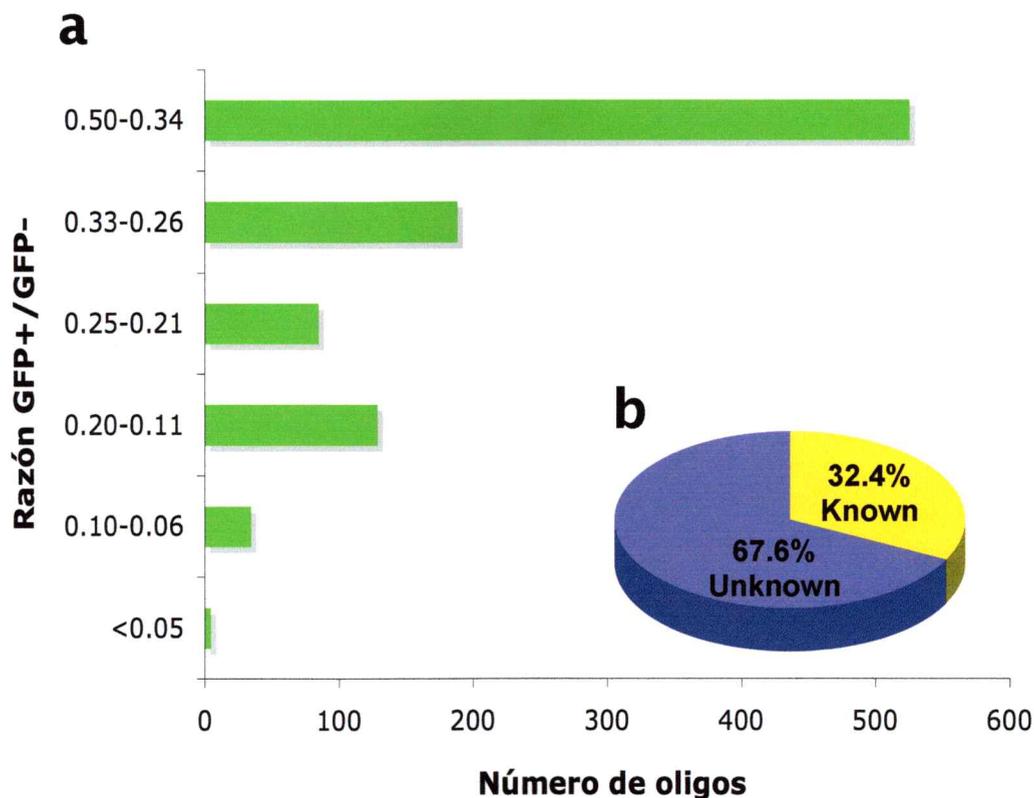


Figura 25. Perfil de expresión génica del primordio de la LLP. a) Gráfico que muestra el número de genes diferencialmente expresados en las células GFP- en los experimentos de microarreglos. b) Gráfico de torta que ilustra el porcentaje de genes anotados (32.4%) y genes desconocidos (67.6%) de los 963 diferencialmente expresados obtenidos de los análisis de microarreglos.

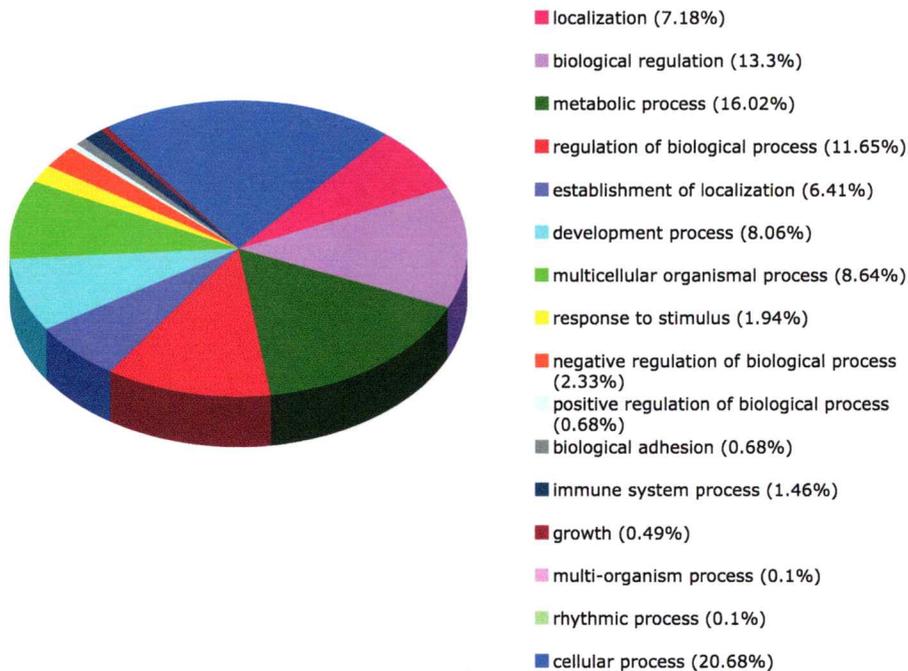


Figura 26. Perfil de expresión génica del primordio de la LLP. Gráfico resumen de las diferentes categorías funcionales de los genes diferencialmente expresados en la muestra control (GFP-), asignadas por el programa GeneSifter.

Paralelamente, con el objetivo de tener un mayor enfoque en el análisis de los microarreglos, los datos arrojados por los experimentos fueron también analizados con el programa FileMaker. Estos análisis arrojaron que del total de secuencias de oligos presentes en el microarreglos, 3.226 oligos presentan en promedio entre los dos microarreglos un aumento mayor a 2 veces comparando células GFP+ vs. GFP-. (La lista de estos oligos, con los genes correspondientes se encuentra en el Anexo 2).

5.3 Identificación de genes (transcriptoma) que se expresan en el primordio de la LLP.

Como primer paso en la caracterización de los genes identificados en el experimento de microarreglos por su expresión diferencial en primordio migratorio (2075 oligos), se comparó esta lista con el conjunto de genes previamente descritos de expresión específica en este tejido (expresión no ubicua). La comparación se realizó contra genes descritos con expresión en línea lateral presentes en las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) y ZFIN (Zebrafish Information Network).

En la base de datos NCBI (Pubmed) se realizó una búsqueda con el término "[lateral line primordium] and [zebrafish]". El resultado arrojó una lista de 24 genes descritos con expresión en el primordio de la línea lateral, de los cuales 20 se encuentran en el chip de microarreglos de cDNA de pez cebra utilizado. La ausencia de algunos en el arreglo se debe a que muchos de estos genes fueron descubiertos y/o anotados en las bases de datos después de la construcción del chip.

A continuación, esta lista se intersectó con la lista de genes descrita anteriormente (2.075 oligos) y se identificaron 9 secuencias (45% del total posible de 20) con un nivel de intensidad de hibridación mayor a 2 veces comparando células GFP+ con las células GFP-. Del resto de los genes, 7 de ellos (un 35%) presentó un nivel de intensidad de hibridación mayor a 1 pero menor a 2 en las GFP+, por lo que no se detectaron como diferencialmente expresados en el experimento de microarreglos.

Paralelamente, realizamos una segunda búsqueda en la base de datos ZFIN con el término "lateral line system" en el campo de "expression". Debe mencionarse que esta anotación incluye todos aquellos genes que poseen expresión de mRNA en

algún componente de la línea lateral, incluyendo las neuronas y el nervio del ganglio de la LLP y los neuromastos, formados muchas horas después de la migración del primordio. Por lo tanto, esta lista representa una sobreestimación significativa con respecto a el número de genes identificados con expresión en primordio migratorio. El resultado de esta búsqueda arrojó una lista de 363 genes descritos con expresión en la línea lateral. De esta lista, 265 son genes anotados y 98 son genes que únicamente se describen con número de acceso GenBank. A continuación, esta lista se intersectó con la lista de oligos descrita anteriormente (2.075). En este caso, 145 genes (39.9%), descritos con expresión en la línea lateral de acuerdo a esta base de datos, no están presentes en el chip de microarreglos utilizado.

De los 363 genes presentes en la colección de ZFIN que incluyen una anotación de expresión en línea lateral, 80 de ellos (36.7%) están presentes en nuestra colección de genes con expresión elevada en el primordio migratorio. Para refinar más aún la búsqueda, se interrogó la base de datos ZFIN con el término "lateral line primordium". El resultado de ésta búsqueda arrojó una lista de 39 genes descritos con expresión en el primordio de la LLP. De ellos, 10 (37%) poseen expresión elevada en la muestra GFP+ en el experimento de microarreglos. Estos resultados, en conjunto con los descritos anteriormente, corroboran la confiabilidad de los datos arrojados por los microarreglos y confirman que mediante esta técnica es posible aislar genes nuevos de expresión específica en el primordio migratorio. Extrapolando los datos de ambas búsquedas (NCBI y ZFIN) podemos decir que entre un tercio y la mitad de los genes identificados en el experimento de purificación de células, extracción de mRNA y microarreglos, tienen expresión específica en el primordio migratorio.

En la tabla 6 se incluye una muestra representativa de genes de expresión conocida en el primordio migratorio de la LLP que fueron detectados con nuestro

experimento de purificación de células e hibridación en microarreglos de los mRNAs purificados. Se indica el número de acceso GenBank de cada uno de ellos, el nombre del gen, el cambio de nivel (razón GFP+ versus GFP-) que presentaron en el experimento de microarreglos y el patrón de expresión descrito para ellos.

Número de acceso	Nombre del gen	Símbolo	Cambio de nivel de expresión en el microarreglo	Patrón de expresión
NM_131763	Claudin b	<i>cldnb</i>	46.8	Primordio LLP, Oído, Bulbo olfatorio
AF024536	Atonal homolog 1a	<i>atoh1</i>	2.36	Primordio LLP, Células ciliadas auditivas
BI888943	Tumor-associated calcium signal transducer	<i>tacstd</i>	97.1	Primordio LLP, Oído, Bulbo olfatorio
AF428249	Vang-like 2 (van gogh, Drosophila)	<i>vangl2</i>	2.91	Primordio LLP, Retina, Oído, Hígado, Páncreas
NM_131193	Eyes absent homolog 1	<i>eya1</i>	2.63	Primordio LLP, Órganos sensoriales

Tabla 6. Genes de expresión conocida en el primordio de la LLP, de acuerdo a las bases de datos NCBI y ZFIN que mostraron un razón GFP+/GFP- mayor a 2 veces en los experimentos de microarreglos.

Como se mencionó anteriormente, no todos los genes con expresión conocida en la línea lateral se detectaron como diferencialmente expresados en el experimento de microarreglos. Esto puede deberse a que estos genes se expresan además en otros

tejidos, presentes en la fracción de células GFP- aisladas de los fragmentos de colas disectadas de los embriones. Tal es el caso de los genes *cxcr4b*, *cxcr7b*, *sox2* y *sox3* (Tabla 7), que se expresan en la línea lateral pero también en el sistema nervioso central (y posiblemente en otros tejidos). Este resultado indica que no todos los genes expresados en el primordio de la LLP han podido ser identificados con nuestra metodología, ya que escapan a nuestra detección aquellos que presentan patrones "no exclusivos" de la LLP y aquellos de expresión ubicua.

Número de acceso	Nombre del gen	Símbolo	Cambio de nivel de expresión en el microarreglo	Patrón de expresión
AF201451	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4b	<i>cxcr4b</i>	1.38	Primordio LLP, Notocorda, Médula espinal
BI889254	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7b	<i>cxcr7b</i>	1.52	Primordio LLP, Sistema inmune
BI980800	SRY-box containing gene 2	<i>sox2</i>	0.81	Primordio LLP, Médula espinal
BG985680	SRY-box containing gene 3	<i>sox3</i>	0.95	Primordio LLP, Médula espinal

Tabla 7. Genes de expresión conocida en el primordio de la LLP, de acuerdo a las bases de datos NCBI y ZFIN, que no se detectaron como diferencialmente expresados en los experimentos de microarreglos.

Finalmente analizamos un grupo de 7 genes seleccionados al azar, cuya expresión es específica de otras estructuras (y que no se detectan en el primordio de la LLP), como es el caso del miosepto horizontal, los somitos y la zona de los pronefros (Tabla 8). Los valores de expresión diferencial obtenidos en estos casos, muestran que

los transcritos respectivos están sobrerrepresentados en la muestra control (GFP-) o no muestran variación, lo que es consistente con los patrones de expresión reportados.

Número de acceso	Nombre del gen	Símbolo	Cambio de nivel de expresión en el microarreglo	Patrón de expresión
BG729476	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12a	<i>sdf1a</i>	0.33	Miosepto horizontal
AI641124	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12b	<i>sdf1b</i>	0.08	Miosepto horizontal
U14940	Tenascin C	<i>tnc</i>	0.09	Miosepto horizontal
NM_131262	Myogenic differentiation	<i>myod</i>	1.15	Somitos
NM_131298	Paired box gene 9	<i>pax9</i>	0.17	Somitos
NM_131234	Gata-binding protein 1	<i>gata1</i>	0.12	Pronefros
NM_130986	Ikaros family zinc finger 1	<i>ikaros</i>	0.29	Pronefros

Tabla 8. Genes de expresión conocida en otras estructuras presentes en las colas disectadas de embriones, que mostraron un razón GFP+/GFP- menor a 2 veces en los experimentos de microarreglos.

Una vez identificado el conjunto de genes sobrerrepresentados en la muestra GFP+, descartamos aquellos cuya expresión y función ha sido reportada en el primordio migratorio y seleccionamos aquellos genes anotados que codifican para proteínas involucradas en procesos de migración celular (según la clasificación hecha por GeneSifter que a su vez se basa en Gene Ontology (genesifter.net). Más aún, se refinó la selección mediante una búsqueda en la literatura utilizando la base de datos NCBI y la base de datos ZFIN. El criterio usado para asignar roles funcionales a estos

genes fue el siguiente: de los oligos anotados, seleccionamos genes involucrados en migración y adhesión celular en los sistemas hematopoiético e inmune y en cáncer, en neurogénesis, y en vías de señalización claves para la morfogénesis y el patterning en el pez cebra, en base a la información otorgada por el programa GeneSifter.

La tabla 9 muestra los genes identificados con estos criterios, el número de acceso GenBank de cada uno de ellos y el cambio de nivel (razón GFP+ vs. GFP-) que presentaron en el microarreglos. Los genes de la tabla 9 están clasificados de acuerdo a su función.

Sistemas hematopoiético e inmune y cáncer

Número de acceso	Nombre del gen	Símbolo	Cambio de nivel de expresión en el microarreglo
AW077995	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	<i>ptgs2</i>	15.26
AB071601	Prostaglandin D2 synthase	<i>ptgds</i>	6.04
BE605271	Prostaglandin I2 synthase like	<i>ptgisl</i>	22.80
NM_131835	Leukocyte cell derived chemotaxin 1	<i>lect1</i>	2.89
NM_131627	Small inducible cytokine subfamily b (Cys-X-Cys), member a	<i>scyba</i>	4.88
BI979989	F11 receptor	<i>f11r</i>	8.02
BI892229	CD9 antigen, like	<i>cd9l</i>	61.37
AW203040	Interferon regulatory factor 5	<i>irf5</i>	6.90
BE605965	Interferon regulatory factor 7	<i>irf7</i>	2.02
BG304206	Toll-like receptor 3	<i>tlr3</i>	2.97
AI330442	Thrombospondin 3a	<i>thbs3a</i>	2.11
NM_131048	Semaphorin 3d	<i>sema3d</i>	2.03
NM_131061	Semaphorin 3ab	<i>sema3ab</i>	3.64

Número de acceso	Nombre del gen	Símbolo	Cambio de nivel de expresión en el microarreglo
BE202006	Platelet endothelial cell adhesion molecule-like	<i>pecaml</i>	2.00
AW174507	Matrix metalloproteinase 9	<i>mmp9</i>	3.03
NM_131857	Kruppel-like factor 2b	<i>klf2b</i>	29.77
NM_131859	Kruppel-like factor 12	<i>klf12</i>	9.22

Neurogénesis

Número de acceso	Nombre del gen	Símbolo	Cambio de nivel de expresión en el microarreglo
NM_131323	Distal-less homeobox gene 6a	<i>dlx6a</i>	409.72
NM_131816	Atonal homolog 2a	<i>atoh2a</i>	9.81
NM_131817	Atonal homolog 2b	<i>atoh2b</i>	3.31
AW344031	SRY-box containing gene 8	<i>sox8</i>	2.13
NM_131287	SRY-box containing gene 17	<i>sox17</i>	2.99
NM_131637	Claudin 7	<i>cldn7</i>	62.16

Patterning

Número de acceso	Nombre del gen	Símbolo	Cambio de nivel de expresión en el microarreglo
NM_130966	Nodal-related 1 (squint)	<i>squint</i>	24.42
AB023488	Dickkopf 1	<i>dkk1</i>	10.78
BE557412	Staufen, RNA binding protein, homolog 2	<i>staufen</i>	2.16

Tabla 9. Genes de expresión desconocida en el primordio de la LLP que mostraron un razón GFP+/GFP- en promedio mayor a 2 veces en los experimentos de microarreglos.

Por otra parte, de la lista de oligos desconocidos (1.369), realizamos un nBLAST (nucleotide blast) y pBLAST (protein blast) de éstos contra la colección genómica del pez cebra, para encontrar el homólogo mas cercano (criterio de identidad mayor al 40%) que estuviera anotado. A continuación, se eligió el gen o EST de mayor identidad de secuencias arrojado por esta búsqueda y la selección de los genes de interés se baso de acuerdo a los criterios previamente descritos.

La tabla a continuación, muestra los oligos identificados con estos criterios, el número de acceso GenBank de cada uno de ellos y el cambio de nivel (razón GFP+ versus GFP-) que presentaron en el microarreglos. Los genes de la tabla 10 están clasificados de acuerdo a sus niveles de expresión.

Número de acceso	Nombre del gen	Cambio de nivel de expresión en el microarreglo
AI958983	Hypothetical protein LOC407680 (similar Glycoprotein A33)	158.33
AW232037	Transcribed locus (similar cxcr6)	91.38
AW116709	Si:ch211-129c21.1 (similar Transmembrane class IV semaphorin)	31.85
AW595843	Zgc:153928 (similar CD99 Type II)	8.26
BI879484	Transcribed locus (similar CD205)	3.23
BI672309	Si:ch211-203I9.2 (similar Tumor protein D52)	3.63

Tabla 10. EST de expresión desconocida en el primordio de la LLP que mostraron un razón GFP+/GFP- en promedio mayor a 2 veces en los experimentos de microarreglos.

5.4 Análisis de expresión y función de los genes seleccionados

Posteriormente, para evaluar la confiabilidad del método para seleccionar genes de expresión restringida en el primordio de la LLP, analizamos el patrón de expresión del conjunto de genes seleccionados (tablas 9 y 10) que presentaron sobrerrepresentación en la muestra GFP+ pero cuya expresión no ha sido reportada.

Para ello, se adquirieron los cDNAs correspondientes a los 32 genes seleccionados (comprados en Open Biosystems, Inc.) y se sintetizaron ribosondas para todos ellos marcando el RNA antisentido con UTP-digoxigenina. El patrón de expresión de los mRNAs respectivos se realizó mediante ensayos de hibridación *in situ* en "whole mount" (montaje completo) usando embriones fijados a las 30 hpf, momento en que la ubicación del primordio migratorio resulta fácil de identificar. De esta manera, se intentó determinar cuantos de los genes identificados en el experimentos de microarreglos mostraban efectivamente expresión específica en el primordio migratorio de la LLP.

Realizamos ensayos de hibridación *in situ* de todos los genes mostrados en las tablas 9 y 10. Estos ensayos se realizaron utilizando el instrumento Bio Lane HTI (Holle & Hutter AG, Alemania), el que permite realizar hibridaciones *in situ* a gran escala (40 muestras simultáneas).

Dados los requerimientos específicos que precisa la técnica de hibridación *in situ*, no todas las sondas sintetizadas dieron una marca visible y confiable en los embriones. Esto puede deberse a que cada ribosonda posee propiedades particulares y requiere condiciones de hibridación específicas, que no fueron determinadas. De la totalidad de las ribosondas probadas (32), observamos 7 patrones de expresión específicos y diferenciales en el primordio de la LLP: *cd9l*, *f11r*, *irf5*, *squint*, *dkk1*, *cldn7*

y el clon zgc:153928 (similar CD99 Type II) (Figura 27). De las restantes 25 ribosondas, no obtuvimos patrones de expresión claros por lo que no podemos confirmar ni descartar expresión en el primordio de la LLP. Es posible que algunos de ellos tengan expresión ubicua o en tejidos diferentes al primordio, por lo que no podemos calcular el porcentaje de error en la metodología experimental. Sin embargo, podemos decir que es posible detectar por este método genes cuya expresión específica en este grupo de células que no ha sido descrita antes (7 genes de 32 candidatos). Esto avala la metodología empleada como una buena herramienta de descubrimiento de genes con expresión tejido-específica.

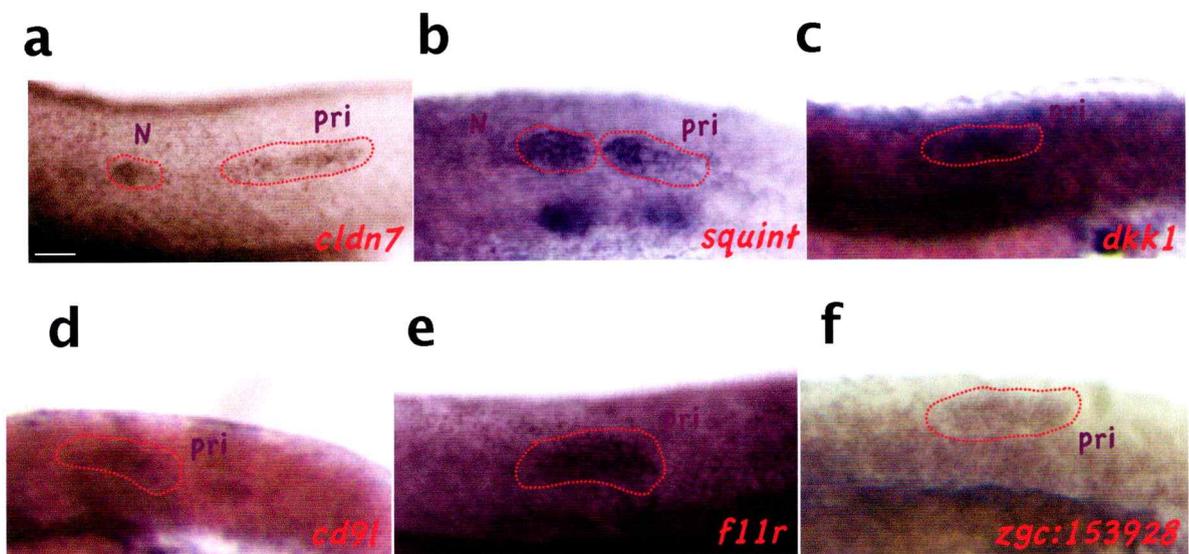
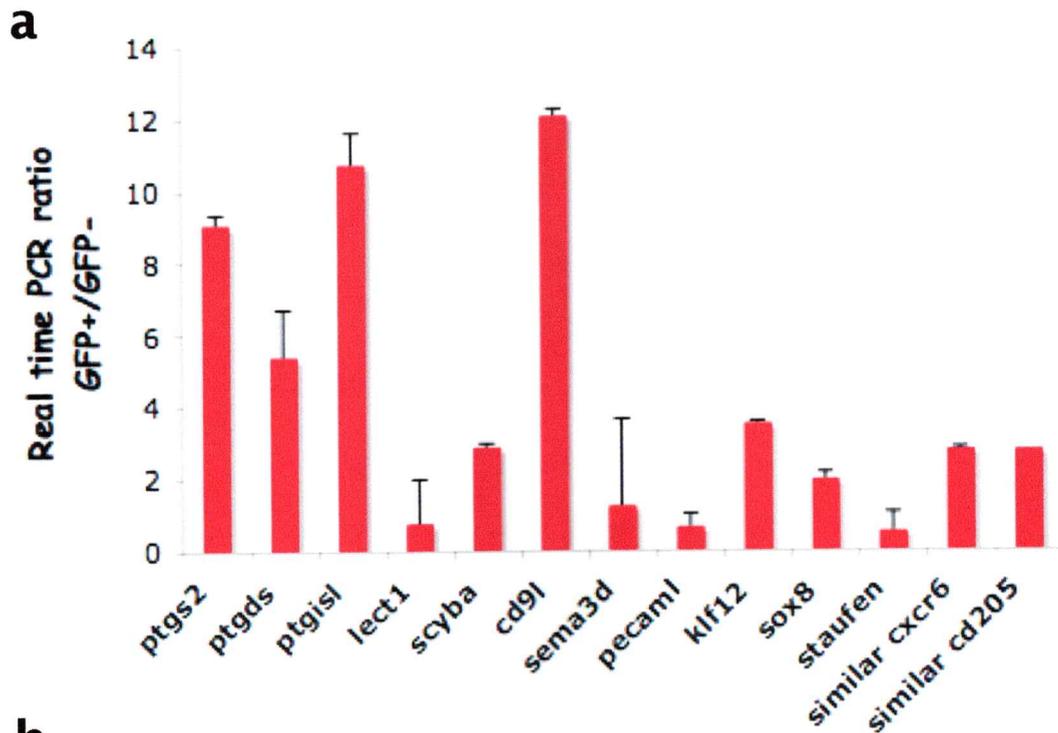


Figura 27. Análisis de hibridación *in situ* del conjunto de genes seleccionados. Se observa la expresión de *claudin 7 (cldn7)*, *nodal-related protein (squint)*, *dickkopf 1 (dkk1)*, *cd9-like (cd9l)*, *f11 receptor (f11r)* y del clon zgc:153928 (similar CD99 Type II) en el primordio de la LLP. pri: primordio; NM: neuromasto. Escala de barras; a-f) 10 μ m.

De los 7 genes cuyo patrón de expresión en primordio de la LLP fue detectado por hibridación *in situ*, *cd9*, *f11r* y *cd99* participan en procesos de migración y adhesión celular en la respuesta inmune en mamíferos (Sobocka MB. y col., 2000; Kobayashi H. y col., 2004; Unternaehrer JJ. y col., 2006; Lou O. y col., 2007; Schenkel AR. y col., 2007; Smith CW., 2008). El factor de transcripción *irf5* (C. d'Alençon, datos no publicados) en cambio, juega un rol en la inducción de repuesta inmune innata (Paun A. y Pitha PM., 2007). Por su parte, *squint* (ligando de la vía Nodal) y *dkk1* (glicoproteína secretada que actúa como inhibidor soluble de la vía Wnt) son genes esenciales para el desarrollo embrionario temprano (patterning) en el pez cebra (Feldman B. y col., 1998; Logan CY. y Nusse R., 2004; Niehrs C., 2006). Finalmente, *cldn7*, al igual que toda la familia de las tetraspaninas, son genes fundamentales para la adhesión celular durante diversos procesos del desarrollo (Kollmar R. y col., 2001).

A continuación, debido a que no todos los genes seleccionados del microarreglo pudieron ser confirmados mediante ensayos de hibridación *in situ*, realizamos ensayos de RT-PCR en tiempo real de estos genes comparando los niveles de mRNA entre las muestras GFP+ y GFP- (Figura 28).



b

	Razón GFP+/GFP- PCR tiempo real	Razón GFP+/GFP- Microarreglo
ptgs2	9.07	15.26
ptgds	5.38	6.04
ptgisl	10.73	22.80
lect1	0.75	2.89
scyba	2.87	4.88
cd9l	12.07	61.37
sema3d	1.24	2.03
pecaml	0.65	2.00
klf12	3.52	9.22
sox8	1.96	2.13
staufen	0.51	2.16
similar cxcr6	2.78	91.38
similar cd205	2.76	3.23

Figura 28. Análisis de PCR en tiempo real de mRNA derivado de células GFP+ y GFP- purificadas. a) Se muestra la razón GFP+/GFP- de la expresión relativa de diferentes genes elegidos al azar. Los niveles de expresión relativa fueron determinados por normalización a β actina. b) Tabla comparativa de los valores obtenidos de la razón GFP+/GFP- en los análisis de PCR en tiempo real y microarreglos, respectivamente.

Como muestra la figura, confirmamos, en la mayoría de los casos, los resultados obtenidos de los microarreglos, ya que los niveles de expresión de los genes analizados por esta técnica cuantitativa muestran una razón GFP+ versus GFP- mayor a dos veces. Estos datos comprueban que la no detección en el primordio de la LLP de todos los genes seleccionados probados mediante hibridación *in situ*, pudo deberse a problemas con la técnica más que por un resultado falso positivo arrojado por el microarreglo.

Finalmente, se seleccionaron cuatro genes, *cd9l*, *f11r*, *dkk1* y *squint* para realizar estudios funcionales *in vivo*, mediante ensayos de pérdida de función génica utilizando morfolinis antisentido. La selección se basó en el papel de estos genes en los procesos de adhesión y migración celular durante la respuesta inmune en mamíferos (*cd9* y *f11r*) y en el papel en los procesos de morfogénesis y patterning en el pez cebra (*dkk1* y *squint*).

Para esto, embriones de peces transgénicos CldnB::GFP en estadio de una célula fueron inyectados con 10 nl de los morfolinis CD9l (Mo-cd9l), F11r (Mo f11r), Dkk1 (Mo-dkk1) y Squint (Mo-squint) 1 mM, respectivamente. El fenotipo de pérdida de función de estos genes en el desarrollo del primordio de la LLP fue observada *in vivo*, mediante microscopia de fluorescencia, durante todo el proceso de migración del primordio.

Como se muestra en la figura 29, tanto la inhibición de *cd9l* como de *f11r* produce un cambio en la estructura del primordio migratorio, ya que se observa un perímetro irregular, forma alargada y un depósito de células aberrante (Figura 29d-g) en comparación con embriones sin inyectar (control) (Figura 29c). Sin embargo, el proceso de migración como tal no es afectado (Figura 29a-b). No obstante, observamos en algunos casos, una disminución en el número de células del primordio

(Figura 29f-g), como también una forma altamente desorganizada del primordio. Este fenotipo puede deberse a la pérdida de adhesión de las células que lo conforman o a una falla en la formación ordenada de rosetas que prefiguran los grupos de células que serán depositadas por el primordio (Figura 29d-e).

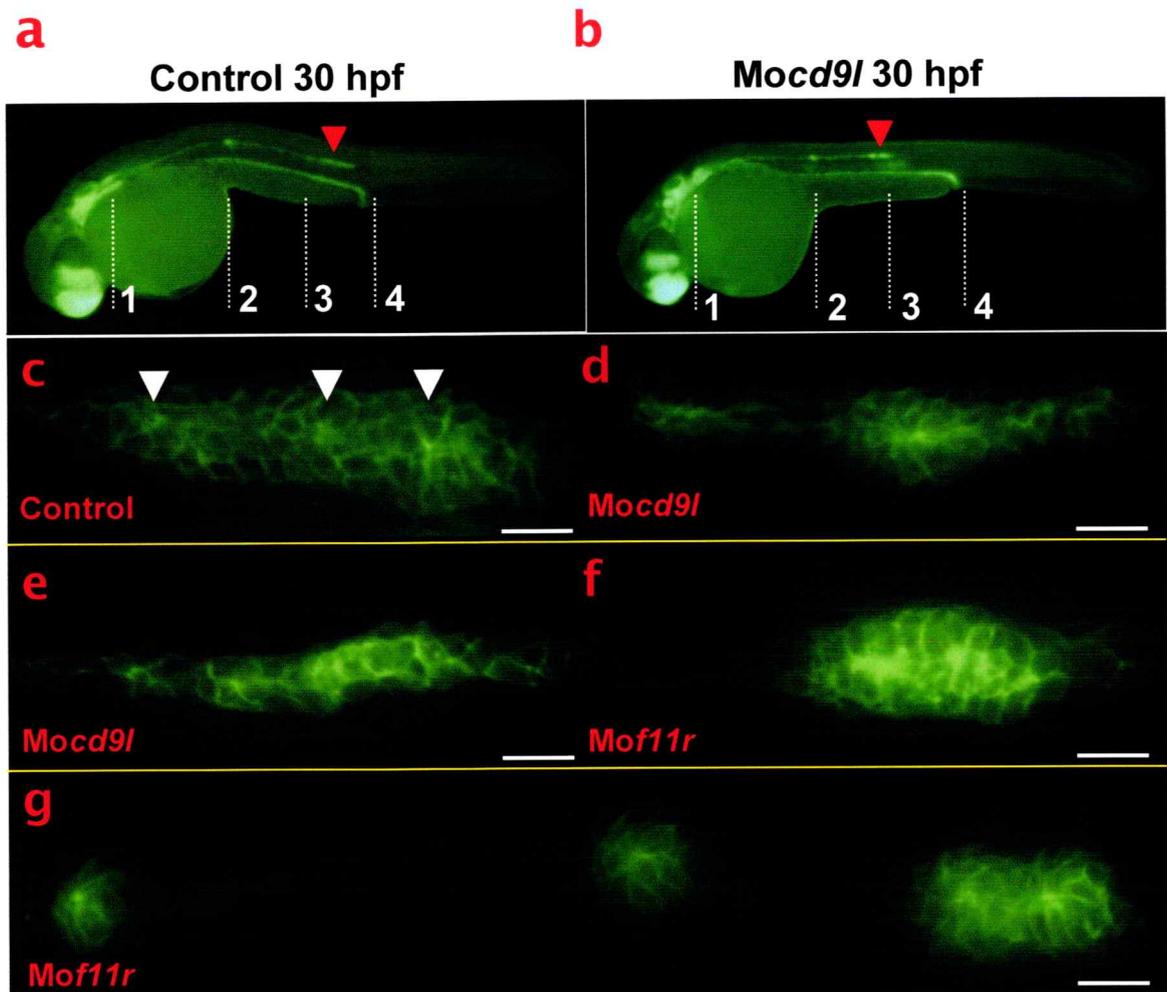


Figura 29. Pérdida de función de los genes *cd9l* y *f11r*. a-b) Inmunofluorescencia de embriones *CldnB::GFP* control (a) y morfantes para *cd9l* (b). Se observa la migración del primordio de la LLP. c-g) Imágenes de primordios de la LLP representativos de embriones control (c) y de embriones morfantes para *cd9l* (d-e) y para *f11r* (f-g). Se observa el patrón de organización de las células del primordio en rosetas (cabezas de flechas en c) en comparación con la pérdida en la organización del primordio observada (d-e) y/o en el número de células que lo conforman (f-g) en embriones morfantes. Escala de barras; c-g) 20 μ m.

La pérdida de la organización celular en el primordio de la LLP observada en embriones morfantes tanto para *cd9l* como para *f11r*, en conjunto con los antecedentes sobre el papel que cumplen estas proteínas durante los procesos de adhesión y migración celular durante la repuesta inmune, sugieren un papel conservado de estas moléculas de adhesión en la comunicación e interacción celular necesaria para los procesos de migración celular de ambos sistemas.

Paralelamente, no observamos diferencias entre los embriones morfantes para *dkk1* y *squint* en comparación con embriones controles (datos no mostrados). Una posible explicación para estos resultados, es que la ausencia de *squint* puede ser rescatada por otro miembro de la familia de proteínas Nodal, como es el caso de Cyclops (Feldman B. y col., 1998), mientras que la ausencia de *dkk1* puede ser recuperada por otros inhibidores de la vía Wnt (Logan CY. y Nusse R., 2004; Niehrs C., 2006).

Finalmente, al no observar defectos en la estructura y/o migración del primordio cuando microinyectamos los morfolidos de *dkk1* y *squint*, confirmamos que la pérdida de la morfología del primordio en embriones morfantes para *cd9l* y *f11r* observada, es debido a la ausencia de estos genes y no por efectos inespecíficos generados por la microinyección o la toxicidad del morfolido. Por lo tanto, estos resultados sugieren un posible rol de estas moléculas de adhesión en la organización celular dentro del primordio migratorio.

5.5 Expresión y función de receptores de quimioquinas en el pez cebra

En paralelo al experimento de búsqueda de nuevos genes expresados en el primordio de la LLP, utilizamos una estrategia alternativa para la identificación de nuevos genes involucrados en la migración de este grupo de células.

Como se mencionó anteriormente, los receptores de quimioquinas juegan un papel fundamental en los procesos de migración celular en los organismos. En base a esto, y con los antecedentes del papel del sistema SDF1/CXCR4/CXCR7 en guiar la migración del primordio, evaluamos si otros miembros de esta familia de proteínas jugaban un papel en la migración del primordio de la LLP. Para esto identificamos genes de pez cebra presentes en las bases de datos que son ortólogos a receptores de quimioquinas en mamíferos.

Se realizaron alineamientos de secuencias contra el genoma de pez cebra y análisis filogenéticos de los genes de receptores de quimioquinas en mamíferos con el objetivo de detectar posibles ortólogos de estos. Identificamos 4 secuencias no descritas previamente y no anotadas en el genoma de *Danio*: receptor de quimioquinas (CC) 7 (*ccr7*), receptor de quimioquinas (CC) 9 (*ccr9*), receptor de quimioquinas (C-X-C) 3 (*cxcr3*) y un cuarto gen no descrito en mamíferos al cual denominamos receptor de quimioquinas like (*ccr-like*).

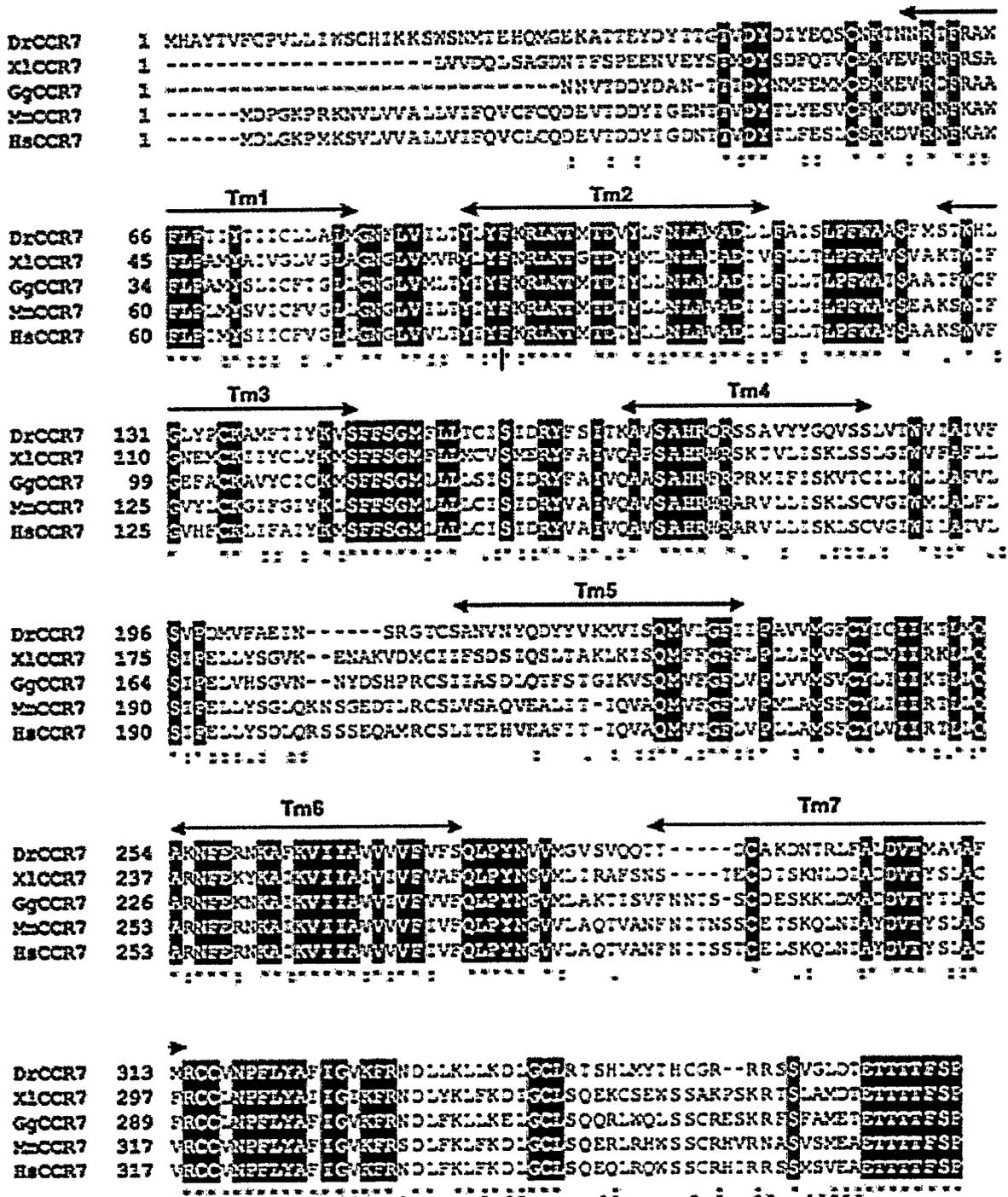
A continuación, analizamos los patrones de expresión de estos genes. Los respectivos cDNAs fueron obtenidos de ESTs (expressed sequence tags) comprados en Open Biosystems y los estudios de expresión fueron realizados mediante ensayos de hibridación *in situ*. No observamos expresión de ninguno de ellos en el primordio de la LLP. No obstante, detectamos expresión de estos genes en zonas donde ocurre hematopoiesis, fundamentalmente linfopoiesis, en el pez cebra. En base a esto y dado

que la migración celular es fundamental para el desarrollo y función de los sistemas hematopoiético e inmune en mamíferos, donde los receptores de quimioquinas juegan un papel esencial para llevar a cabo estos procesos, evaluamos la función de dos de estos genes en los procesos de migración durante el desarrollo de la hematopoesis en el pez cebra.

De acuerdo a los antecedentes y sobre la base del papel fundamental que juegan en el desarrollo y función de los sistemas anteriormente descritos, elegimos estudiar en esta tesis la expresión y función de *ccr7* y *ccr9*, moléculas esenciales en el desarrollo y función de los linfocitos T en mamíferos (Sallusto F. y Lanzavecchia A., 2000; Esche C. y col., 2005; Broxmeyer HE. 2008).

Inicialmente, realizamos análisis filogenéticos de estos genes comparando con sus respectivos ortólogos en vertebrados. La figura 30a muestra la secuencia aminoacídica de CCR7 de *Danio rerio* alineada contra las secuencias de CCR7 de humano, ratón, pollo y rana, respectivamente. A su vez, la figura 30b muestra un árbol filogenético generado en base a los alineamientos múltiples de secuencias realizado.

a



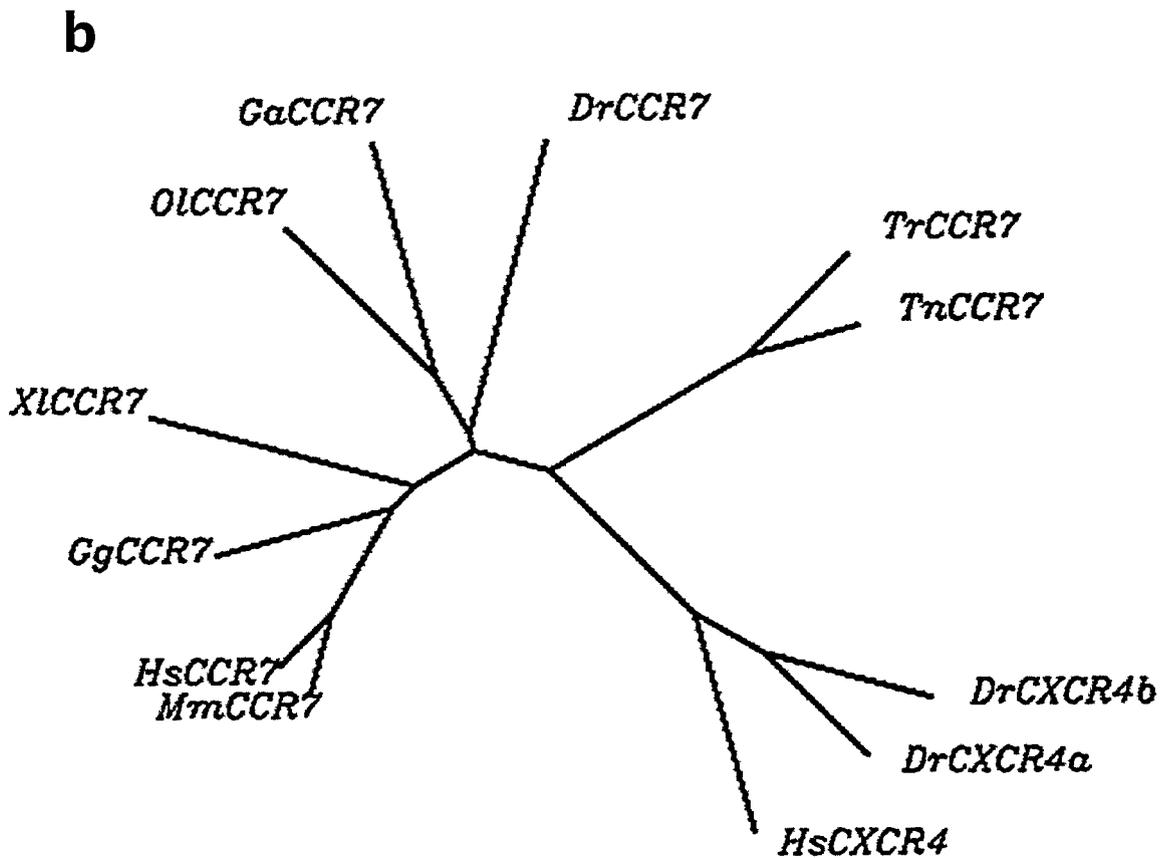


Figura 30. Análisis filogenéticos de múltiples alineamientos de CCR7 entre especies. a) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de CCR7 (DrCCR7) de pez cebra contra las secuencias de XICCR7 (rana africana), GgCCR7 (pollo), MmCCR7 (ratón) y HhCCR7 (humano). Las líneas horizontales demarcan los dominios transmembrana (Tm). Los alineamientos se realizaron utilizando el programa ClustalW. b) Árbol filogenético generado de múltiples alineamientos utilizando el programa Phylip. Se agregó las secuencias de CCR7 de fugu (TrCCR7), medaka (OICCR7), stickleback (GaCCR7) y tetraodon (TnCCR7); y además las secuencias de CXCR4 de pez cebra (DrCXCR4a, DrCXCR4b) y humano (HsCXCR4).

Paralelamente, se realizó análisis filogenéticos de CCR9 con sus respectivos ortólogos en vertebrados (Figura 31).

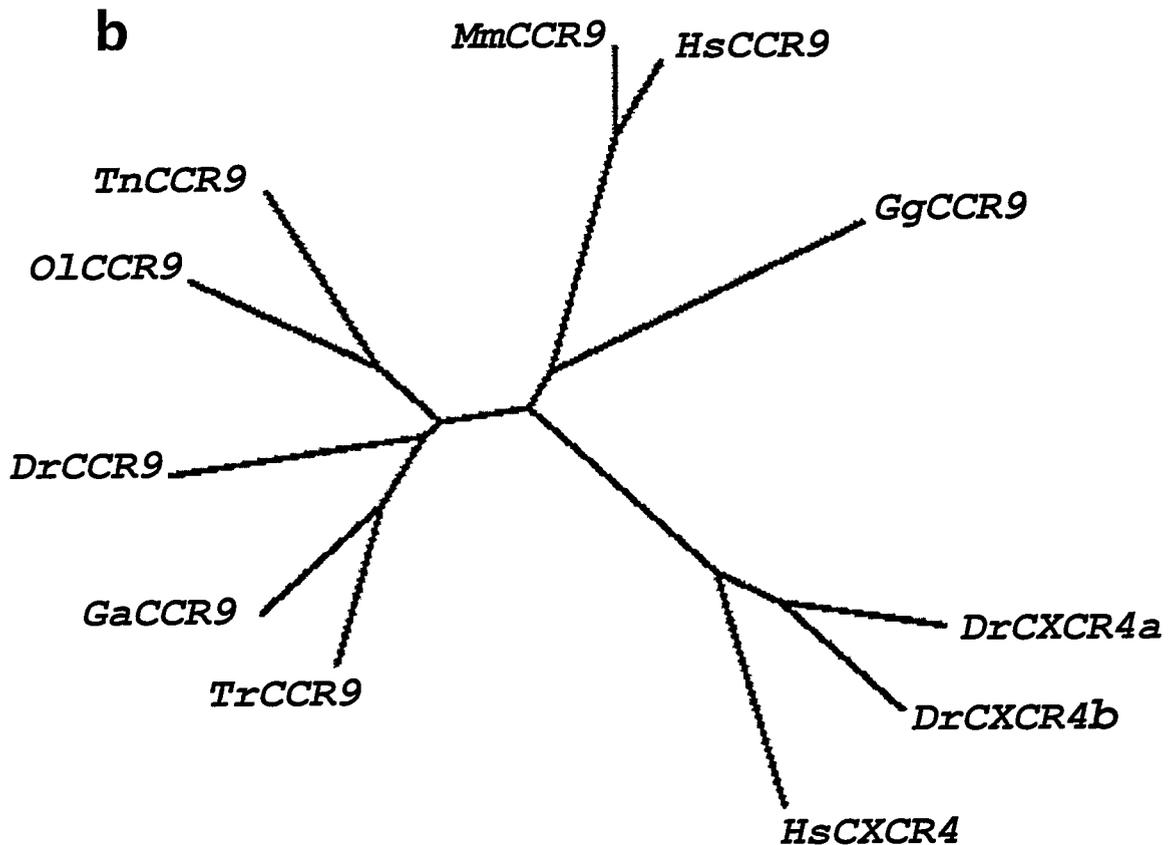


Figura 31. Análisis filogenéticos de múltiples alineamientos de CCR9 entre especies. a) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de CCR9 (*DrCCR9*) de pez cebra contra las secuencias de *GgCCR7* (pollo), *MmCCR7* (ratón) y *HhCCR7* (humano). Las líneas horizontales demarcan los dominios transmembrana (Tm). Los alineamientos se realizaron utilizando el programa ClustalW. b) Árbol filogenético generado de múltiples alineamientos utilizando el programa Phylip. Se agregó las secuencias de CCR9 de fugu (*TrCCR9*), medaka (*OICCR9*), stickleback (*GaCCR9*) y tetraodon (*TnCCR9*); y además las secuencias de CXCR4 de pez cebra (*DrCXCR4a*, *DrCXCR4b*) y humano (*HsCXCR4*).

A continuación, evaluamos el patrón de expresión de *ccr9* mediante análisis de hibridación *in situ* (Figura 32).

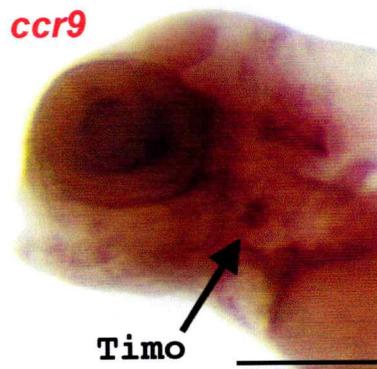


Figura 32. Expresión del mRNA de *ccr9* analizado por hibridación *in situ*. Vista lateral de una larva de 5 dpf. La flecha indica la expresión de *ccr9* en el timo de pez cebra. . Escala de barras; 200 μ m.

Como se muestra en la figura, *ccr9* se expresa en el timo de larvas de pez cebra de 5 dpf, no detectándose expresión en estadios más tempranos. Este resultado indica que al igual que en mamíferos, este gen estaría siendo expresado por linfocitos T que ya alcanzaron el timo, y sería un marcador de la etapa definitiva de hematopoiesis en el pez cebra.

Paralelamente, analizamos el patrón de expresión de *ccr7* (Figura 33).

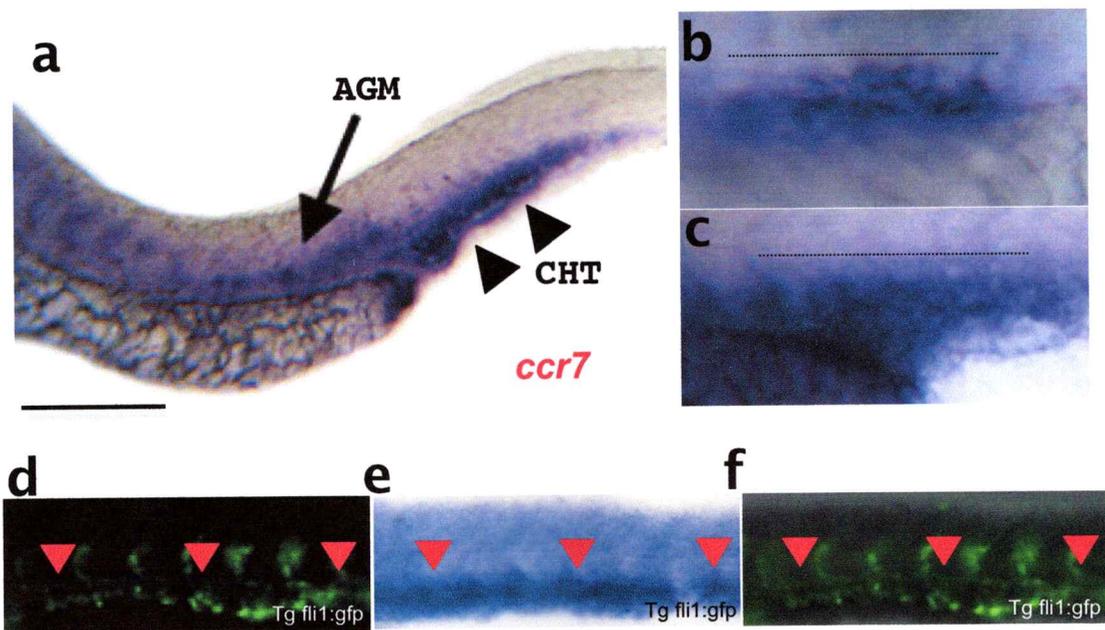


Figura 33. Expresión de *ccr7* en el pez cebra. a-f. Análisis de hibridación *in situ* de *ccr7*. a) Vista lateral de un embrión de 36 hpf. Se observa la expresión de *ccr7* en la región AGM (flecha negra) y en la región CHT (cabeza de flecha). b–c) Vista lateral de la región AGM (b) y de la región CHT (c). d) Inmunofluorescencia de un embrión de 30 hpf de la línea transgénica Tg(*fli1*:eGFP). Se observa la marca de GFP en la región AGM (línea punteada en b). e) Análisis de hibridación *in situ* de *ccr7* en el mismo embrión que se muestra en d. f) Sobreposición de las imágenes mostradas en d) y e). Escala de barras; a-f) 200 μ m.

Tal como se aprecia en la figura 33, *ccr7* se expresa en las regiones AGM y CHT de embriones de pez cebra a las 30 hpf. No detectamos expresión del mRNA de *ccr7* en estadios más tardíos. A su vez, se realizó análisis de hibridación *in situ* en embriones transgénicos Fli1:GFP, y observamos que el mRNA de *ccr7* colocaliza con la marca de GFP en la región del AGM (Figura 33e-g) a las 30 hpf. De esta forma se concluye, que *ccr7* estaría siendo expresado por precursores de linfocitos T en la etapa

definitiva de la hematopoiesis en el pez cebra.

Producto de que las células precursoras de linfocitos T deben migrar hacia el timo para su posterior diferenciación, quisimos evaluar la función de este receptor de quimioquinas en la migración de estas células.

Para esto, analizamos el papel de *ccr7* sobre el proceso hematopoiético en el pez cebra, mediante la inactivación del gen respectivo con el uso de un morfolino antisentido específico para este gen (*Mo-ccr7*). A continuación, comparamos la expresión de marcadores de hematopoiesis tanto primitiva como definitiva en peces silvestres y morfantes. Encontramos que la inactivación de este gen disminuye la expresión de *rag1*, marcador de linfocitos T, en el timo en larvas de pez cebra de 5 dpf (Figura 34).

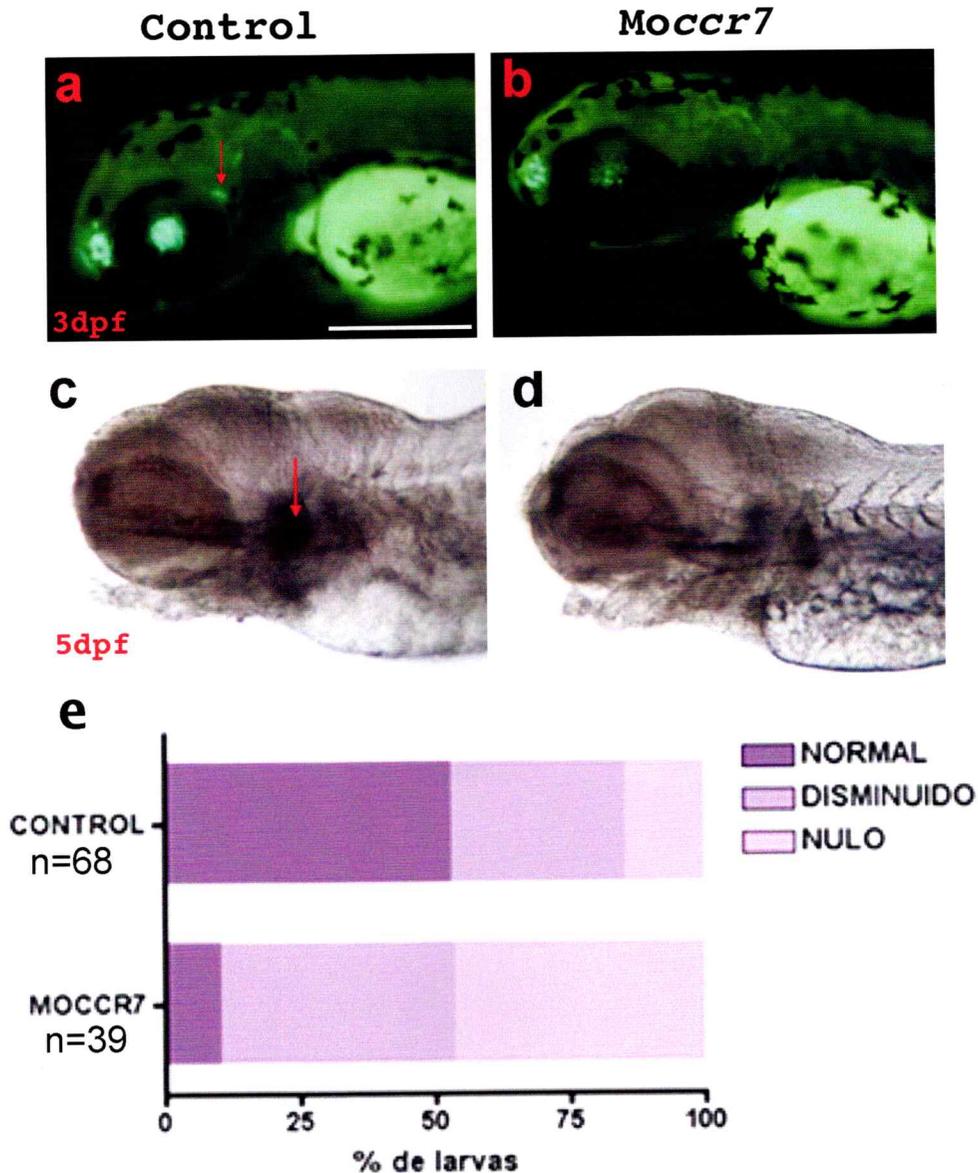


Figura 34. Bloqueo de CCR7 disminuye la expresión de *rag1* en el timo. a-b. Línea transgénica Rag1::GFP, que expresa GFP en el timo del pez cebra. Vista lateral de un embrión de 3dpf. Se observa una disminución de la marca GFP en el timo de embriones inyectados con el Mo-CCR7 (b) comparados con embriones sin inyectar (a). c-d. Análisis de hibridación *in situ* en larvas de pez cebra de 5 dpf. La inhibición de CCR7 disminuye la marca de *rag1* en el timo (d), en comparación con larvas control (c). e) Gráfico que muestra los niveles de expresión definidos para *rag1*. Escala de barras; a-d) 200 μ m

Debido a que la disminución en la expresión de *rag1* en los morfantes para *ccr7* no fue observada en el 100% de las larvas analizadas, se definieron 3 categorías arbitrarias (normal, disminuida y nula) dependiendo del nivel de expresión de *rag1* en el timo (Figura 34e). Como se observa en la figura, aproximadamente un 90% de las larvas morfantes para *ccr7* presentan una expresión de *rag1* en el timo disminuida o nula, en comparación con un 10% observado en las larvas control, demostrando así que la inhibición de *ccr7* disminuye la expresión de este marcador de linfocitos T.

Luego, para confirmar el papel específico de *ccr7* en la diferenciación celular linfoide, analizamos la expresión de los marcadores de células progenitoras embrionarias *ikaros* (marcador de progenitores linfoides), *scl* y *c-myb* (marcadores de progenitores eritroide-mieloide).

La inhibición de *ccr7* no altera la expresión los marcadores *scl* y *c-myb* (datos no mostrados). Sin embargo, la inactivación de este gen disminuye la expresión del marcador linfoide *ikaros* en la regiones AGM y CHT (Figura 35).

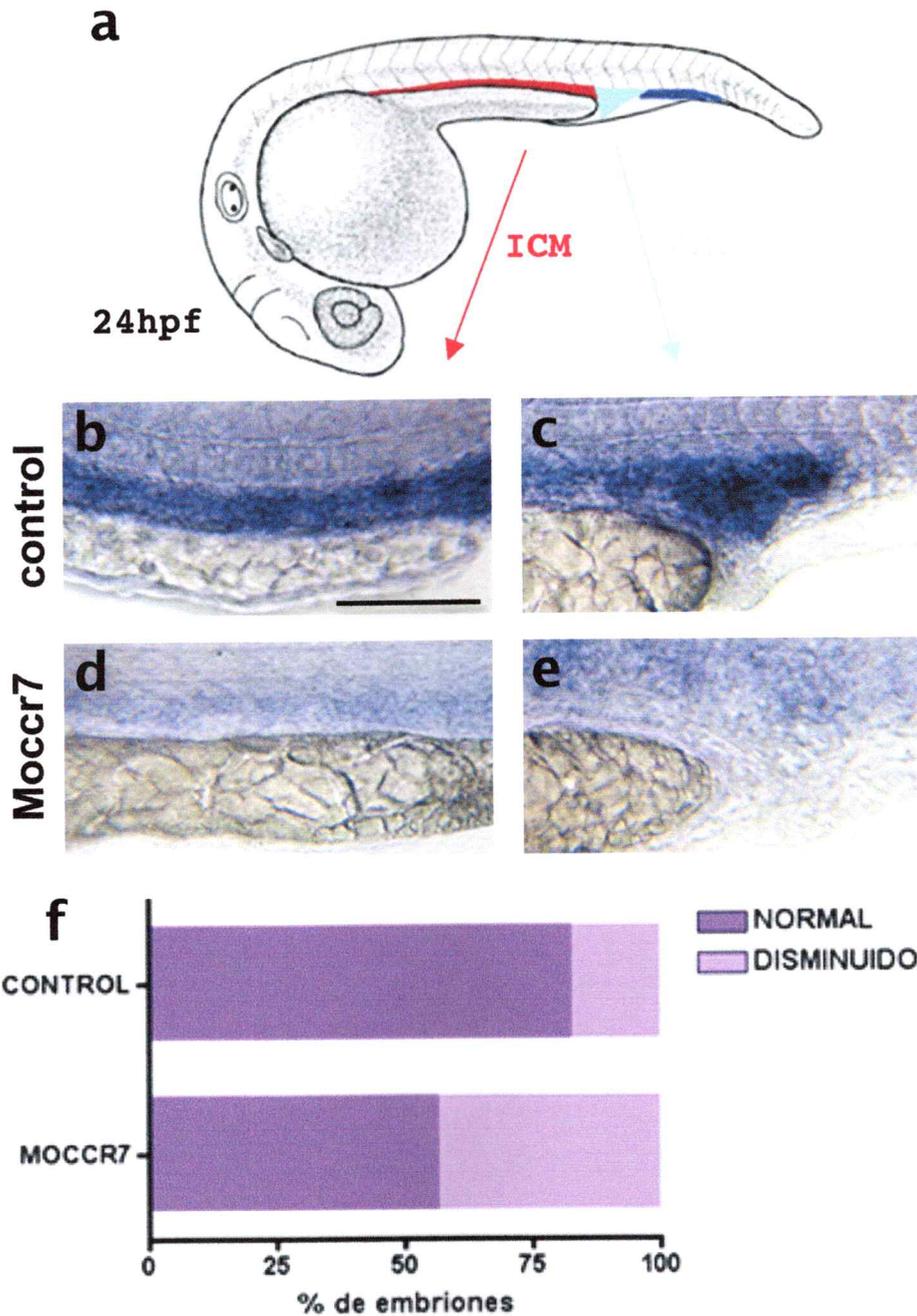


Figura 35. Inhibición de CCR7 disminuye la expresión de *ikaros* en la región ICM (intermediate cell mass). a-d) Vista lateral de embriones de 24 hpf. Análisis de hibridación *in situ* muestran que embriones inyectados con el Mo-*ccr7* presentan una disminución en la expresión de *ikaros* en la región del ICM (c) y en el CHT (d) con respecto a embriones no inyectados (a-b). e) Gráfico que muestra los niveles de expresión definidos para *ikaros*. Escala de barras; b-e) 200 μ m

Se definieron dos categorías: normal y disminuido, de acuerdo a los niveles de expresión de *ikaros* (Figura 35f). Se observa que embriones morfantes para *ccr7* presentan aproximadamente un 50% de disminución en la expresión de este marcador linfoide.

Estos resultados en conjunto nos indicarían que *ccr7* estaría jugando un papel en la linfopoesis del pez cebra, específicamente en el desarrollo de los precursores de linfocitos T.

Finalmente, nos propusimos establecer si secuencias reguladoras río arriba de *ccr7* de pez cebra son capaces de dirigir la expresión del gen reportero GFP a células inmunes migratorias. Para ello, obtuvimos los primeros 6Kb río arriba del primer codón de *ccr7* y lo fusionamos con la secuencia codificante de EGFP utilizando el sistema Tol2, vector basado en un transposón de peces (Kawakami K. y Noda T., 2004). Con esta construcción mezclada con la transposasa específica para Tol2, microinyectamos embriones al estadio de una célula y observamos mediante microscopia de fluorescencia la expresión del gen reportero *in vivo* durante la embriogénesis. La observación del proceso de migración del primordio no mostró expresión de GFP en estas células, confirmando el resultado negativo obtenido mediante hibridación *in situ* (Figura 36).

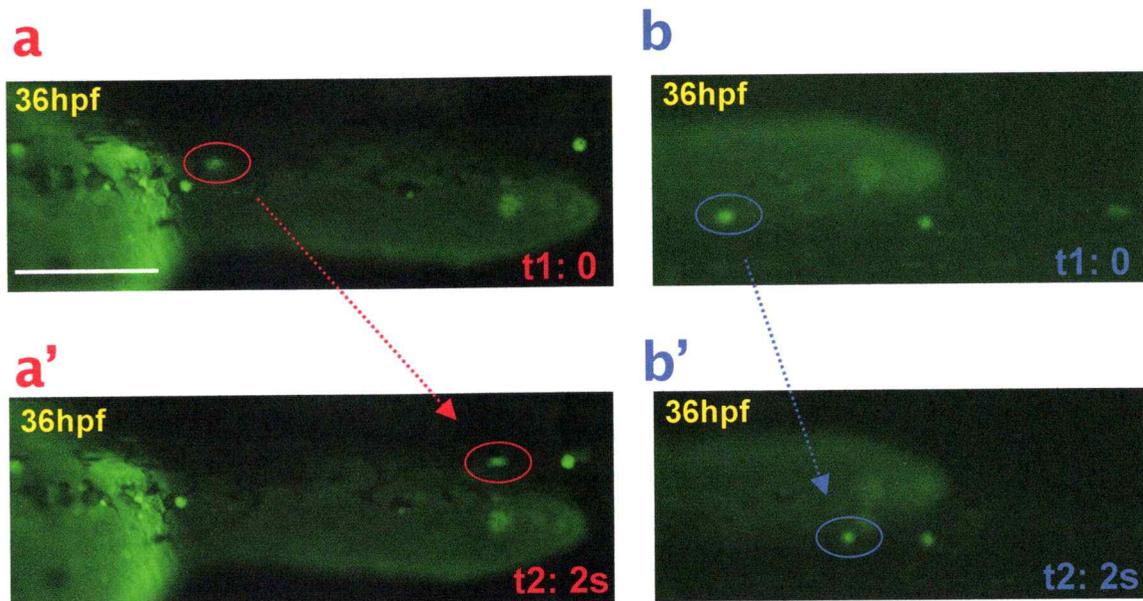


Figura 36. Análisis de la función *in vivo* de *ccr7* en el desarrollo del pez cebra. Se observa la expresión transiente de unas pocas células circulantes que expresan GFP en embriones de 36 hpf. Se muestra la migración de dos células positivas para GFP: círculo rojo: a (t1: 0) \rightarrow a' (t2: 2s) y círculo azul: b (t1: 0) \rightarrow b' (t2: 2s), en embriones inyectados con el constructo *ccr7-egfp*. s: segundos.

Sin embargo, como se muestra en la figura, se observa un pequeño número de células marcadas en la sangre circulante en embriones de 30 hpf. Sin embargo, esta expresión se observa sólo entre las 30 y 36 hpf aproximadamente, ya que en embriones menores y mayores que este estadio no se observa la presencia de células positivas para GFP. En conjunto, estos resultados sugieren que células precursoras de linfocitos T expresan *ccr7* en la fase inicial de la hematopoiesis definitiva del pez cebra, indicando que en este estadio los precursores de linfocitos T se estarían generando para su posterior diferenciación en el timo.

Como objetivo futuro posterior a este estudio, se podría utilizar el modelo transgénico descrito como modelo *in vivo* para estudiar el desarrollo de los linfocitos T y su posterior función en la respuesta inmune del pez cebra con todos los procesos que conlleva.

VI. DISCUSION

Movimientos activos de células son esenciales en muchos procesos del desarrollo incluyendo la gastrulación, organogénesis y la formación de los sistemas nervioso e inmune. Por otra parte, la migración celular desempeña un papel importante durante todo el ciclo vital de un organismo, participando en procesos de regeneración, cicatrización de heridas y en las respuestas del sistema inmune (Ridley AJ. y col., 2003).

Muchas de las características de la migración celular, ya sea de cómo este proceso es regulado y cuales son las moléculas relevantes para este evento son, en su mayoría, desconocidas. La complejidad y heterogeneidad de los territorios por los cuales las células se mueven y el gran número de factores que son potencialmente relevantes en este proceso hacen que los análisis *in vitro* sean incompletos y los análisis *in vivo* sean difíciles de estudiar en condiciones controladas. Con respecto a esto último, el desarrollo de tecnologías de imágenes de organismos vivos aún no permite realizar un seguimiento en tiempo real de las células migratorias, exceptuando aquellas que ocurren en las etapas tempranas del desarrollo. Por ejemplo, estudios de metástasis (Condeelis J. y Segall JE., 2003; Sahai E. y Marshall CJ., 2003) o homing linfocitario (Grinnell F. y col., 2003; Witt CM. y col., 2005; Henrickson SE. y col., 2008) deben efectuarse, muchas veces, de manera indirecta y sin poder hacerse una descripción acabada de los mecanismos finos de migración *in vivo*

En esta tesis se apuntó a realizar una caracterización global de los genes que se expresan en un grupo de células migratorias, el primordio de la línea lateral posterior del pez cebra. Recientemente, la línea lateral posterior (LLP) del pez cebra ha emergido como un buen sistema para el análisis genético de la migración celular y de

cómo ésta es controlada (Villablanca EJ. y col., 2008).

La línea lateral es un sistema mecanosensorial compuesto por un grupo de órganos sensoriales superficiales llamados neuromastos, que se encuentran distribuidos en la superficie del cuerpo de peces y anfibios en patrones especie-específicos (Ghysen A. y Dambly-Chaudière C., 2007). Estos órganos sensoriales son depositados por un primordio migratorio de células que se origina desde las placodas cefálicas. En el pez cebra, el primordio de la LLP inicia su migración a las 20 horas post fertilización y migra a través del miosepto horizontal, depositando grupos de 15-20 células (pro-neuromastos) en intervalos regulares. Los neuromastos contienen células ciliadas mecanorreceptoras que se diferencian pocas horas después del depósito. El proceso migratorio termina a las 48 hpf, tiempo durante el cuál el embrión de pez cebra mantiene su transparencia, permitiendo la visualización *in vivo* de todo el proceso. Además, la existencia de líneas transgénicas que expresan la proteína fluorescente verde, GFP, facilita la identificación de tipos celulares específicos así como su morfología y comportamiento durante todo el desarrollo (Haas P. y Gilmour D., 2006). Si bien en esta tesis nos concentramos en los fenómenos relacionados con la migración celular, es importante recalcar que simultáneamente, en el primordio de la LLP están ocurriendo diversos procesos de desarrollo (Ghysen A. y Dambly-Chaudière C., 2007). Las células migratorias son precursores neurales, de características troncales, ya que son capaces de generar diversos destinos celulares. Dentro del primordio, las células están sufriendo procesos de división celular, probablemente simétrica y asimétrica y esta ocurriendo neurogénesis. Además, se manifiesta una organización interna en el primordio con formación repetitiva de rosetas, probablemente involucrando una transición mesénquima-epitelio (Nechiporuk A. y Raible DW., 2008). Finalmente, toda esta actividad paralela puede ser analizada en el

mismo sistema, lo que le asigna una versatilidad y utilidad multifacética al primordio de la LLP.

Estudios recientes han demostrado la importancia de la vía de señalización mediada por la familia de factores de crecimiento fibroblásticos (FGF's) en controlar el "patterning" y la organización de las células del primordio (Lecaudey V. y col., 2008; Nechiporuk A. y Raible DW., 2008). En estos trabajos, los autores proponen que la expresión dinámica de los ligandos de FGF (*fgf3/10*) determina el patrón espacio-temporal en la morfogénesis de la línea lateral, demostrando un nuevo link entre la organización interna de los tejidos y la migración celular colectiva. Hacemos notar que en nuestra búsqueda de genes expresados en el primordio, hemos detectado la presencia de los genes descritos en estos trabajos así como ligandos de esta familia no descritos previamente (*fgf13* y *fgf8*).

Por otra parte, durante el desarrollo de esta tesis, diversos trabajos han evidenciado la importancia del sistema *sdf1a/cxcr4b/cxcr7b* en guiar al primordio a través del miosepto horizontal (Dambly-Chaudière C. y col., 2007; Valentin G. y col., 2007). Estos estudios han demostrado que la inactivación tanto de *sdf1a* como de *cxcr4b* y/o *cxcr7b* produce alteraciones en la migración del primordio y sobre la direccionalidad por la cual éste migra. En conjunto estos trabajos sugieren que la señalización mediada por este sistema es importante para guiar al primordio a través del miosepto horizontal, y al mismo tiempo, alude a la presencia de otras moléculas quimioattractantes que estarían guiando al primordio por vías alternativas.

Nuevamente, las moléculas ya descritas han sido detectadas en nuestro trabajo, así como nuevos miembros de la familia de las quimioquinas y sus receptores.

A su vez, como se mencionó anteriormente la organización interna del primordio y por ende la cohesión de sus células es fundamental para el desarrollo de la LLP. En

esta tesis detectamos también moléculas de adhesión como *cadherina 2*, (*cdh2*), la que es altamente expresada en la línea lateral del pez cebra, donde juega un papel en la formación de este sistema (Kerstetter AE. y col., 2004). La expresión de dos nuevas moléculas de adhesión fue encontrada en este trabajo, las que fueron estudiadas funcionalmente y demostraron la existencia de mecanismos adicionales a los ya descritos (ver más abajo).

Sumado a las consideraciones anteriores, sin duda el comportamiento migratorio del primordio de la LLP es el que genera el mayor interés. En general la migración celular puede ser clasificada en dos categorías principales: la migración de células únicas (llamada ameboidal o mesenquimática) y la migración colectiva. Esta última puede adoptar diversas conformaciones, como la migración concatenada (células ordenadas en fila, como ocurre con las glías que siguen un axón) o en forma de cohorte (Friedl P. y col., 2004). El primordio de la LLP sigue un tipo de migración en cohorte, que ha sido descrita en varios otros modelos biológicos y patológicos (Friedl P. y col., 2004). Diversos cánceres como el melanoma, cáncer epitelial y sarcomas, muestran este tipo de migración en hojas o en filas, un proceso invasivo que no sufre una transición epitelio-mesénquima, y se caracteriza por la expresión de metaloproteasas y colagenasas (Wolf K. y col., 2007). Si bien en esta tesis hemos propuesto que el primordio de la LLP utilizaría mecanismos conservados con aquellos presentes en el sistema inmune, el mecanismo migratorio que involucra una cohorte de células migratorias cohesionadas es más parecido a aquel que ocurre en ciertas células tumorales invasivas. Es así como encontramos en nuestra búsqueda genes correspondientes a diversas moléculas implicadas en invasión tumoral, en particular genes de metaloproteasas como MMP9, algunas integrinas y marcadores conocidos sólo por su expresión en cánceres, como por ejemplo, *tacstd* (Villablanca E.J. y col.,

2006).

Estos hallazgos reafirman nuestra convicción de que el primordio de la LLP puede tener utilidad como modelo de diversos tipos de migración y en específico de ciertos tipos de tumores, lo que lo transforma en una oportunidad de generación de nuevos conocimientos y en una herramienta para probar efectos de moléculas anti-migratorias, ya sea desde una aplicación genética (terapia génica) o farmacológica (drogas antitumorales). Cabe recalcar que nuestro laboratorio ha presentado una solicitud de patente justamente proponiendo esta metodología de búsqueda (Allende ML. y Villablanca EJ., 2008) y el presente estudio aporta nuevos antecedentes que avalan el uso práctico del primordio de la LLP.

En cuanto al proceso de neurogénesis y diferenciación del sistema sensorial al que da lugar el primordio, también hemos sido capaces de identificar a los participantes ya descritos, así como a una colección de nuevos genes involucrados en este proceso.

Los factores de transcripción de la familia Sox (SRY-related homeobox) son importantes para la mantención del estado multipotente de progenitores neurales y al menos uno de ellos, Sox2, ha sido caracterizada su expresión en el primordio y en neuromastos (Hernández PP. y col., 2007). Sin embargo, muchos de estos genes presentan funciones en todo el sistema nervioso y, por lo tanto, están presentes en el tubo neural posterior, tejido que formó parte del material usado para la preparación del cDNA utilizado en la hibridación diferencial en el experimento de microarreglo. Es por esta razón, que no fuimos capaces de detectar muchos de estos genes, probablemente debido a que el experimento sólo detecta genes expresados diferencialmente, o exclusivamente, en el primordio de la LLP. A pesar de ello, algunos genes de la familia Sox, como *sox21*, mostraron sobrerrepresentación en nuestro experimento, lo que indica que algunos genes involucrados en este proceso pueden ser detectados en

nuestra colección de genes específicos. Genes de diferenciación de células ciliadas sí deben estar presentes en la colección de genes seleccionados, ya que no existen células similares en la población celular usada como tejido de "sustracción". Es así como detectamos la presencia de *ath1a*, gen estudiado por nuestro grupo y de papel esencial en la diferenciación de células ciliadas (Sarrazin AF. y col., 2006), y de otros genes pro-neurales como *ath2a* y *atoh7*. Ciertamente, nuestro grupo espera utilizar la riqueza de la información aquí generada para analizar el rol de este tipo de genes en el desarrollo y diferenciación de los distintos tipos celulares presentes en la línea lateral, y poder aportar al conocimiento general de estos procesos en otros sistemas sensoriales, particularmente en el oído.

Dada la amplitud de los temas a los cuales se hace un aporte con esta tesis, nos concentramos en la identificación de nuevas moléculas que contribuyen al movimiento direccional del primordio de la LLP. Nuestro objetivo, es lograr un mejor conocimiento de los procesos de migración celular durante el desarrollo y mantenimiento de los organismos. Además, al existir muchos genes homólogos en pez cebra a genes humanos, es posible la extrapolación de este sistema-modelo para entender los mecanismos moleculares de enfermedades humanas tales como el cáncer.

6.1 Aspectos técnicos abordados en esta tesis:

6.1.1 Purificación de células del primordio migratorio

Para identificar los genes que se expresan en el primordio migratorio de LLP, se realizó, en esta tesis, un análisis de expresión global basado en la construcción de una

librería de cDNAs a partir de células purificadas del primordio.

Para llevar a cabo este objetivo, utilizamos inicialmente la línea transgénica sqET20 (Parinov S. y col., 2004) que expresa GFP en el primordio migratorio; sin embargo, este transgénico posee una alta expresión de GFP en muchos otros tipos celulares por lo que se descartó para el experimento definitivo de purificación. En el año 2006, se publicó un trabajo que describe la generación de la línea transgénica CldnB::GFP, la cual expresa GFP en todas las células del primordio de la línea lateral posterior primaria del pez cebra (Haas P. y Gilmour D., 2006). Sin embargo, esta línea también expresa GFP en otros tejidos como la cabeza y la zona de los pronefros, por lo que fue necesario disectar colas de embriones de 36 hpf, para reducir al máximo la posible contaminación de la muestra de células GFP+ con tipos celulares distintos al primordio migratorio. Aún seccionando las colas, es probable que haya un grupo residual de células que contaminan la población GFP+, pero se consideró que esta contaminación era minoritaria y no afectaría mayormente el experimento. Los resultados confirmaron esta apreciación. La efectividad de las disecciones fue confirmada con tres tipos de análisis (visualización de las colas seccionadas bajo fluorescencia, ensayos de RT-PCR, e hibridación *in situ*) (Figuras 12 y 13). En cada sesión experimental, se alcanzó un límite de 200 embriones para disectar, dado el tiempo que este paso toma. Consideramos importante no dejar las colas seccionadas por un mayor tiempo en el medio de disección para evitar la muerte de las células o la degradación del mRNA.

A continuación, mediante análisis de citometría de flujo y cell sorting separamos las células GFP+ del primordio de la LLP a partir de colas de embriones transgénicos CldnB::GFP (Figura 15). Si bien, la separación física de células mediante ensayos de FACS ha sido ampliamente utilizada en el pez cebra, principalmente para estudiar el

desarrollo y función de los sistemas hematopoiético e inmune (Long Q. y col., 1997; Traver D. y col., 2003; Langenau DM. y col., 2004), es la primera vez que esta técnica es implementada para aislar células a partir de colas de embriones disectados. El aspecto técnico de mayor relevancia en este sentido es el protocolo de disección del tejido y de separación de las células, que obviamente puede ser aplicado ahora a otras líneas transgénicas que tengan patrones específicos de expresión de GFP.

Para cada experimento, separamos dos poblaciones celulares: GFP positivas y GFP negativas (control), respectivamente (Figura 15). Sin embargo, fue necesario realizar 2 a 3 purificaciones de células GFP+, para obtener una cantidad de células equivalente a la muestra control, debido a que del total de células purificadas en promedio por experimento, un 60% de células recuperadas correspondió a células GFP- y un 20% a células GFP+.

Considerando que el requisito esencial en los experimentos de microarreglos es que las muestras de mRNAs sean de excelente calidad, realizamos diversos controles en cada etapa durante la metodología para verificar la integridad del RNA. Dentro de los principales problemas que se presentaron durante el desarrollo de ésta, fueron la gran cantidad de pasos necesarios para la obtención de las células del primordio, los cambios de temperatura y el tiempo requerido para la disección de los embriones. Es por estas razones, que se priorizó disectar menos embriones por cada purificación; además de que durante toda la metodología las células fueron mantenidas en hielo y la separación de las células fue realizada directamente en Trizol, para así preservar la estabilidad del RNA.

Finalmente, mediante microscopia de fluorescencia (Figura 17) y ensayos de PCR en tiempo real (Figura 18) verificamos que la mayoría de las células purificadas mediante análisis de FACS expresan GFP, descartando así posibles contaminaciones

de la muestra con células GFP- y además, que estas células están altamente enriquecidas en marcadores moleculares del primordio migratorio. Estos controles fueron importantes previo a realizar la preparación de cDNA y la posterior hibridación de estas sondas con los microarreglos.

6.1.2. Construcción de una librería de cDNA del primordio migratorio

Como se mencionó anteriormente, el paso esencial para realizar experimentos de microarreglos es la integridad y por ende la concentración inicial de RNA. En esta tesis, la purificación del RNA de las diferentes muestras se realizó utilizando el método de "Trizol Reagent", obteniendo para todos los casos una razón de A260/280 del RNA mayor a 1.7. Sin embargo, debido a la baja cantidad de RNA obtenida de las diferentes muestras en cada ensayo de purificación por separado, fue necesario juntar muestras provenientes de 2 ó 3 purificaciones de células para obtener una muestra biológica de mRNA de cada población celular. A su vez, también se debió amplificar estas muestras mediante ensayos de transcripción reversa, para así contar con la cantidad necesaria de cDNA para la síntesis de sonda.

Se realizó dos experimentos de microarreglos en paralelo con dos set de muestras de RNA, a su vez cada una de ellas por triplicado. Esta etapa se realizó utilizando el servicio del NHGRI, de Bethesda, MD, EEUU, por lo que no comentaremos acerca de los detalles experimentales usados en la hibridación. El análisis de los resultados por su parte, se realizó utilizando los programas FileMaker y GeneSifter.

Para los análisis con el programa GeneSifter, se calculó el promedio de intensidad que emitió cada spot en los canales Cy5 y Cy3 para comparar ambas

condiciones, GFP+ y GFP-, y se utilizó el método del "fold change" usando un punto de corte ("threshold") de 2 para seleccionar los genes diferencialmente expresados. Este valor es el que habitualmente se utiliza en experimentos de hibridación en microarreglos y corresponde a un valor de alta confiabilidad estadística para detectar genes expresados diferencialmente (Aubert J. y col., 2004). Estos análisis arrojaron una lista de 2.075 oligos con expresión sobrerrepresentada en la muestra GFP+, que están presentes en ambos microarreglos (ver Anexo 1) .

Paralelamente, el análisis de los resultados con el programa FileMaker, arrojo una lista de 3.226 oligos sobreexpresados más de 2 veces en las células GFP+ vs. células GFP- en ambos experimentos. Esta lista se obtuvo sacando un promedio de la razón GFP+/GFP- de las 6 muestras hibridadas (3 de cada microarreglo) (Anexo 2).

Uno de los mayores obstáculos en el análisis de los resultados fue que aproximadamente un 60% de los oligonucleótidos sembrados en el microarreglo corresponden a genes no anotados (proviene de cDNAs o ESTs de diversas genotecas), por lo que no se pudo clasificar el 100% de los genes seleccionados según su función y/o posición en alguna vía de señalización. Sin embargo, producto de que existen errores en la anotación del genoma del pez cebra, es probable que muchos de los oligonucleótidos que aparecen como genes desconocidos en nuestros resultados, sean en realidad genes conocidos pero que aparecen sin ninguna clasificación o con otro número de acceso. Esta constatación puede verse desde otro punto de vista, sin embargo, ya que se han identificado numerosos genes de expresión específica de primordio migratorio que no han sido caracterizados y que, por lo tanto, representan nuevas avenidas de investigación futura.

6.1.3. Identificación de genes que se expresan en el primordio de la LLP

Luego de la obtención de los genes expresados específicamente en las células GFP+, se procedió a un análisis de ellos para seleccionar un grupo para su posterior estudio.

En primer lugar, se apuntó a validar los resultados de estos experimentos comparando la lista de datos obtenida de los experimentos de microarreglos con el conjunto de genes de expresión conocida en el primordio de la LLP presentes en las bases de datos NCBI y ZFIN.

Del conjunto de genes con expresión conocida en línea lateral, aproximadamente un 35% están presentes en la selección de genes que realizamos luego del experimento de microarreglos (Tabla 6). Esta es ciertamente una aproximación muy gruesa por dos razones. Primero, muchos de los genes descritos con expresión en línea lateral no se expresan en primordio sino que en otros componentes del sistema, como las neuronas que lo inervan y las células ciliadas. Segundo, muchos de los genes descritos bajo ese término se expresan en otros tejidos, por lo que en nuestro experimento pudieran no ser detectados (no presentan expresión diferencialmente más alta en primordio comparado con otros tipos celulares, como es el caso de Sox2, descrito más arriba).

Finalmente, aproximadamente un 30% de los genes de expresión conocida en el primordio no se encuentran en el chip de microarreglos utilizado. Si bien el microarreglo que se utilizó en esta tesis es el más completo que existe actualmente, ya que cuenta con el mayor número de secuencias de oligos de pez cebra, el chip fue construido en el año 2005, por lo que es posible que muchos de estos genes fueran descubiertos y/o anotados en las bases de datos después de la construcción del chip.

Estos resultados indican que no todos los genes expresados en el primordio de la LLP fueron identificados con nuestra metodología, ya que escapan a nuestra detección aquellos que presentan patrones "no exclusivos" de la LLP, aquellos de expresión ubicua y aquellos que no están presentes en el chip de microarreglo. Sin embargo, es nuestra opinión que todos los genes que no caen en estas excepciones sí fueron detectados y proponemos que la colección de genes compilados en las tablas de los Anexos 1 y 2 son una muy buena representación del transcriptoma del primordio de la LLP. Dado el diseño del experimento, es imposible obtener el total de genes expresados en el primordio migratorio; para ellos, debería recurrirse a otros tipos de recuperación de datos del transcriptoma, como el SAGE u otras técnicas similares (Velculescu VE. y col., 1995).

6.1.4. Análisis de expresión y de función del grupo de genes seleccionados

La elección de aquellos genes sobrerrepresentados en la muestra GFP+ que se examinarían en mayor detalle se realizó de manera arbitraria y guiado por el interés perseguido en este trabajo de aumentar nuestro conocimiento de los procesos involucrados en migración celular y en el desarrollo de este sistema sensorial. Seleccionamos en total 32 genes (tablas 9 y 10), conocidos por su participación en migración y adhesión celular en los sistemas hematopoiético e inmune y en cáncer, en neurogénesis, y en vías de señalización claves para la morfogénesis y el patterning, en base a la información otorgada por el programa GeneSifter. Incluimos en este grupo, algunos genes desconocidos, pero identificados en términos de homología de secuencias (detectados por BLAST) con genes anotados y que tuvieran un papel en los procesos previamente descritos.

La prueba final de confiabilidad del método fue ensayada a través de análisis de expresión mediante ensayos de hibridación *in situ* y con ensayos de PCR en tiempo real (Figuras 27 y 28).

Como se describió anteriormente, sólo 7 de los 32 genes seleccionados (*cd9l*, *f11r*, *irf5*, *squint*, *dkk1*, *cldn7* y el clon zgc:153928 (similar CD99 Type II)) mostraron expresión en el primordio de la LLP mediante análisis de hibridación *in situ* (Figura 27). De las restantes ribosondas probadas, no obtuvimos patrones de expresión claros por lo que no podemos confirmar ni descartar su expresión en el primordio de la LLP. La hibridación *in situ* es una técnica notoriamente difícil, que requiere una puesta a punto para cada sonda que se prueba por primera vez. Dado que realizamos este experimento en "batch", usando una equipo que usa condiciones estándares de hibridación, es muy probable que muchos de los genes no pudieran detectarse por requerir otras condiciones de temperatura, etc. Por otro lado, es posible que algunos genes presenten niveles levemente superiores en primordio vs. el resto de las células y que no fuera posible reconocer esta diferencia a nivel de hibridación *in situ*. Además, debe recordarse que se realizó un paso de amplificación para generar la sonda de microarreglos por lo que es posible que diferencias pequeñas fueran amplificadas. Finalmente, es posible que algunos de estos genes tengan expresión ubicua o en tejidos diferentes al primordio, y representarían el error introducido en el experimento. Sin embargo, recalcamos que el experimento de hibridación no es concluyente en este sentido y que, al menos, no arrojó ningún gen de expresión elevada en tejidos distintos al primordio migratorio de la LLP, por lo que debemos dejar sin cálculo el porcentaje de error en la metodología experimental.

Por otra parte, los análisis de PCR en tiempo real de un grupo de genes seleccionados al azar confirmaron, en la mayoría de los casos, los resultados

obtenidos de los microarreglos (Figura 28). Si bien estos experimentos avalaron la metodología empleada como una buena herramienta de descubrimiento de genes con expresión tejido-específica, en muchos de los casos, el cambio de nivel de expresión observado no concordó con el obtenido de los experimentos de microarreglos. Esto pudo deberse, al igual que en el caso anterior, a que en los ensayos de microarreglos hubo un paso previo de amplificación del mRNA, lo que pudo haber distorsionado en cierta medida los valores de intensidad obtenidos. Otra posible explicación es la influencia del contenido de CG que contiene cada secuencia específica, lo que no hace comparable en términos cuantitativos un experimento de microarreglos con uno de qPCR. Finalmente es posible que simplemente algunas sondas de cDNA quedaron mejor marcadas que otras con los respectivos fluoróforos generándose una distorsión en los valores de intensidad de fluorescencia comparado con el número real de transcritos presentes en las muestras.

6.2 Significancia de los resultados para el estudio de la migración celular y el desarrollo de la LLP

Durante el desarrollo de esta tesis han aparecido algunas publicaciones que validan y complementan de manera importante nuestros resultados. Es el caso del factor de crecimiento fibroblástico *fgf3*, el que es expresado por las células del primordio de la LLP y es fundamental para la organización interna, el patrón y la migración de éste (Lecaudey V. y col., 2008; Nechiporuk A. y Raible DW., 2008). Es interesante notar además, que otro grupo de investigación (T. Piotrowski, comunicación personal) encontró la expresión de *dkk1* en el primordio migratorio y han demostrado un rol importante de la vía Wnt en la organización de éste durante la migración.

Estos resultados, en conjunto con los descritos anteriormente, corroboran la confiabilidad de los datos arrojados por los microarreglos y confirman que mediante esta técnica es posible aislar genes nuevos de expresión específica en el primordio migratorio.

Nos interesó, sin embargo, seleccionar un pequeño grupo de genes que no se hubieran descrito previamente en el pez cebra para un análisis funcional. Estos ensayos se realizaron con 4 de los genes previamente seleccionados: *cd9l*, *f11r*, *dkk1* y *squint*. Efectuamos específicamente ensayos de pérdida de función génica utilizando morfolinós antisentido, una técnica muy utilizada para inhibir de manera específica la traducción de un gen en embriones de pez cebra.

La inyección de morfolinós para inhibir la traducción de los genes *cd9l* y *f11r* demostró que estos genes están involucrados en la organización interna de la estructura del primordio (Figura 29). Si bien, el proceso de migración celular del primordio como tal no es afectado, sí observamos que estas moléculas son indispensables para mantener la organización de las células que lo conforman. Estos resultados, en conjunto con los antecedentes que se tienen sobre el papel de estas proteínas durante los procesos de adhesión y migración celular durante la respuesta inmune (Sobocka MB. y col., 2000; Kobayashi H. y col., 2004; Barreiro O. y col., 2005; Sobocka MB. y col., 2005; Unternaehrer JJ. y col., 2006; Smith CW., 2008), sugieren un rol conservado de estas moléculas de adhesión en la comunicación e interacción celular necesaria tanto para la migración de las células durante la respuesta inmune en mamíferos, como para el desarrollo de la línea lateral posterior del pez cebra. Este resultado es similar al hallazgo previo que demostró un rol clave para los genes *cxcr4*, gen esencial en la migración de linfocitos y células dendríticas (Villablanca EJ., 2008) y *tacstd*, gen sobreexpresado en algunos cánceres en humanos, en el desarrollo de la

LLP del pez cebra (Villablanca EJ. y col., 2006).

En este estudio se incorporan dos nuevos genes que, siendo relevantes en los procesos de migración celular en otros sistemas como el sistema inmune o en patologías como el cáncer, se expresan en el primordio de la LLP y contribuyen a su desarrollo. Por lo tanto, comprobamos nuestra hipótesis en cuanto a que existe un paralelo molecular en la migración dirigida de células en diversos contextos.

Por otra parte, no observamos diferencias entre los embriones morfantes para *dkk1* y *squint* en comparación con embriones controles (datos no mostrados). Una posible explicación para estos resultados, es que la ausencia de *squint* puede ser rescatada por otro miembro de la familia de proteínas Nodal, como es el caso de Cyclops (Feldman B. y col., 1998), mientras que la ausencia de *dkk1* puede ser recuperada por otros inhibidores de la vía Wnt (Logan CY. y Nusse R., 2004; Niehrs C., 2006). Sin embargo, no encontramos este tipo de genes en nuestra colección de genes obtenida con el experimento de microarreglos, por lo que también es posible que la pérdida de función de estos dos genes no produzca un fenotipo evidente en la formación de la LLP.

A su vez, T. Piotrowski y col., (resultados no publicados; comunicación personal), quienes han detectado también la expresión de *dkk1* en el primordio de la LLP, no han reportado estos hallazgos producto de que no han podido confirmar la presencia de ningún ligando de la vía Wnt en el primordio. Cabe recalcar que dos ligandos de la vía Wnt (*wnt8a* y *wnt4*) fueron detectados en nuestro experimento de microarreglos. En futuros trabajos exploraremos la posibilidad de que estos ligandos participen en los procesos de migración, organización o diferenciación celular en el primordio de la LLP.

El análisis de expresión global de genes del primordio de la LLP realizado en

esta tesis, identificó genes de expresión conocida en el primordio migratorio y a su vez, permitió la identificación de nuevos genes sin expresión conocida en el primordio. Estos datos a su vez, serán un fuente de información para asistir a la comunidad científica en cuanto a la identificación de genes relevantes en el proceso de migración celular, como también en procesos de “patterning” y organización celular.

De esta manera, se comprobó que el sistema de la línea lateral posterior del pez cebra, es un buen sistema-modelo de estudio *in vivo* de genes involucrados en organización y migración celular, tales como genes de la vía de FGF, Wnt y quimioquinas.

Como proyección, este sistema se puede utilizar para estudiar inhibidores de la migración que pueden ser aplicados por ejemplo, en tratamientos anti-metastásicos. A su vez, este modelo puede ser de mucha utilidad para estudiar las bases moleculares de procesos fisiológicos, como la migración dirigida de las células durante la respuesta inmune; así como también de procesos patológicos, como la propagación tumoral, metástasis y en las posibles terapias para inhibir estas enfermedades.

6.3 Expresión y función de receptores de quimioquinas en el pez cebra

Como se mencionó en un principio, los receptores de quimioquinas juegan un papel fundamental en los procesos de migración celular en los organismos en una variedad de contextos.

A través de alineamientos múltiples y análisis filogenéticos identificamos 4 secuencias no descritas previamente y no anotadas en el genoma de *Danio*: *ccr7*, *ccr9*, *cxcr3* y un cuarto gen no descrito en mamíferos al cual denominamos *ccr-like*.

Los patrones de expresión de estos genes evaluados mediante análisis de

hibridación *in situ*, no mostraron expresión de ninguno de ellos en el primordio de la LLP. No obstante, detectamos expresión de estos genes en zonas donde ocurre hematopoyesis, fundamentalmente linfopoyesis, en el pez cebra.

Al igual que en mamíferos, *ccr9* y *ccr7*, moléculas esenciales en el desarrollo y función de los linfocitos T, se expresan en lugares donde ocurre linfopoyesis en el pez cebra (Figuras 32 y 33) sugiriendo que estos receptores están participando en el desarrollo de linaje linfocítico del pez cebra.

Los ensayos funcionales por su parte, mostraron que la inhibición de *ccr7* disminuye la expresión de los marcadores linfocíticos *rag1* (Figura 34) e *ikaros* (Figura 35) y no así de los marcadores mielocítico-eritrocítico *scl* y *c-myb* (datos no mostrados), demostrando que *ccr7* participa en la linfopoyesis en pez cebra.

En esta tesis, se clonaron 6,3Kb de la región genómica río-arriba del gen *ccr7*. El objetivo fue obtener los elementos regulatorios que podrían dirigir la expresión de un gen reportero (EGFP) a las regiones donde ocurre linfopoyesis en el pez cebra. La generación del constructo *ccr7-egfp* se realizó utilizando el sistema Tol2, vector basado en un transposón de peces (Kawakami K. y Noda T., 2004).

La inyección de este constructo demostró que los 6,3Kb de región promotora contienen los elementos cis-regulatorios necesarios para dirigir la expresión de EGFP en un pequeño número de células circulantes en el estadio de 30 hpf (Figura 36). Sin embargo, no podemos confirmar que estas células sean efectivamente precursores de linfocitos T o de algún otro tipo celular del sistema inmune, aunque sí podemos decir que este sistema, es un potencial modelo para el estudio de la respuesta inmune en el pez cebra.

No obstante, estos resultados, en conjunto con los análisis de hibridación *in situ* y los ensayos funcionales utilizando morfolidos antisentido, sugieren que células

precursoras de linfocitos T expresan *ccr7* en la fase inicial de la hematopoiesis definitiva del pez cebra.

Como objetivo futuro posterior a este estudio, se pretende obtener un modelo de estudio *in vivo*, para estudiar el desarrollo de los linfocitos T y su posterior función en la respuesta inmune del pez cebra con todos los procesos que conlleva.

VII. CONCLUSIONES

1. Se implementó una metodología de purificación de células de embriones de pez cebra mediante el uso de líneas transgénicas y ensayos de FACS.
2. Se generó una librería específica de cDNAs de células del primordio de la LLP.
3. Mediante un análisis global utilizando microarreglos, se identificó un grupo de nuevos genes que se expresan en el primordio de la LLP.
4. Se identificó nuevos genes que participan en la organización del primordio migratorio de la LLP.
5. Los análisis filogenéticos demostraron que los receptores de quimioquinas CCR7 y CCR9 del pez cebra, se encuentran conservados a través de la evolución y que posiblemente se expresen en subpoblaciones linfoides en el pez cebra.
6. La expresión de *ccr7* en las regiones AGM y CHT; y la disminución de la expresión de *rag1* en el timo y del marcador linfoide *ikaros* en las regiones AGM y CHT en embriones morfantes para este gen, sugiere que *ccr7* participa en el desarrollo de linaje linfoide del pez cebra.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Affolter M., Weijer CJ. 2005. Signaling to cytoskeletal dynamics during chemotaxis. *Dev Cell*. 9(1):19-34.

Aitman T. 2001. DNA microarrays in medical practice. *BMJ*. 323:611-615.

Allende ML., Villablanca EJ. 2008. Método *in vivo* para la selección a gran escala de moléculas con potencial terapéutico en enfermedades asociadas a cualquier evento subcelular o extracelular relacionado con migración celular. Presentación en Ministerio de Economía, Junio 2008.

Amatruda JF., Zon LI. 1999. Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish. *Dev Biol*. 216(1):1-15.

Amatruda JF., Shepard JL., Stern HM., Zon LI. 2002. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell*. 1(3):229-231.

Aubert J., Bar-Hen A., Daudin JJ., Robin, S. 2004. Determination of the differentially expressed genes in microarray experiments using local FDR. *BMC Bioinformatics*. 5(125):1-9.

Bahary N., Zon LI. 1998. Use of the zebrafish (*Danio rerio*) to define hematopoiesis. *Stem Cells* 16(2):89-98.

Barreiro O., Yáñez-Mó M., Sala-Valdés M., Gutiérrez-López MD., Ovalle S., Higginbottom A., Monk PN., Cabañas C., Sánchez-Madrid F. 2005. Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood* 105:2852-2861.

Berghmans S., Jette C., Langenau D., Hsu K., Stewart R., Look T., Kanki JP. 2005. Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *Biotechniques*

39(2):227-237.

Berman JN., Kanki JP., Look AT. 2005. Zebrafish as a model for myelopoiesis during embryogenesis. *Exp Hematol.* (9):997-1006.

Bertrand JY., Kim AD., Violette EP., Stachura DL., Cisson JL., Traver D. 2007. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Development* 134:4147-4156.

Bertrand JY., Kim AD., Teng S., Traver D. 2008. CD41+ cmyb+ precursors colonize the zebrafish pronephros by a novel migration route to initiate adult hematopoiesis. *Development* 135:1853-1862.

Bier FF., von Nickisch-Rosenegk M., Ehrentreich-Förster E., Reiß E., Henkel J., Strehlow R., Andresen D. 2008. DNA Microarrays. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 109:433-453.

Boehm T., Bleul CC., Schorpp M. 2003. Genetic dissection of thymus development in mouse and zebrafish. *Immunol Rev.* 195:15-27.

Borisy GG., Svitkina TM. 2000. Actin machinery: pushing the envelope *Curr Opin Cell Biol.* 12,104-112.

Brösamle C., Halpern ME. 2002. Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia* 39(1):47-57.

Broxmeyer HE. 2008. Chemokines in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 15:49-58.

Burns CE., Traver D., Mayhall E., Shepard JL., Zon LI. 2005. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes & Dev.* 19:2331-2342.

Burns CE., Zon LI. 2006. Homing sweet homing: odyssey of hematopoietic stem cells. *Immunity* 25(6):859-862.

Busillo JM., Benovic JL. 2007. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1768(4):952-963.

Carradice D., Lieschke GJ. 2008. Zebrafish in hematology: sushi or science?. *Blood* 111(7):3331-3342.

Chiu L., Cunningham L., Raible DW., Rubel E., Ou H. 2008. Using the Zebrafish Lateral Line to Screen for Ototoxicity. *JARO*. 9:178–190.

Chung CY., Funamoto S., Firtel RA. 2001. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem. Sci.* 26:557–566

Collazo A., Fraser SE., Mabee PM. 1994. A dual embryonic origin for vertebrate mechanoreceptors. *Science* 264(5157):426-430.

Condeelis, J., Segall, J.E. 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat. Rev. Cancer* 3:921-930.

Covassin L., Amigo JD., Suzuki K., Teplyuk V., Straubhaar J., Lawson ND. 2006. Global analysis of hematopoietic and vascular endothelial gene expression by tissue specific microarray profiling in zebrafish. *Dev Biol*. 299(2):551-562.

Dambly-Chaudière C., Sapède D., Soubiran F., Decorde K., Gompel N., Ghysen A. 2003. The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates. *Biol Cell*. 95:579-587.

Dambly-Chaudière C., Cubedo N., Ghysen A. 2007. Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev Biol*. 7:1-14.

Danilova N., Hohman VS., Kim EH., Steiner LA. 2000. Immunoglobulin variable-region diversity in the zebrafish. *Immunogenetics*. 52(1-2):81-91.

Danilova N., Steiner LA. 2002. B cells develop in the zebrafish pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(21):13711-13716.

David NB., Sapède D., Saint-Etienne L., Thisse C., Thisse B., Dambly-Chaudière C., Rosa FM., Ghysen A. 2002. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(25):16297-16302.

de Jong JL., Zon LI. 2005. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annu Rev Genet.* 39:481-501.

Doitsidou M., Reichman-Fried M., Stebler J., Köprunner M., Dörries J., Meyer D., Esguerra CV., Leung T., Raz E. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111(5):647-59.

Douglas SE. 2006. Microarray Studies of Gene Expression in Fish. *OMICS* 10(4):474-489.

Ekker SC. 2000. Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast* 17(4):302-306.

Esche C., Stellato C., Beck LA. 2005. Chemokines: Key Players in Innate and Adaptive Immunity. *J Invest Dermatol.* 125:615– 628.

Even-Ram S., Yamada K.M. 2005. Cell migration in 3D matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 17:524-532.

Feitsma H., Cuppen E. 2008. Zebrafish as a cancer model. *Mol Cancer Res.* 6(5):685-94.

Feldman B., Gates MA., Egan ES., Dougan ST., Rennebeck G., Sirotkin HI., Schier AF., Talbot WS. 1998. Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* 395:181-185.

Franz CM., Jones GE., Ridley AJ. 2002. Cell migration in development and disease. *Dev Cell.* 2(2):153-158.

Friedl P., Brocker EB. 2000. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 57:41-64.

Friedl P., Hegerfeldt Y., Tusch M. 2004. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol.* 48(5-6):441-449.

Gerhard GS. 2007. Small laboratory fish as models for aging research. *Ageing Res Rev.* 6(1):64-72.

Gilmour D., Maischein HM., Nüsslein-Volhard C. 2002. Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* 34(4):577-588.

Gilmour D., Knaut H., Maischein HM., Nüsslein-Volhard C. 2004. Towing of sensory axons by their migrating target cells in vivo. *Nat Neurosci.* 7(5):491-492.

Ghysen A., Dambly-Chaudière C. 2004. Development of the zebrafish lateral line. *Curr Opin Neurobiol.* 14(1):67-73.

Ghysen A., Dambly-Chaudière C. 2007. The lateral line microcosmos. *Genes & Dev.* 21:2118-2130.

Goessling W., North TE., Zon LI. 2007. New waves of discovery: modeling cancer in zebrafish. *J Clin Oncol.* 25(17):2473-2479.

Goodrich LV. 2005. Hear, hear for the zebrafish. *Neuron* 45(1):3-5.

Grabher C., Cliffe A., Miura K., Hayflick J., Pepperkok R., Rørth P., Wittbrodt J. 2007. Birth and life of tissue macrophages and their migration in embryogenesis and inflammation in medaka. *J. Leukoc. Biol.* 81:263-271.

Grinnell F., Ho CH., Tamariz E., Lee DJ., Skuta G. 2003. Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Mol. Biol. Cell* 14:384-395.

Gunzer M. 2007. Migration, cell-cell interaction and adhesion in the immune system. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 3:97-137.

Haas P., Gilmour D. 2006. Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev Cell.* 10(5):673-680.

Haines L., Neyt C., Gautier P., Keenan DG., Bryson-Richardson RJ., Hollway GE., Cole NJ., Currie PD. 2004. Met and Hgf signaling controls hypaxial muscle and lateral line development in the zebrafish. *Development* 131(19):4857-4869.

Haire RN., Rast JP., Litman RT., Litman GW. 2000. Characterization of three isotypes of immunoglobulin light chains and T-cell antigen receptor alpha in zebrafish. *Immunogenetics* 51(11):915-923.

Hall C., Flores MV., Storm T, Crosier K., Crosier P. 2007. The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC Dev Biol.* 7:42

Hansen JD., Zapata AG. 1998. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunol Rev.* 166:199-220.

Heideman W., Antkiewicz DS., Carney SA., Peterson RE. 2005. Zebrafish and cardiac toxicology. *Cardiovasc Toxicol.* 5(2):203-214.

Henrickson SE., Mempel TR., Mazo IB., Liu B., Artyomov MN., Zheng H., Peixoto A., Flynn M., Senman B., Junt T., Wong HC., Chakraborty AK., von Andrian UH. 2008. In vivo imaging of T cell priming. *Sci Signal.* 1(12):pt2.

Hernandez PP., Olivari FA., Sarrazin AF., Sandoval PC., Allende ML. 2007. Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker *sox2* and proliferation-dependent and-independent mechanisms of hair cell

renewal. *Dev Neurobiol.* 67(5):637-654.

Hsu K., Traver D., Kutok JL., Hagen A., Liu TX., Paw BH., Rhodes J., Berman JN., Zon LI., Kanki JP., Look AT. 2004. The pu.1 promoter drives myeloid gene expression in zebrafish. *Blood* 104(5):1291-1297.

Iijima M., Huang YE., Devreotes P. 2002. Temporal and spatial regulation of chemotaxis. *Dev. Cell* 3:469-478

Itoh M., Chitnis AB. 2001. Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts. *Mech Dev.* 102(1-2):263-266.

Jagadeeswaran P. 2005. Zebrafish: a tool to study hemostasis and thrombosis. *Curr Opin Hematol.* 12(2):149-152.

Johansson-Lindbom B., Agace WW. 2007. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol Rev.* 215:226-242.

Kawakami K., Noda T. 2004. Transposition of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells. *Genetics* 166(2):895-899.

Keller ET., Murtha JM. "The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2004 Jul; 138(3):335-341.

Kerstetter AE., Azodi E., Marrs JA., Liu Q. 2004. Cadherin-2 function in the cranial ganglia and lateral line system of developing zebrafish. *Dev Dyn.* 230(1):137-143.

Kishi S., Uchiyama J., Baughman AM., Goto T., Lin MC., Tsai SB. 2003. The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. *Exp Gerontol.* 38(7):777-786.

Kobayashi H., Hosono O., Iwata S., Kawasaki H., Kuwana M., Tanaka H., Dang NH., Morimoto C. 2004. The tetraspanin CD9 is preferentially expressed on the human CD4(+) CD45RA+ naive T cell population and is involved in T cell activation. *Clin Exp Immunol.* 137:101–108.

Koizumi K., Hojo S., Akashi T., Yasumoto K., Saiki I. 2007. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci.* 98(11):1652–1658.

Kollmar R., Nakamura SK., Kappler JA., Hudspeth AJ. 2001. Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18):10196-10201.

Kunwar PS., Siekhaus DE., Lehmann R. 2006. In vivo migration: a germ cell perspective. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:237-265.

Kwan KM., Fujimoto E., Grabher C., Mangum BD., Hardy ME., Campbell DS., Parant JM., Yost HJ., Kanki JP., Chien CB. 2007. The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev Dyn.* 236(11):3088-3099.

Laguerre L., Soubiran F., Ghysen A., König N., Dambly-Chaudière C. 2005. Cell proliferation in the developing lateral line system of zebrafish embryos. *Dev Dyn.* 233(2):466-472.

Lam SH., Chua HL., Gong Z., Lam TJ., Sin YM. 2004. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev Comp Immunol.* 28:9–28.

Langenau DM., Traver D., Ferrando AA., Kutok JL., Aster JC., Kanki JP., Lin S., Prochownik E., Trede NS., Zon LI., Look AT. 2003. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science* 299(5608):887-890.

Langenau DM., Ferrando AA., Traver D., Kutok JL., Hezel JP., Kanki JP., Zon LI., Look

TA., Trede NS. 2004. In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(19):7369–7374.

Langenau DM., Zon LI. 2005. The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development. *Nat Rev Immunol.* 5(4):307-317.

Lawson ND., Weinstein BM. 2002. In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. *Dev Biol.* 248:307–318.

Lecaudey V., Cakan-Akdogan G., Norton WH., Gilmour D. 2008. Dynamic Fgf signaling couples morphogenesis and migration in the zebrafish lateral line primordium. *Development* 135(16):2695-2705.

Levraud JP., Colucci-Guyon E., Redd MJ., Lutfalla G., Herbomel P. 2008. In vivo analysis of zebrafish innate immunity. *Methods Mol Biol.* 415:337-363.

Lin HF., Traver D., Zhu H., Dooley K., Paw BH., Zon LI., Handin RI. 2005. Analysis of thrombocyte development in CD41-GFP transgenic zebrafish. *Blood* 106:3803-3810.

Li Q., Shirabe K., Kuwada JY. 2004. Chemokine signaling regulates sensory cell migration in zebrafish. *Dev Biol.* 269(1):123-136.

Logan CY., Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:781-810.

Long Q., Meng A., Wang H., Jessen JR., Farrell MJ., Lin S. 1997. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development* 124(20):4105-4111.

López-Schier H., Starr CJ., Kappler JA., Kollmar R., Hudspeth AJ. 2004. Directional cell migration establishes the axes of planar polarity in the posterior lateral-line organ of the zebrafish. *Dev Cell.* 7(3):401-412.

Lou O., Alcalde P., Luscinskas FW., Muller WA. 2007. CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *J. Immunol.* 178(2):1136-1143.

Lu M., Grove EA., Miller RJ. 2002. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(10):7090-7095.

Sapède D. 2003. Zebrafish, a model for migration of cancer cells?. *Med Sci (Paris)*. 19(8-9):780-782.

Mathavan S., Lee SG., Mak A., Miller LD., Murthy KR., Govindarajan KR., Tong Y., Wu YL., Lam SH., Yang H., Ruan Y., Korzh V., Gong Z., Liu ET., Lufkin T. 2005. Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays. *PLoS Genetics* 1(2):260:276.

Metcalfe WK. 1985. Sensory neuron growth cones comigrate with posterior lateral line primordial cells in zebrafish. *J Comp Neurol.* 238(2):218-224.

Mine N., Iwamoto R., Mekada E. 2005. HB-EGF promotes epithelial cell migration in eyelid development. *Development* 132(19):4317-4326.

Montero JA., Heisenberg CP. 2004. Gastrulation dynamics: cells move into focus. *Trends Cell Biol.* 14(11):620-627.

Murayama E., Kissa K., Zapata A., Mordélet E., Briolat V., Lin HF., Handin RI., Herbomel P. 2006. Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development. *Immunity* 25:963-975.

Nechiporuk A., Raible DW. 2008. FGF-dependent mechanosensory organ patterning in zebrafish. *Science* 320(5884):1774-1777.

Niehrs C. 2006. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25(57):7469-7481.

Norrby K. 2006. In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 10(3):588-612.

North TE., Zon LI. 2003. Modeling human hematopoietic and cardiovascular diseases in zebrafish. *Dev Dyn.* 228(3):568-583.

Paun A., Pitha PM. 2007. The IRF family, revisited. *Biochimie* 89:774-753.

Parinov S., Kondrichin I., Korzh V., Emelyanov A. 2004. Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Dev Dyn.* 231(2):449-459.

Peatman E., Liu Z. 2007. Evolution of CC chemokines in teleost fish: a case study in gene duplication and implications for immune diversity. *Immunogenetics* 59(8):613-623.

Pribila JT., Quale AC., Mueller KL., Shimizu Y. 2004. Integrins and T cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 22:157-180.

Pollard TD., Borisy GG. 2003 Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453-465.

Qian F., Zhen F, Xu J., Huang M., Li W., Wen Z. 2007. Distinct functions for different scl isoforms in zebrafish primitive and definitive hematopoiesis. *PLoS Biol.* 5(5):e132.

Raman D., Baugher PJ., Thu YM., Richmond A. 2007. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett.* 256(2):137-165.

Ratajczak MZ., Zuba-Surma E., Kucia M., Reza R., Wojakowski W., Ratajczak J. 2006. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* 20(11):1915-1924.

Raz E., Reichman-Fried M. 2006. Attraction rules: germ cell migration in zebrafish. *Curr Opin Genet Dev.* 16:355-359.

Reymond MA., Schlegel W. 2007. Proteomics in cancer. *Adv Clin Chem.* 44:103-42.

Ridley AJ., Schwartz MA., Burridge K., Firtel RA., Ginsberg MH., Borisy G., Parsons JT., Horwitz AR. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302(5651):1704-1709.

Rosenkilde MM., Schwartz TW. 2004. The chemokine system a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS.* 112(7-8):481-495.

Sahai E., Marshall CJ. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis *Nat. Cell Biol.* 5:711-719.

Sallusto F., Lanzavecchia A. 2000. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev.* 177: 134–140.

Santos F., MacDonald G., Rubel EW., Raible DW. 2006. Lateral line hair cell maturation is a determinant of aminoglycoside susceptibility in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res.* 213(1-2):25-33.

Sapède D. 2003. Zebrafish, a model for migration of cancer cells?. *Med Sci (Paris).* 19(8-9):780-782.

Sarrazin AF., Villablanca EJ., Nuñez VA., Sandoval PC., Ghysen A., Allende ML. 2006. Proneural gene requirement for hair cell differentiation in the zebrafish lateral line. *Dev Biol.* 295(2):534-545

Schaerli P., Moser B. 2005. Chemokines control of primary and memory T-cell traffic. *Immunol Res.* 31(1):57–74.

Schenkel A., Dufour EM., Chew TW., Sorg E., Muller WA. 2007. The murine CD99-related molecule CD99-Like2 (CD99L2) is an adhesion molecule involved in the

inflammatory response 1. *Cell Commun Adhes.* 14(5):227–237.

Schier AF. 2003. Chemokine signaling: rules of attraction. *Curr Biol.* 13(5):R192-194.

Schorpp M., Bialecki M., Diekhoff D., Walderich B., Odenthal J., Maischein HM., Zapata AG. 2006. Conserved junctions of ikaros in vertebrate lymphocyte development: genetic evidence for distinct larval and adult phases of T cell development and two lineages of B cells in zebrafish. *J Immunol.* 177: 2463–2476.

Smith CW. 2008. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 121(2 Suppl):S375-S379.

Sobočka MB., Sobocki T., Banerjee P., Weiss C., Rushbrook JI., Norin AJ., Hartwig J., Salifu MO., Markell MS., Babinska A., Ehrlich YH., Kornecki E. 2000. Cloning of the human platelet F11 receptor: a cell adhesion molecule member of the immunoglobulin superfamily involved in platelet aggregation. *Blood* 95: 2600-2609.

Sobočka MB., Sobocki T., Babinska A., Hartwig JH. Li M., Ehrlich YH., Kornecki E. 2004. Signaling pathways of the F11 receptor (F11R; a.k.a. JAM-1, JAM-A) in human platelets: F11R dimerization, phosphorylation and complex formation with the integrin GPIIIa. *J Recept Signal Transduct Res.* 24(1-2):85–105.

Stern HM., Zon LI. 2003. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish". *Nat Rev Cancer* 3(7):533-539.

Sullivan C., Kim CH. 2008. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish Shellfish Immunol.* (Epub ahead of print).

Sun G. 2007. Application of DNA microarrays in the study of human obesity and type 2 diabetes. *OMICS.* 11(1):25-40.

Thisse C., Zon LI. 2002. Organogenesis—heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science* 295(5554):457-462.

Thisse C., Thisse B. 2008. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc.* 3(1):59-69.

Thompson MA., Ransom DG., Pratt SJ., MacLennan H., Kieran MW., Detrich HW., Vail B., Huber TL., Paw B., Brownlie AJ., Oates AC., Fritz A., Gates MA., Amores A., Bahary N., Talbot WS., Her H., Beier DR., Postlethwait JH., Zon LI. 1998. The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol.* 197(2):248-269.

Tiveron MC., Cremer H. 2008. CXCL12/CXCR4 signalling in neuronal cell migration. *Curr Opin Neurobiol.* (Epub ahead of print).

Tomasiewicz HG., Flaherty DB., Soria JP., Wood JG.. 2002. Transgenic zebrafish model of neurodegeneration. *J Neurosci Res.* 70(6):734-745.

Ton C., Stamatidou D., Dzau VJ., Liew CC. 2002. Construction of a zebrafish cDNA microarray: gene expression profiling of the zebrafish during development. *Biochem Biophys Res Commun* 296:1134–1142.

Tran PB., Miller RJ. Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci* 4:444-455.

Traver D., Herbomel P., Patton EE., Murphey RD., Yoder JA., Litman GW., Catic A., Amemiya CT., Zon LI., Trede NS. 2003. The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. *Adv Immunol.* 81:253-330.

Traver D., Paw BH., Poss KD., Penberthy WT., Lin S., Zon LI. 2003. Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nat. Immunol.* 4:1238–1246.

Trede NS., Langenau DM., Traver D., Look AT., Zon LI. 2004. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* 20(4):367-379.

Trede NS., Zapata A., Zon LI. 2001. Fishing for lymphoid genes. *Trends Immunol.* 22(6):302-307.

Unternaehrer JJ., Chow A., Pypaert M., Inaba K., Mellman I. 2007. The tetraspanin CD9 mediates lateral association of MHC class II molecules on the dendritic cell surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(1):234 –239.

Valentin G., Haas P., Gilmour D. 2007. The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Curr Biol.* 17(12):1026-1031.

Van Haastert PJ., Devreotes PN. 2004. Chemotaxis: signaling the way forward. *Nat. Rev Mol Cell Biol.* 5:626–634.

Velculescu VE., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler, K.W. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science.* 270:484-487.

Villablanca EJ., Renucci A., Sapède D., Lec V., Soubiran F., Sandoval PC., Dambly-Chaudière C., Ghysen A., Allende ML. 2006. Control of cell migration in the zebrafish lateral line: implication of the gene "tumour-associated calcium signal transducer," *tacstd.* *Dev Dyn.* 235(6):1578-1588.

Villablanca EJ., Pistocchi A., Court FA., Cotelli F., Bordignon C., Allende ML., Traversari C., Russo V. 2007. Abrogation of prostaglandin E2/EP4 signaling impairs the development of rag1+ lymphoid precursors in the thymus of zebrafish embryos. *J Immunol.* 2007 179(1):357-64.

Villablanca EJ., Russo V., Mora JR. Dendritic cell migration and lymphocyte homing imprinting. *Histol Histopathol.* 23(7):897-910.

Villablanca EJ., Zhou D., Valentinis B., Negro A., Raccosta L., Mauri L., Prinetti A., Sonnino S., Bordignon C., Traversari C., Russo V. 2008. Selected natural and synthetic retinoids impair CCR7- and CXCR4-dependent cell migration in vitro and in vivo. *J*

Leukoc Biol. 84(3):871-879.

Villefranc JA., Amigo J., Lawson ND. 2007. Gateway compatible vectors for analysis of gene function in the zebrafish. *Dev Dyn.* 236(11):3077-3087.

Virtanen C., Woodgett J. 2008. Clinical uses of microarrays in cancer research. *Methods Mol Med.* 141:87-113.

Vlacich G., Roe C., Webb GC. 2007. Technology insight: microarrays--research and clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 3(8):594-605.

Voduc D., Kenney C., Nielsen TO. 2008. Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol.* 18(2):89-97.

Webb DJ., Zhang H., Horwitz AF. 2005. Cell migration: an overview. *Methods Mol Biol.* 294:3-11.

Weber GJ., Choe SE., Dooley KA., Paffett-Lugassy NN., Zhou Y., Zon LI. 2005. Mutant-specific gene programs in the zebrafish. *Blood* 106(2):521-530.

Westerfield M. 1994. *The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (Danio rerio)*. 1994. 2.1 ed. Eugene, OR: University of Oregon Press.

Willett CE., Zapata AG., Hopkins N., Steiner LA. 1997. Expression of zebrafish rag genes during early development identifies the thymus. *Dev Biol.* 182:331-341.

Willett CE., Kawasaki H., Amemiya CT., Lin S., Steiner LA. 2001. Ikaros expression as a marker for lymphoid progenitors during zebrafish development. *Dev Dyn.* 222:694-698.

Witt CM., Raychaudhuri S., Schaefer B., Chakraborty AK., Robey, EA. 2005. Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol.* 3(6):e160.

Wolf K., Wu YI., Liu Y., Geiger J., Tam E., Overall C., Stack MS., Friedl P. 2007. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* 9(8):893-904.

Yang Z., Jiang H., Zhao F., Shankar DB., Sakamoto KM., Zhang MQ., Lin S. 2007. A highly conserved regulatory element controls hematopoietic expression of GATA-2 in zebrafish. *BMC Dev Biol.* 7:97.

Yoder JA., Nielsen ME., Amemiya CT., Litman GW. 2002. Zebrafish as an immunological model system. *Microbes Infect.* 4(14):1469-1478.

Zhang XY., Rodaway AR. 2007. SCL-GFP transgenic zebrafish: In vivo imaging of blood and endothelial development and identification of the initial site of definitive hematopoiesis. *Dev. Biol.* 307(2):179-194.

Zhu H., Traver D., Davidson AJ., Dibiase A., Thisse C., Thisse B., Nimer S., Zon LI. 2005. Regulation of the *lmo2* promoter during hematopoietic and vascular development in zebrafish. *Dev Biol.* 281(2):256-269.

Zlotnik A. 2008. New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J Pathol.* 215(3):211-213.

Zlotnik A., Yoshie O., Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 7(12):243.

Zou YR., Kottmann AH., Kuroda M., Taniuchi I., Littman DR. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393(6685):595-599.

IX. ANEXOS

- Anexo 1 Lista de oligos diferencialmente expresados en la muestra GFP+, de acuerdo a el programa GeneSifter (CD Adjunto)
- Anexo 2 Lista de oligos diferencialmente expresados en la muestra GFP+, de acuerdo al programa FileMaker (CD Adjunto)

FINANCIAMIENTO

- Beca Conicyt de Estudios de Doctorado
- Núcleo Milenio CGC (Center for Genomics of the Cell), Proyecto P06-039F
- Proyectos FONDECYT 1031003 y 1070867
- Beca Conicyt de Apoyo a Realización de Tesis Doctoral
- Beca MECESUP para Estadías Cortas en el Extranjero
- Beca VAA Departamento de Postgrado y Postítulo de la U. de Chile para Estadías Cortas en el Extranjero