



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS NADPH
OXIDASAS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO DEL PEZ
CEBRA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

L. en C. Francisco Javier Mendez Cruz

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Salas Vidal
Instituto de Biotecnología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Martin Gustavo Pedraza Alva
Instituto de Biotecnología UNAM
Dr. Luis Cardenas Torres
Instituto de Biotecnología UNAM

Ciudad de México. Mayo, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo de las siguientes instituciones, unidades, laboratorios, colaboradores y técnicos.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Biotecnología UNAM.

CONACyT, Numero de beca 623117

Laboratorio 15, Instituto de Biotecnología UNAM.

Dra. Hilda Lomeli Buyoli, Dr. Mario Adán Mendiera Serrano, Dra. Denhi Schnabel Peraza, M en C. Dulce I. Benitez Pacheco y a la M. en C. Laura S. Ramirez ángeles

Unidad de Docencia y Formación de Recursos Humanos, Instituto de Biotecnología UNAM. Gloria Villa Herrera, Lic. Jose Antonio Bolaños Guillen, Ing. Jalil Saab.

Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Este trabajo de investigación fue financiado por PAPIIT-UNAM IN210316

Dedicado

A mi hija Natalia y a mi esposa Rosario, que son lo que más quiero en la vida, mi inspiración y mis ganas de seguir superándome.

A mi madre Margarita Cruz Galindo, por su amor incondicional.

A mis hermanos Ricardo y Nicolás, porque siempre me han acompañado y apoyado.

A mi familia y a mis amigos.

Agradecimientos

A mi tutor Enrique Salas por todas sus enseñanzas, paciencia y apoyo, por preocuparse por mí y por enseñarme a que puedo llegar tan lejos como me lo proponga.

A Mario Mendieta, mi segundo tutor, por su amistad y sus consejos, que me ayudaron a crecer en lo personal y académicamente.

A la Dra. Hilda Lomeli por permitirme trabajar en su laboratorio, en el cual tuve todas las facilidades para sacar adelante este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio de los cuales he aprendido mucho.

A los Doctores Gustavo Pedraza y Luis Cardenas, que con sus comentarios e ideas en cada evaluación, ayudaron a enriquecer este trabajo.

A mi jurado, los Dres. Carmen Quinto, Susana Castro, Mario Zurita, Fernando Lopez y Takuya Nishigaky, por su tiempo y sus comentarios los cuales enriquecieron mi tesis.

INDICE

Lista de Figuras.....	1
Abreviaturas.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Migración celular durante el desarrollo embrionario.....	5
1.2 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	7
1.3 NADPH oxidasas.....	8
1.4 El pez cebra como modelo de estudio.....	11
1.5 Proceso de epibolia en pez cebra.....	12
HIPÓTESIS GENERAL.....	16
OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Animales.....	18
3.2 Cultivo de embriones de pez cebra.....	18
3.3 Clasificación de los embriones de pez cebra.....	18
3.4 Análisis de los efectos de la inhibición de la actividad de NADPH oxidasas en la migración celular durante la epibolia.....	18
3.4.1 Tratamiento con el inhibidor farmacológico de NADPH Oxidasas, VAS2870.....	18
3.4.2 Tratamiento con el inhibidor VAS2870 y H ₂ O ₂	20
3.4.3 Microinyección de oligonucleótidos antisentido tipo Morfolino.....	22
3.4.4 Validación de los morfolinos Duox1 y p22.....	23
3.4.5 Tratamiento con H ₂ O ₂ de embriones coinyectados con los Morfolinos p22 y Duox.....	23
3.5 Microscopia de fluorescencia convencional.....	23
3.6 Análisis de imágenes.....	24
3.7 Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS.....	25
4.1 VAS2870 afecta el proceso de epibolia en pez cebra.....	25
4.2 Tratamiento simultáneo de VAS2870 y H ₂ O ₂	28
4.3 Tratamiento desfasado de VAS2870 y H ₂ O ₂	32
4.3 Inyección de morfolinos.....	34

4.3.1 Inyección del morfolino p22	34
4.3.2 Inyección del Morfolino Duox1	35
4.3.3 Coinyección del MO p22/Duox1.....	36
4.4 Análisis del efecto de la incubación en medio con H ₂ O ₂ de embriones inyectados con los morfolidos p22 y Duox1.	37
4.5 Validación de la efectividad de los morfolidos p22 y Duox1.	40
DISCUSIÓN	42
5.1 La inhibición farmacológica de Nox retrasa la migración por epibolia	42
5.2 El tratamiento continuo con peróxido de hidrógeno rescata los efectos provocados por el inhibidor VAS2870.....	42
5.3 El tratamiento con peróxido de hidrógeno posterior al tratamiento con el inhibidor VAS2870 rescataron la migración durante la epibolia.	44
5.4 El peróxido de hidrógeno no rescató los efectos provocados por la inyección del doble morfolido de p22 y Duox.....	45
5.5 Validación de la eficiencia de los morfolidos	46
CONCLUSIONES	49
PERSPECTIVAS	50
REFERENCIAS	51

Lista de Figuras

Figura 1. NADPH Oxidasas presentes en el pez cebra.

Figura 2. Esquema del inicio y progresión de la epibolia.

Figura 3. Patrón de localización de la señal de DCF durante el proceso de epibolia.

Figura 4. Esquema representativo del tratamiento con el inhibidor VAS2870.

Figura 5. Estructura química del inhibidor VAS2870.

Figura 6. Tratamiento con el inhibidor VAS2870 y H₂O₂.

Figura 7. Análisis del efecto del tratamiento con VAS2870 en la epibolia.

Figura 8. Análisis del efecto de los tratamientos continuos de VAS2870 y H₂O₂ en etapa de esfera.

Figura 9. Análisis del efecto de los tratamientos continuo y simultáneo de VAS2870 y H₂O₂ en etapa de 50% de epibolia.

Figura 10. Tratamiento desfasado con el inhibidor VAS2870 y H₂O₂.

Figura 11. Inyección del MO p22.

Figura 12. Inyección del MO Duox1.

Figura 13. Coinyección del MO p22 y Duox1.

Figura 14. Análisis del efecto de la inyección del MO p22/Duox y el tratamiento con H₂O₂.

Figura 15. Reacción de PCR para validar los morfolinos p22 y Duox.

Figura 16. Esquema de la reacción con VAS2870 y peróxido de hidrógeno.

Figura 17. Validación de los morfolinos de Duox1 y p22 por PCR.

Abreviaturas

ADN, ácido desoxirribonucleico

ARN, ácido ribonucleico

ATP, adenosin trifosfato

BMP, proteína morfogénica ósea

DCF, diclorofluoreseina

DMSO, dimetilsulfóxido

dpf, días posteriores a la fertilización

ERO, especies reactivas de oxígeno

FAD, flavin adenin dinucleótido

FGF, factor de crecimiento fibroblástico

PFA, paraformaldehído

mM, milimolar

MO, morfolino

NADH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

MO Std Ctrl, Morfolino estándar control

VEGF, factor de crecimiento endotelial vascula

μM, micromolar

RESUMEN

La familia de enzimas NADPH Oxidasas cataliza la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO), superóxido y/o peróxido de hidrógeno. Las ERO son moléculas señalizadoras importantes involucradas en la regulación de los diferentes comportamientos celulares como la migración celular. En el pez cebra se han encontrado cinco genes, nox1, nox2, nox4, nox5 y duox1, de los cuales se ha reportado previamente que duox participa en la formación de peróxido de hidrógeno durante la respuesta de cicatrización en peces de tres días posteriores a la fertilización (dpf). Sin embargo, aún falta hacer estudios detallados de la participación de duox1 en etapas tempranas del desarrollo en pez cebra. Durante la gastrulación en pez cebra ocurre el mayor proceso de motilidad celular del desarrollo, que es conocido como epibolia. Durante la epibolia, las células se mueven desde el polo animal hacia el polo vegetal cubriendo a la célula llamada vitelo. Debido a que las enzimas Nox tienen la particular capacidad de formar superóxido y peróxido de hidrógeno, en este proyecto proponemos que las Nox participan en la formación de ERO que regulan el proceso de epibolia. El objetivo de este proyecto es caracterizar el efecto de la inhibición de las Nox durante el proceso de epibolia. Los resultados encontrados en este proyecto mostraron que la inhibición de la actividad de las Nox disminuye la formación de ERO, afecta la motilidad celular y provoca un retraso en la epibolia, efectos que fueron completamente rescatados mediante la adición de peróxido de hidrógeno. Adicionalmente, los resultados encontrados indican que es requerida la actividad de varios genes Nox para la formación de ERO y el control de la motilidad celular durante la progresión de la epibolia.

ABSTRACT

NADPH oxidase (Nox) enzymes catalyze the formation of the reactive oxygen species (ROS), superoxide and/or hydrogen peroxide. ROS are important signaling molecules involved in the regulation of major cellular behaviors such as cell migration. In zebrafish five nox genes have been found nox1, nox2, nox4, nox5 and duox, from which duox has been previously reported to participate in hydrogen peroxide formation during wound response in three days post fertilization fishes. However, detailed studies on the participation of nox genes in early zebrafish development are still lacking. During zebrafish gastrulation a major cell motility developmental process occurs, known as epiboly. During epiboly cells move from the animal pole to the vegetal pole covering the yolk cell. Recently, we detected a distinctive ring of ROS formation in the region leading epiboly. Due to the particular capacity of Nox enzymes to form superoxide and hydrogen peroxide, we propose that Nox are responsible for ROS formation and that it participates in the control of epiboly. The objective of this project is characterize the effect on epiboly of Nox activity inhibition. We found that Nox activity inhibition decreased ROS formation, affected cell motility and delayed epiboly, effects that were fully rescued by hydrogen peroxide treatment. These results indicate that the activities of several nox genes are required for the formation of ROS and the control of cell motility during epiboly progression.

INTRODUCCIÓN

1.1 Migración celular durante el desarrollo embrionario

La migración celular es uno de los procesos celulares evolutivamente conservado fundamental para el desarrollo embrionario de animales, durante la morfogénesis de diferentes tejidos, así como para el establecimiento del plan corporal, además de que participa en el mantenimiento de la homeóstasis en organismos unicelulares y pluricelulares (Aman & Piotrowski, 2010). La migración celular, también es importante en la cicatrización de heridas, en la respuesta inmune, durante la angiogénesis y en patologías como el cáncer en la metástasis, por mencionar algunos ejemplos (Kurosaka & Kashina 2008). La migración celular está compuesta de otros procesos que incluyen el establecimiento de la polaridad celular, la extensión del frente de migración en las protrusiones, la formación de regiones de adhesión célula-matriz, la translocación del cuerpo celular, y la retracción de la parte posterior de la célula (Lauffenburger & Horwitz 1996; Vicente-Manzanares et al. 2005). La migración celular comienza cuando una célula o un grupo de células reciben una señal que la induce, lo cual provoca el inicio de la polarización y la extensión de protrusiones celulares. Estas protrusiones se adhieren al substrato sobre el cual las células se mueven proporcionando tracción, mientras que el frente de migración se retrae. Gradientes de señales de repulsión y atracción son usadas para dirigir la migración celular. Los quimioatrayentes se unen a proteínas transmembranales en la superficie de las células y dirigen la migración mediante la transducción de señales que provocan cambios en el citoesqueleto y en las adhesiones. Otros factores que afectan la migración celular son cambios en el substrato en el cual las células se mueven (Hurd et al. 2012). La migración celular puede ser clasificada en dos tipos: movimientos celulares colectivos o individuales. En años recientes ha surgido un gran interés por estudiar la migración celular colectiva y el papel que tiene en el desarrollo embrionario. La migración celular colectiva es definida como la habilidad de un grupo de células para moverse juntas, lo cual requiere de la coordinación y cooperación de las células en migración (Rørth, 2012). Uno de los ejemplos mejor estudiados de migración celular colectiva durante el desarrollo embrionario, es la migración de las células germinales, proceso mediante el cual las células primordiales germinales migran desde el sitio donde se originan hasta su destino final que es la gónada, la cual provee a las células germinales el

ambiente adecuado para su diferenciación (Barton, LeBlanc, & Lehmann, 2016). Otro ejemplo es la migración del primordio de la línea lateral de pez cebra que es un proceso muy estudiado. La línea lateral en el pez cebra es un sistema mecanosensor situado en la superficie del pez que consiste en pequeños parches sensoriales (neuromas) distribuidos en líneas discretas sobre la superficie corporal (Raible and Kruse, 2000). La línea lateral se divide en dos sistemas, la línea lateral anterior que se extiende sobre la cabeza, y la línea lateral posterior que se extiende desde el tronco hacia la cola (Gallardo et al., 2010). Este sistema es estimulado por el desplazamiento del agua que rodea al pez y por vibraciones, esto le permite al pez detectar la propulsión de los peces a través del agua, lo cual ayuda en la captura de sus presas y la prevención de depredadores, así como para evitar obstáculos. La línea lateral posterior es un modelo de estudio de migración celular importante en el cual se ha encontrado que depende enteramente de la interacción entre el receptor de quimiocinas CXCR4 que está presente en las células en migración, y su ligando SDF1 que es sintetizado por una línea estrecha de células (Ghysen and Dambly-Chaudière, 2004). Otro ejemplo muy interesante es la migración de las células de la cresta neural craneal en la cual una población de células localizadas en el borde de la placa neural migra por inducción de BMP, Wnt, FGF y ácido retinoico (De Calisto, Araya, Marchant, Riaz, & Mayor, 2005). En estos ejemplos, existe un proceso de migración celular dirigida en el cual un grupo de células cambia o sesga su dirección acoplando su locomoción a una señal externa (Loosley et al. 2015). La migración celular dirigida es un proceso que implica la generación de moléculas espacial y temporalmente restringidas. Existe una gran variedad de moléculas que afectan la direccionalidad de la migración celular. En reportes recientes se ha encontrado que las especies reactivas de oxígeno (ERO) participan en regular la migración celular en diferentes tipos celulares en cultivos *in vitro* (Hurd et al. 2012) y además se ha encontrado que las ERO regulan la direccionalidad de la migración celular de los leucocitos durante el proceso de cicatrización en larvas de pez cebra (Niethammer et al. 2009). Adicionalmente las ERO son moléculas indispensables que regulan procesos como la formación de protrusiones celulares, estructuras lamelares y filopodiales en el frente de migración de las células (Taulet et al. 2012). Es por ello que las especies reactivas de oxígeno son de particular interés en este proyecto en el cual hemos estudiado su posible participación en la regulación de la migración celular durante el desarrollo embrionario temprano.

1.2 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas derivadas del oxígeno entre las que se encuentra el anión superóxido, el radical hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y el oxígeno en singulete, por mencionar algunos ejemplos. Tradicionalmente se han considerado como moléculas tóxicas capaces de modificar macromoléculas biológicas como ADN, lípidos y proteínas, además de participar en procesos de eliminación de agentes infecciosos mediado por los fagocitos en un proceso conocido como estallido respiratorio (Wojtaszek 1997). En este proceso, las ERO son utilizadas para la eliminación de agentes infecciosos. Sin embargo, se ha encontrado que las ERO pueden participar como segundos mensajeros en la regulación del comportamiento celular como la migración celular, la proliferación, la muerte celular, la diferenciación y en el desarrollo embrionario, además de participar en la regulación de la expresión génica (ten Freyhaus et al. 2006 y Ushio-Fukai 2006). Existen diferentes fuentes de generación de especies reactivas de oxígeno intracelular que incluyen la cadena transportadora de electrones (CTE) mitocondrial, la familia de las NADPH Oxidasas, las xantin oxidasas, las cicloxigenasas y las lipoxigenasas (Gloire et al. 2006).

La cadena transportadora de electrones produce ERO durante la respiración aeróbica. La CTE está compuesta por un complejo de cuatro proteínas I-IV en donde se llevan a cabo las reacciones de oxidación y reducción para crear un gradiente electroquímico que se utiliza para la síntesis de ATP. Durante estas reacciones se forman ERO en los complejos I-III. La oxidación de moléculas altamente energéticas como el NADH y el FAD, libera electrones que después son acarreados por la co-enzima Q o el citocromo C. La transferencia de electrones a través de la cadena transportadora es usada para la reducción de O₂ a agua en el complejo IV. Durante la transferencia de electrones, algunos de ellos escapan y reaccionan con el O₂ generando la reducción incompleta del oxígeno molecular para producir aniones superóxido (Cadenas & Davies 2000). Otra fuente importante de generación de especies reactivas de oxígeno son las NADPH oxidasas de las cuales se hablará en el siguiente apartado y en las cuales nos centraremos en este estudio.

Se han descrito diferentes proteínas susceptibles a ser modificadas por la acción de ERO. Las ERO pueden actuar oxidando de manera irreversible grupos tiol (SH) de cisteínas en proteínas blanco (Berlett 1997). También pueden llevar a cabo modificaciones reversibles de cisteínas reactivas por medio de las cuales inactivan a fosfatasas por mencionar un ejemplo

(Ostman et al. 2011) ó por la oxidación de grupos tiol en cinasas cómo en la proteína Src que resultan en su activación (Giannoni et al. 2010). Blancos importantes de la señalización durante la migración celular incluyen activadores de los receptores tirosina cinasa (RTKs) como la proteína cinasa C (PKC) y reguladores negativos de RTKs como la proteína tirosina fosfatasa (PTP) (Wu et al. 2006). Tanto las PKCs como las PTPs tienen cisteínas que pueden ser oxidadas por ERO que afectan su actividad. PKC es activada después de la oxidación mientras que las PTP son inactivadas (Boivin et al. 2010). Interesantemente, una vez activadas las PKC pueden a su vez influenciar la generación de ERO, lo cual sugiere que hay un mecanismo de retroalimentación positiva que resulta en la amplificación de la señal que potencia la migración celular (Wu et al. 2006). La función de muchas proteínas incluyendo proteínas del citoesqueleto, son afectadas por la señalización por ERO (Sparaco et al. 2006). Diferentes estudios han mostrado que el balance redox afecta la dinámica del citoesqueleto, lo cual impacta directamente en la morfología y el comportamiento celular *in vivo* e *in vitro* (Jaworski et al. 2009). Interesantemente las ERO pueden influenciar la dinámica de los filamentos de actina (F-actina) tanto directa como indirectamente. Por un lado, se ha encontrado que la oxidación directa de la actina por ERO afecta la polarización. Tratamientos *in vitro* con altas concentraciones de H₂O₂ disminuye la tasa de polimerización y de elongación de los filamentos de actina (Moldovan et al. 2000). Por otro lado, las Rho GTPasas, que son uno de los principales moduladores de los rearrreglos del citoesqueleto durante la migración celular, como Rac1, RhoA y Cdc42 tienen un motivo redox sensible en su secuencia proteica primaria que puede ser modificado por ERO, lo cual afecta su actividad. Estos cambios en la actividad de diferentes Rho GTPasas pueden inducir rearrreglos del citoesqueleto que resultan en la regulación indirecta de la dinámica del citoesqueleto (Moldovan et al. 1999). Las ERO que participan en la migración celular pueden tener diferentes orígenes de generación, una de ellas es la familia de enzimas NADPH Oxidasas que se describirán de manera breve a continuación.

1.3 NADPH oxidasas

Las NADPH oxidasas (Nox) son un grupo de enzimas que están asociadas a la membrana plasmática en una gran variedad de tipos celulares. Hasta el momento se han descrito siete NADPH oxidasas, las cuales se expresan dependiendo del organismo, el tipo celular o alguna

condición particular de la célula. Nox1, Nox2, Nox3 y Nox4 son activadas por interacciones tipo proteína-proteína, y tienen en común a la subunidad p22 que es importante para la maduración, el plegamiento y la estabilización del sitio catalítico (Brandes et al. 2014). Nox1 requiere además de otras proteínas como la Rho GTPasa Rac, NOXO1 Y NOXA1. Por su parte Nox2 requiere de Rac, p47, p67 y p40 para activar la generación de especies reactivas de oxígeno (Bedard & Krause 2007) (Figura 1). Nox3 al igual que Nox1 requiere de NOXO1, NOXA1 y Rac1 (Ueyama et al. 2006) para su activación, aunque hay reportes que sugieren que p47 y p67 también pueden participar en la activación de Nox3 (Ueno et al. 2005). Nox4 se caracteriza por permanecer constitutivamente activa, siempre y cuando esté unida a la subunidad p22. Sin embargo, existen otras proteínas de la familia Nox como Nox5, Duox1 y Duox2 cuya actividad no depende de p22, en cambio contienen motivos EF hand los cuales las hacen dependientes de calcio para ser activadas (Brandes et al. 2014) (Figura 1). La función de esta familia de proteínas, es la producción regulada de superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrógeno en algunos casos, por la reducción de un electrón del oxígeno, usando NADPH como el donador del electrón como se representa en la siguiente reacción: $2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^- + NADPH^+ + H^+$ (Babior 2014).

El superóxido generado puede servir como material de partida para la producción de una vasta variedad de especies reactivas de oxígenos (ERO) incluyendo, alógenos oxidados, radicales libres y al oxígeno en singulete (Babior 2014).

Además de la generación del superóxido, las Nox pueden producir peróxido de hidrógeno, ya sea en pasos sucesivos en los cuales el superóxido se dismuta a peróxido de hidrógeno por medio de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), o generándolo directamente (Vaziri et al. 2003).

En humanos se han descrito siete genes NOX, NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2, los cuales presentan diferencias en el nivel de expresión, en los mecanismos que controlan su expresión, en los patrones de expresión entre tejidos y del tipo de ERO que produce la enzima para la cual codifican (Brandes et al. 2014). En pez cebra se han descrito únicamente cinco genes Nox, Nox1, Nox2, Nox4, Nox5 y Duox1, (Niethammer, et al. 2009) los cuales parecen presentar diferencias tanto en los patrones como en su nivel de expresión (Weaver et al. 2016). Sin embargo, el patrón de expresión detallado de los genes que codifican a estas enzimas y a las proteínas accesorias durante el desarrollo embrionario

temprano, aún se desconoce. En la Figura 1, se muestra un esquema de las cinco NADPH oxidasas descritas en el pez cebra.

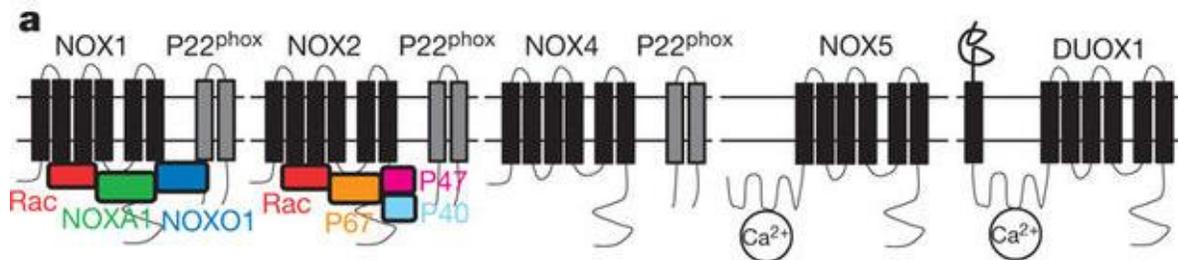


Figura 1. NADPH Oxidasas presentes en el pez cebra. En este esquema se representan las diferentes Nox presentes en el pez cebra. Nox1, Nox2 y Nox4 requieren de p22 para ser activadas. Nox5 y Duox1 contienen motivos EF hand de unión a calcio. (Tomado de Niethammer et al 2009).

Interesantemente se ha reportado que la producción de ERO derivadas de las NADPH oxidasas participan como reguladores importantes de la motilidad celular en diferentes tipos celulares y en organismos diversos, de los cuales se mencionan algunos ejemplos a continuación.

Se ha encontrado que Nox1 participa en la migración celular inducida por citocinas. Además, está implicada en la migración de células musculares lisas en respuestas a factores de crecimiento como el factor derivado de plaquetas (PDGF) (Maheswaranathan et al. 2011) y al factor de crecimiento fibroblástico básico (bFgf) (Schröder et al. 2007). Otro aspecto importante es que Nox1 regula la migración mediante la proteína disulfuro-isomerasa (PDI). En concentraciones basales, PDI interactúa físicamente con Rho GTPasas pequeñas y su regulador Rho GDI. Después de la estimulación con PDGF, PDI interactúa con Rac1 y Rho aumentando el número de adhesiones focales y la migración celular (Pescatore et al. 2012). Adicionalmente Nox1 está involucrado en la regulación de la expresión de la metaloproteinasa MMP-9, que participa en la degradación de la matriz extracelular importante para la migración celular (Pescatore et al. 2012).

Nox2 está mayormente implicado en la migración de células endoteliales y macrófagos en las cuales se ha encontrado que está altamente expresado, por lo que Nox2 influye en la respuesta inflamatoria y la angiogénesis. Similar a Nox1, Nox2 promueve la migración vía señalización mediada por redox. La formación de ERO por parte de Nox2 induce rearrreglos del citoesqueleto que participan en la extensión, motilidad y adhesión célula-célula de células endoteliales humanas (Van Buul et al. 2005).

En estudios de cultivos celulares se ha encontrado que Nox4 participa en procesos como la angiogénesis, afectando además de la migración de células endoteliales, y la expresión de estímulos pro migratorios como VEGF (Schröder et al. 2012). Se ha encontrado que Duox1 produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) directamente, el cual participa en la regulación de la migración y adhesión de las células endoteliales humanas. Recientemente, en estudios hechos en la aleta caudal larval del pez cebra, que es un modelo para estudiar las respuestas inflamatorias y regenerativas de heridas, se encontró que el H_2O_2 producido por Duox1 actúa como una señal parácrina quimiotáctica que estimula el reclutamiento de leucocitos al sitio de la lesión (Hurd et al. 2012; Niethammer et al. 2009).

Sin embargo, hasta hace algunos años, se desconocía el sensor a través del cual las ERO regulan la migración celular de los leucocitos en el modelo de pez cebra. En 2011 Yoo y colaboradores identificaron a Lyn, una proteína cinasa de la familia Src, como el mediador inicial del reclutamiento de los leucocitos al sitio de la lesión. Análisis *in vitro* realizados en este mismo trabajo identificaron un solo residuo de cisteína, C466 como responsable de la activación de Lyn mediada por la oxidación, importante para la repuesta de los neutrófilos durante la cicatrización y la señalización *in vivo* (Yoo et al. 2011). Todos estos ejemplos muestran que las ERO derivadas de la actividad de NADPH oxidasas juegan un papel importante en la regulación de la migración celular de tipos celulares particulares. Sin embargo, aún queda por explorar que tan general es la participación de las ERO en regular procesos de migración celular durante el desarrollo embrionario temprano, por ello en este trabajo investigaremos el papel de las ERO y la fuente que las genera utilizando a los embriones del pez cebra aprovechando diversas características que tienen estos organismos que lo hacen un excelente modelo de estudio como se describe a continuación.

1.4 El pez cebra como modelo de estudio

El pez cebra se ha establecido como un importante modelo de estudio debido a que presenta varias características como un tamaño reducido, transparencia y un desarrollo embrionario externo y rápido, que permite estudiar al organismo completo bajo el microscopio a un nivel de resolución que no es posible en ningún otro vertebrado en etapas críticas del desarrollo como es la gastrulación (Solnica-Krezel et al. 1995; Kimmel et al. 1995). Utilizando técnicas como la inmunohistoquímica, la cual es una herramienta poderosa en el modelo de pez cebra,

se puede determinar tanto la presencia como la localización subcelular de proteínas, en los tejidos del embrión completo con gran resolución (Mendieta-Serrano et al. 2013, Thisse & Thisse 2008, Bensch et al. 2013, Gao et al. 2015 y Webb & Miller 2003). El pez cebra se ha utilizado en años recientes para analizar los mecanismos responsables de la migración celular, ya que este proceso se coordina de manera muy fina con otros comportamientos celulares como la proliferación celular, la inducción celular para definir el destino de los diferentes linajes, así como con la muerte celular para llevar a cabo el proceso de la morfogénesis. Uno de los primeros procesos morfogenéticos en el pez cebra es el de la gastrulación, en el que un embrión en blástula, prácticamente sin estructura, forma las tres capas embrionarias, (endodermo, mesodermo y ectodermo) organizando el plan corporal definido por los ejes antero-posterior y dorso-ventral (Solnica-Krezel 2005). En pez cebra el primer movimiento a gran escala que se observa es el de epibolia que es un tipo de migración propio de la gastrulación como se describe en el siguiente apartado.

1.5 Proceso de epibolia en pez cebra

La epibolia en pez cebra es un proceso en el cual las células del blastodermo migran para recubrir el vitelo. Esto implica una migración masiva de células, donde prácticamente todas las células del embrión se encuentran en movimiento, es por ello que en este proyecto nos enfocamos al estudio de la epibolia.

Durante la epibolia, que inicia aproximadamente 4 horas después de la fertilización (hdf), las células del embrión están organizadas en 3 capas como se muestra en la figura 2A. Las células de la capa envolvente (evl), la cual es una monocapa de las células más externas del blastodermo que posteriormente dará origen al peridermo y a células dorsales precursora. Las células de la capa profunda (dc) que origina al embrión (Oteíza et al. 2008). Por último, se encuentra el vitelo que contiene la capa sincicial vitelina (ysl), la cual es una población de núcleos cercanos al blastodermo, pero contenidos en la célula gigante del vitelo. Esta capa se forma alrededor de la división 10 (3 hpf) cuando los blastómeros marginales se fusionan y liberan el citoplasma y núcleo al córtex del vitelo subyacente formándose así los núcleos sincitiales vitelinos (ysn) (Kimmel & Law 1985).

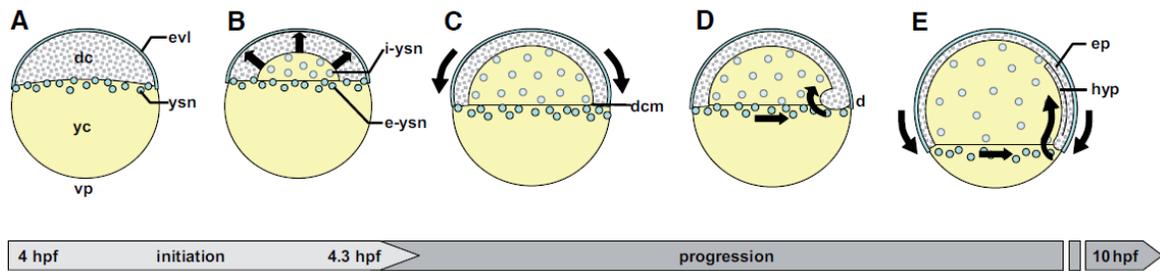


Figura 2. Esquema del inicio y progresión de la epibolia. A, Etapa de esfera en la cual se observa la capa envoltiva (evl) encima de las células de la capa profunda (dc) las cuales forman al blastodermo que se encuentra en el polo animal con respecto a la célula del vitelo (yc) que tiene una ubicación en el polo vegetal (vp). B, La transición de esfera a domo ocurre y se pueden reconocer dos poblaciones de núcleos sinciales vitelinos internos (i-ysn) y externos (e-ysn). C, El blastodermo aumenta el área de su superficie y cubre el vitelo, el embrión se encuentra en etapa de 50% de epibolia. D, Poco tiempo después del 50% de epibolia, las células se internalizan y forman al escudo que es la primera estructura que por morfología indica la región dorsal. E, Las células del embrión se intercalan para elongar el eje antero-posterior además de que las células que se internalizaron forman el hipoblasto (hyp) que dará origen al mesendodermo y al endodermo, se forma también el epiblasto (ep), que originará al ectodermo. En este esquema se representa un embrión en la etapa de 75% de epibolia (Lepage and Bruce, 2010).

La fase de iniciación comprende la transición de la etapa de esfera (Figura 2A) a la etapa de domo (Figura 2B). Durante la etapa de domo, la célula del vitelo comienza a ejercer fuerza hacia el polo animal provocando que el blastodermo se adelgace. Posteriormente el blastodermo comienza a recubrir el vitelo, adquiriendo mayor área de superficie, y estas etapas se definen por el porcentaje de vitelo cubierto (Figura 2C). Una vez en 50% de epibolia, las células realizan otros tipos de migración celular propios de la gastrulación como lo son la ingresión (Figura 2D), durante este proceso las células se internalizan para formar el hipoblasto (hyp) y el epiblasto (ep). El hipoblasto dará origen al mesendodermo y al endodermo, mientras que el epiblasto originará al ectodermo (Figura 2E). Por último las células convergen hacia lo que será el eje principal del embrión y una vez ahí las células se intercalan y extienden el eje antero-posterior (Bruce, 2016).

La migración celular es un proceso fundamental para que se lleven a cabo los diferentes tipos de movimientos propios de la gastrulación, incluyendo a la epibolia. El antecedente principal de este proyecto proviene del trabajo realizado por el Dr. Mario A. Mendieta en el cual utilizó un reactivo sensible a ERO para analizar las regiones de formación de especies reactivas de oxígeno a lo largo del desarrollo embrionario; este compuesto es el clorometil-2',7'-diclorodihidro-fluoresceína-diacetato (CM-H2DCFDA) que al ser oxidado por ERO genera

DCF el cual es una molécula fluorescente. Con este sensor se encontraron patrones muy interesantes de formación de ERO a lo largo del proceso de epibolia. Se encontró que la señal del DCF proviene del blastodermo y en particular de las células de la capa profunda, además de un anillo de ERO en el frente de migración como se muestra en la Figura 3. Una vez que se conocían los patrones de formación de ERO la siguiente pregunta que surgió fue ¿cuál es la fuente de generación de ERO durante el proceso de epibolia?

Dos de los posibles candidatos para contestar esta pregunta son las mitocondrias, las cuales son las principales productoras de especies reactivas de oxígeno, y las NADPH oxidasas, que como ya se mencionó antes son fuentes generadoras de ERO de manera regulada. En este proyecto me enfocaré a estudiar a las NADPH oxidasas como las posible fuente generadoras de ERO y analizar su posible función durante el proceso de epibolia.

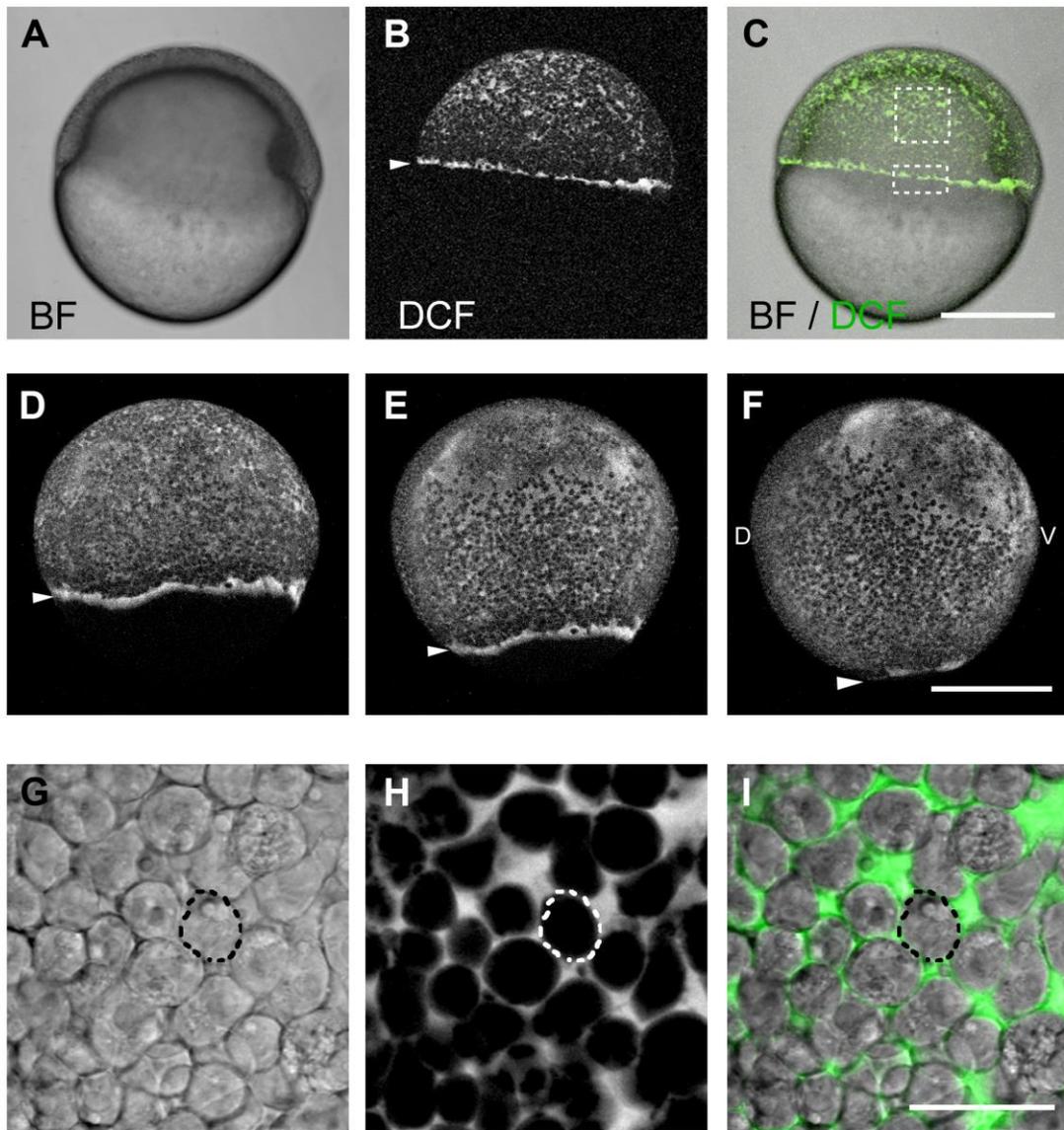


Figura 3. Patrón de localización de la señal de DCF durante el proceso de epibolia. (A y C) Embrión en etapa de escudo. A, Embrión visto en campo claro; B DCF; C, Superposición de A y B. (D-F) Imágenes de la dinámica de la señal de DCF a lo largo de la progresión de la epibolia. Las cabezas de flecha indican la posición del cinturón de DCF al borde del frente de migración por epibolia. (G-I) Se confirmó que la señal de DCF proviene del espacio intersticial que forma una red compleja entre las células de la capa profunda las cuales están representadas por los círculos punteados (Mendieta-Serrano et al, sometido).

HIPÓTESIS GENERAL

Las especies reactivas de oxígeno derivadas de la actividad de NADPH oxidasas participan en la regulación de la migración celular por epibolia en el desarrollo embrionario en pez cebra.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Analizar los efectos de la inhibición de la actividad de NADPH oxidasas en la migración celular durante la epibolia mediante el tratamiento farmacológico con la molécula VAS2870.
- 2.- Analizar los efectos de la inhibición de la actividad de NADPH oxidasas en la migración celular durante la epibolia con los morfolidos p22 y Duox1.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales.

Los embriones fueron obtenidos a partir de peces cebra silvestres que provienen de un acuario local y de una línea híbrida AB-TUB-WIK. Los peces fueron mantenidos en cautiverio, separando hembras y machos, las hembras se colocaron en peceras de 5 litros con una población de 7 hembras por cada pecera, mientras que los machos se colocaron en peceras de 3 litros con una población de 5 machos por pecera, a una temperatura de 28°C. Los peces se mantuvieron con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad y fueron alimentados tres veces al día; las condiciones del agua (pH, conductividad eléctrica y temperatura) se monitorearon diariamente y se realizaron recambios diarios de agua preparada (agua desionizada por ósmosis inversa mezclada con sales: NaHCO₃ 0.1 g/l, instant ocean 0.1 g/l) (Westerfield, 2000).

3.2 Cultivo de embriones de pez cebra.

Los peces cebra machos y hembras fueron colocados en una red una noche anterior a la mañana de la cruce para permitir que los huevos recién fecundados fueran depositados en el fondo del acuario y así evitar que fueran comidos por los peces adultos. Los embriones fueron colectados al inicio del fotoperiodo de luz que es cuando los peces se estimulan para la ovoposición y fertilización. Los embriones se succionaron con una pipeta del fondo de la pecera y fueron separados para la limpieza de detritos. Los embriones de pez cebra fueron cultivados *in vitro* en cajas Petri de 100 mm en medio de embrión de pez cebra a una temperatura de 28°C (Westerfield, 2000).

3.3 Clasificación de los embriones de pez cebra.

Los embriones cultivados *in vitro* se clasificaron en diferentes etapas del desarrollo embrionario por criterios morfológicos de acuerdo con la tabla propuesta por Kimmel y colaboradores en 1995.

3.4 Análisis de los efectos de la inhibición de la actividad de NADPH oxidasas en la migración celular durante la epibolia.

3.4.1 Tratamiento con el inhibidor farmacológico de NADPH Oxidasas, VAS2870

Se obtuvieron embriones recién fertilizados y se incubaron en medio de embrión a 29°C en la incubadora hasta que llegaron a la etapa de oblongo. Posteriormente se colocaron 10

embriones por cada pozo en cajas de 48 pozos, como se muestra en la Figura 4. Cada tratamiento se hace al menos por duplicado para tener de 20 a 30 embriones en cada uno de los tratamientos. Una vez que llegan a la etapa de esfera se retira la mayor cantidad de medio de embrión y se adiciona DMSO al 1% en el grupo control y VAS2870 a una concentración de 5 y 10 μM para los grupos experimentales. La estructura de la molécula VAS2870 se representa en la Figura 5. El inicio del tratamiento de los embriones con el VAS2870 se llevó a cabo en diferentes etapas del desarrollo del pez cebra, como se muestra en la Figura 4 para determinar la etapa adecuada para llevar a cabo los tratamientos.

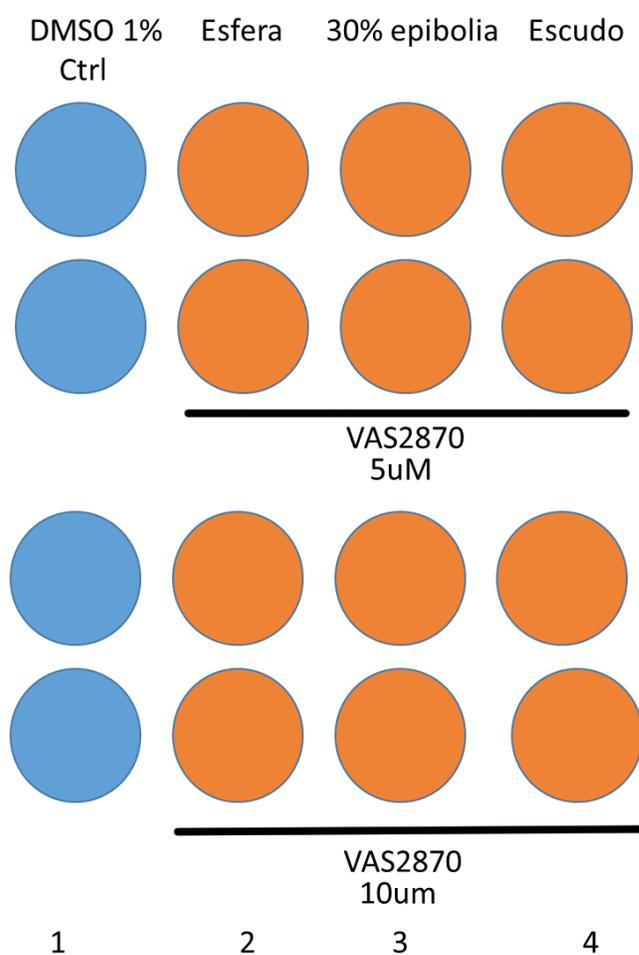


Figura 4. Esquema representativo del tratamiento con el inhibidor VAS2870. Los círculos de color azul representan pozos con 10 embriones controles, cada uno tratados únicamente con DMSO al 1%. Los círculos naranjas representan 10 embriones, cada uno tratados con VAS2870. En la parte superior se muestra la etapa en la cual fue incubado con el tratamiento, mientras que en la barra en

color negro muestra que los dos pozos superiores se trataron con VAS2870 a una concentración de 5 uM, y los dos pozos inferiores se trataron con VAS2870 a una concentración de 10 uM.

Una vez que los embriones controles llegan a la etapa de 75% de epibolia, se fijan los embriones de todos los pozos al mismo tiempo con paraformaldehído al 4% durante toda la noche para su posterior tinción acorde con Mendieta-Serrano (2013).

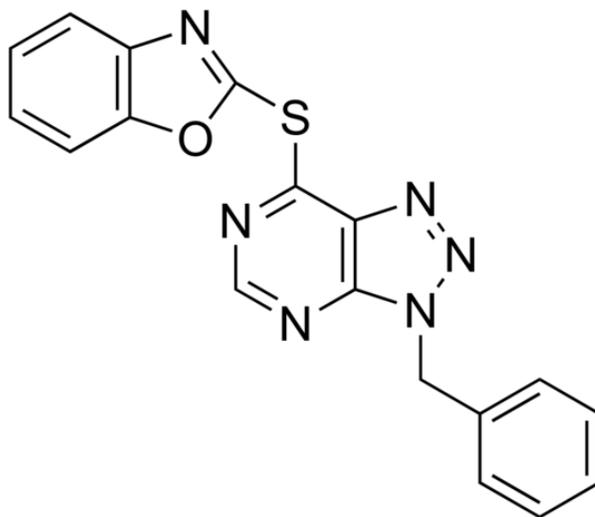


Figura 5. Estructura química del inhibidor VAS2870. La molécula 3-benzilo-7-(2-benzoxazolil)thio-1,2,3-triazolo[4,5-d]pirimidina (VAS2870) fue caracterizada mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, y fue reportada por primera vez en 2006 (ten Freyhaus et al., 2006).

3.4.2 Tratamiento con el inhibidor VAS2870 y H₂O₂.

Como se muestra en la Figura 6, los embriones se incubaron con VAS2870 y H₂O₂ en dos formas diferentes a las cuales les llamamos tratamiento desfasado (Figura 6i) y tratamiento continuo simultáneo (Figura 6ii). En ambos experimentos se utilizaron 30 embriones por cada tratamiento. En el tratamiento desfasado se colocó el grupo de embriones control en DMSO al 1% (barra en color azul fuerte). El siguiente tratamiento consistió en colocar los embriones durante una hora en VAS2870 a una concentración de 10 uM durante una hora (barra en color rojo), posteriormente se retiró la mayor cantidad del inhibidor cada tratamiento y se adicionó DMSO 1% hasta que los embriones fueron fijados (barra rojo-azul fuerte). En el tratamiento de rescate se colocó el grupo de embriones control en VAS2870 a una concentración de 10 uM durante una hora, se retiró el VAS2870 y se adicionó peróxido

de hidrógeno a diferentes concentraciones (barra en color rojo-azul cielo). En el tratamiento continuo simultáneo (Figura 6ii), los embriones del tratamiento control se colocaron en DMSO 1% de manera continua desde la etapa de esfera hasta la etapa de 90% de epibolia (barra en color verde). En el siguiente tratamiento, se colocaron a los embriones en VAS2870 10 μ M de manera continua hasta que los embriones control llegaron a la etapa de 90% de epibolia (barra en color rojo). En el tercer tratamiento continuo simultáneo el grupo de embriones se colocaron en una solución que contiene VAS2870 10 μ M y diferentes concentraciones de H₂O₂ de manera continua (barras en color rojo-azul cielo). Una vez que los embriones control llegaron a la etapa de 90% de epibolia (aproximadamente 9 horas posteriores a la fertilización), se fijaron todos los grupos de tratamientos con paraformaldehído al 4% (representado en la Figura 6 con la barra negra perpendicular), para posteriormente analizar los efectos del tratamiento.

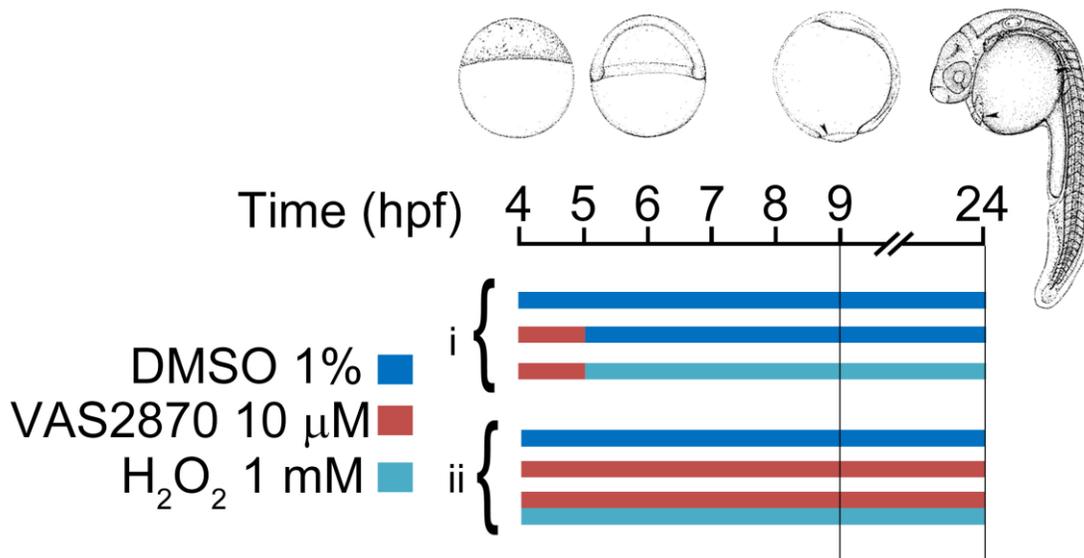


Figura 6. Tratamiento con el inhibidor VAS2870 y H₂O₂. En esta figura se muestra un esquema general de los diferentes tratamientos realizados. Se observa una línea del tiempo con las etapas del desarrollo en las cuales fueron sometidos los embriones a cada tratamiento. La barra debajo de la línea del tiempo representa el tipo de tratamiento, el inicio y fin de cada uno de ellos. Las barras en color azul fuerte representan el tratamiento con DMSO 1%, las barras en color rojo el tratamiento con VAS2870 10 μ M y en color azul cielo el tratamiento con peróxido de hidrógeno. La Figura 6i muestra el tratamiento desfasado. La Figura 6ii muestra el tratamiento continuo simultáneo.

3.4.3 Microinyección de oligonucleótidos antisentido tipo Morfolino

Los morfolinos (MO) son oligonucleótidos antisentido que tienen dos mecanismos de acción: pueden interrumpir el inicio de la traducción del ARNm o afectar el proceso de corte y empalme (splicing) del pre-ARNm (Morcos, 2007). En este proyecto se utilizaron morfolinos diseñados para afectar el splicing del ARNm y así provocar la pérdida de función parcial de la subunidad de p22 y la NADPH oxidasa Duox1. A continuación, se describe de manera resumida la metodología empleada para inyectar ARNm o morfolino en embriones de pez cebra acorde con lo reportado (Mendieta-Serrano et al., 2015).

Primeramente, se obtienen embriones recién fertilizados, y se colocan en placas de agarosa, las cuales contienen surcos en los cuales se colocan los embriones en fila. Posteriormente se calibra el microinyector para inyectar a los embriones con la concentración deseada la cual se calibra previamente inyectando la solución sobre una reglilla y se mide el diámetro de la burbuja que se forma hasta obtener el diámetro deseado. Bajo el microscopio estereoscópico se inyectan los embriones en el vitelo antes de que formen la primera célula, y una vez inyectados, se colocan en una caja Petri la cual contiene agua de embrión (60mg/litro de Instant Ocean en agua bidestilada). Los embriones se crecen a 28°C en una incubadora (Yuan & Sun 2009).

Los morfolinos fueron sintetizados por la compañía (GeneTools LLC Oregon) para los genes Duox1 5'-AGTGAATTAGAGAAATGCACCTTTT-3', y Cyba (p22 phox) 5'-ATCATAGCATGTAAGGATACATCCC-3' acorde con las secuencias reportadas en la literatura (Niethammer et al., 2009). Estos morfolinos fueron diluidos en buffer Danieau e inyectados en los embriones a una concentración de 7.5 ng por embrión de cada uno de los morfolinos de Duox1 y de p22. El MO Std control se inyectó a 7.5 ng por embrión.

En los experimentos donde se obtuvieron dobles morfantes se inyectó de manera simultánea 7.5 ng de cada morfolino p22 y Duox1, por lo que la cantidad total de los morfolinos fue de 15 ng por embrión (7.5ng p22 + 7.5 ng Duox1). Por lo que el MO Std ctrl se inyectó a una concentración total de 15 ng por embrión.

3.4.4 Validación de los morfolidos Duox1 y p22.

Se utilizaron dos pares de oligos previamente descritos (Niethammer, Grabher, A. T. Look, et al. 2009) : cyba 5' GCGAAGATTGAGTGGGCGATGTGGGCC y 3'TTATTCGTTGATGGTGACAGACATAGGATTGTC, Duox 5'ACACATGTGACTTCATATCCAG y 3'ATTATTA ACTCATCCACATCCAG para amplificar la región en la que teóricamente se afecta el corte y empalme provocado por los morfolidos previamente mencionados. Para ello, se realizó una extracción de ARN de sesenta embriones inyectados con los morfolidos control (std), de duox y de p22 en estadios de 24 hpf mediante fenol cloroformo con TRIZOL (Life Technologies) siguiendo el manual del proveedor. A partir de los ARNs se sintetizó el ADNc mediante retrotranscripción con oligonucleótidos Random Primers (Termo Scientific), oligo dT (Invitrogen) y M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del proveedor. Se realizaron las reacciones de PCR y los amplicones se cargaron en geles de agarosa al 4% (Buffer Tae 1X, agarosa de bajo punto de fusión).

3.4.5 Tratamiento con H₂O₂ de embriones coinjectados con los Morfolinos p22 y Duox

Se coinjectaron embriones en etapa de una célula con los Morfolinos p22 y Doux a una concentración de 15 ng por embrión (7.5 ng p22 + 7.5 ng Duox1), inyectando el MO Std ctrl a la misma concentración de 15 ng por embrión. Se dejaron incubando a 29°C hasta que llegaron a la etapa de Esfera. Una vez en esa etapa, 30 embriones coinjectados con el MO p22/Duox se incubaron en DMSO 1% y 30 embriones coinjectados con el MO p22/Duox se incubaron en diferentes concentraciones de H₂O₂. El mismo procedimiento se utilizó con los embriones inyectados con el MO Std Ctrl incubándose los embriones hasta la etapa de 75-80% de epibolia en la cual los embriones fueron fijados con PFA 4% para teñirlos y analizarlos posteriormente.

3.5 Microscopia de fluorescencia convencional.

Los embriones teñidos con colorantes fluorescentes fueron montados en agarosa de bajo punto de fusión al 1% y posteriormente visualizados por microscopia de fluorescencia convencional y fotografiados en un microscopio Leica (DMLB) con objetivos 5X (apertura

numérica 0.12 y corrección NPLAN); la adquisición de las imágenes se realizó con la cámara AXIOVISION MRc5 mediante el software AXIOVISION REL. Versión 4.8.

3.6 Análisis de imágenes.

Las imágenes de microscopia de fluorescencia fueron obtenidas manualmente ajustando los valores de adquisición con el programa axiovision rel y se guardaron como series. El análisis de las imágenes fue realizado con el software libre ImageJ v.1.37 (Abramoff et al., 2004) o con la versión alternativa de software Fiji (<https://imagej.net/Fiji>) (Schindelin et al., 2012). La cuantificación de las imágenes fue realizada con ImageJ 1.48.

Para la presentación de las imágenes en mosaicos se utilizó el programa Adobe Photoshop Cs6. Las imágenes no se sometieron a ningún procesamiento adicional durante el análisis o presentación de las imágenes.

3.7 Análisis estadístico

En el tratamiento con el inhibidor VAS2870 y en la inyección de los morfolidos Duox, p22 y Duox/p22 se realizó una prueba t de student para analizar si las diferencias eran significativas entre el tratamiento y el control.

En los tratamientos con el inhibidor VAS2870 y H₂O₂ se utilizó la prueba one way anova seguida de la prueba de Tukey para analizar si las diferencias eran significativas entre todos los grupos de tratamiento.

Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism versión 4.0, La Jolla California USA, www.graphpad.com

RESULTADOS

4.1 VAS2870 afecta el proceso de epibolia en pez cebra.

El VAS2870 es un inhibidor farmacológico general de las NADPH Oxidasas (ten Freyhaus et al. 2006), el cual ha sido ampliamente usado en cultivos celulares y en diferentes organismos, entre ellos el pez cebra (Niethammer et al. 2009). Probamos este inhibidor usando como vehículo el DMSO que es una molécula que se utiliza en diferentes tratamientos farmacológicos para permeabilizar a las células del embrión y así facilitar la entrada de los fármacos que se están estudiando.

Inicialmente determinamos la concentración de DMSO que se debe usar para obtener experimentos con resultados reproducibles. Encontramos que la concentración de 1% de DMSO es la ideal para realizar los tratamientos con VAS2870, por lo que al probar el efecto de diferentes diluciones de VAS2870 la concentración del DMSO debe permanecer constante al 1%. A esta concentración el DMSO no presentó ningún efecto evidente en el desarrollo de los embriones de pez cebra como se puede ver más adelante.

Una vez que se determinó la concentración en la cual se utilizará el DMSO, nos enfocamos en determinar el rango de concentraciones de exposición de los embriones al VAS2870. Inicialmente probamos la concentración reportada por Niethamer y colaboradores (Niethammer et al. 2009), la cual era de 20 μ M, sin embargo esa concentración en nuestras manos, detiene el desarrollo de los embriones y posteriormente mueren. Esto nos llevó a probar concentraciones más bajas, 1, 2.5, 5 y 10 μ M, y encontramos que a concentraciones de 5 y 10 μ M podíamos observar efectos en el desarrollo sin afectar la sobrevivencia de los embriones durante la epibolia.

Una vez que se determinó la concentración de DMSO y VAS2870 que debíamos usar, nos enfocamos en analizar el efecto del inhibidor en el proceso de epibolia. Se utilizó el inhibidor en diferentes etapas del desarrollo. Durante el inicio de la epibolia, que corresponde a la etapa de esfera, posteriormente en 30% y 50% de epibolia. Para esto, se incubaron los embriones hasta que los controles con DMSO 1% llegaron a 75% de epibolia y se fijaron los embriones de todos los tratamientos. La Figura 7A se muestra un esquema representativo de la titulación con el inhibidor VAS2870. En la Figura 7 B y F se observan los embriones control, los cuales

fueron incubados desde la etapa de esfera con DMSO 1%. Estos embriones se incubaron hasta llegar a la etapa de 75% de epibolia en la cual los fijamos con paraformaldehído al 4% y posteriormente los núcleos se tiñeron con Hoescht. Como referencia usamos a los embriones control, ya que una vez que estos embriones llegan a la etapa de 75% de epibolia, además de fijar este grupo, también se fijan los embriones tratados con VAS2870 con diferentes concentraciones y en diferentes etapas. Los embriones de la Figura 7 C y G fueron tratados desde la etapa de esfera con VAS2870 a 5 y 10 uM respectivamente. Se observa que en ambos tratamientos se afecta la migración tanto en la capa envolvente como en la capa profunda. Al medir el porcentaje de avance de ambas capas y hacer un análisis estadístico, se encontró que la capa envolvente recubría el 60% del vitelo mientras que la capa profunda se encontraba recubriendo el 50% como se muestra en la Figura 7J. Los embriones de la Figura 7 D y H fueron tratados desde la etapa de 30% de epibolia con VAS2870 a 5 y 10 uM y se dejaron incubando hasta que los embriones control llegaron al 75% de epibolia. Se observó que en ambos tratamientos se afecta la migración tanto de la capa envolvente como de la capa profunda, que a diferencia de los embriones tratados con VAS2870 desde la etapa de esfera, se ven menos afectados. Además, los embriones tratados con la concentración de 5uM se ven aún menos afectados que los tratados con 10 uM. Por último, los embriones tratados con VAS2870 desde la etapa de escudo tienen un efecto leve en la migración, ya que los embriones tratados con 5 uM y 10 uM (Figura E e I), se observa que la capa envolvente se desarrolla hasta 75% de epibolia, mientras que la capa profunda se desarrolla 70 y 60% de epibolia respectivamente. Estos resultados muestran que el VAS2870 tiene mayor efecto sobre la migración por epibolia cuando se incuba en etapas más tempranas y a concentraciones crecientes, pero si los embriones se incuban con VAS2870 en etapas más avanzadas, el efecto del VAS2870 sobre la migración por epibolia es menor.

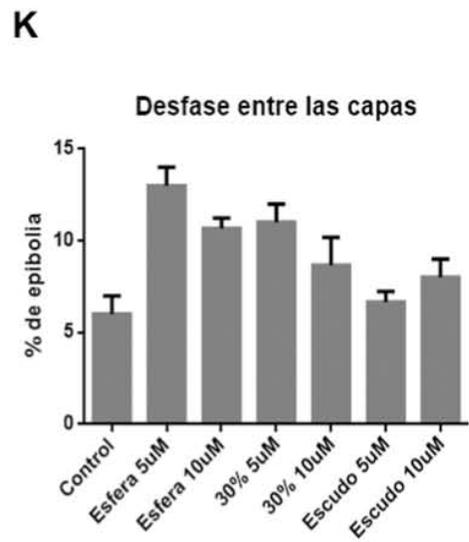
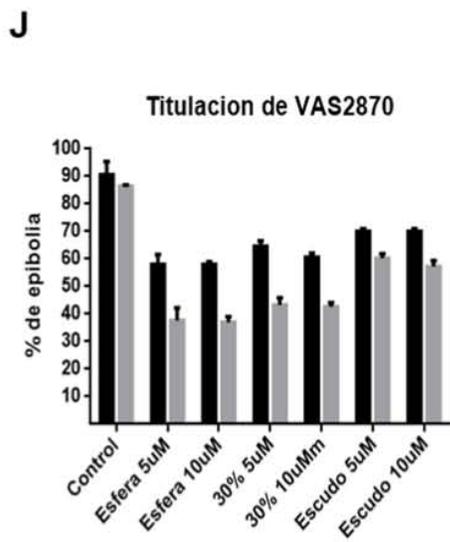
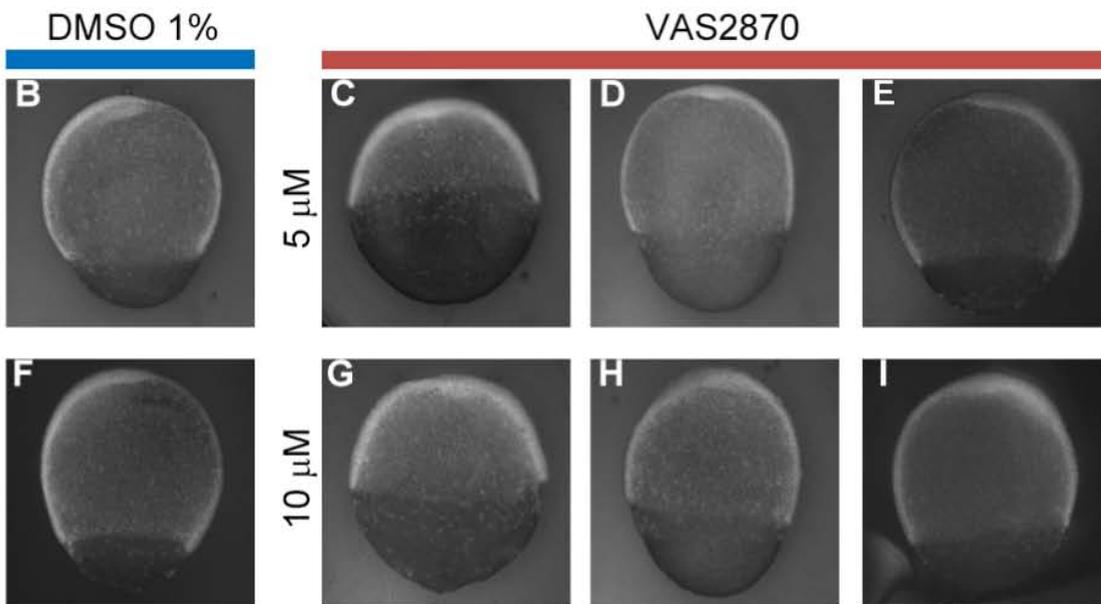
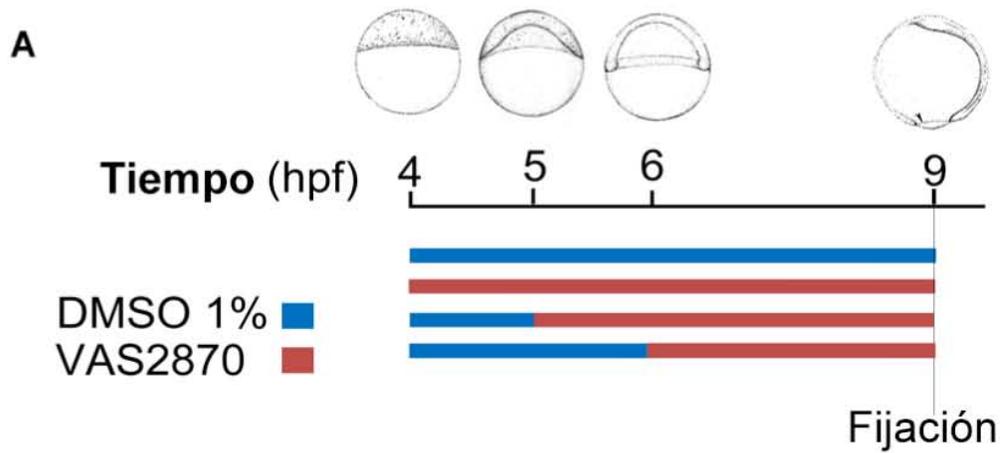


Figura 7. Análisis del efecto del tratamiento con VAS2870 en la epibolia. A Esquema representativo del experimento de titulación. La barra de tiempo representa el tiempo aproximado en el cual los embriones alcanzan cierta etapa. Debajo de la barra de tiempo las barras en color azul y rojo representa el tiempo durante el cual se incubaron a los embriones. La barra en color rojo azul representa el tratamiento con DMSO 1% y la barra en color rojo, el tratamiento con VAS2870. B y F Embriones control tratados con DMSO al 1%. C-E Embriones tratados con VAS2870 5 uM iniciando el tratamiento en diferentes etapas de la epibolia. G-I Embriones tratados con VAS2870 10 uM iniciando el tratamiento en diferentes etapas de la epibolia. C y G el tratamiento con VAS2870 iniciado en esfera. D y H tratamiento con VAS2870 iniciado en 30% de epibolia. E e I el tratamiento con VAS2870 iniciado en escudo. J Gráfica que muestra el porcentaje de avance de la epibolia; en el eje Y se muestra el porcentaje de avance de las capas y en el eje X se representa los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los embriones. Las barras en color negro representan el porcentaje de avance de la capa envolvente (CE) y las barras en color gris el porcentaje de avance de la capa profunda (CP). K En esta gráfica se muestra el porcentaje del desfase que hay entre las capas, que es la diferencia en el porcentaje de avance entre la capa envolvente y profunda. (N=2) con 20 embriones en cada tratamiento (n=40).

4.2 Tratamiento simultáneo de VAS2870 y H₂O₂

Actualmente se conoce que el VAS2870 tiene como blanco principal a las enzimas NADPH oxidasas cuya función es la producción de ERO. Al inhibir la producción de ERO como ya se mencionó antes, durante la epibolia se afecta la migración celular de la capa profunda (CP) y la capa envolvente (CE) durante la epibolia (Figura 7). Para probar que el VAS2870 está afectando de manera específica la función de las proteínas Nox, los embriones fueron tratados con VAS2870 a 10 uM y además se incubaron de manera simultánea con diferentes concentraciones de H₂O₂ (1, 2.5, 5 y 10 mM), para analizar si los efectos biológicos provocados por la inhibición de las NADPH oxidasas descritos previamente pueden ser rescatados. Se encontró que 1 y 2.5 mM de peróxido de hidrógeno rescatan los defectos en la migración celular de la capa envolvente y profunda en embriones tratados con VAS2870. Los embriones se incubaron de manera continua con VAS2870 y H₂O₂ como se muestra en el esquema A de la Figura 8. Estos tratamientos fueron probados en dos etapas, al inicio de la epibolia que corresponde a la etapa de esfera, y en etapa de 50% de epibolia. El primer tratamiento de rescate lo realizamos durante la etapa de esfera (Figura 8), en la cual sabemos que el efecto del tratamiento con VAS2870 a 10 uM es más fuerte que en etapas posteriores. En la Figura 8B se muestra un embrión representativo de cada tratamiento. En el tratamiento con VAS2870 10 uM se observó que se afecta de manera significativa la migración celular en comparación con los embriones control los cuales se colocan en un medio con DMSO al 1% como se muestra en la Figura 8C. Al colocar a los embriones en un medio con VAS2870

10 μM más peróxido de hidrógeno 1 mM (VAS- H_2O_2) encontramos que hay un rescate parcial en la migración celular tanto de la capa profunda como de la envolvente en comparación con los embriones tratados únicamente con VAS2870. Pero cuando los embriones son tratados de manera simultánea con VAS280 10 μM más peróxido de hidrógeno 2.5 mM (VAS- H_2O_2 2.5 mM) encontramos que se rescata de manera total la migración por epibolia de la capa envolvente y profunda, ya que al compararlos contra los embriones control, vemos que no hay diferencias significativas en la migración por epibolia (Figura 8C).

En el tratamiento iniciado en etapa de 50% de epibolia observamos resultados similares a los encontrados en etapa de esfera. En este experimento se esperaba rescatar de manera total la migración de la capa envolvente y profunda, ya que el tratamiento con el VAS2870 iniciado en etapa de esfera (que tiene efectos más severos en la migración) se rescató totalmente cuando adicionamos H_2O_2 2.5 mM. Encontramos que en el tratamiento iniciado en etapa de 50% de epibolia, el porcentaje de avance CE y CP de todos los tratamientos es mayor que en tratamiento iniciado en esfera, y la migración se rescata totalmente únicamente cuando adicionamos H_2O_2 2.5 mM (Figura 9 B y C).

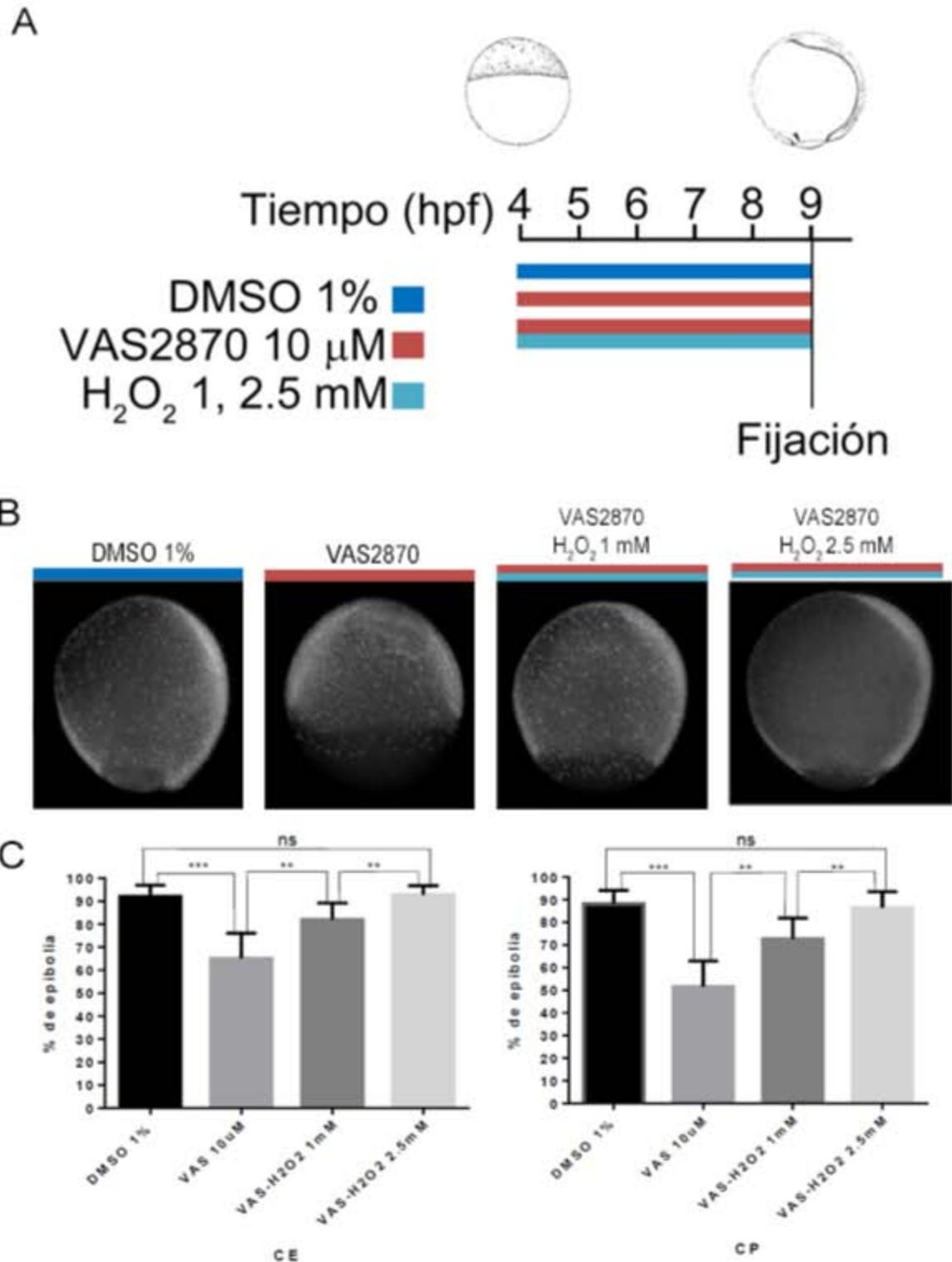


Figura 8. Análisis del efecto de los tratamientos continuos de VAS2870 y H₂O₂ en etapa de esfera. A) Esquema representativo de los diferentes tratamientos realizados en etapa de esfera. Las barras de color en la parte inferior a la barra de tiempo, representan el tipo de tratamiento y el tiempo al que fueron sometidos. La barra en color azul marino representa el tratamiento con DMSO 1%, en rojo el tratamiento con VAS2870, las barras en rojo y azul cielo representan los tratamientos

simultáneos de VAS2870 y peróxido de hidrógeno. B) Embriones representativos de cada tratamiento. C) Porcentaje de avance de la capa envolvente en el lado derecho y de la capa profunda en el lado izquierdo de cada tratamiento. Se anidaron los resultados, cada barra representa 3 experimentos independientes con 30 embriones por cada experimento. Se utilizó la prueba oneway ANOVA $p < 0.005$, ns= no significativo.

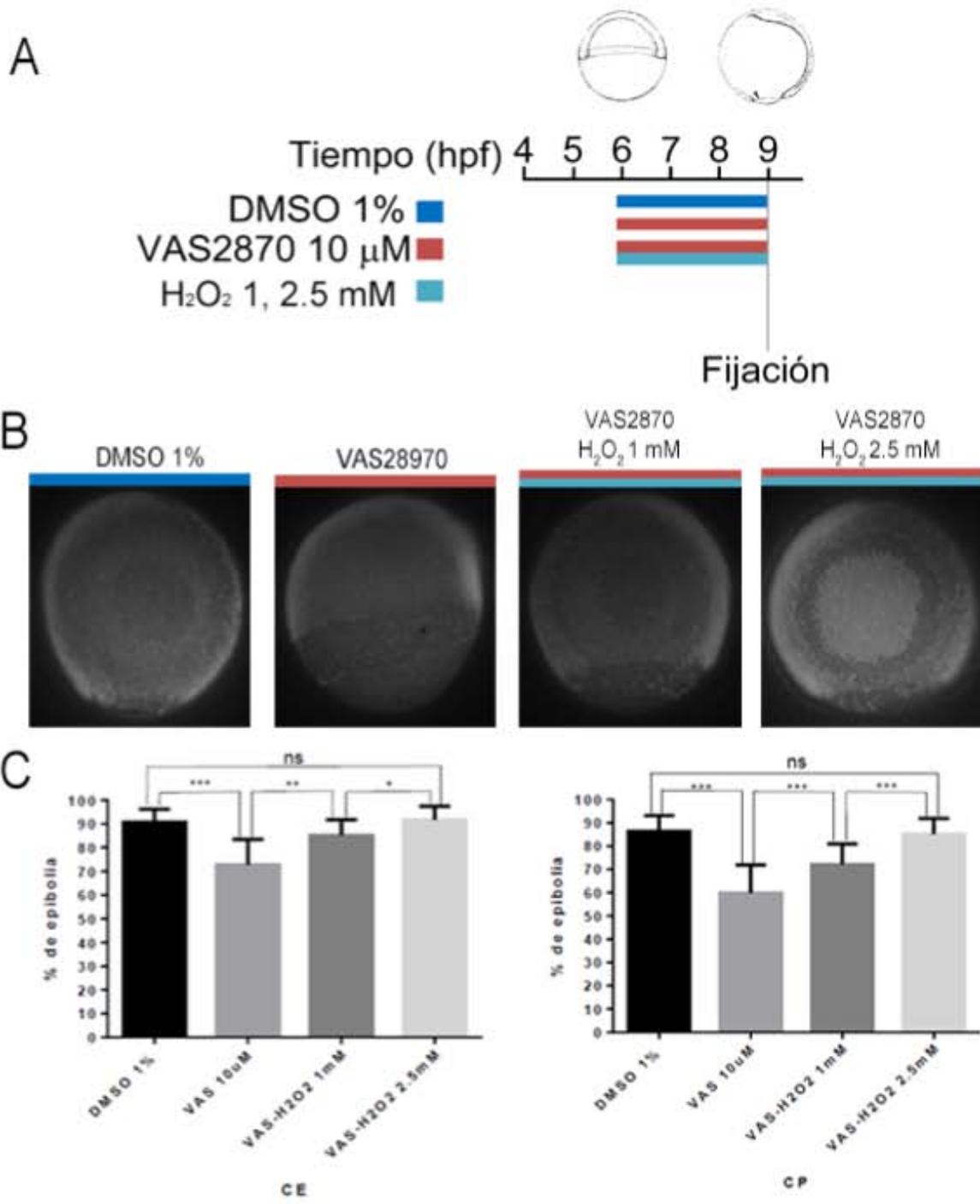


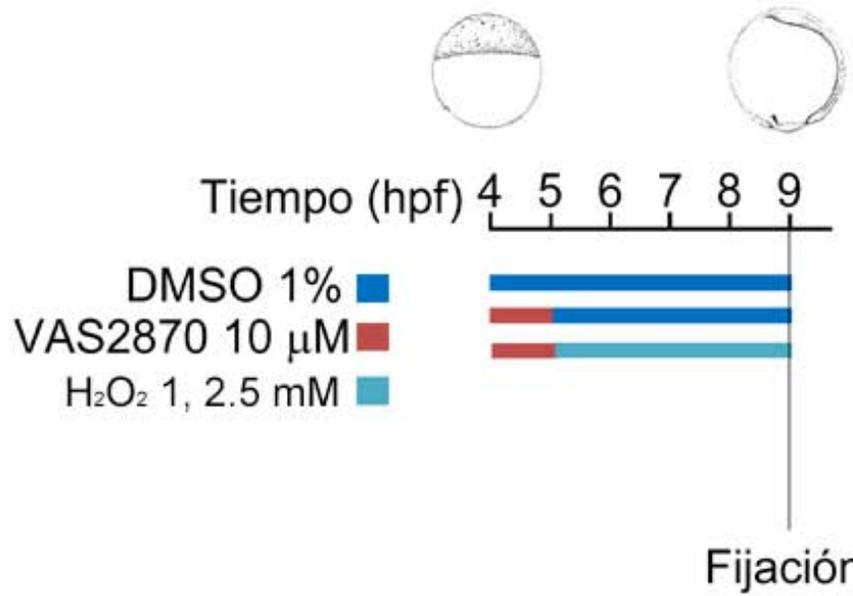
Figura 9. Análisis del efecto de los tratamientos continuo y simultáneo de VAS2870 y H₂O₂ en etapa de 50% de epibolia. A) Esquema representativo del tratamiento en 50% de epibolia. B) Embriones representativos de cada tratamiento. C) Porcentaje de avance de la capa envolvente en el lado derecho y de la capa profunda en el lado izquierdo de cada tratamiento. Los resultados se anidaron; cada barra representa tres experimentos independientes con treinta embriones por cada experimento. Se utilizó la prueba oneway ANOVA $p < 0.005$, ns= no significativo.

4.3 Tratamiento desfasado de VAS2870 y H₂O₂.

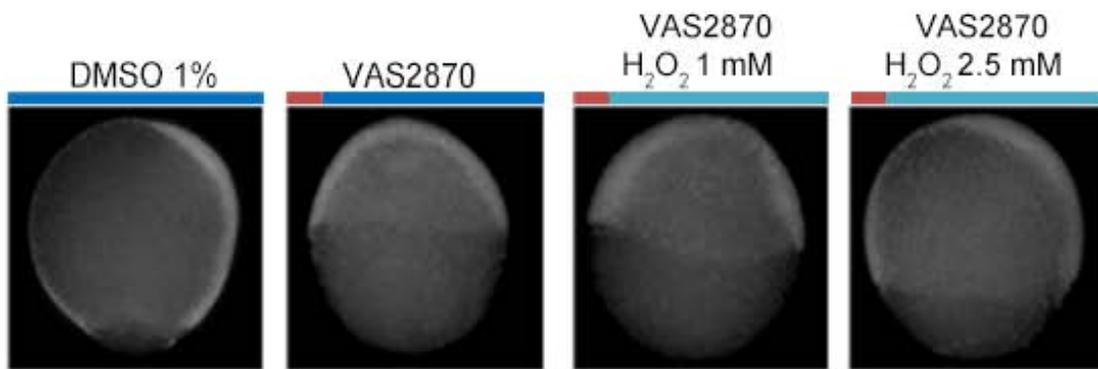
Para determinar si el rescate con peróxido de hidrógeno visto en el tratamiento anterior se debe principalmente a la compensación de la disminución de ERO endógenas provocada por inhibición de las NADPH oxidasas con VAS2870 y no a una posible modificación del inhibidor con el H₂O₂, se hicieron tratamientos en los embriones de manera desfasada, en los cuales se expusieron los embriones al inhibidor durante una hora y posteriormente se incubaron en otro medio como se describe en la sección de materiales y métodos 3.5.2 (Figura 6i). El tratamiento desfasado consistió en poner primero el inhibidor durante una hora y posteriormente agregar DMSO y/o peróxido de hidrógeno dejándolos incubar posteriormente hasta que los embriones control llegaron a la etapa de 90% de epibolia, en la cual fijamos a los embriones de todos los tratamientos, como se muestra en la Figura 10A. Los tratamientos se realizaron por triplicado, comenzando desde la etapa de esfera. Una vez fijados los embriones se tiñeron con DAPI y mediante análisis de imágenes se midió el porcentaje de migración por epibolia de cada una de las capas; los datos de las mediciones se representan en las gráficas de la Figura 10C. Observamos que el tratamiento de una hora con VAS2870 10 μ M es suficiente para retrasar la migración por epibolia de la capa envolvente y profunda (Figura 10 B y C). Además, observamos que, a diferencia del tratamiento continuo descrito en la sección anterior, al tratar a los embriones con 1 mM de H₂O₂ no observamos un rescate significativo ni en la CE ni en la CP, pero al agregar peróxido de hidrógeno 2.5 mM observamos que la migración de ambas capas se rescata parcialmente como se observa en la Figura 10 B y C.

Estos resultados sugieren que el rescate observado en los tratamientos simultáneos descritos en el apartado anterior, se deben a que el H₂O₂ agregado de manera exógena, compensan la disminución de peróxido de hidrógeno generada por la inhibición de la actividad de las NADPH Oxidasas, y no a la modificación u obstrucción de la actividad del VAS2870 debida a su interacción con el H₂O₂.

A



B



C

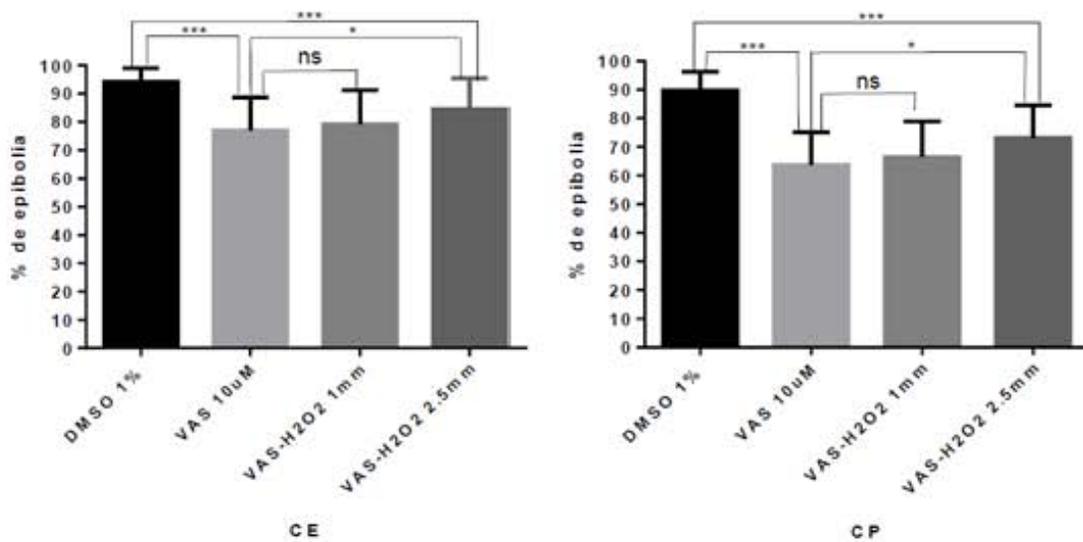


Figura 10. Tratamiento desfasado con el inhibidor VAS2870 y H₂O₂. A) Esquema representativo de cada tratamiento. B) Embriones representativos de cada tratamiento. Las barras de color en la parte superior representan el tipo de tratamiento y el tiempo al que fueron sometidos. La barra en color azul marino representa el tratamiento con DMSO 1%, en rojo seguida de la barra azul marino representa el tratamiento con VAS2870 por una hora y posteriormente con DMSO 1%, la barra de color rojo seguida de la barra azul cielo representa el tratamiento por una hora con VAS2870 y posteriormente el tratamiento con peróxido de hidrógeno. B) Porcentaje de avance de la capa envolvente en el lado derecho y de la capa profunda en el lado izquierdo de cada tratamiento. Se anidaron los resultados, cada barra representa 3 experimentos independientes con 30 embriones por cada experimento. Se utilizó la prueba oneway ANOVA p<0.005, ns= no significativo.

4.3 Inyección de morfolidos

Los resultados presentados en la primera parte de la tesis indican que las ERO derivadas de la actividad de las enzimas NADPH oxidasas participan en la regulación del proceso de migración durante la epibolia, la siguiente pregunta por resolver era ¿Cuáles NADPH oxidasas participan en regular el proceso de epibolia? Para avanzar en el esclarecimiento de esta la pregunta utilizamos dos morfolidos que afectan la expresión de dos genes diferentes: p22 y Duox. La subunidad p22 activa a Nox1, Nox2 y Nox4, por lo que al afectar la expresión en teoría disminuiría también la actividad de las NADPH oxidasas antes mencionadas.

4.3.1 Inyección del morfolino p22

Para analizar si las NADPH oxidasas Nox1, Nox2 y Nox 4 son importantes para la migración celular durante la epibolia en embriones de pez cebra, se inyectó el morfolino p22, el cual afecta el splicing del ARNm de la subunidad p22, y en teoría disminuye la expresión de la subunidad p22, lo cual en principio debería de afectar la activación de tres NADPH oxidasas (Figura 1). El MO p22 se inyectó en embriones recién fertilizados antes de que formaran la primera célula y posteriormente se analizó la morfología de los embriones durante la etapa de epibolia, que comprende desde la etapa de esfera que es el inicio de la epibolia, hasta las 72 horas. Se tomaron fotografías en el microscopio de campo claro de algunas de las etapas más representativas como se observa en la Figura 11. En la Figura 11A se muestran embriones representativos de la inyección con el MO Std Ctrl, y en la figura 11B se muestran embriones inyectados con el MO p22. Se observa que tanto el embrión inyectado con el Morfolino estándar control (MO Std Ctrl) como el inyectado con el MO p22 no presentan diferencias morfológicas visibles en las diferentes etapas.

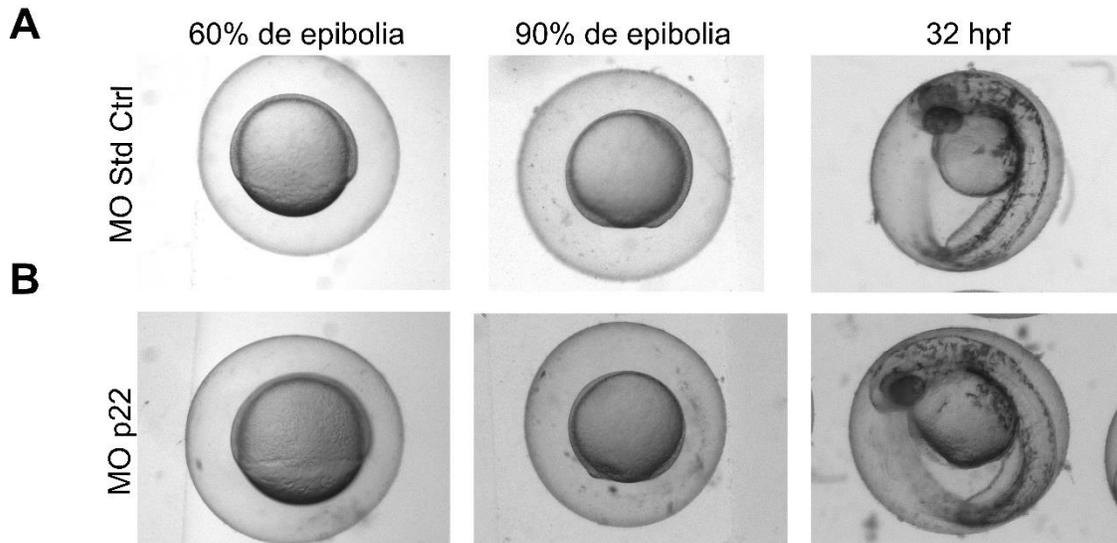


Figura 11. Inyección del MO p22. A) Embriones inyectados con el MO Std Ctrl a una concentración de 7.5ng, se adquirieron imágenes en las etapas de 60 y 90 % de epibolia y a las 32 hpf. B) Embriones inyectados con el MO p22 a una concentración de 7.5 ng.

4.3.2 Inyección del Morfolino Duox1

Para analizar el posible papel de Duox1 en el proceso de epibolia, se inyectaron embriones recién fertilizados los cuales aún no formaban la primera célula con el morfolino de Duox y posteriormente se analizaron en el microscopio de campo claro. Como se muestra en la Figura 12, los embriones inyectados no presentaron algún efecto evidente durante la epibolia, los embriones se desarrollaron de manera normal al igual que los controles inyectados con el morfolino estándar Figura 12A, lo cual sugiere que no se afecta el proceso de migración celular durante la epibolia. Sin embargo, al analizar los embriones inyectados con el morfolino que afecta la expresión de Duox1 a las 24 horas, se encontró que tienen alto grado de muerte celular localizada en la cabeza y en la cola, además de que observamos que hay anomalías en su morfología además de que la talla de los embriones es más corta (Figura 12B). A las 48 horas se observa una disminución en la cantidad de melanocitos y a las 72 horas comienzan a morir.

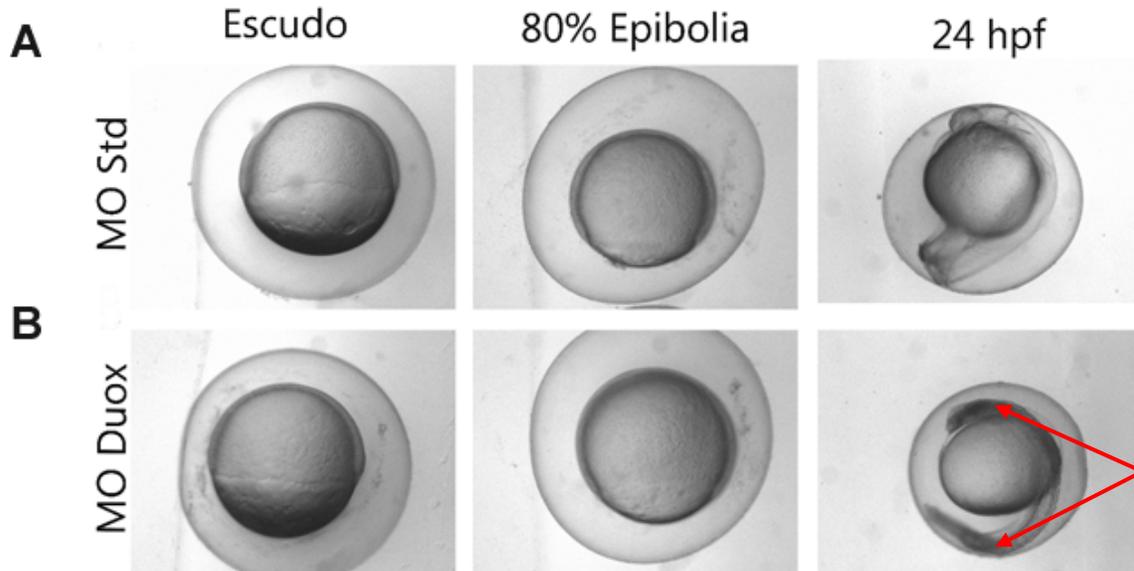


Figura 12. Inyección del MO Duox1. A, Embriones inyectados con el MO Std Ctrl a una concentración de 7.5ng. Se adquirieron imágenes en la etapa de escudo y 80 % de epibolia. B, Embriones inyectados con el MO Duox1 de los cuales se adquirieron las imágenes en diferentes etapas. Durante la epibolia no parece haber ningún defecto morfológico, mientras que a las 24 horas se observa muerte celular localizada en cabeza y cola como se indica con las flechas en color rojo.

4.3.3 Coinyección del MO p22/Duox1

Debido a que observamos que la inyección por separado de los morfolinios p22 y Duox1 no tenía efecto aparente en la epibolia, decidimos coinyectar ambos morfolinios, esperando que al disminuir la actividad de 4 de las 5 NADPH oxidasas en la epibolia, se observara un efecto sumatorio o potenciador parecido o igual al tratamiento con VAS2870. Se hicieron tres repeticiones de la inyección y en la Figura 13 se presentan imágenes con embriones representativos de lo observado en las repeticiones. Observamos que los embriones coinyectados con los morfolinios p22/Duox1 tienen efectos en la migración por epibolia desde la etapa de esfera, lo cual es más evidente cuando los embriones inyectados con el MO Std Ctrl se encuentran en la etapa de escudo, ya que al observar a los embriones inyectados con los MOs p22/Duox encontramos que estos aún se encontraban en la etapa de esfera. Este retraso en la epibolia de los embriones inyectados con los MOs p22/Duox1 persiste durante toda la epibolia como se observa en la Figura 13 en la que los embriones inyectados con el MO Std Ctrl se han desarrollado hasta la etapa de 90% de epibolia mientras que los embriones inyectados con los MOs p22/Duox1 se encuentran en la etapa de 50% de epibolia.

Aproximadamente el 50% de los embriones inyectados con el MO p22/Duox1 sobreviven a las 24 horas, sin embargo, estos embriones presentan deformaciones severas, acortamiento

de la cola, la cabeza tiene un tamaño más pequeño y además se observa muerte celular localizada, como en los embriones inyectados solamente con el MO Duox1.

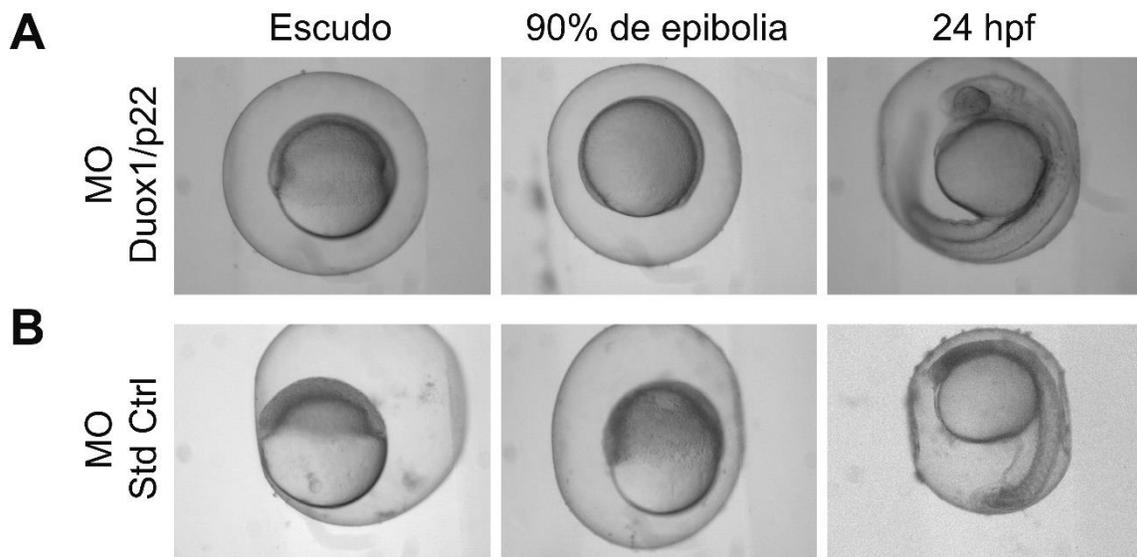


Figura 13. Coinyección del MO p22 y Duox1. A) Embrión representativo el cual fue inyectado con el MO Std Ctrl. Se adquirieron imágenes en etapas de escudo, 90% epibolia y a las 24 hpf. B) Coinyección del morfolino p22 y Duox1 (MO p22/Duox1). Se adquirieron las imágenes al mismo tiempo que los embriones inyectados con el MO Std Ctrl. La coinyección del MO p22/Duox1 tiene efectos en la migración durante toda la epibolia y esto provoca el retraso en los embriones durante la epibolia y a las 24 hpf.

4.4 Análisis del efecto de la incubación en medio con H₂O₂ de embriones inyectados con los morfolidos p22 y Duox1.

Se realizaron tres experimentos independientes, en los cuales se inyectaron embriones con el morfolino Std Ctrl y por otro lado se inyectaron de manera simultánea el MO de p22 y Duox1 en embriones que aún no formaban la primera célula. Estos experimentos se realizaron de esta manera esperando que al inyectar ambos morfolidos en teoría disminuiría la actividad de la mayoría de las NADPH oxidasas, y posiblemente pudiéramos encontrar algún efecto parecido a los observados con el inhibidor VAS2870. Los embriones inyectados se incubaron hasta la etapa de esfera, y una vez en esta etapa, los embriones se separaron en dos grupos. En cada grupo se incluyeron embriones inyectados con el morfolino estándar y embriones coinyectados con el morfolino de p22 y Duox1. El primer grupo de embriones se incubó en medio control con DMSO1%, mientras que el segundo grupo se incubó en medio con H₂O₂ a la concentración de 1 mM. Ambos grupos de embriones se incubaron hasta la etapa de 90% de epibolia (Figura 14A). Una vez que los embriones llegaron a esta etapa, se fijaron y tiñeron

con DAPI, se tomaron fotografías en el microscopio de fluorescencia para posteriormente mediante análisis de imágenes medir el porcentaje de migración por epibolia de la capa envolvente y la profunda. Mediante la prueba estadística oneway ANOVA se verificó si había alguna diferencia significativa. Se hicieron tres comparaciones como se muestra en la Figura 14B. En la primera se compararon embriones inyectados con el morfolino Std Ctrl que se incubaron con medio DMSO 1% contra medio con H₂O₂ 1 mM. En experimentos independientes se observó que en los embriones tratados con H₂O₂, no se afecta la migración celular en dos de los tres experimentos y solo en uno de los tres experimentos encontramos que el H₂O₂ provoca que tanto la CE como la CP migren más rápido, sin embargo, al anidar los resultados de los tres experimentos, se encontró que estas diferencias no son significativas como se muestra en la Figura 14B. En la segunda comparación se encuentran los embriones inyectados con dos morfolinós de manera simultánea (p22 y Duox1) tratados con DMSO al 1% contra tratados con H₂O₂ 1 mM. En este grupo de experimentos encontramos que solo en una repetición experimental del tratamiento con el H₂O₂ se observa un rescate del efecto sobre el retraso en la epibolia que tiene el tratamiento con los dos morfolinós. Al anidar los resultados no se observa un rescate del fenotipo por el tratamiento con peróxido de hidrógeno (Figura 14B). Por último, se resumen los resultados obtenidos en las tres réplicas experimentales en donde se comparan los efectos que tienen la inyección del MO Std Ctrl y los efectos provocados en la epibolia por la inyección simultánea con los morfolinós contra p22 y contra Duox. Estos experimentos sirven como referencia de que la inyección con el MO p22 y MO Duox1 afecta la migración celular en comparación con los embriones inyectados con el MO Std Ctrl los cuales se desarrollan de manera normal, como ya se había mostrado anteriormente.

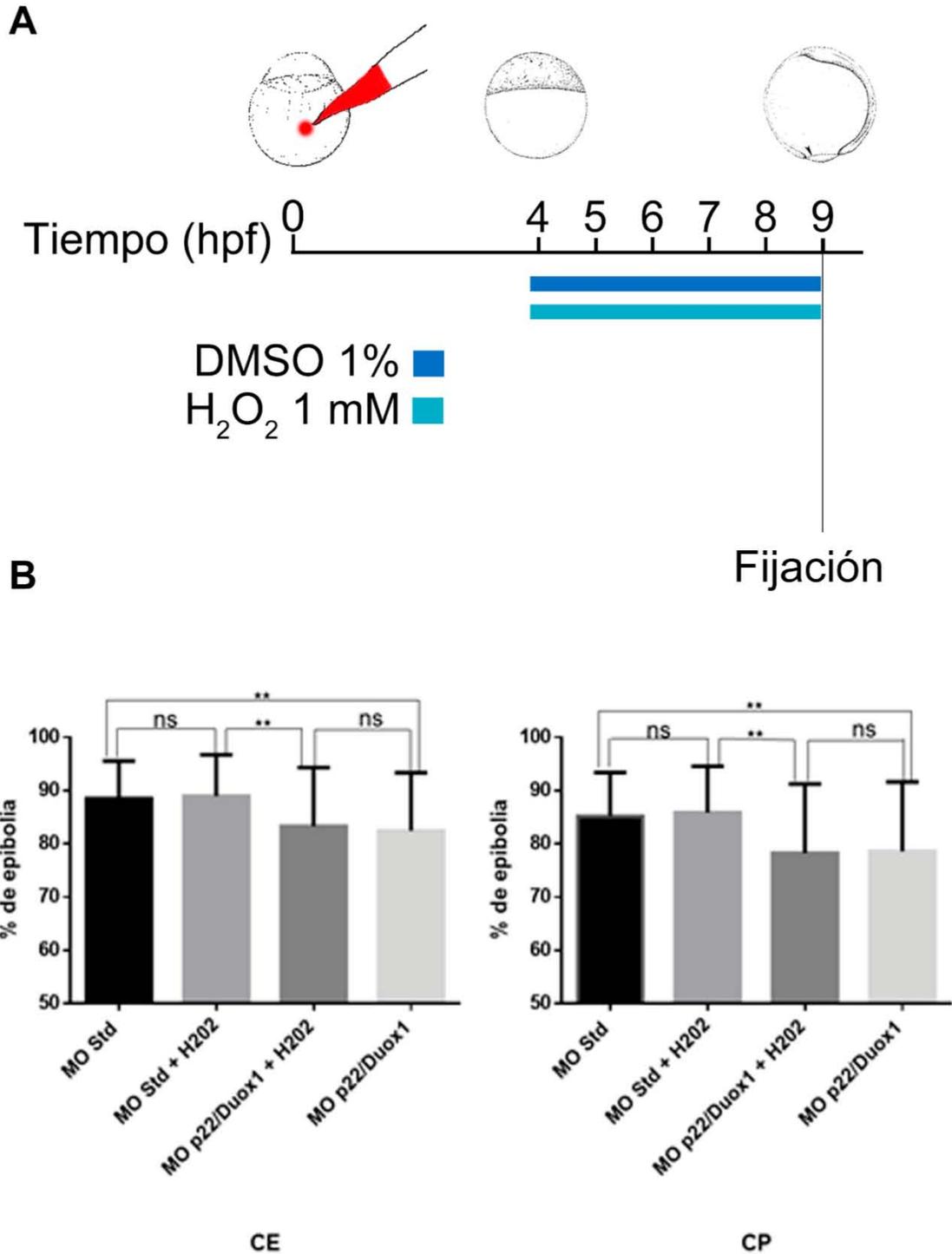


Figura 14. Análisis del efecto de la inyección del MO p22/Duox y el tratamiento con H₂O₂. A) Esquema representativo del rescate con peróxido de hidrógeno de los embriones inyectados con los dobles morfolidos. En la barra de tiempo se indica la inyección del morfolido al tiempo 0, los embriones inyectados se incuban hasta que llegan a la etapa de esfera, en la cual, se dividieron en grupos para tratarlos con DMSO 1% representado en color azul fuerte, o H₂O₂ representado en azul

tenue. B) La gráfica muestra los datos anidados de tres experimentos independientes. Se realizaron tres comparaciones. 1. MO Std Ctrl en medio DMSO 1% vs MO std en medio H₂O₂ 1mM; 2.MO p22+Duox en medio DMSO 1% vs MO p22+Duox en medio H₂O₂ 1 mM; 3.-MO Std Ctrl vs MO p22+Duox. Se realizó la prueba estadística Oneway anova con un valor de p<0.05.

Estos resultados muestran que el efecto de la inyección simultánea con los morfolinós contra p22 y Duox sólo pudo ser rescatado en uno de los experimentos independientes, pero al anidar estos resultados se encontró que este rescate no es reproducible, ya que es estadísticamente significativo al tratar con la concentración de H₂O₂ 1 mM. Como perspectivas de estos experimentos, queda por analizar si concentraciones más elevadas de H₂O₂ como 2.5 mM rescatan estos efectos al igual que en los tratamientos con VAS2870.

4.5 Validación de la efectividad de los morfolinós p22 y Duox1.

Existen varias metodologías para validar que los morfolinós son efectivos para afectar la expresión de los genes de p22 y Duox. Debido a que los dos morfolinós que utilizamos afectan el corte y empalme del pre-ARNm, se realizaron PCRs para evaluar la conversión del ARNm en un ARNm modificado el cual contiene un codón de paro que detiene la traducción prematuramente acorde con lo descrito por la publicación original en donde fueron reportados estos morfolinós (Niethammer et al., 2009). En la Figura 15 se muestran los resultados de la reacción de PCR de los embriones inyectados con los morfolinós p22 y Duox. En la Figura 15A se observa en el primer carril el marcador de pares de bases (PB), en el segundo carril una banda de aproximadamente 280 PB que corresponde al producto de PCR de un fragmento del ARNm de Duox de embriones inyectados con el MO Std y en el tercer carril se observan 2 bandas marcadas con las flechas rojas que corresponden a un fragmento del ARNm modificado de Duox de embriones inyectados con el MO Duox, una de alrededor de 300 PB y otra de 200 PB en las cuales se observa que se afecta el corte y empalme del pre-ARNm.

En la figura 15B se muestra en el segundo carril el amplicón de 550 PB que corresponde a un fragmento del ANRm de p22 de embriones inyectados con el morfolino estándar, y en el tercer carril se encontraron dos amplicones de menor tamaño (400 y 300 PB) en los cuales se afecta el corte y empalme del pre-ARNm de p22.

Estos experimentos sugieren que la inyección de los Morfolinos de p22 y Duox afectan la expresión y la actividad de las enzimas Nox.

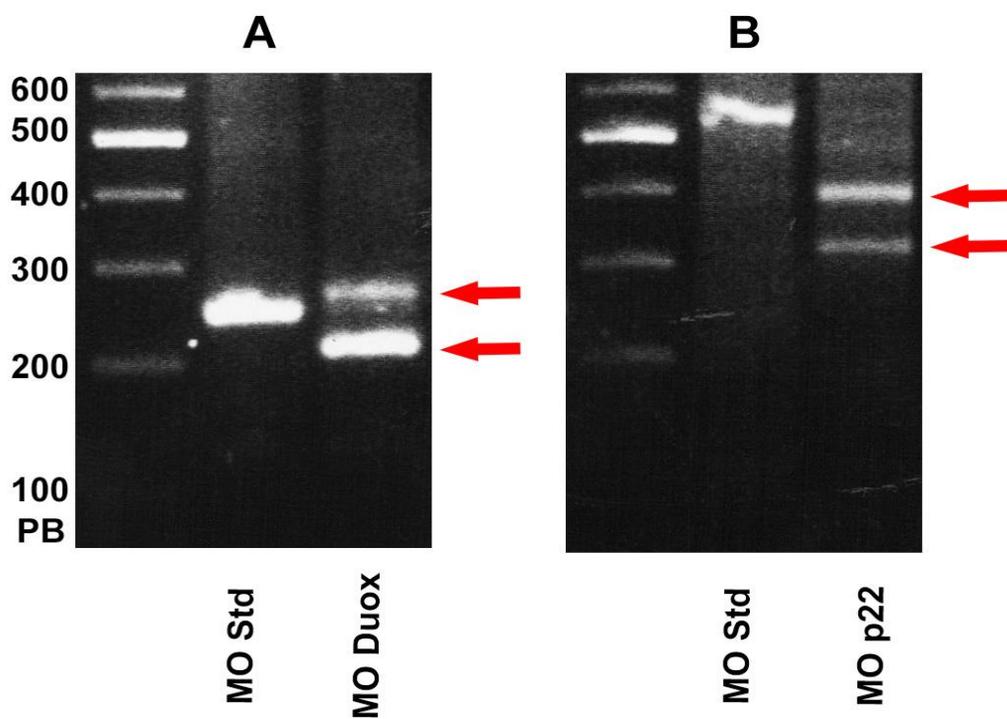


Figura 15. Reacción de PCR para validar los morfolidos p22 y Duox. A) En el segundo carril se observa el amplicón de 280 PB. En el tercer carril se observan dos bandas señaladas con flechas de color rojo que muestran 2 fragmentos de 300 PB y 200 PB. B) En el segundo carril se encontró una banda de 550 PB y en el tercer carril 2 fragmentos de 400 y 300 PB señaladas con las flechas rojas.

DISCUSIÓN

5.1 La inhibición farmacológica de Nox retrasa la migración por epibolia

En años recientes, se han descrito a las ERO (principalmente al peróxido de hidrógeno), como moléculas que actúan como segundos mensajeros, capaces de regular a diferentes blancos intracelulares desencadenando o interactuando con otras vías de señalización (Apel & Hirt 2004) para así regular comportamientos celulares como migración, proliferación, diferenciación y muerte celular. Todos estos comportamientos celulares son importantes para que se lleve de manera adecuada el desarrollo embrionario (Hernández-García et al. 2010). El patrón de localización general de ERO observado durante el proceso de la epibolia (Figura 3) (Mendieta-Serrano et al 2017, Tesis de Doctorado) sugiere que las ERO participan en el proceso de la epibolia. Por lo anterior nos preguntamos ¿cuál es mecanismo responsable de la formación de las ERO observadas? y ¿qué ocurre al inhibir su formación? Una fuente potencial de la generación de las ERO son las enzimas NADPH oxidasas o Nox. Encontramos que al exponer a los embriones de pez cebra a la molécula pequeña VAS2870, que actúa como un inhibidor específico y general de las Nox (ten Freyhaus et al., 2006) , se observa una disminución en la producción de ERO (Mendieta-Serrano et al. 2017, Artículo sometido). En la presente tesis nos preguntamos si la inhibición farmacológica general de la actividad Nox afecta al proceso de la epibolia. Se encontró que el VAS2870 provoca el retraso en la epibolia principalmente de la capa y profunda (CP) y en menor medida de la capa envolvente (CE) (Figura 7). Al afectar el proceso de epibolia hay una alteración en el desarrollo que afectan la morfología y la sobrevivencia de los embriones en etapas posteriores.(Schepis et al. 2012, Köppen et al. 2006)

5.2 El tratamiento continuo con peróxido de hidrógeno rescata los efectos provocados por el inhibidor VAS2870.

El peróxido de hidrógeno está involucrado en varios procesos de transducción de señales. El mecanismo llamado “señalización Redox” incluye la oxidación reversible mediada por H_2O_2 de residuos de cisteína en enzimas y factores de transcripción que alteran sus actividades (Lennicke et al. 2015). El peróxido de hidrógeno participa en varios procesos celulares como proliferación, regeneración celular (Love et al. 2013), migración (Niethammer et al. 2009; Tazuin et al. 2014) y muerte celular (Whittemore et al. 1995)

Tanto el peróxido de hidrógeno como otras especies reactivas de oxígeno tienen efectos pleiotrópicos que dependen de la concentración intracelular e intercelular en la que se encuentran en el organismo. Para rescatar los efectos de la inhibición de las NADPH oxidasas, en los cuales hay una disminución de ERO y efectos en la epibolia, nos preguntamos si al adicionar de manera exógena H_2O_2 se podía compensar los efectos provocados en la epibolia por la inhibición de los genes Nox.

Estudios previos como en la regeneración en renacuajos de *Xenopus tropicalis* a los cuales se les corta la punta de la cola, observaron mediante un sensor de H_2O_2 (HyPer-YFP), que se genera un gradiente de peróxido de hidrógeno, el cual es importante para activar el programa de regeneración. Además, encontraron que el tejido en regeneración mantiene un nivel sostenido de H_2O_2 intracelular a una concentración entre 50 y 200 μM y que la disminución de H_2O_2 mediante tratamientos farmacológicos y genéticos reduce la proliferación e interrumpe la regeneración de la cola del renacuajo. El rescate genético rescata tanto la producción de ERO como la regeneración celular (Love et al. 2013).

En trabajos de migración de neutrófilos en larvas de pez cebra, se inyectó H_2O_2 en la cavidad ótica a una concentración de 10 μM y se observó que hubo un aumento en el número de neutrófilos que migran a la cavidad, mientras que en cortes de cola en los cuales utilizaron el inhibidor de NADPH Oxidasas DPI, rescatan la migración de neutrófilos al sitio de la lesión adicionando H_2O_2 a una concentración de 10 μM (Yoo et al. 2011)

Estos reportes previos, nos sirvieron como antecedentes para que en este proyecto se probaran varias concentraciones de peróxido de hidrógeno (desde 10 μM hasta 1 mM), para analizar si estos tratamientos rescatan a los embriones de los efectos provocados por la inhibición con VAS2870. Encontramos que concentraciones por debajo de 1 mM no rescataron los efectos de la inhibición con VAS2870, mientras que concentraciones arriba de 5 mM de peróxido de hidrógeno, tenían efectos adversos en los cuales se disminuyó la sobrevivencia de los embriones.

Los resultados obtenidos, indican que las concentraciones de peróxido que rescataron los efectos de la inhibición con VAS2870 fueron 1 y 2.5 mM (Figuras 8 y 9). También se probaron las concentraciones 1 y 2.5 mM de H_2O_2 en embriones, sin ningún otro tratamiento, para analizar qué efectos tenían las dos concentraciones de peróxido por sí solas. Observamos

que en algunos embriones se aceleraba el desarrollo durante la epibolia, pero el análisis completo de los experimentos no mostró que este resultado fuera estadísticamente significativo (resultados no mostrados). Esto se debe posiblemente a que el peróxido de hidrógeno adicionado exógenamente sea metabolizado de manera muy eficiente debido a que en las células del embrión están presentes una variedad de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para eliminar el H_2O_2 . Es posible que presente variaciones entre embriones y por ello vemos que en algunos las células migran más rápido.

5.3 El tratamiento con peróxido de hidrógeno posterior al tratamiento con el inhibidor VAS2870 rescataron la migración durante la epibolia.

Para probar que el rescate con peróxido de hidrógeno no se debe a la inactivación del VAS2870 por el H_2O_2 , decidimos hacer tratamientos desfasados. En estos tratamientos utilizamos VAS2870 10 μM durante una hora y posteriormente se retiró completamente el inhibidor y se adicionó inmediatamente el peróxido de hidrógeno a las dos concentraciones antes mencionadas; de esta manera, se buscó que el inhibidor no interactuara con el peróxido, por lo que el rescate observado se debió únicamente a que se compensa la disminución del nivel de H_2O_2 y las vías en que éste actúa (Figura 10). Decidimos hacer el experimento únicamente en la etapa de esfera ya que el tratamiento de VAS2870 por una hora provocó que los embriones se desarrollen hasta la etapa de 40-50% de epibolia; una vez que adicionamos el peróxido de hidrógeno, éste tiene el tiempo suficiente para rescatar los efectos del VAS2870 hasta que los embriones llegan a la etapa de 90% de epibolia, en la cual los fijamos con PFA. Hacer el tratamiento desfasado en etapas posteriores como 50% de epibolia, no permite que los embriones tengan el tiempo suficiente en el medio con H_2O_2 por lo que no se rescata la migración de la CE Y CP.

Adicionalmente, se realizaron pruebas mediante resonancia magnética nuclear para analizar si el peróxido de hidrógeno afecta o modifica la estructura de la molécula del VAS2870 durante las cuatro horas (que es el tiempo de incubación en las cuales el VAS2870 interactúa con el H_2O_2). Como se muestra en la Figura 16, el resultado de este experimento fue que se generaba una mezcla de dos productos, en los cuales el 76% correspondía a la molécula VAS2870 sin modificar mientras que sólo el 24% restante correspondía a la molécula del VAS2870 modificada en su grupo azufre, el cual puede ser susceptible a ser oxidado y

generar un sulfóxido (Mendiata-Serrano et al., sometido). Estos resultados mostraron que un 76 % de la molécula puede seguir activa con la capacidad de inhibir a las NADPH Oxidasas. Sin embargo, no se sabe hasta el momento si el otro 24% del VAS2870 pueda seguir inhibiendo o no a las NADPH Oxidasas

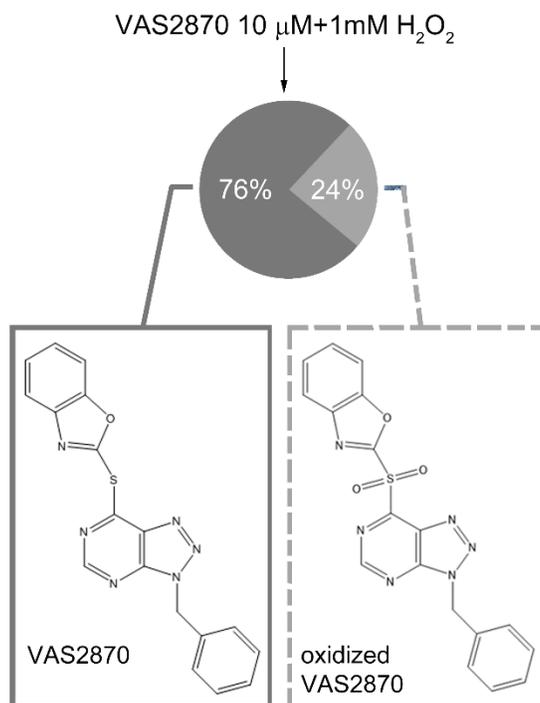


Figura 16. Esquema de la reacción con VAS2870 y peróxido de hidrógeno. En esta figura se muestran las estructuras del VAS2870 y el producto de la reacción entre VAS2870 y H₂O₂. En gris oscuro se representa el porcentaje de VAS2870 sin modificar y en líneas punteadas se representa la molécula del VAS2870 modificada.

5.4 El peróxido de hidrógeno no rescató los efectos provocados por la inyección del doble morfolino de p22 y Duox.

El VAS2870 es un inhibidor general de las Nox, sin embargo, no sabemos si todas las Nox descritas en pez cebra o sólo algunas son responsables de la formación de ERO que participan en el proceso de epibolia. Como una primera aproximación se decidió inhibir la actividad de diferentes Nox por medio del uso de morfolinós. Para inhibir la actividad de Nox1, 2 y 4, usamos el morfolino que inhibe la expresión de p22 que es la subunidad necesaria para la actividad de las tres Nox antes mencionadas, y encontramos que al inhibirla (afectando el splicing del mRNA) no hubo ningún efecto en la epibolia (Figura 11). Por otro lado, la

inhibición del splicing del mensajero de Duox tampoco presentó efectos en la epibolia (Figura 12). En cambio, al inhibir de manera simultánea ambos genes (p22 y Duox1) se afectó la migración por epibolia (Figura 13), lo cual sugiere que diferentes genes Nox participan en la formación de las ERO que regulan la epibolia.

Sin embargo, en la inyección con los dobles morfolinós no se logró rescatar de manera significativa la migración por epibolia de la capa envolvente o de la profunda al tratarlos con el peróxido de hidrógeno (Figura 13). Esto pudiera deberse a que la doble inyección en la cual se afecta la expresión de las NADPH oxidasas desde la transición de la blástula media, es demasiado severa como para poder ser rescatada con la adición de peróxido en la concentración 1 mM. Además, de ello una pequeña variación en la cantidad de morfolino inyectado es suficiente para aumentar la severidad de los efectos observados. Como control de que la inyección funcionó, se dejaron desarrollar algunos embriones hasta las 24 horas, en las cuales la mitad de los embriones debía haber sobrevivido, además de presentar los defectos antes descritos como malformación de la cola y la cabeza y que los embriones presentaban muerte localizada en la cabeza. Lo interesante de estos resultados es que la adición del peróxido de hidrógeno por sí solo no afectó la migración por epibolia, y sólo en algunos casos logró rescatar los efectos provocados por la doble inyección con los morfolinós. Esto sugiere que debemos seguir probando concentraciones más bajas del doble morfolino y además probar concentraciones más altas de peróxido de hidrógeno. También es importante analizar con mayor detalle lo que sucede con los filamentos de actina y con las adhesiones celulares para ver si alguna de estas vías es afectada por la disminución de ERO. Otra posibilidad es que algunos de los efectos observados por los tratamientos con morfolinós sean inespecíficos y éstos no se pueden rescatar por el tratamiento con el peróxido de hidrógeno.

5.5 Validación de la eficiencia de los morfolinós

En la literatura se han reportado diferentes anticuerpos con los cuales se detecta la presencia de las diferentes Nox en humano y en otras especies. En pez cebra no se han reportado anticuerpos que detecten específicamente a las NADPH oxidasas. Hasta el momento sólo hemos probado dos anticuerpos que detectan las proteínas p22 y Duox1 de humano en pez cebra. En ensayos de “Western blot” encontramos varias bandas, lo cual sugiere que los

anticuerpos no son tan específicos. Hasta el momento, en la literatura no se ha reportado el uso de anticuerpos para p22 (cyba) o Duox1 en pez cebra, los cuales podrían ser usados para validar la eficiencia de los morfolinós mediante Western blots o inmunotinciones. Algunas veces los anticuerpos producidos para reconocer proteínas en otros organismos como conejo y ratón son usados en pez cebra para hacer inmunohistoquímica. Sin embargo se debe validar la especificidad de los morfolinós mediante ensayos de competencia y western blot. Debido a que no hay anticuerpos que reconozcan específicamente a p22 y Duox1 en pez cebra y además los morfolinós que se usaron en este proyecto afectan el corte y empalme del pre-mRNA esto puede ser verificado por PCR ya que al verse afectado el corte y empalme se espera que se formen transcritos más pequeños que pueden detectarse por medio de una reacción de PCR, en la cual genera un amplicón de menor tamaño comparado con el control. Ana Hutennlocher y colaboradores (Niethammer *et al.*, 2009) reportaron que el morfolino de p22 generaba una banda de aproximadamente 255 pb en comparación con el control en el cual se generaba un amplicón de alrededor de 300 pb (Figura 17B). Nosotros encontramos que se generaron las bandas reportadas y además que se formó una banda adicional de mayor tamaño en los tratamientos con el MO p22, la cual no fue reportada por Niethammer (Figura 17B'). Esta banda puede ser generada debido a que podría existir otra isoforma de p22 la cual no haya sido reportada. En ese mismo reporte, los autores utilizaron el MO Duox1 en el cual también se verificó la eficacia del morfolino a través de PCR. Encontraron que en los tratamientos con el MO Duox se formó una banda de menor tamaño (Figura 17A). Sin embargo, en los experimentos realizados por nosotros en el laboratorio, observamos que el tratamiento con el MO Duox1 al igual que el morfolino de p22, generó dos bandas las cuales son de menor tamaño que las generadas por el tratamiento control (Figura 17A'). Cabe mencionar que usamos los mismos oligos para amplificar las regiones que son afectadas por los morfolinós y además se realizaron en las mismas etapas que ya habían sido reportadas.

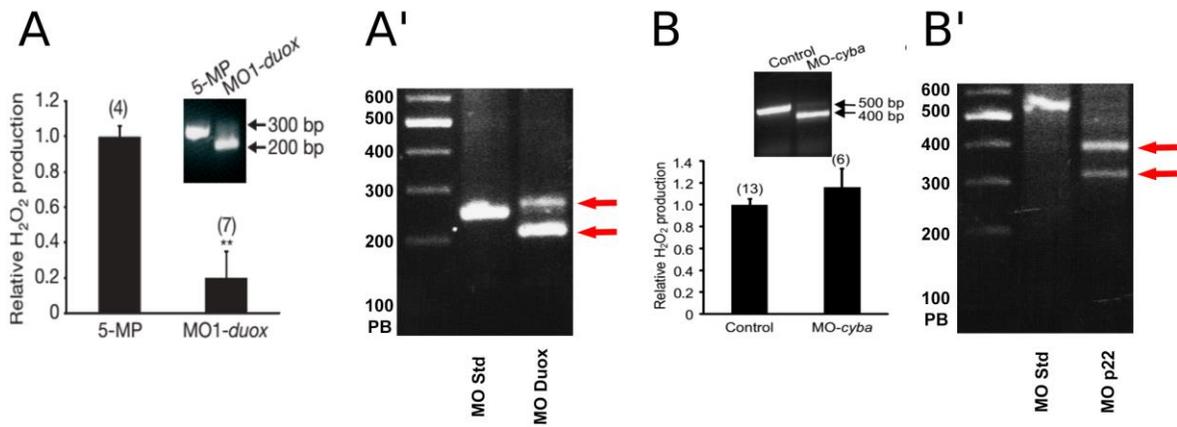


Figura 17. Validación de los morfolidos de Duox1 y p22 por PCR. En esta figura se hace una comparación entre los datos obtenidos mediante la reacción de PCR por (Niethammer *et al.*, 2009)

CONCLUSIONES

- A) Las NADPH Oxidasas son responsables de la formación de ERO en el blastodermo en embriones de pez cebra.
- B) Las ERO generadas a partir de la actividad de las NADPH oxidasas, participan en la regulación de la migración celular durante el proceso de epibolia preferencialmente de la capa profunda.
- C) Ambos tratamientos, el farmacológico y el genético para inhibir la generación de ERO, sugieren que varias Nox participan en la generación de especies reactivas de oxígeno y la regulación de la migración celular durante la epibolia.

PERSPECTIVAS

- Identificar los genes Nox que se expresan durante el desarrollo temprano del pez cebra y caracterizar sus patrones de expresión espacio-temporal.
- Generar mutantes en los genes Nox que tienen una expresión temprana para determinar cuáles genes son responsables de la formación de ERO importantes en la epibolia.
- Identificar los blancos de las ERO que participan en el control de la epibolia.
- Analizar si existe algún sensor molecular que media los efectos regulados por las ERO.

REFERENCIAS

- Apel, K. & Hirt, H., 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), pp.373–399. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>.
- Babior, B.M., 2014. NADPH Oxidase: An Update. , pp.1464–1476.
- Bedard, K. & Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), pp.245–313. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237347>.
- Bensch, R. et al., 2013. Non-directional radial intercalation dominates deep cell behavior during zebrafish epiboly. *Biology open*, 2, pp.845–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3744077&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Berlett, B.S., 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), pp.20313–20316.
- Bill, B.R. et al., 2009. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish*, 6(1), pp.69–77. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2776066&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Boivin, B., Yang, M. & Tonks, N.K., 2010. Targeting the reversibly oxidized protein tyrosine phosphatase superfamily. *Sci Signal*, 3(137), p.pl2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20807953>.
- Brandes, R.P., Weissmann, N. & Schröder, K., 2014. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free radical biology & medicine*, 76, pp.208–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25157786>.
- Van Buul, J.D. et al., 2005. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*, 7(3–4), pp.308–317. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15706079.
- Cadenas, E. & Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine*, 29(3–4), pp.222–230.
- ten Freyhaus, H. et al., 2006. Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation. *Cardiovascular research*, 71(2), pp.331–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16545786> [Accessed October 15, 2014].

- Gao, H. et al., 2015. Mecp2 regulates neural cell differentiation by suppressing the Id1-Her2/Hes5 axis in zebrafish. *Journal of cell science*, 128(12), pp.2340–2350. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/128/12/2340.abstract?ct=ct>.
- Giannoni, E., Taddei, M.L. & Chiarugi, P., 2010. Src redox regulation: again in the front line. *Free radical biology & medicine*, 49(4), pp.516–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20434540>.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J., 2006. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology*, 72(11), pp.1493–505. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16723122>.
- Hernández-García, D. et al., 2010. Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free radical biology & medicine*, 49(2), pp.130–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353819> [Accessed October 14, 2014].
- Hurd, T.R., DeGennaro, M. & Lehmann, R., 2012. Redox regulation of cell migration and adhesion. *Trends in cell biology*, 22(2), pp.107–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209517> [Accessed October 22, 2014].
- Jaworski, J. et al., 2009. Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron*, 61(1), pp.85–100. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.013>.
- Kimmel, C.B. & Law, R.D., 1985. Cell lineage of zebrafish blastomeres. II. Formation of the yolk syncytial layer. *Developmental biology*, 108(1), pp.86–93.
- Köppen, M. et al., 2006. Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and Drosophila. *Development (Cambridge, England)*, 133, pp.2671–2681.
- Kurosaka, S. & Kashina, A., 2008. Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 84(2), pp.102–122.
- Lauffenburger, D. a & Horwitz, a F., 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84(3), pp.359–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608589>.
- Lennicke, C. et al., 2015. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell communication and signaling : CCS*, 13, p.39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26369938>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4570748>.
- Loosley, A.J. et al., 2015. Describing directional cell migration with a characteristic directionality time. *PLoS ONE*, 10(5).
- Love, N.R. et al., 2013. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful Xenopus tadpole tail regeneration. *Nature Cell Biology*, 15(2), pp.222–228. Available at:

/pmc/articles/PMC3728553/?report=abstract.

- Macdonald, R., 1999. Zebrafish immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 127, pp.77–88.
- Maheswaranathan, M. et al., 2011. Platelet-derived growth factor (PDGF) regulates slingshot phosphatase activity via Nox1-dependent auto-dephosphorylation of serine 834 in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), pp.35430–35437.
- Mendieta-Serrano, M. a et al., 2013. Cell proliferation patterns in early zebrafish development. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 296, pp.759–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554225>.
- Moldovan, L. et al., 2000. Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics. *Circulation research*, 86(5), pp.549–557.
- Moldovan, L. et al., 1999. The actin cytoskeleton reorganization induced by Rac1 requires the production of superoxide. *Antioxidants & redox signaling*, 1(1), pp.29–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899048>.
- Mendieta Serrano, Mario Adán, and Enrique Salas Vidal. *Análisis del papel funcional de la glutatión peroxidasa 4 y de las especies de oxígeno reactivas en el desarrollo embrionario temprano del pez cebra*. n.p.: 2017. TESIUNAM, EBSCOhost (accessed September 13, 2017).
- Mendieta-Serrano, M. a et al., 2013. Cell proliferation patterns in early zebrafish development. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 296, pp.759–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554225>.
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, a T., et al., 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*, 459(7249), pp.996–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2803098&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed July 15, 2014].
- Ostman, A. et al., 2011. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *Journal of biochemistry*, 150(4), pp.345–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21856739>.
- Oteíza, P. et al., 2008. Origin and shaping of the laterality organ in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 135(16), pp.2807–2813.
- Pescatore, L. a. et al., 2012. Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), pp.29290–29300.
- Schepis, a., Sepich, D. & Nelson, W.J., 2012. E-catenin regulates cell-cell adhesion and membrane blebbing during zebrafish epiboly. *Development*, 139(3), pp.537–546.

- Schröder, K. et al., 2007. Nox1 mediates basic fibroblast growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(8), pp.1736–1743.
- Schröder, K. et al., 2012. Nox4 Is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circulation Research*, 110(9), pp.1217–1225.
- Sparaco, M. et al., 2006. Protein glutathionylation in human central nervous system: potential role in redox regulation of neuronal defense against free radicals. *Journal of neuroscience research*, 83(2), pp.256–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385584>.
- Sharma, D. et al., 2005. Role of Fyn kinase in signaling associated with epiboly during zebrafish development. *Developmental Biology*, 285(2), pp.462–476.
- Sharma, D. et al., 2005. Role of Fyn kinase in signaling associated with epiboly during zebrafish development. *Developmental Biology*, 285(2), pp.462–476.
- Taulet, N., Delorme-Walker, V.D. & DerMardirossian, C., 2012. Reactive oxygen species regulate protrusion efficiency by controlling actin dynamics. *PloS one*, 7(8), p.e41342. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3410878&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Tauzin, S. et al., 2014. Redox and Src family kinase signaling control leukocyte wound attraction and neutrophil reverse migration. *The Journal of cell biology*, 207(5), pp.589–98. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4259815&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Thisse, C. & Thisse, B., 2008. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature protocols*, 3(1), pp.59–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18193022>.
- Tovey, S.C. & Taylor, C.W., 2012. Accepted manuscript Journal of Cell Science. , (March 2013).
- Tsai, W. Bin et al., 2005. Role of Yes kinase during early zebrafish development. *Developmental Biology*, 277(1), pp.129–141.
- Ueno, N. et al., 2005. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22 phox-dependent manner: Its regulation by oxidase organizers and activators. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), pp.23328–23339.
- Ueyama, T., Geiszt, M. & Leto, T.L., 2006. Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Molecular and cellular biology*, 26(6), pp.2160–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507994>.
- Ushio-Fukai, M., 2006. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2006(349), p.re8. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16926363> [Accessed September 3, 2014].
- Vaziri, N.D. et al., 2003. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney International*, 63(1), pp.179–185.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J. & Horwitz, a R., 2005. Cell migration at a glance. *Journal of cell science*, 118(Pt 21), pp.4917–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254237> [Accessed May 26, 2014].
- Weaver, C.J., Leung, Y.F. & Suter, D.M., 2016. Expression dynamics of NADPH oxidases during early zebrafish development. *Journal of Comparative Neurology*, 524(10), pp.2130–2141.
- Webb, S.E. & Miller, A.L., 2003. Calcium signalling during embryonic development. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(7), pp.539–51. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838337>.
- Whittemore, E.R. et al., 1995. A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience*, 67(4), pp.921–932.
- Wojtaszek, P., 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *The Biochemical journal*, 322 (Pt 3, pp.681–92. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1218243&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Wu, W.-S. et al., 2006. Reactive Oxygen Species Mediated Sustained Activation of Protein Kinase C {alpha} and Extracellular Signal-Regulated Kinase for Migration of Human Hepatoma Cell Hepg2. *Mol Cancer Res*, 4(10), pp.747–758. Available at:
<http://mcr.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/4/10/747>.
- Yoo, S.K. et al., 2011. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature*, 480(7375), pp.109–112. Available at:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature10632>.
- Yuan, S. & Sun, Z., 2009. Microinjection of mRNA and morpholino antisense oligonucleotides in zebrafish embryos. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (27).