

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Una mutación retroviral en el gen LIMP-II
induce alteraciones durante el desarrollo
embrionario del pez cebra (Danio rerio)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

MAGDA ELENA BARRERA MEDINA

TUTOR: DR. ERNESTO MALDONADO

2007



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Barrera

Medina

Magda Elena

58444109

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

099041140

2. Datos del tutor

Dr.

Ernesto

Maldonado

Olvera

3. Datos del Sinodal 1

Dra.

Maria Cristina

Revilla

Monsalve

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Rosa Estela

Navarro

González

5. Datos del Sinodal 3

Dra.

Marina

Macias

Silva

6. Datos del sinodal 4

M. en I.B.B.

Simón

Guzmán

León

DEDICATORIAS

A mis padres...

Por darme siempre su amor y apoyo incondicional. Porque su fortaleza y valor me dio la oportunidad de ser libre permitiendo que todo esto fuera posible.

A Ernesto...

Por todo tu apoyo, comprensión y paciencia. Por que todo lo que aprendí de ti durante la realización de esta tesis me ha permitido mejorar como estudiante y como persona.

A mi hermano...

Compañero de alegrías y tristezas desde siempre, por tus palabras de aliento. A **Emilio**, un ángel que forma parte de mí y a **Lili** por tu confianza.

A mis tíos...

Angélica Venegas y Ausencio Medina, por todo su cariño y apoyo. A Paola y Sofía a quienes adoro.

A mis abuelitos...

Por cuidarme y quererme. A mi abuelito, por que en cada palabra siempre hubo una enseñanza, la fuerza y confianza para seguir adelante. Y por que eres el mejor ejemplo de amor hacia la vida.

A mis amigos...

A Amalia Sandoval por sostenerme en los momentos más difíciles de mi vida.

A Lucy Reyes por contagiarme tu entusiasmo hacia la vida y dejarme soñar con tigo.

A Claudia Barajas por permitirme crecer junto a ti. Por enseñarme esa otra parte de la vida. Y a tu familia a la que aprecio mucho, gracias por todo su apoyo.

A Teresita Torres y Gerardo Trejo, por estar junto a mí cuando más los necesité. Y a toda la familia por permitirme entrar en sus vidas y compartir su cariño conmigo. Por esas agradables noches en familia.

A Karina Mares por esos momentos mágicos que compartimos juntas.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Silvia, Carlos, Andrés, Cassandra, Aydé, Rodrigo, Valeria y Giovanni, Daniel y a Rocío por hacer del laboratorio un lugar muy agradable: y por todos esos momentos especiales y divertidos que hemos compartido.

AGRADECIMEINTOS

A la Dra. Rosa Navarro

Por el apoyo que me brindaste durante mi estancia en el laboratorio.

A Cristina Revilla

Por estar siempre que te he necesitado y por que he aprendido cosas muy valiosas de ti que me permitieron llegar a este momento.

A la Dra. **Marina Macias** y al M en I.B.B. **Simón Guzmán** por aceptar ser mis sinodales brindándome un poco de su tiempo para la revisión de esta tesis.

A Elidia Loredo y Miguel Ángel Palomino

Por los buenos momentos que hemos compartido. Por su paciencia y sus consejos durante todo este tiempo y por que se que siempre contare con ustedes.

A Andrés Porta

Por toda la ayuda que me ha brindado desde que llegue a la facultad. Porque sus palabras me han alentado a mejorar.

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE ESTUDIO.....	4
1.2 EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA.....	7
1.2.1 Periodo de cigoto (0 - $\frac{3}{4}$ hpf)	7
1.2.2 Periodo de división ($\frac{3}{4}$ - $2\frac{1}{4}$ hpf).....	7
1.2.3 Periodo de blástula ($2\frac{1}{4}$ - $5\frac{1}{4}$ hpf).....	8
1.2.4 Periodo de gástrula ($5\frac{1}{4}$ -10 hpf).....	10
1.2.5 Periodo de segmentación (10 - 24 hpf).....	10
1.2.6 Periodo de farínula (24 - 48 hpf).....	12
1.2.7 Periodo de eclosión (48 - 72 hpf).....	12
1.2.8 Periodo de larva temprana.....	13
1.3 FUNCIÓN Y ESTRUCTURA DE LA NOTOCORDA.....	14
1.3.1 Función de la notocorda	14
1.3.2 Formación y estructura de la notocorda.....	18
1.3.3 Mutaciones que afectan la estructura de la notocorda.....	20
1.4 LOS LISOSOMAS Y LA PROTEÍNA INTEGRAL DE MEMBRANA LISOSOMAL II (LIMP II).....	22
1.4.1 Los lisosomas.....	23
1.4.2 La membrana lisosomal y sus proteínas.....	25
1.4.3 Características y función de LIMP II.....	26
1.5 MUTAGÉNESIS INSERCIONAL EN PEZ CEBRA.....	32
2. HIPÓTESIS.....	38
3. OBJETIVO GENERAL.....	38
4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
5.1 Mantenimiento de una colonia de peces cebras.....	39
5.2 Genotipificación de la cepa hi1463 de pez cebras.....	40
5.2.1 Obtención de la biopsia de la aleta caudal.....	40
5.2.2 Reacción de PCR.....	41
5.2.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	41
5.3 Observación <i>in vivo</i> , microscopía Nomarki y fotografía de embriones y larvas de pez cebras.....	42
5.3.1 Observaciones de las diferencias estructurales entre embriones silvestres y mutantes con el microscopio estereoscópico.....	42

<i>Embriones en estadio de esfera y anillo embrionario (5-6 hpf)</i>	42
<i>Alteraciones morfológicas en el cerebro (28 hpf)</i>	42
<i>Larvas silvestres y homocigos de primero, segundo, tercero y quinto día de desarrollo</i>	43
5.3.2 Observación de la estructura de la notocorda con óptica Nomarski.....	43
5.4 Aislamiento de RNA total de embriones y larvas de pez cebra.....	44
5.5 Cuantificación de ácidos nucleicos (RNA).....	45
5.6 Síntesis del cDNA por reverso transcripción (RT-PCR).....	45
5.7 Reacción de PCR.....	46
5.8 Electroforesis en geles de agarosa.....	47
6. RESULTADOS	
6.1 Identificación de peces portadores de la inserción retroviral.....	48
6.2 Alteraciones en estadios tempranos del desarrollo embrionario en pez cebra.....	50
6.3 Alteraciones en estadios tardíos de desarrollo embrionario en pez cebra.....	53
6.4 Estructura de la notocorda de larvas homocigas del gen LIMP II.....	55
6.5 Expresión del gen LIMP II en diferentes estadios de desarrollo.....	58
7. DISCUSIÓN	62
8. CONCLUSIONES	66
9. PERSPECTIVAS	67
10. ANEXO 1	68
11. BIBLIOGRAFÍA	70
ÍNDICE DE FIGURAS	
Figura 1.....	9
Figura 2.....	15
Figura 3.....	16
Figura 4.....	19
Figura 5.....	20
Figura 6.....	27
Figura 7.....	49
Figura 8.....	51
Figura 9.....	52
Figura 10.....	54
Figura 11.....	55
Figura 12.....	56
Figura 13.....	57
Figura 14.....	58
Figura 15.....	60
Figura 16.....	61

ABREVIATURAS

Abs: absorbancia
ADAMTS: dominio de metaloproteasas y desintegrinas (desintegrin and metalloprotease domain)
AP: proteína adaptadora (adapter protein)
BMP: proteína morfogenética del hueso (protein morphogenetic bone)
cDNA: copia del ácido ribonucleico
DA: aorta dorsal
DEPC: dietilpirocarbonato
DES: dietilstilbestrol
Ehh: Equidna hedgehog
FP: placa basal (floor plate)
dT: oligo dT
emp: proteína de membrana epitelial (epithelial membrane protein)
dH₂O : agua pura grado Milli Q
dH₂O-DEPC: agua pura grado Milli Q preparada con dietilpirocarbonato
dNTPs: Deoxi-Nucleótidos Trifosfatados
E: Aminoácido Acido glutámico
ENU: etilnitrosourea
EVL: capa envolvente (enveloping layer)
E-YSL: capa sincicial vitelina externa (E-YSL: external-yolk syncytial layer)
FAT: translocasa de ácido graso (fatty acid translocase)
F: Aminoácido fenilalanina
FGF2: factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factor 2)
g: gramos
hpf: horas post-fertilización
I-YSL: capa sincicial vitelina interna (internal-yolk syncytial layer)
K: Aminoácido lisina
L: litros
LAMPs: proteínas de membrana asociadas a lisosomas (lysosome associated membrane proteins)
LDL: lipoproteína de baja densidad (low density lipoprotein)
LIMPs: proteínas integrales de membrana lisosomal (lysosomal integral membrane protein)
LGPs: glicoproteínas de membrana lisosomal 2 (lysosomal membrane glycoprotein)
MBT: mid-blastula (midblastula transition)
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
ml: mililitros
MoMLV: Moloney Leukemia Virus
mM: milimolar
mRNA: ácido ribonucleico mensajero
MPRs: receptores manosa-6 fosfato (mannose phosphate receptor)
nm: nanómetros
NO: notocorda
NT: tubo neural
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PK: proteinasa K
PVC: vena pericardial
ppm: partes por millón

Q: Aminoácido Glutamina
RT-PCR: reverso transcripción por PCR
R: Aminoácido Arginina
rpp: revoluciones por minuto
Shh: Sonic hedgehog
SR-B1: receptor pepenador clase B-I (scavenger receptor class B-I)
SO: somitas
TBE: Tris-Borato-EDTA
TSPI: trombospodina I (thombospodin-1)
TNG: red trans-Golgi
Thh: Tiggywinkle hedgehog
VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular (vascular endotelial growth factor)
VSV: virus de stomatitis vesicular
VSV-G: vectores MoMLV pseudotipificados con la proteína G del virus de somatitis vesicular
YSL: capa sincicial del vitelo (yolk syncytial layer)
U/ μ l: unidades por microlitro
 μ g: microgramos
 μ l: microlitros
 $^{\circ}$ C: grados centigrados

RESUMEN

Recientemente el pez teleosteo *Danio rerio*, comúnmente conocido como pez cebra, ha sido uno de los organismos modelo favorito de quienes estudian el desarrollo embrionario de los vertebrados. Como vertebrado posee la ventaja de tener un desarrollo externo con embriones transparentes, un tamaño pequeño, tiempo generacional corto (2-3 meses) y la capacidad de producir hasta 200 embriones por pareja por semana. La posibilidad de realizar estudios genéticos en este modelo ha contribuido al conocimiento sobre el papel que juegan los genes durante el desarrollo embrionario; se han utilizado varias técnicas para inducir mutaciones, una de estas es la mutagénesis insercional, con la cual se puede identificar fácilmente el gen responsable de la mutación.

En este trabajo se describe el fenotipo, durante el desarrollo embrionario, de la mutante insercional de pez cebra hi1463. El gen mutado, en condiciones silvestres, codifica para una proteína de membrana lisosomal denominada LIMP II, de la cual hasta ahora no es clara su función. Pertenece a una familia de proteínas denominada CD36/LIMP II, que esta integrada por proteínas de superficie celular y de membrana lisosomal.

Nuestros resultados demuestran que las alteraciones morfológicas en embriones homócigos para la mutación se presentan hasta las 24 horas post-fertilización. Dichas alteraciones se observan en diferentes regiones del cerebro y en el cuerpo de larvas del pez, el cual es curvo debido a la alteración de las células de la notocorda, que al perder su tamaño normal no ejercen presión de turgencia contra la vaina perdiendo así la forma recta, que además altera locomoción. También se observó un retraso en el desarrollo embrionario, reflejado en el tamaño del vitelo así como en la hipopigmentación en estadios tempranos; aun que en estadios tardíos la pigmentación se recuperó, los melanocitos se observaron más extendidos. En el análisis de la expresión del gen, el mRNA se observa en los días 2, 3 y 5 del desarrollo. Estos resultados indican que probablemente el producto de este gen se necesita hasta las 24 horas post-fertilización y que tiene un papel importante en la diferenciación y mantenimiento de la notocorda, y que debido a la alteración que esta presenta, otras estructuras como el cerebro y la vejiga natatoria también están alteradas, ya que la notocorda es un recurso de señalización importante para la formación adecuada de tejidos adyacentes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE ESTUDIO

En Biología del Desarrollo se utilizan algunos organismos como modelos de estudio para entender como un cigoto se transforma en un organismo multicelular funcional (Udvardia et.al. 2003). En años recientes, la aplicación de análisis genéticos en dichos organismos ha transformado nuestro entendimiento en esta área de la Biología, principalmente debido al éxito de la estrategia adoptada por Nusslein- Volhard y Wieschaus para la identificación de los genes que controlan el desarrollo embrionario de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Nusslein-Volhard et.al. 1980). Su enfoque fue simple, ellos analizaron las mutaciones letales embrionarias en la generación F3 de moscas mutagenizadas, sin embargo sus resultados además de ampliar el conocimiento sobre la embriogénesis de *Drosophila*, contribuyeron con nuevas ideas para entender el desarrollo embrionario de otros organismos, desde insectos hasta humanos, a través del descubrimiento de los homólogos de estos genes. Un aspecto clave de la estrategia de Nusslein- Volhard y Wieschaus fue la búsqueda de mutaciones con fenotipos definitivamente claros para identificar aquellos genes que tuvieran un papel único en algún proceso de desarrollo específico; y para estar seguros de que todos estos genes fueron aislados ellos llevaron el análisis a saturación, es decir realizaron el análisis hasta que las únicas mutaciones recuperadas fueran las de alelos de genes identificadas al inicio. Se sabe que varias de estas mutaciones están en genes que codifican elementos de vías de desarrollo específicas, y precisamente es a través de su propio descubrimiento y análisis que la elucidación de estas vías ha sido posible. Se ha encontrado en muchos casos que genes homólogos regulan procesos marcadamente similares en el desarrollo de moscas y vertebrados (Ingham 1997). Pero ¿Por qué el conocimiento sobre la embriogénesis de *Drosophila* no es suficiente para un entender el desarrollo embrionario en vertebrados, si además es complementado por el trabajo embriológico del desarrollo de rana y pollo, y la mutación de genes en ratón?. A pesar de que el mismo conjunto básico de genes identificados en *Drosophila* y las proteínas que cifran están conservados en mamíferos y parecen gobernar importantes procesos de desarrollo en muchos animales superiores (Griffiths et. al. 2002), tal como la conservación de programas genéticos básicos que dirigen la gastrulación, determinación axial y regionalización metamérica entre *Drosophila* y humano, existen varias características nuevas en vertebrados que no están presentes en los invertebrados. Por ejemplo la notocorda, que además de ser un sistema de soporte, genera las señales requeridas para la

diferenciación del sistema nervioso, los huesos y músculos; la cresta neural, las células migratorias del sistema nervioso central, los arcos faríngeos, el sistema nervioso periférico y los melanocitos también parecen ser una invención de vertebrados. Por esto es importante estudiar el desarrollo en un sistema de vertebrados y establecerlo como un sistema genético. El ratón es ideal a este respecto para el estudio de genes que actúan tardíamente, pero su desarrollo intrauterino hace menos accesible la observación del desarrollo temprano (Driever et al., 1996).

En años recientes el pez teleosteo *Danio rerio*, comúnmente conocido como pez cebra, ha sido uno de los organismos modelo importante para el estudio del desarrollo embrionario de los vertebrados. Como vertebrado, el pez cebra tiene la ventaja de desarrollo externo con embriones transparentes, así que los estados de desarrollo tempranos son accesibles. Además tiene un gran potencial como modelo genético debido a su pequeño tamaño, lo cual permite el mantenimiento de un gran número de individuos con un tiempo generacional relativamente corto (2 - 3 meses) y la producción de más de 200 embriones por hembra por semana (Barut et al. 2000). Los embriones se desarrollan rápidamente, con el primer latido del corazón y eritrocitos visibles a las 24 horas. Otra ventaja es que en contraste con otros peces, los cuales pueden ser triploides o tetraploides, se mantiene en estado diploide haciendo su análisis genético más accesible (Wixon 2000).

La caracterización inicial del pez cebra, realizada por George Streisinger y colaboradores (Gruwald et al. 1992; Streisinger et al. 1981; Streisinger et al. 1986) sentó las bases para su uso en los estudios de genética, que con la combinación de exámenes fenotípicos así como la facilidad de inducir mutaciones en los estadios tempranos del desarrollo embrionario dieron lugar a la realización de proyectos de mutagénesis a gran escala; de esta manera la mutagénesis a saturación en vertebrados fue posible (Barut et al. 2000). Para finales de 1996, los grupos de Nusslein-Volhard y Wolfgang Driever reportaron los resultados del primer análisis mutacional sistemático del pez cebra en una publicación especial de la revista *Development* (Volumen 123). Ellos identificaron 6647 mutaciones, que provocaron defectos morfológicos durante los periodos de desarrollo embrionario investigados. Alrededor de 2000 de esas mutaciones fueron particularmente interesantes debido a los defectos específicos que produjeron en los órganos, y por esta razón los portadores de esa mutación fueron mantenidos para futuros análisis (Ingham 1997). La mutagénesis en el pez cebra provee el enfoque: “primero el fenotipo” (genética clásica) para el descubrimiento del gen, complementario al enfoque de “primero los genes” (genética reversa) de las técnicas de clonado, substracción o secuenciación de cDNA parcial al azar (Driever et al. 1996).

El enfoque de mutagénesis a saturación en todo el genoma es nuevo en los vertebrados. Su premisa es que la mutación de genes únicos podría producir fenotipos informativos con respecto a los pasos del desarrollo. Su postulado es que con esto será más fácil resolver un rompecabezas cuando las piezas cruciales hayan sido reveladas. Aquí el rompecabezas es el control genético del desarrollo de vertebrados, y las piezas son todos los genes involucrados. El análisis por mutagénesis a saturación había sido aplicado solo en el estudio de los invertebrados *Drosophila* y *C. elegans* y la planta *Arabidopsis*, debido a que el gran número de animales necesarios lo hace prohibitivamente caro para la mayoría de los organismos vertebrados que son modelos actualmente, excepto para el pez cebra (Driever et. al. 1996).

Las mutagénesis en gran escala han producido muchos mutantes de pez cebra que exhiben varios desordenes tanto en el desarrollo embrionario como fisiológicos. Estos desordenes incluyen hemofilia, anemia, Porfiria, neuropatías del sistema nervioso periférico y enfermedades del sistema nervioso central (Dodd et. al. 2000). Así la relevancia médica parece ser grande, dando pistas por ejemplo, de como genes únicos regulan la formación de órganos y como causan tanto desordenes degenerativos como congénitos cuando son alterados. Con todo esto y debido a la disponibilidad de nuevas herramientas genéticas, el valor del pez cebra como un modelo para el estudio de las enfermedades humanas ha aumentado. En numerosos estudios se ha demostrado que el genoma del pez cebra será un recurso de fácil acceso para el aislamiento de homólogos de genes humanos, lo cual puede ayudar en el análisis funcional de los genes. El trabajo de Karlovich y Leimer son ejemplos que demuestran la función potencial del pez cebra como modelo para enfermedades humanas (Barut et. al. 2000). Karlovichi et.al. aislaron el gen homologo de la enfermedad de Huntington en el pez cebra e investigaron el papel potencial de este gen en el desarrollo temprano de vertebrados (Karlovich et. al. 1998). Lai et.al. clonaron dos homólogos de pez cebra de enzimas humanas involucradas en la esteroidogénesis, lo cual puede facilitar el estudio de la enfermedad humana asociada al desbalance esteroidogénico (Lai et. al. 1998). El rápido progreso de identificación y mapeo de genes en el pez cebra demuestra el valor de este organismo en el campo de la genómica fisiológica. El continuo desarrollo de las herramientas genéticas para el sistema del pez cebra aumenta probabilidad de identificar la función de nuevos genes descubiertos y determinar su relevancia en las enfermedades humanas (Barut et. al. 2000, Dodd et. al. 2000, Driever et. al. 1996, Uvadia et.al. 2002).

1.2 EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA

Los huevos del pez cebra son telolecicos, es decir, que la mayor parte del huevo está ocupada por el vitelo. Las divisiones celulares sólo toman lugar en el blastodisco, una delgada región de citoplasma libre de vitelo en el polo animal, y no lo dividen completamente, por eso son llamadas divisiones meroblásticas. Ya que solo el blastodisco llega a formar el embrión, este tipo de división meroblástica es llamada discoidal (Gilbert 2003).

El desarrollo embrionario del pez cebra se divide en varios periodos y estos a su vez en estadíos. En cada estadío se destacan los principales cambios originados de los procesos de desarrollo embrionario que ocurren durante los tres primeros días después de la fertilización. Los estadíos y sus nombres están basados en características morfológicas, generalmente para una rápida identificación a través de la observación de embriones vivos en el microscopio estereoscópico. La serie de estadíos es una herramienta que proporciona precisión en los estudios de desarrollo. Esto es porque diferentes embriones, aun que sean de la misma puesta, se desarrollan a tazas ligeramente deferentes (Kimmel et al. 1995).

1.2.1 Periodo de cigoto: 0 – $\frac{3}{4}$ hpf (horas post-fertilización)

Este periodo abarca desde el momento de la fertilización hasta que ocurre la primera división. Las corrientes de calcio iniciadas en la fertilización, estimulan la contracción del citoesqueleto el cual coloca el citoplasma no vitelino en el polo animal del huevo. Este proceso convierte el huevo esférico en una estructura en forma de pera con un blastodisco apical (Fig.1 B) (Gilbert 2003). El corion, que rodea el huevo recién fertilizado, aumenta su tamaño alejándose de el (Fig.1 A) (Kimmel et. al. 1995).

1.2.2 Periodo de división: $\frac{3}{4}$ – 2 $\frac{1}{4}$ hpf

Este periodo comprende los estadíos de 2, 4, 8, 16, 32 y 64 células. La primera división celular es seguida de un patrón altamente reproducible de divisiones meridionales y ecuatoriales. Las divisiones son rápidas, tomando alrededor de 15 minutos cada una. Un subgrupo de blastomeras, de acuerdo al estadío, permanece conectado por puentes citoplásmicos. Este periodo comprende seis divisiones dando lugar a 64 células (Fig.1 C). En el estadío de 16 células se originan tanto las blastomeras centrales (las cuatro más centrales) como las blastomeras marginales (las 12 células restantes que rodean a las 4 centrales). En el estadío de 64 células, por primera vez algunas blastomeras cubren a otras. Cada una de las células que quedan cubiertas, llamadas células

profundas, se originan de una de las dos blastomeras hijas, de las cuatro blastomeras centrales, que estaban presentes en el estadio de 32 células. Las otras blastomeras hijas permanecen superficiales, en la hilera más superior, formando la capa envolvente (EVL: enveloping layer). Las blastomeras marginales dan lugar a dos EVL, y en una vista de frente en este estadio se ven tres hileras de células de EVL (Kimmel, et al. 1995).

1.2.3 Periodo de blástula: 2 ¼ - 5 ¼ hpf

Este periodo comprende los estadios de 128, 256, 512, 1000 células, “high”, “oblong”, esfera, domo y el de 30% de epibolia. Dura hasta el inicio de la gastrulación. El blastodisco comienza a verse como un balón (Kimmel et. al. 1995). El embrión entra a la transición de midi-blastula (MBT: midiblastula transition) al décimo ciclo de división (512 células) en donde inicia la transcripción cigótica, las divisiones celulares se hacen lentas y los movimientos celulares de las células profundas se hacen evidentes (Fig.1 D). En este momento se pueden distinguir tres poblaciones celulares distintas: la capa sincicial del vitelo (YSL: yolk syncytial layer), la EVL y las células profundas. La YSL se forma en el noveno o décimo ciclo celular cuando las células marginales sufren un colapso liberando su citoplasma y núcleos hacia el vitelo adyacente. Después de la formación de la YSL, las células de la EVL que estaban en la segunda hilera del blastodisco ahora yacen en la porción marginal. Primero la YSL tiene la forma de un aro de núcleos justo en el borde del blastodisco, pero pronto se extiende debajo del blastodisco formando un sincicio interno completo, la capa sincicial vitelina interna (I-YSL: internal-yolk syncytial layer). En esta posición, entre las células embrionarias y el vitelo, la I-YSL podría estar jugando un papel nutritivo. Otra porción de esta, la E-YSL (E-YSL: external-yolk syncytial layer), es transitoriamente externa al borde del blastodisco durante la epibolia, la cual en el teleosteo *Fundulus* parece ser el principal motor de la epibolia. (Gilbert 2003, Kimmel et al. 1995). La epibolia, que comienza en la blástula tardía, es el adelgazamiento y expansión tanto de la YSL como del blastodisco sobre el vitelo. El vitelo cambia de forma, la superficie de I-YSL o domo se dirige hacia el polo animal, siendo esto esta la señal más clara del comienzo de la epibolia. La epibolia continúa durante la gastrulación (ciclo 14) (Kimmel et al. 1995).

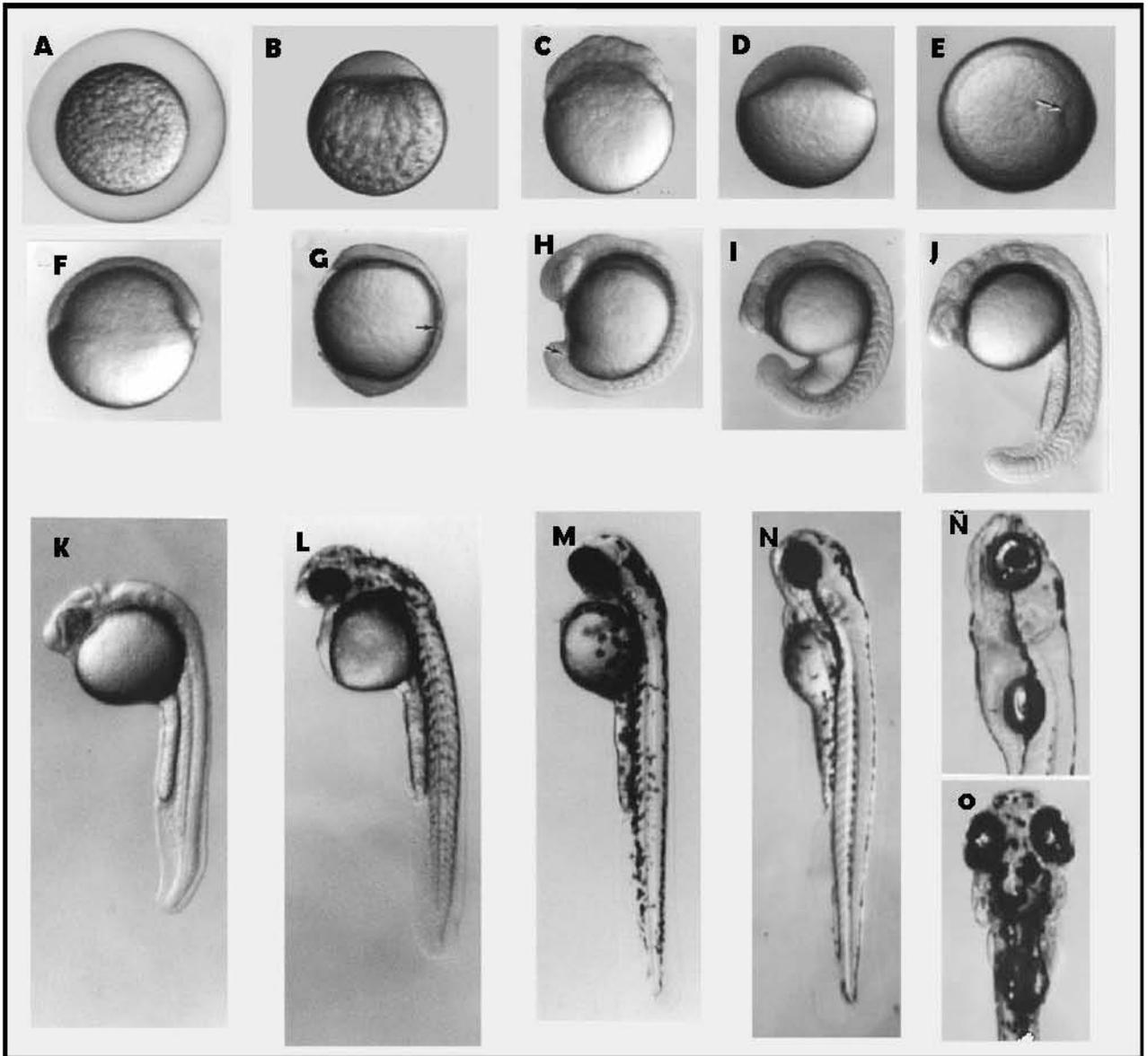


Figura 1. Estadios de desarrollo del pez cebra. Vista lateral. (A) Huevo recién fertilizado protegido por el corion. (B) Cigoto de una célula. Toma la forma de una pera debido a los movimientos citoplásmicos. (C) Cigoto de 64 células. Las células son más pequeñas que en estadios anteriores. (D) Embrión en estadio de domo. El domo se dirige hacia el polo animal. (E y F) Embrión en estadio de escudo embrionario, el escudo en (E) se indica por la flecha. Vista sobre el polo animal, en (F) es una vista lateral. (G) Embrión en estadio de dos somitas, indicadas por la flecha. (H) Estadío de 13 somitas. Las somitas comienzan a tomar una forma de “V” y la cola llega a ser más prominente. (I) Estadío de 17 somitas. La placa óptica comienza a hundirse y la extensión del vitelo se ve bien delimitado. (J) Estadío de 25 somitas. El telencéfalo es prominente dorsalmente hacia la parte anterior del eje neural. (K) Embrión en estadio de prim 5 (24 hpf). El cerebro está formado, comienza la melanogénesis. (L) Estadío de prim 12. Los melanóforos se extienden hacia atrás y hacia el vitelo. (M) Larva en estadio de “high-pec” (42 hpf). Los pigmentos de extienden a todo lo largo del embrión. (N) Larva en el periodo de eclosión, en el estadio de “pec-fin” (60 hpf). (N y O) Larva temprana (120 hpf).

1.2.4 Periodo de gástrula: 5 ¼- 10 hpf

Este periodo esta integrado por los estadios de 50% de epibolia, anillo germinal, escudo embrionario, 75% y 90 % de epibolia y el estadio de brote. Durante el periodo de gástrula la epibolia continúa e inician los movimientos celulares morfogénicos de involución, convergencia y extensión que producen las capas embrionarias primarias y los ejes embrionarios. El comienzo de la involución define el inicio de la gastrulación, lo cual ocurre en el 50 % de epibolia. Como consecuencia, a los pocos minutos de alcanzar el 50% de epibolia, aparece una espesa región marginal denominada anillo germinal (Fig. 1E y F) alrededor del borde del blastodermo. Los movimientos de convergencia producen una acumulación local de células en una parte del anillo germinal, llamada escudo embrionario. Durante estos eventos la epibolia se detiene, pero después de que se forma el escudo continúa; el margen del blastodermo avanza alrededor del vitelo cubriéndolo completamente (Kimmel et. al. 1995). El anillo germinal está compuesto de una capa superficial, el epiblasto, y una capa interna, el hipoblasto; los movimientos de convergencia entre estas dos capas son las que forman el escudo embrionario indicando el futuro lado dorsal del embrión (Gilbert 2003).

Así mientras las células del blastodermo experimentan epibolia alrededor del vitelo, también están invaginándose hacia el margen y convergiendo hacia la región dorsal anterior y el escudo embrionario. Las células del hipoblasto del escudo embrionario convergen consigo mismas y se extienden anteriormente, eventualmente se reúnen a lo largo de la línea media del hipoblasto. Este movimiento forma el cordomesodermo, precursor de la notocorda. Las células ascendentes del cordomesodermo, células del mesodermo paraxial, son las precursoras de las somitas mesodermales. Movimientos de extensión y convergencia en el epiblasto origina unas presuntas células neurales sobre todo el epiblasto en la línea media dorsal, donde formaran la cresta neural. Las células restantes en el epiblasto formarán el ectodermo (Gilbert 2003).

1.2.5 Periodo de segmentación: 10 - 24 hpf

Este periodo comprende los estadios de 1, 5, 14, 20 y 26 somitas; ocurren una gran variedad de movimientos morfogénicos, las somitas se desarrollan (Fig. 1G), los rudimentos de los órganos primarios son visibles, el brote de la cola es más prominente (Fig. 1H) y el embrión se elonga. Al inicio del periodo los ejes anterior-posterior y ventral-dorsal aun no se observan claramente. Las primeras células se diferencian morfológicamente y aparece el primer movimiento corporal.

La morfogénesis de la cola es más prominente durante este periodo de desarrollo y como la cola se extiende, la longitud total del cuerpo del embrión incrementa rápidamente (Fig. 1 I y J).

Las somitas aparecen secuencialmente en el tronco y en la cola. Las más anteriores se desarrollan primero y más rápido con una velocidad de 3 por hora; y las posteriores después y más lentamente, a una velocidad de 2 por hora a temperatura estándar (28.5 °C). Poco después de la formación de cada somita, en su superficie aparece epitelio. La gran mayoría de las células del interior de las somitas se desarrollarán como miotomo o músculo segmental. Un segundo derivado de las somitas es el esclerotomo que originará cartílago vertebral. Los conductos pronefríticos se desarrollan bilateralmente y bajo el tercer par de somitas. Cada primordio de los conductos pronefríticos, al principio sin lumen, crece cerca de la porción final y en una posición ventral a la extensión del saco vitelino para alcanzar el sitio medio ventral cercano al futuro ano donde el par de conductos funcionaran juntos. El lumen aparece y eventualmente se abren hacia el exterior.

La notocorda se diferencia, también en una secuencia anterior a posterior. Algunas de sus células se hinchan y llegan a ser el elemento estructural de este órgano, mientras otras forman una vaina, una capa epitelial que rodea el órgano.

El endodermo se distingue morfológicamente al comienzo del periodo de segmentación. El epiblasto, ahora exclusivamente ectodermal, sufre una extensiva morfogénesis. Cuando termina la gastrulación, el primordio del sistema nervioso central y la placa neural están ya casi bien delimitados. Ocurre la formación del tubo neural mediante un proceso conocido como neurulación secundaria, por un proceso de cavitación. La parte media de la placa neural forma estructuras ventrales en el tubo neural y la parte lateral de la placa el tubo dorsal. Hasta después de la cavitación, la parte anterior de la quilla neural que formará el cerebro sufre morfogénesis regional. Al comienzo del periodo de segmentación, el cerebro rudimentario parece uniforme a lo largo del cuerpo. Entonces, durante la primera parte del periodo de segmentación aparecen las neurómeras. Las primeras tres son largas. Ellas corresponden a dos subdivisiones cerebrales, el diencéfalo y el telencéfalo en el cerebro anterior, y el mesencéfalo o cerebro medio. Además, los rudimentos de los ojos, el primordio óptico se desarrollan tempranamente de las paredes del diencéfalo. Durante la última parte de este periodo el diencéfalo ventral se expande como primordio del hipotálamo y el primordio de la epífisis aparece. El primordio del cerebro medio se subdivide horizontalmente para formar el cerebro medio dorsal (tectum) y el cerebro medio ventral (tegmentum). Las otras siete neurómeras, terminan como rombómeras, subdividiendo el cerebro posterior. Las neuronas comienzan a diferenciarse (Kimmel et. al. 1995).

1.2.6 Periodo de Farínula: 24-48 hpf

Este periodo lo integran los estadios de prim 5, prim 15, prim 25 y el de “high pec”. Transcurre en el segundo y tercer día de desarrollo embrionario. Hay una organización bilateral evidente, la notocorda esta bien desarrollada y hay un juego completo de somitas que se extienden hacia el final de la cola. El sistema nervioso es hueco y se expande anteriormente. Ocurre una rápida morfogénesis cerebelar del metencéfalo que divide al cerebro en cinco lóbulos (Fig. 1K y L).

El nombre del periodo enfoca la atención a los primordios de los arcos faríngeos. Los arcos faríngeos se desarrollan rápidamente durante el segundo día desde una región primordial que puede ser visualizada ventralmente a la vesícula ótica. De este primordio se desarrollan siete arcos faríngeos, un límite prominente ocurre entre el arco 2 y 3. Este límite es importante porque los arcos anteriores forman la mandíbula y el opérculo, y los arcos posteriores forman las agallas.

Durante las primeras horas del periodo de farínula el embrión continúa el rápido alargamiento que inició a las 15 horas, pero luego la velocidad disminuye abruptamente, entre las 31 y 32 horas. La nueva tasa de alargamiento se mantiene durante todo el resto de la embriogénesis. La cabeza también se alinea con el tronco. La morfogénesis que acompaña al alineamiento acorta la cabeza, en términos absolutos, haciéndola más compacta a lo largo del eje antero-posterior.

Comienza la formación de las aletas, las células pigmentarias se diferencian, el sistema circulatorio se forma y la sensibilidad a estímulos táctiles aparece. Las flexiones de los miotomos individuales, antes descoordinados, ahora son orquestadas en rítmicos movimientos de nado (Kimmel et al. 1995).

1.2.7 Periodo de eclosión: 48-72 hpf

Este periodo se divide en los estadios de long-pec, pec fin y protruding-mouth. Durante este periodo el embrión continúa creciendo, se completa o disminuye considerablemente la morfogénesis de muchos de los órganos, con algunas excepciones notables incluyendo el intestino y los órganos asociados, pero como son estructuras endodermales es muy difícil de observarlos, es más fácil ver el desarrollo de los rudimentos de las aletas pectorales, la mandíbula y las agallas (Fig. 1N).

El desarrollo de la aleta pectoral es una característica usual en este periodo, especialmente para la primera parte. Al inicio los primordios de las aletas son brotes elongados y cada uno contiene una

condensación mesenquimal localizada centralmente que formará la franja de cartílago. El pliegue epitelial distal que cubre el brote, el cual se desarrolla de la cresta ectodermal apical, ahora se expande adentro de la de la propia aleta. Al mismo tiempo se forma un canal circulatorio como un asa continua hacia la base de la aleta alargada, su posición es proximal a la actinotriquia pero distal al cartílago. Este canal desarrollará tanto las arterias como las venas.

Ocurren cambios prominentes en la región faríngea. Durante la primera parte del periodo la pequeña apertura de la boca se localiza en una posición ventral media, entre los ojos, debido al movimiento morfogenético de la mandíbula. Entonces, principalmente durante las últimas doce horas de la embriogénesis, ocurre una dramática reposición de la boca. La morfogénesis de la mandíbula mueve la posición de la boca hacia la parte anterior, y justo hacia el final del periodo de eclosión la boca sobresale más allá de los ojos. Durante el periodo de larva temprana ocurre una rápida morfogénesis de la boca y de la mandíbula. El desarrollo del cartílago en el primordio de la mandíbula también se usa para describir este periodo, especialmente durante la parte final. Los dos arcos faríngeos más anteriores que forman la mandíbula y que están asociados con la estructura de soporte son siempre distintivos de los arcos más posteriores, que en su conjunto se llaman arcos branquiales. El cartílago de los arcos branquiales comienza a desarrollarse morfológicamente aproximadamente medio día después del cartílago de la mandíbula (Kimmel et al. 1995).

1.2.8 Periodo de Larva temprana

Para el tercer día de desarrollo la larva ya eclosionada ha completado la mayoría de su morfogénesis y continúa un rápido crecimiento. Durante los siguientes días ocurren cambios prominentes, tanto la inflación de la vejiga natatoria y como la protrusión anterior-dorsal de la boca. Al mismo tiempo se hacen evidentes las rayas reflectivas de iridióforos, el vitelo se extiende hacia ambos lados. El tubo digestivo se inclina más ventralmente y la extensión del vitelo, que sirve como alimento durante el desarrollo, está casi vacía. Durante el periodo de eclosión los embriones están relajados, en cambio la larva temprana comienza a nadar y mueve la mandíbula, la aleta opercular, las aletas pectorales y los ojos. Se producen respuestas de escape rápido y la búsqueda de alimento (fig. 1Ñ y O) (Kimmel et. al. 1995).

1.3 FUNCIÓN Y ESTRUCTURA DE LA NOTOCORDA

Durante el desarrollo embrionario, la notocorda es el principal tejido que se deriva del organizador y es una de las estructuras que caracteriza al phylum cordata. Es transitoria y tiene dos papeles principales en el desarrollo de los vertebrados. Primero, como una estructura mecánica es el principal elemento esquelético embrionario de vertebrados inferiores, por lo que es importante para la locomoción. Segundo, la notocorda es importante para el desarrollo normal de todos los vertebrados ya que proporciona señales moleculares que forman tejidos adyacentes. Su desarrollo en el pez cebra es relativamente simple; la notocorda, que comprende un único tipo celular, experimenta una serie de eventos característicos de diferenciación marcados por cambios morfológicos evidentes. Debido a los estudios realizados en mutantes de pez cebra nuestro conocimiento sobre la diferenciación notocordal se ha incrementado significativamente (Gong et. al. 2004)

1.3.1 Función de la notocorda

La notocorda, situada debajo del tubo neural, fue considerada un fuerte candidato como productor de señales de diferenciación celular y morfogénesis. Los trabajos embriológicos realizados en pollo, tanto de trasplante como de eliminación de la notocorda, proponen que las características morfológicas de la placa basal dependen de la notocorda y que junto con esta controla el patrón de diferenciación celular a lo largo del eje dorso-ventral del tubo neural (Fig. 2 y 3) Estos trabajos demostraron que la ausencia de notocorda da como resultado la formación anormal tanto de la placa basal como del tubo neural (Cleaver et. al. 2001, Elizabeth et. al. 1993).

La ablación de la notocorda y de la placa basal, previene la diferenciación de motoneuronas y otros tipos celulares neuronales ventrales en pollo. Además los injertos de notocorda o de placa basal a la línea media dorsal del tubo neural suprimen el destino del desarrollo neural dorsal y promueve la formación ectópica de tipos celulares neuronales ventrales (Cleaver et. al. 2001). Estudios similares en el pez cebra demostraron que una señal difusible, que se deriva primero de la notocorda y después de la placa basal, forma el tubo neural. Esta señal difusible fue identificada como la proteína Sonic hedgehog (*Shh*) (Fig. 3). En pez cebra hay tres genes hedgehog expresados en la línea media: *equidna hedgehog* en el cordomesodermo, *tiggy winkle* en la placa basal y *Sonic hedgehog* en ambos (Gong et. al. 2004).

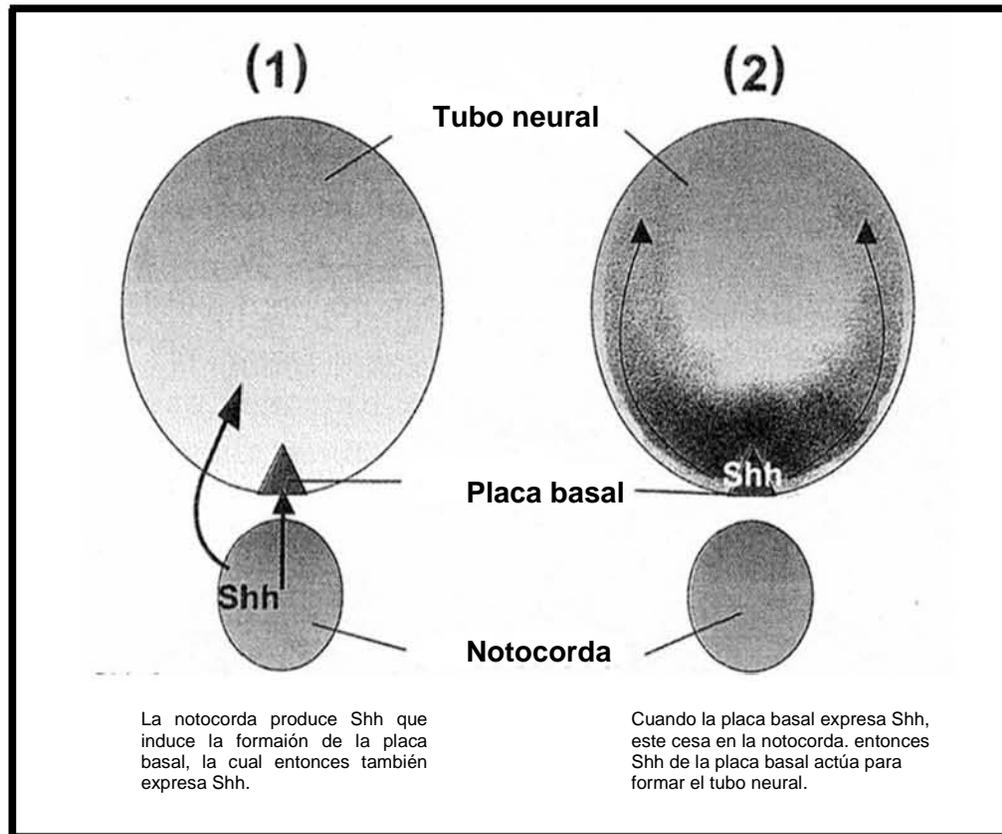


Figura 2. Formación del tubo neural ventral. (1) Proteínas Hedgehog, como Sonic hedgehog (Shh), producidas por la notocorda inducen la palca basal. (2) Una vez que la placa basal se forma, mientras la expresión de Equidna Hedgehog se extingue en la notocorda, Shh y Tiggywinkle hedgehog (Thh) continua expresándose en la placa basal. Esto genera un gradiente de la actividad de Hedgehog en el tubo neural, el cual el cual especifica el destino ventral mientras suprime el destino dorsal.

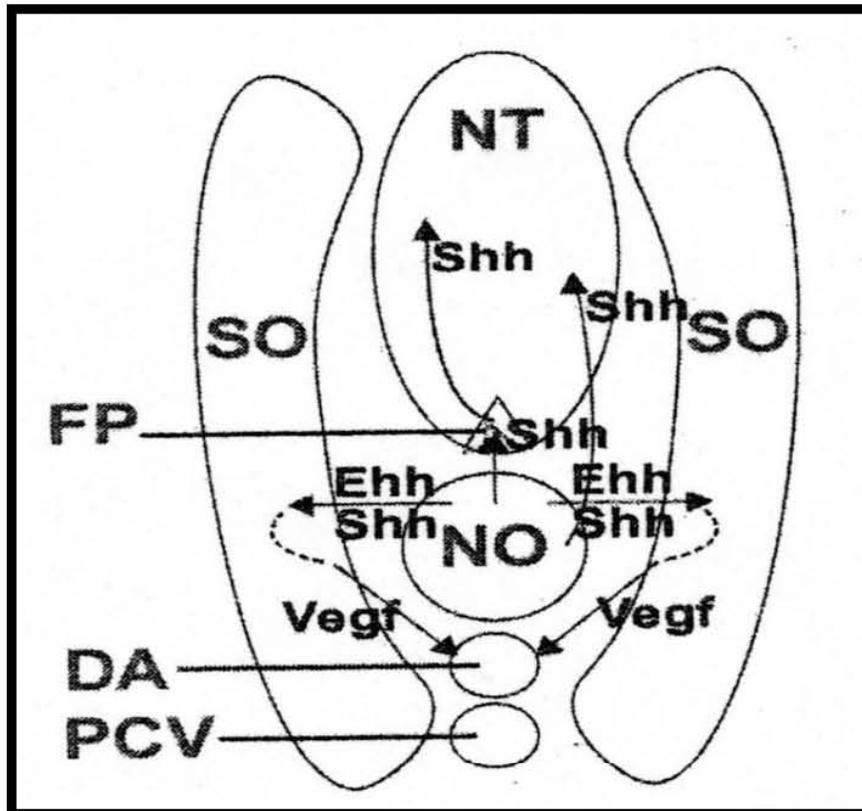


Figura 3. Esbozo de la función de la notocorda para la formación de tejidos adyacentes. Sonic Hedgehog (Shh) desde la notocorda (NO) induce la placa basal (FP). Una vez que la placa basal es inducida, la expresión de hedgehog se extingue en la notocorda, pero se sigue produciendo en la placa basal para formar el tubo neural (NT). Sonic hedgehog (Shh) y Equidna hedgehog (Ehh) también están involucrados en la formación de las somitas (SO), que a su vez producen VEGF en respuesta a estas señales, lo que permite la formación de la aorta dorsal (DA). (PCV: vena pericardinal).

El gen *shh* es esencial para la formación correcta del tubo neural y también para la formación de la placa basal, cuando se bloquea la función de Shh con anticuerpos se previene la formación de la placa basal y causa una formación incorrecta del tubo neural. Explantes de placa neural de pollo tratados *in vitro* con una combinación de *shh* y *cordina*, un antagonista de BMP (proteína morfogenética ósea) normalmente expresada por la notocorda, desarrolló placa basal sugiriendo un mecanismo de inducción de la placa basal. Este modelo consiste en que la notocorda produce cordina para inhibir las BMPs derivadas dorsalmente, generando un medio ambiente permisivo en el cual Shh puede inducir la placa basal (Fig. 3). Si Shh produce centralización y BMPs produce dorsalización, entonces se establece un gradiente de estas dos el cual permite la formación del tubo

neural. Inicialmente Shh se expresa en la notocorda y luego en la placa basal, y en el desarrollo tardío su expresión llega a ser confinada únicamente en la placa basal (Gong et. al. 2004)

Las células adyacentes al cordomesodermo, llamadas células adaxiales, eventualmente expresarán la proteína Engrailed y serán las células pioneras musculares que definen el miosepto horizontal y la forma en “V” de las somitas. En mutantes de diferenciación notocordal, las somitas toman una forma anormal en “U” debido a que fallan en la formación del miosepto horizontal y disminuyen la expresión de Engrailed. Se sugieren dos pasos de control para la expresión de Engrailed en las células musculares pioneras, el primer paso es una señal derivada de la notocorda o del cordomesodermo especificando la expresión de Engrailed en las células pioneras, el segundo paso es una señal derivada de la notocorda necesaria para mantener la expresión de Engrailed en las células pioneras (Gong et. al. 2004, Odenthal et. al. 1996, Stemple et. al. 1996).

También se ha demostrado el papel de la notocorda en el desarrollo del corazón y la vasculatura. La remoción de la región anterior de la notocorda causa un incremento en la expresión del gen *Nkx2.5*, un marcador para la región destinada a ser el corazón, lo cual indica que la notocorda juega un papel importante en la supresión de la formación del corazón, de este modo se define el límite posterior del campo del corazón. Varias líneas de evidencia demuestran el papel de la notocorda en la formación de los vasos sanguíneos principales del tronco. En mutantes *ntl* y *flh*, la aorta dorsal no se forma. El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) es vital para la formación correcta de estos vasos sanguíneos y se cree que es suficiente para la especificación arterial. La sobreexpresión de mRNA *vegf* en embriones de pez cebra origina la expresión ectópica de *eprnb2a* en la vasculatura. La sobreexpresión de *vegf* fue suficiente para rescatar la diferenciación arterial en la ausencia de Shh. En contraste, *vegf* fue incapaz de rescatar los defectos arteriales en mutantes de la vía *notch*. Con estos datos se sugiere un modelo para la formación de vasos sanguíneos en el cual Shh, emitido desde la notocorda, induce la expresión de *vegf* en las somitas y entonces *vegf* actúa en la aorta dorsal, mediada por *notch*, para inducir el desarrollo arterial apropiado (Fig. 3) (Gong et. al. 2004).

La notocorda tiene papeles de instructor en el desarrollo del páncreas y la hipocorda (Cleaver et. al. 2001). En cultivo, el endodermo presuntamente pancreático no expresa marcadores pancreáticos en estas condiciones, los expresarán en presencia de la notocorda. Cuando se cultiva con otro endodermo, los marcadores pancreáticos no son inducidos, sugiriendo que solo la notocorda es capaz de inducir el desarrollo pancreático permisivo en endodermo periconditinoideo. La hipocorda es una estructura transitoria en forma de barra situada inmediatamente ventral a la notocorda. La

hipocorda también expresa altos niveles de *vegf* siendo un importante recurso en el desarrollo de la vasculatura. Así la inducción de la hipocorda dependiente de la notocorda es completada en estados tardíos de neurulación. Además la señal *notch* es esencial para el desarrollo de la hipocorda, y otros candidatos en la inducción de la hipocorda que controlan la señal derivada de la notocorda incluyen *shh*, *activina-βB* y *FGF2* (fibroblast growth factor 2) (Gong et. al. 2004, Cleaver et. al. 2001).

1.3.2 Formación y estructura de la notocorda

La notocorda está formada por una pila de células independientes, cada una de las cuales adquiere una gran vacuola, rodeada por una gruesa vaina de membrana basal. Esta vaina sirve como un límite físico; limita y controla la longitud y forma de la notocorda. La presión de turgencia, generada por la vacuola, es controlada por la vaina fibrosa que da fuerza y rigidez a la notocorda. Las células de la notocorda se diferencian en dirección anterior a posterior. Consecuentemente el cambio en el volumen de las células anteriores empuja a las más posteriores hacia la cola, extendiendo la notocorda. Esta extensión es dirigida por la hinchazón de las vacuolas limitadas por la vaina. Las células notocordales son empujadas hacia la parte posterior, dentro del tubo formado por la vaina originando fuertes asociaciones mecánicas en forma de hemidesmosomas entre las células notocordales, y la vaina no es formada hasta que las células notocordales estén maduras (Fig. 4) (Gong et. al. 2004).

Las micrografías electrónicas de secciones transversales de la notocorda muestran que las fibras están arregladas y corren tanto paralelas como perpendiculares a la notocorda. La notocorda está acoplada mecánicamente a otras estructuras, en posición dorsal a ella está la placa basal, la cual expresa muchas de las mismas proteínas extracelulares, tal como colágena $\alpha 1$ tipo II; ventralmente a la notocorda está la hipocorda que expresa proteínas similares. Estas dos estructuras sirven como cables que corren a lo largo, arriba y debajo de la notocorda, limitándola en el plano horizontal. Así alguna fuerza ejercida en la notocorda por los músculos circundantes dará lugar únicamente a movimientos izquierda - derecha de la cola, consistente con los requerimientos para la locomoción (Fig. 5) (Gong et. al. 2004).

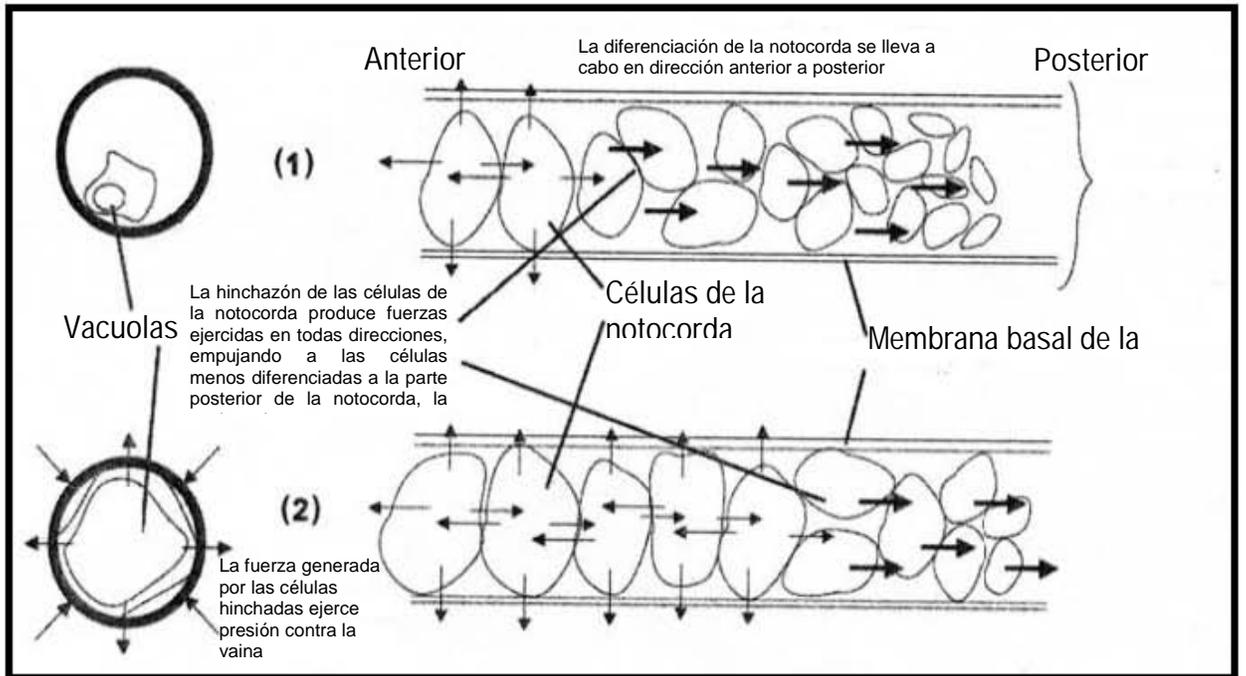


Figura 4. Aspecto mecánico del desarrollo de la notocorda. (1) En el desarrollo temprano de la notocorda, las vacuolas aun no se han hinchado y no ejercen presión de turgencia contra la vaina. Las células anteriores de hinchan y diferencian primero. (2) En la diferenciación, las vacuolas se hinchan y empujan a la célula contra la vaina generando una fuerza hidrostática, dando soporte al embrión en desarrollo. Como muchas células se hinchan hay un continuo movimiento de células hacia la parte posterior. Cuando las células se han diferenciado completamente, las fuerzas entre ellas y la vaina son iguales.

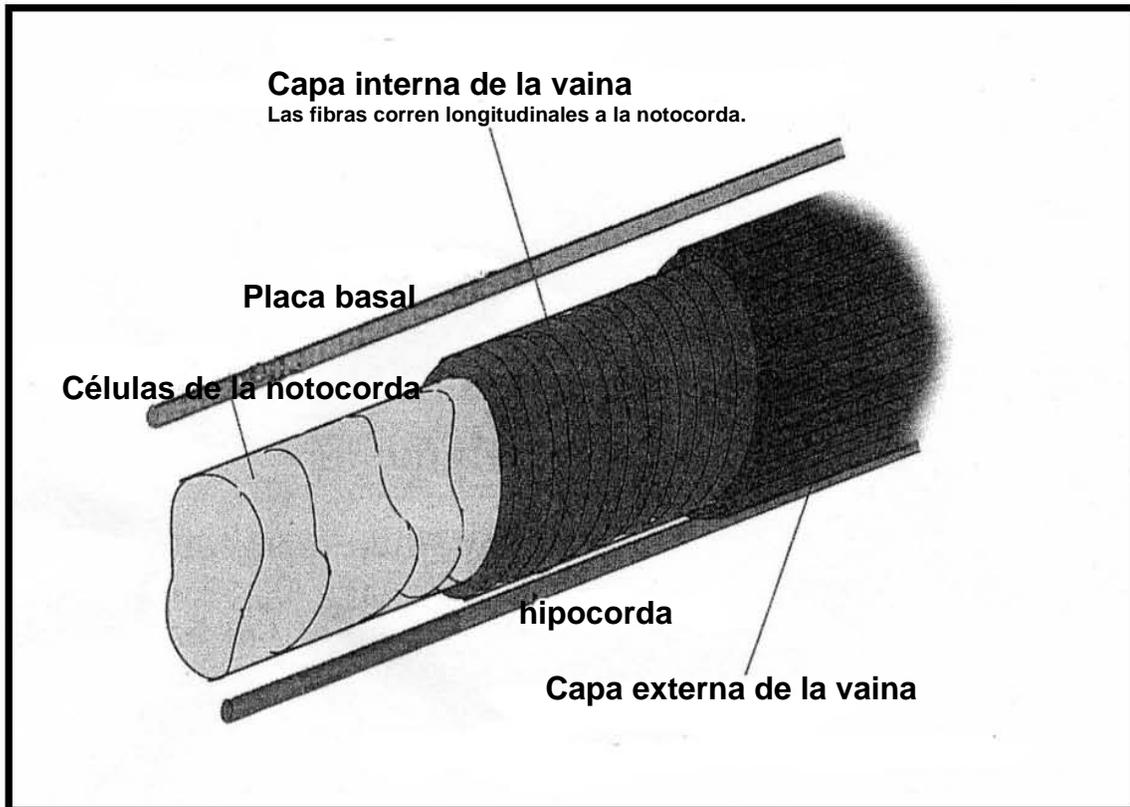


Figura 5. Estructura de la notocorda. La vaina de la membrana basal que rodea a la notocorda es necesaria para la generación de la presión hidrostática, lo cual permite a la notocorda actuar como soporte. Para maximizar la fuerza de la vaina, esta se forma de dos capas, una longitudinal y otra paralela al eje antero – posterior de la notocorda. Situadas dorsal y ventralmente a la notocorda la placa basal y la hipocorda, respectivamente, son capaces de resistir compresión y tensión, y por lo tanto son capaces de dar soporte en ambas regiones. Así el movimiento de la notocorda se limita al plano lateral.

1.3.3 Mutaciones que afectan la estructura de la notocorda

Fenotípicamente la formación de la notocorda puede ser dividido en dos transiciones discretas, primero el cordomesodermo es especificado como un mesodermo de línea media, y luego se lleva a cabo la “diferenciación notocordal”, es decir la transición del cordomesodermo a notocorda. Hay dos características morfológicas que marcan la diferenciación de la notocorda, la primera es que las células del cordomesodermo desarrollan una gruesa membrana basal, la cual forma una vaina o tubo alrededor de la notocorda. En la segunda, acoplada a desarrollo de la membrana basal, cada célula adquiere una gran vacuola que ejerce presión de turgencia contra la vaina (Fig. 3) (Gong et. al. 2004). La alteración en la hinchazón de la vacuola produce un embrión substancialmente corto que se puede reconocer fácilmente. Por esta razón muchas mutaciones que afectan la diferenciación notocordal fueron identificadas en el análisis de la mutagénesis en pez cebra en 1996 (Odenthal J et. al. 1996, Stemple D, et. al. 1996).

Los esfuerzos para identificar los genes mutados han contribuido a entender cual es del papel de la membrana basal en la diferenciación notocordal. Por ejemplo la ausencia de cualquiera de los loci *sleep(sly)* y *grumpy(gup)*, que codifican para las cadenas de laminina $\gamma 1$ y $\beta 1$ respectivamente, en pez cebra conduce a una falla en la formación de la membrana basal alrededor de la notocorda, posteriormente se observó que son necesarios para una apropiada formación de los vasos sanguíneos intersegmentales; otro locus que también afecta la diferenciación notocordal es *bahful(bal)* que codifica una α -laminina (Pollard et. el. 2006).

Otros tres mutantes de diferenciación notocordal son *dopey(dop)*, *happy(hap)* y *sneezy(sny)* (llamados así por que su cuerpo corto asemeja a los siete enanos) los cuales, además de los efectos en la notocorda, sufren apoptosis generalizada después en el desarrollo (Stemple et. al. 1996, Gong et. al. 2004). En forma similar a las mutantes de laminina; *dop*, *hap* y *sny* también tiene la membrana alterada y fallan al formar la vacuola expresando persistentemente a *Sonic Hedgehog*.

Otra clase de mutantes en diferenciación notocordal son *doc* y *no tail(ntl)*, en los cuales hay una expresión persistente de marcadores tempranos y falla la formación de la vacuola, pero poseen una membrana basal normal. Experimentos de trasplante muestran que el defecto de diferenciación notocordal es celularmente autónomo tanto para *ntl* y *doc*. De estos dos loci *doc* es el que provoca los defectos notocordales más específicos. Mientras mutantes *ntl* fallan al generar la cola, en la región del tronco son fenotípicamente muy similares a los mutantes *doc*, donde los únicos defectos observados están en la diferenciación notocordal acoplado a una falla de señalización hacia los tejidos circundantes (Gong et. al. 2004).

En mutantes *ntl* el cordomesodermo se desarrolla normalmente pero se detiene previo a la diferenciación notocordal. A diferencia de las mutantes *floating head(flh)*, en las cuales el cordomesodermo es convertido a mesodermo somático, el destino del cordomesodermo de mutantes *ntl* no es claro. Algunas células mueren por apoptosis y otras terminan en la medula espinal y se cree que forman la placa basal media. El gen *ntl* codifica para el homólogo en pez cebra del gen *T brachyury* de ratón. También hay evidencia de que la expresión de *ntl*, así como su contraparte en *Xenopus*, *Xbra*, es controlado principalmente por la señal FGF. Durante el desarrollo normal, *ntl* se expresa primero en las células marginales en la blástula tardía y gástrula temprana, y entonces se internaliza en células profundas y es mantenida solo en el cordomesodermo. Estudios de combinaciones de mutantes *ntl*, *flh* y *cyc(cyclops)* han ayudado a establecer la relación entre estos genes en el control de la identidad de la línea media. Una hipótesis es que *ntl*, *spade tail(spt)* y *flh* están controlando la diferenciación de la placa basal media y cordomesodermo, y del destino medio

y lateral; los tres activados competitivamente son balanceados a través de asas de regulación, posiblemente involucrando a la señal Nodal y FGF para asegurar que la cantidad apropiada en cada uno de los tejidos sea especificada (Gong et. al. 2004).

Bloqueando la vía NF- κ B, mediante la sobre expresión de una forma negativo-dominante de la proteína inhibidora I κ B α , se encontró que el desarrollo de la notocorda en pez cebra se ve afectado; el análisis de los resultados de este estudio sugieren que las proteínas NF- κ B podrían ser requeridas para la diferenciación del mesodermo regulando al gen *ntl*, esencial para la morfogénesis del mesodermo dorsal en pez cebra. La vía de señalización NF- κ B juega un papel crucial en eventos fisiológicos tales como la inflamación, respuesta inmune, apoptosis, crecimiento celular y diferenciación. Los factores transcripcionales NF- κ B se encuentran en el citoplasma como heterodímeros asociados con proteínas I κ B que bloquean sus dominios de localización nuclear y por lo tanto previenen la translocación de NF- κ B al núcleo (Correa et. al. 2004).

1.4 LOS LISOSOMAS Y LA PROTEÍNA INTEGRAL DE MEMBRANA LISOSOMAL II (LIMP II).

Desde su descubrimiento, mucho se ha aprendido acerca de la función de los lisosomas en el desarrollo de enfermedades. Estos organelos celulares representan el destino final tanto de moléculas de secreción como de moléculas endocitadas y autofagocitadas destinadas a la destrucción o reciclaje. Por lo tanto, numerosas funciones, incluyendo el reciclaje de proteínas celulares, la regulación de la expresión de receptores de superficie, la liberación de nutrientes endocitados, la inactivación de organismos patogénicos, la reparación de la membrana plasmática y el cargado de antígenos procesados en moléculas de MHC clase II, son consideradas como dependientes de una función lisosomal normal. Su importancia fisiológica se hace evidente por las enfermedades resultantes de defectos en la biogénesis lisosomal y en la capacidad degradativa normal (Eskelinen et. al. 2003).

1.4.1 Los lisosomas

Los lisosomas son morfológicamente muy heterogéneos debido a su amplia variedad de funciones digestivas y a la variación de su contenido. Específicamente los lisosomas son definidos como organelos ácidos ricos en hidrolasas (Eskelinen et. al. 2003). Contienen alrededor de 40 tipos de enzimas hidrolíticas entre las que se encuentran proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasas y sulfatasas. Todas ellas son hidrolasas ácidas cuya actividad óptima se encuentra a un pH cercano a 5, que es el pH que tiene el interior de los lisosomas. Además cuenta con una membrana envolvente característica. En general, los lisosomas son puntos de encuentro donde convergen diferentes corrientes del tráfico intracelular. Las enzimas digestivas son descargadas a ellos mediante una ruta que va por el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, mientras que las sustancias que deben ser digeridas llegan a ellos a través de por lo menos tres vías. De estas tres vías, la mejor estudiada es la que siguen las macromoléculas endocitadas, dichas macromoléculas inicialmente se transfieren a unas vesículas intracelulares pequeñas e irregulares llamadas endosomas tempranos. En ellos algunas de las moléculas endocitadas son seleccionadas y recicladas a la membrana plasmática, mientras que otras se dirigen a los endosomas tardíos. En los endosomas tardíos, los materiales que van a ser digeridos se encuentran con las hidrolasas lisosomales que provienen del complejo de Golgi, debido a la fusión de las vesículas de transporte de ambas rutas. El interior de los endosomas tardíos es medianamente ácido (pH 6), y se cree que es el lugar donde empieza la digestión hidrolítica de las moléculas endocitadas. A partir de los endosomas tardíos se forman los lisosomas, aunque no se sabe exactamente como ocurre esto. Durante este proceso de conversión, algunas de las moléculas de la membrana son eliminadas y se produce una disminución del pH interno (Alberts 2002).

La segunda ruta que aporta materiales a los lisosomas para ser degradados, mediante la cual pueden ser destruidas partes obsoletas de la propia célula, es un proceso denominado autofagia. Al parecer, el proceso de digestión supone que el organelo sea envuelto por membranas derivadas de retículo endoplásmico, generándose un autofagosoma. Se cree que el autofagosoma se fusiona con un lisosoma (o un endosoma tardío). El proceso está altamente regulado, de forma que durante la remodelación celular se pueden seleccionar diferentes componentes celulares y ser destinados a su destrucción (Alberts 2002).

La tercera ruta que proporciona materiales a los lisosomas sólo tiene lugar en células especializadas en la fagocitosis de grandes partículas y de micro-organismos. Estas células (macrófagos y neutrófilos en vertebrados) pueden ingerir grandes objetos y formar un fagosoma. Se

creo que el fagosoma se transforma en el lisosoma de la misma forma que el autofagosoma (Alberts 2002).

Podría existir una cuarta ruta de degradación proteica que condujese hasta los lisosomas algunas proteínas poseen ciertas señales llamadas secuencias KFERQ, de lisina (K), fenilalanina (F), glutamato (E), arginina (R) y glutamina (Q) que son responsables de su selección para ser descargadas en los lisosomas. Es posible que estas secuencias unan dichas proteínas a determinados organelos que serán autofagocitados, de manera que de forma indirecta también serían destruidas. Alternativamente, puede existir un transportador específico en la membrana del lisosoma que reconozca estas señales y transfiera directamente las proteínas a través de la membrana lisosomal (Alberts 2002).

Respecto a la ruta que conduce tanto a las hidrolasas solubles como a las proteínas de membrana hasta los lisosomas en células de mamífero, se conoce más sobre el mecanismo de marcado y la vía de transporte de las hidrolasas solubles a los lisosomas que de aquellos mecanismos involucrados en el marcado de las proteínas de membrana lisosomal. Las hidrolasas y las proteínas de membrana son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y luego son transferidas al Aparato de Golgi (Sandoval et. al. 1994). Específicamente, las hidrolasas solubles luego de haber sido sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso son transferidas a la red cis-Golgi donde sufren algunas modificaciones tal como la unión de residuos de manosa-6-fosfato a los N-oligonucleotidosacáridos, luego entran a la red trans-Golgi (TNG) donde dichos residuos son reconocidos por dos tipos de receptores MPRs (mannose-6 phosphate receptor) formando así complejos lisosomales MPR-hidrolasa que son incluidos en vesículas cubiertas de clatrina en la TNG como consecuencia de la interacción de las colas citoplásmicas de MPR con alguna AP (adaptador protein) de complejo I (Tabuchi et. al. 2002). Los MPRs son proteínas transmembranales presentes en la TNG y se une a su oligonucleotidosacárido específico a pH 7 y lo libera a pH 6, que es el pH de los endosomas tardíos. Así, en cuanto llegan al interior de estos endosomas tardíos, las enzimas lisosomales se disocian de los receptores. Una vez que han liberado las enzimas, los receptores son recuperados y devueltos a la membrana de la TNG mediante vesículas de transporte que surgen por gemación de los endosomas tardíos (Alberts 2002).

El cargado de las proteínas de membrana a los lisosomas, a diferencia de las hidrolasas solubles, es independiente de la señal de manosa-6-fosfato. El transporte a los lisosomas de las proteínas de membrana H-lamp (LIMP III), el precursor de la fosfatasa ácida lisosomal, el antígeno CD36 y lamp-2 (LIMP IV) parecen involucrar una señal basada en tirosina. Sin embargo esta señal

no parece ser universal entre todas las proteínas de membrana lisosomal (Sandoval, et. al. 1994). Se ha observado que ciertas secuencias de aminoácidos en la cola citoplásmica COOH-terminal de las proteínas de membrana lisosomal son importantes para que sean colocadas en endosomas y lisosomas; hasta ahora se han identificado dos secuencias, una de ellas es el motivo GYXXØ en el cual X es cualquier aminoácido y Ø es un aminoácido hidrofóbico voluminoso y la otra es un motivo di-leucina. Recientes estudios han mostrado que también los residuos de aminoácidos ubicados corriente arriba del motivo di-leucina son importantes para el establecimiento de algunas proteínas en los endosomas tardíos y lisosomas o para su transporte a través del sistema endosomal y lisosomal (Tabuchi et. al. 2002).

Hasta ahora, se han propuesto dos diferentes vías de transporte para las proteínas de membrana lisosomal recién sintetizadas. Una de ellas es la ruta intracelular directa que libera estas proteínas desde la TGN a los lisosomas vía endosomas. La otra es la ruta indirecta en la cual estas proteínas son transportadas desde la TNG a la membrana plasmática y subsecuentemente liberadas a los lisosomas vía endocítica. En ambas rutas intracelulares, la directa y la indirecta, el tráfico y clasificación de proteínas de membrana lisosomal son mediados por distintos complejos adaptadores heterotriméricos. Cuatro complejos adaptadores AP-1, AP-2, AP-3 y AP-4 y GGAs han sido descritos y se cree que funcionan en el transporte de proteínas cargo en la vía endocítica y lisosomal. Recientes estudios han señalado la participación de AP-3 en el transporte de varias proteínas de membrana lisosomal incluyendo LAMPs y LGP85 (LIMP II) a los lisosomas desde la TGN o endosomas usando motivos de clasificado tanto de tirosina- como de di-leucina (Kuronita et. al. 2002).

1.4.2 La membrana lisosomal y sus proteínas

Un papel importante de la membrana lisosomal y endosomal es separar las hidrolasas ácidas de los otros constituyentes celulares para protegerlos de la degradación. La membrana lisosomal además de estar constituida por colesterol y poseer una composición fosfolipídica característica, es extremadamente rica en carbohidratos. Ciertas proteínas de membrana lisosomal median muchas de las funciones esenciales de este organelo. Por ejemplo, la acidificación del lumen lisosomal a través de una bomba de protones; la translocación de aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos resultado de la degradación hidrolítica y de nutrientes liberados por hidrolasas lisosomales específicas (vitamina B12 y colesterol) han sido atribuidos a las proteínas de membrana lisosomal; estas últimas también están involucradas en la fusión homotípica lisosomal así como en la fusión con las

membranas de otros organelos, incluyendo endosomas, fagosomas y la membrana plasmática (Eskelinen et. al. 2003)

En 1980 se describieron bioquímicamente dos abundantes glucoproteínas de alto peso molecular. Sin embargo, se adquirió un mayor conocimiento sobre la composición proteica después de la producción de anticuerpos mono y policlonales dirigidos contra proteínas de membrana lisosomal purificadas. Estos estudios revelaron proteínas integrales altamente glicosiladas, en el rango de 90–120 y 30–85 kDa, que fueron enriquecidas en endosomas tardios y/o lisosomas. Dichas proteínas fueron designadas como LAMPs (lysosome associated membrane proteins), LGPs (lysosomal membrane glycoprotein) y LIMPs (lysosomal integral membrane protein). Se ha propuesto que LAMPs and LIMPs son proteínas de endosomas tardios y lisosomas (Eskelinen et. al. 2003). Las proteínas de membrana lisosomal mejor caracterizadas son LAMP 1 y LAMP 2; ellas contiene un gran dominio luminal que lleva cadenas N- de unión de oligonucleotidosacáridos, una única ancla transmembranal y un dominio corto citoplásmico que lleva un motivo de tirosina, la cual es necesaria para y suficiente para su ubicación en los lisosomas (Gamp et. al., 2003). LIMP-1 y LIMP-2/LGP85 también son proteínas de membrana lisosomal importantes, aunque menos abundantes que las LAMPs y no exhiben homología con LAMP-1 o LAMP-2 (Fig. 6) (Eskelinen et. al. 2002)

1.4.3 Características y función de LIMP II

La proteína LIMP II, también conocida como LGP 85 y CD36L2 (Eskelinen et. al. 2003) es un subgrupo de la gran familia de proteínas de superficie celular CD36/LIMP II y esta conservada desde amoeba hasta mamíferos (Janssen et.al. 2001). Esta familia de genes en mamíferos codifica para moléculas de adhesión celular, transportadores de ácidos grasos y receptores pepenador en la superficie celular, así como proteínas de membrana lisosomal. La mayoría de las proteínas CD36/LIMP II se localizan en la membrana plasmática, mientras que LIMP II solo se ha encontrado en vesículas de origen endosomal (Fig. 6).

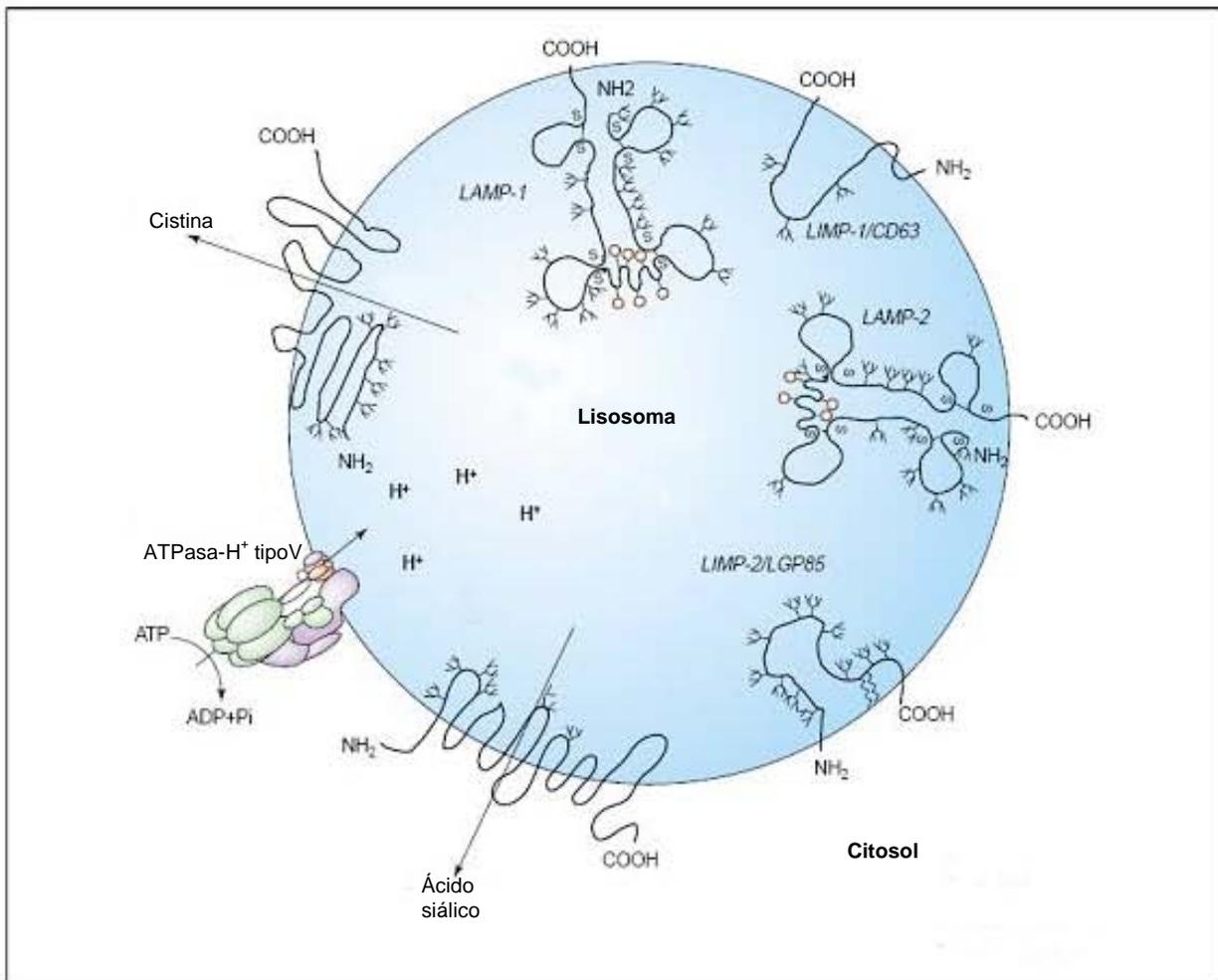


Figura 6. La membrana lisosomal, además de estar constituida por colesterol y poseer una composición fosfolipídica característica, es extremadamente rica en carbohidratos. Ciertas proteínas de membrana lisosomal median muchas de las funciones esenciales de este organelo. Por ejemplo, la acidificación del lumen lisosomal a través de una bomba de protones. En esta figura se observan algunas de las proteínas principales: LAMP-I, LAMP-II, LIMP I y LIMP II. Se observan sus dominios transmembranales y sus sitios de glucosidación.

Otros miembros de esta familia incluyen los genes de mamífero SR-B1 (*scavenger receptor class B-1*) que fue identificado como receptor de lipoproteínas de alta densidad mediante un enfoque knockout en ratones, se une a liposomas de fosfatidil inositol y fosfatidil serina con una especificidad que estrechamente pertenece a aquella de CD36; el homólogo humano SRBI, llamado Cla-1 (CD36, LIMP II análogo-1) que parece que tiene las mismas propiedades fisiológicas que SRB1 y por lo tanto es muy importante en el estudio de la arteriosclerosis; el gen *DC36* de rata, también conocido como FAT (fatty acid translocase) que ha sido implicado en el metabolismo de ácidos grasos y resistencia a la insulina; los genes *croquemort* (dCD36), que es un receptor de monocitos para las células apoptóticas durante la embriogénesis y *emp* (*epithelial membrane*

protein) de *Drosophila*, *emp* se expresa en varios tipos celulares epiteliales derivados del ectodermo y durante el desarrollo larval se detecta en células epiteliales de los discos imaginales de las alas, en las células precursoras de estructuras epidermales, lo cual sugiere un papel de la proteína *emp* en el desarrollo o en la función celular de células epiteliales (Crombie et. al. 1998, Hart et. al. 1993, Janssen et. al. 2001) y el gen *cm08 h8* de *Caenorhabditis elegans* (Crombie et. al. 1998). La similitud en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas revela un 30% de identidad y a nivel estructural ellas comparten una topología similar con dos dominios transmembranales (Kuronita et. al. 2005). Similitudes estructurales significativas incluyen hidrofobicidad global, un péptido señal N-terminal sin procesar, una señal de paro en el extremo C-terminal, dominios transmembranales putativos que originan colas citoplasmicas cortas, un gran dominio extracelular/intraluminal con residuos de cisteína altamente conservados y sitios potenciales de glucosilación (Crombie et. al. 1998).

CD36 (glucoproteína GPIV de plaquetas), el prototipo de esta familia de genes, es una glucoproteína de superficie celular presente en plaquetas, monocitos, precursores eritroides, epitelio retinal y mamario, adipositos, keratinocitos y cierto endotelio microvascular. Se ha observado que sirve como receptor de TSPI (thombospodin-1), una glicoproteína trimérica de matriz extracelular, colágena tipo I y IV, eritrocitos parasitados de *Plasmodium falciparum*, ácidos grasos de cadena larga, fosfolípidos aniónicos especialmente fosfatidil inositol y fosfatidil serina, lipoproteínas de baja densidad oxidadas y membrana de fotorreceptores retinales. También se cree que está involucrado en la apoptosis, más específicamente en el reconocimiento, por parte de los monocitos, de fosfolípidos aniónicos en la superficie de células apoptóticas, los cuales serán finalmente procesadas mediante fagocitosis (Crombie et. al., 1998, Janssen et.al. 2001). Dichas funciones han conducido a Krieger y colaboradores a postular que la familia de genes CD36 codifica una nueva clase de receptores “*scavenger*”. Sustentando esto, se encuentran las recientes observaciones de las funciones de SR-BI como un receptor selectivo para lipoproteínas de alta densidad y las funciones de *croquemort* en la embriogénesis de *Drosophila*. *Croquemort* es un receptor de células hematopoyéticas, el cual induce la fagocitosis de células en apoptosis mediada por macrófagos. CD36 también ha sido implicado en la transducción de señales, físicamente asociado con tirosinas cinasas citoplásmicas *fyn*, *lyn* y *yes* (Crombie et. al. 1998).

LIMP II, es una glucoproteína transmembranal tipo III de 477 residuos de aminoácidos (Kuronita et. al. 2005). Se expresa en la membrana de lisosomas y gránulos secretores con propiedades lisosomales. La porción mayor de la proteína reside en el lado luminal y contiene 11

sitios de N-glicosilación potenciales y tiene 5 residuos de cisteína; además de poseer dos cruces transmembranales, uno en la región amino y otro en la región carboxilo terminal. El segmento N-terminal (~ 426 residuos) consiste de un péptido señal que nunca se corta. Los extremos N- y C-terminal de la proteína constituyen una pequeña cola citoplásmica (Fig. 6) (Tabuchi et. al. 2002). Se ha demostrado que el cargado específico de LIMP II a los lisosomas es realizado por la interacción de una señal de marcado lisosomal (tipo dileucina) con el complejo adaptador AP-3 (Jansen et. al. 2001, Tabuchi, et. al. 2002). En la cola citoplásmica de 20 aminoácidos del COOH-terminal, (R459-GQGSMDEGTADERAPLIRT-478); L475 e I476 forman el motivo di-leucina. Una sustitución en el residuo de leucina con algún aminoácido elimina completamente o reduce remarcadamente la localización de LIMP II a los lisosomas, dando como resultado su aparición en la superficie celular (Tabuchi, et. al., 2002). Parece que esta proteína es la única LIMP que no requiere residuos de tirosina para insertarse en los lisosomas (Attwood et. al. 2003).

El homólogo de LIMP II en *Dictyostelium discoideum* (DdLIMP) ha mostrado ser un efectivo supresor del fenotipo de “profilin-minus”. Profilina es una proteína de unión a G actina. Las células de *Dictyostelium discoideum* deficientes de profilina han mostrado defectos en la pinocitosis, macropinositosis, exocitosis y secreción de hidrolasas. Se propone que Dd LIMP podría pertenecer a una cascada reguladora corriente arriba de profilina (Karakesisoglou I, 1999)

Estudios *in vitro* han demostrado que la sobre expresión de LIMP II causa un alargamiento de los endosomas tempranos y endosomas/lisosomas tardíos. Tales alteraciones morfológicas no fueron observadas después sobre-expresar otras proteínas de membrana lisosomal. La sobre-expresión de LIMP II altera el tráfico endocítico de membranas, causado probablemente por acumulación de colesterol en estos compartimentos. La co-transfección de LIMP II con la forma dominante negativa de Rab5b inhibe la formación de vacuolas alargadas, sugiriendo una interacción de la forma activa con GTP unido de Rab5b con LIMP II. Se ha estimado que LIMP II contribuye con alrededor del 4% de todas las proteínas de membrana lisosomales (Kuronita et. al. 2002, Gamp et. al. 2003).

La función en vivo de LIMP II en mamíferos aun no es clara, se ha postulado como responsable del procesamiento de productos hidrolíticos desde los lisosomas al citoplasma. Ningún ligando fisiológico se ha demostrado para LIMP II, sin embargo se ha observado que *in vitro*, se une a péptidos derivados de trombospodina-1, componente de la matriz extracelular; la unión es mediada por un dominio que es conservado entre CD36 y LIMP II (Janssen et. al. 2001). Se realizó un estudio en ratones deficientes de LIMP II, en donde se observó que desarrollan una dilatación de la pelvis renal y tumores al tercer mes de vida. Esta hidronefrosis uni- o bilateral es causada por una

obstrucción en el tracto urinario entre la pelvis renal y el uréter. La osmolaridad aumenta severamente y los parámetros urinarios alterados indican una disfunción renal. Presentan un alta cantidad de albúmina en la orina, posiblemente debido a un daño secundario en la filtración glomerular debido a la hidronefrosis. Los estudios microscópicos señalan que la obstrucción se debe a una hiperproliferación de la mucosa en la unión ureteropelvica. Los exámenes de microscopía electrónica y de luz de las células superficiales del uroepitelio muestran una acumulación masiva de estructuras vesiculares, muy probablemente de origen lisosomal. Se ha sugerido que estas células tienen una endocitosis activa para asegurar la recuperación de sustancias de alto y bajo peso molecular desde la orina, las cuales son entonces transportadas a los lisosomas para su degradación y reciclaje al organismo. Además se observó una sobrerregulación de LAMP I y LAMP II en riñón, ureter y vejiga, así como el incremento en la actividad de diferentes enzimas lisosomales; lo cual podría indicar un daño en el transporte vesícula/membrana en las células llamadas tipo paraguas en ratones deficientes de LIMP II. La suposición del daño en el tráfico vesicular también es sostenida por una severa alteración en la expresión de uroplaquina en el uroepitelio de los ratones deficientes de LIMP II. La uroplaquina esta involucrada en la estabilización de la superficie apical del uroepitelio de mamífero previniendo la ruptura durante la distensión de vejiga, regulando el área de superficie apical a través de la recuperación reversible e inserción en la superficie apical de uroplaquina y en la regulación de la función de la barrera de permeabilidad del uroepitelio (Gamp, et. al., 2003; Knipper M, et. al., 2006). Un fenotipo similar se ha descrito en ratones deficientes para la metaloproteinasa ADAMTS-1, la cual está involucrada en el procesamiento proteolítico de las moléculas tanto de superficie celular como de matriz extracelular. ADAMTS-1 contiene motivos de trombospodina 1, haciendo posible una interacción entre LIMP II y ADAMTS-1. Experimentos *in vitro* sugieren tal interacción y se especula que LIMP II puede estar involucrado en la modulación de la actividad de metaloproteinasas de la familia ADAMTS (a desintegrin and metalloprotease domain). Los ratones deficientes de LIMP II, también presentan una severa pérdida de la audición por disfunción stria, debido a la atrofia del *stria vascularis* revelada por análisis histopatológicos, el cual es el evento más temprano en la patología del oído interno, seguida por la pérdida de las células ciliadas externas e internas y las células ganglioespirales. El *stria vascularis* es un epitelio estratificado altamente vascularizado y consiste de dos barreras epiteliales: las células marginales, que secretan K⁺ hacia la endolinfa, donde las células basales dentro del *stria vascularis* se asocian inmediatamente con células intermedias, y afuera el ligamento espiral se asocia con fibrositos. Una concentración de 150 mM de K⁺ en la endolinfa dirige la transducción sensorial en las células

ciliadas. La atrofia severa de las células marginales en ratones deficientes de LIMP II podría originar una alteración del potencial endococlear y un daño secundario de las células ciliadas y neuronas del ganglio espiral. Estos ratones también desarrollan una neuropatía progresiva que se restringe al sistema nervioso periférico; el principal tipo celular responsable de esta desmielinización patológica es el de las células de Schwann, estas células en ratones deficientes de LIMP II muestran una sobre-expresión de enzimas lisosomales coincidente con la disminución de proteínas de mielina periférica. Deberá determinarse si la disminución de mielina se debe a errores en su distribución o a la degradación en los compartimentos lisosomales, destacando un papel inesperado de LIMP II en la regulación de la mielina (Gamp et. al. 2003).

Las células marginales del *stria vascularis* están involucradas en la generación del potencial endococlear y la secreción de K^+ , el cual es el principal catión de la endolinfa generador de la transducción de señales y generador del potencial endococlear. La importancia del K^+ en la coclea es marcada por el descubrimiento de varias formas de sordera hereditaria que se originan de mutaciones en los canales de potasio. Para tener una idea más clara sobre la causa primaria de la pérdida en la función auditiva debido a la presunta pérdida del potencial endococlear, se realizó un estudio más detallado combinándolo con análisis de los canales del ion potasio, de la deficiencia auditiva en los ratones deficientes de LIMP II (Gamp et. al. 2003, Knipper M et. al. 2006). En este estudio se observó que la pérdida auditiva estaba temporalmente relacionada con la pérdida de las subunidades KCNK1/KCNE1 del canal de potasio y del receptor endocítico de megalina en la membrana de la superficie luminal de las células marginales. La megalina es un miembro de la familia de receptores LDL (low density lipoprotein), es un receptor de superficie celular que transporta distintas moléculas hacia el interior de la célula a través de endocitosis mediada por receptor. La pérdida de estas subunidades, así como de la megalina se observaron antes que cualquier otra señal de cambios estructurales o degeneración, indicando una alteración del reciclado de membrana de estas proteínas. El reciclado de membrana de proteínas expresadas apicalmente es un mecanismo para regular el nivel de expresión superficial de receptores de la membrana plasmática o proteínas transportadoras. Una vez incorporadas en los endosomas, las proteínas pueden reciclarse regresando a la red trans Golgi o a la membrana plasmática. Un subgrupo de proteínas de membrana pueden también ser cargadas a los lisosomas para su degradación. De esta manera los resultados demuestran un papel importante de LIMP II en la expresión superficial celular correcta de canales iónicos funcionalmente relevantes y de proteínas receptoras del *stria vascularis* (Knipper et. al. 2006).

En otro estudio, los ratones expuestos lactacional y gestacionalmente a DES (dietilstilbestrol), un estrógeno sintético no esferoidal, mostraron una disminución en el crecimiento testicular y número de espermatozoides así como la habilidad de fertilización *in Vitro*. Al parecer los efectos adversos a largo plazo que causa DES en el desarrollo testicular y función espermática, están asociados a la alteración en la expresión gene testicular; entre los cuales se encuentra LIMP II (Fiendelden et. al. 2002).

1.5 MUTAGÉNESIS INSERCIONAL EN PEZ CEBRA

Los principales objetivos de las investigaciones biológicas y principalmente de la genética molecular son determinar cuantos y cuales son los genes necesarios durante el desarrollo embrionario, y como es que estos pueden originar la complejidad de los patrones y formas durante la embriogénesis. Las mutaciones, cambios que afectan la función de un gen, son una herramienta importante para el estudio de componentes individuales durante el desarrollo embrionario, ya que sólo un único componente, el producto del gen, es removido o alterado, mientras que el resto del organismo queda intacto y las funciones de un gen pueden ser deducidas a partir de la observación del fenotipo mutante, es decir la forma del desarrollo embrionario en ausencia del producto génico. Genes con fenotipos similares probablemente tienen funciones similares y sus productos probablemente cooperan en el proceso de desarrollo. Las mutaciones ocurren espontáneamente a una tasa baja, pero su frecuencia puede incrementarse utilizando mutágenos como los rayos X o sustancias químicas que alteran la secuencia de DNA. Esta propiedad fue usada primero para la clasificación de mutaciones que afectan procesos de interés en bacterias y levaduras, y posteriormente también para mutaciones que afectan el proceso de desarrollo en *Drosophila melanogaster* y produciendo mutaciones que alteran el patrón de desarrollo post – embrionario en el nematodo *Cenorhabditis elegans* (Nusslein, 1995).

El conocimiento de la embriogénesis en vertebrados se ha obtenido principalmente de experimentos en rana y pollos, con el mínimo uso de enfoques genéticos. La investigación de genes descubiertos por su homología con *Drosophila*, es uno de los enfoques más exitosos para entender el control genético del desarrollo de vertebrados. Sin embargo, durante la evolución, los vertebrados han adquirido estructuras y mecanismos específicos; para identificar los genes que afectan tales estructuras y mecanismos en la embriogénesis, es necesario realizar análisis de mutagénesis directamente en un organismo vertebrado. Por esto varios grupos de investigación han establecido

métodos usando pez cebra como un organismo modelo para analizar el control genético del desarrollo embrionario (Nusslein 1995).

En 1992 en el Instituto Max-Planck, Nusslein-Volhard y colaboradores comenzaron el proyecto de mutagénesis a gran escala en pez cebra utilizando una sustancia química llamada ENU (etil-nitrosourea) obteniendo resultados en 1996, que fueron publicados en la revista "Development", se describieron 1200 mutantes, cada mutante estaba afectado en uno o más aspectos del desarrollo embrionario, (Haffter et al., 1996) sin embargo hasta la fecha solo se han identificado 200 de los genes mutados.

Entre los años de 1998 y 2002, el grupo de la Dra. Nancy Hopkins en el Instituto Tecnológico de Massachussets (MIT) de la ciudad de Boston, llevo a cabo una nueva mutagénesis a gran escala en pez cebra empleando la metodología conocida como mutagénesis insercional. La diferencia entre esta metodología y la de utilizada por Nusslein-Volhard es que en lugar de usar un mutágeno químico se usa un retrovirus; lo cual permite identificar fácilmente los genes mutados (Ámsterdam 2003, Maldonado 2003). Con la mutagénesis insercional a gran escala se logró introducir más de 50,000 inserciones retrovirales en el genoma del pez cebra, obteniéndose cerca de 500 mutantes, de las cuales se han identificado un poco más de 280 genes (Ámsterdam 2003).

En la mutagénesis química se utiliza el agente alquilante ENU, para inducir las mutaciones, el cual causa sustituciones de los pares de bases y en menor grado elimina regiones cromosomales. Sin embargo la identificación y clonación de los genes mutados es muy difícil (aunque su eficiencia sea mayor que la mutagénesis insercional) (Amsterdam et. al. 2006). Aunque avances recientes de las herramientas genómicas han ayudado al proceso de clonado posicional, se requiere un año para la identificación de un gen (Amsterdam 2003). La mutagénesis insercional es una alternativa a la mutagénesis química. En este caso DNA exógeno se usa como mutágeno que a su vez sirve como una marca que ayuda al aislamiento de los genes mutados. Varios métodos podrían ser empleados para insertar DNA en el genoma del pez cebra, incluyendo la microinyección de DNA, microinyecciones ayudados por integrantes retrovirales o una transposasa de elementos transponibles. Sin embargo, hoy en día el método más eficiente para hacer un gran número de inserciones independientes en el genoma de pez cebra es el uso de un retrovirus pseudotipificado.

Los retrovirus son virus con un genoma de RNA, que se replican a través de un DNA intermediario utilizando la enzima transcriptasa inversa. Existen varias proteínas en su cubierta, siete proteínas internas típicas, cuatro estructurales y tres enzimáticas. El ADN intermediario se integra en cualquier región del DNA celular, y el elemento, que una vez integrado se llama provirus,

pasa a ser un elemento genético estable. Como provirus, su información genética puede expresarse o permanecer en un estado latente y no expresarse (Madigan et. al. 1999), y así heredarse a toda la descendencia de esta célula por que la infección no es letal para la célula.

Los vectores retrovirales de replicación defectiva, a diferencia de los no defectivos, son agentes infecciosos se integran como retrovirus, pero su material genético carece de secuencias codificantes de proteínas necesarias para producir la progenie del virón. Se producen en células empaquetadas de “genoma bifurcado”, en las cuales el genoma del vector retroviral es expresado desde un conjunto de secuencias virales integradas, mientras que los genes retrovirales requeridos para el empaquetamiento, para la infección, para la reverso-transcripción e integración son expresados desde algún otro locus. El vector retroviral más usado ha sido derivado de un retrovirus murino, Moloney Leukemia Virus (MoMLV), resultando en un virus de replicación defectiva, que puede ser producido en muy altas cantidades, sin embargo estos retrovirus inicialmente fueron incapaces de infectar células de mamífero. Los retrovirus poseen cierto grado de tropismo (rango de células que pueden infectar), el cual es frecuentemente determinado por su proteína envoltente que reconoce y se une a algunos componentes específicos, usualmente proteínas, en la superficie de las células que infecta. El tipo celular con el receptor apropiado puede ser infectado por el retrovirus, es decir el tipo celular no es refractario a la infección. El tropismo de un virus puede cambiarse mediante un proceso de pseudotipificación que genera virones con el genoma y proteínas principales de un virus y la envoltura de otro, lo cual capacita al virus para la infección de un tipo celular que antes no podía infectar. Hay algunas especificidades en cuanto a cuales proteínas de envoltura pueden encapsidar genomas virales específicos (un genoma dado solo puede ser pseudotipificado con un número limitado de proteínas de envoltura); una combinación es particularmente usada en la encapsidación de MoMLV con la proteína envoltente “G-protein” del virus de stomatitis vesicular (VSV). El VSV, es un rhabdovirus que puede infectar células de especies tan diversas como son insectos y mamíferos. Los vectores MoMLV pseudotipificados con la proteína G del virus de somatitis vesicular (VSV-G) posee dos cualidades esenciales para su uso en transgénesis de alta frecuencia de línea germinal en pez cebra, la primera es su extendido rango de hospederos, permitiendo la infección de células de pez, y la segunda es que los virones pseudotipificados VSV-G son usualmente estables, permitiendo que los virus sean concentrados 1000 veces por centrifugación.

Cuando los vectores retrovirales se inyectan en blástulas de pez cebra, muchas de las células llegan a ser infectadas independientemente, produciendo un organismo mosaico en el cual diferentes

células abrigan inserciones en diferentes sitios cromosomales. Cuando se infectan las células destinadas a originar la línea germinal, alguna proporción de la progenie de los peces inyectados tendrá una o más inserciones. Cuando una cantidad de virus suficientemente elevada es usada, se puede infectar una alta proporción de la línea germinal de los peces infectados. En promedio, una docena de inserciones independientes pueden ser heredadas desde un único fundador, aunque alguna inserción dada estará presente solo en un 2-5 % de la descendencia. Sin embargo la progenie de los fundadores no es mosaico para la inserción y la transmitirán en una forma mendeliana al 50% de su progenie. Lo que es más, dado que más de un virus puede infectar una única célula, algunas células germinales contienen múltiples inserciones, y su descendencia puede tener 1, 2, 3 o más inserciones segregadas independientes (Ámsterdam et. al. 1999).

El proyecto de mutagénesis a gran escala por inserción retroviral, consistió de la inyección de un retrovirus de alto título a 2500 embriones en estadio de blástula. Después de 4 horas se seleccionaron los embriones con mayor número de eventos de inserción retroviral y estos fueron criados hasta la etapa adulta. En organismos diploides es necesario homocigar las mutaciones para observar su efecto. Para homocigar las mutaciones y aumentar el número de inserciones de cada pez, se produjeron dos generaciones consecutivas de peces cebra (F1 y F2 respectivamente) de la siguiente manera: los 12,000 peces fundadores fueron cruzados entre ellos para producir 200,000 de la generación F1 (primera generación), los cuales son mosaicos para las inserciones (cada célula con inserciones distintas). Posteriormente ya para simplificar el trabajo y maximizar el espacio fue necesario identificar a los peces F1 con el mayor número de inserciones (llamados F1MI o F1 multi-inserción). Los F1MI se identificaron por medio de un análisis de ADN tomado de biopsias de la cola de peces adultos de 8 semanas de edad. El número de inserciones se determinó por PCR cuantitativo y análisis tipo "Southern". Con este método se seleccionaron 14,000 peces F1MI, cada uno con un promedio de 10 inserciones. Las generaciones F1 y F2 ya no son mosaico para las inserciones ya que todas las células cargan con las mismas inserciones.

Por cada pareja sexual de la generación F1 se produjo una familia F2 de alrededor de 48 individuos. La generación F2 consistió de 6, 200 familias (300,000 peces adultos). Debido a que tanto el macho como la hembra F1 aportan sus genes con inserciones al 50 % de su descendencia F2, al llevar a cabo las cruces al azar entre miembros de la familia F2, aumenta la probabilidad (86 % con 6 cruces) de que se crucen dos peces con exactamente la misma inserción retroviral. De ocurrir esto, el 25 % de la descendencia homocigará la inserción y de ser mutagénica (1 de cada 100 inserciones) se obtendrá una mutación en algún gen involucrado en el desarrollo del pez.

Se realizaron 40,000 cruzas entre peces F2 y se inspeccionaron cuidadosamente los embriones F3 (aproximadamente 1.2×10^6 individuos), mientras tanto se mantuvo a cada pareja progenitora separada del resto de la familia hasta completar el análisis. Los embriones se mantuvieron a 28.5 °C y las observaciones se realizaron en microscopios estereoscópicos en los días 1, 2 y 5 del desarrollo. Lo que se buscaba era cualquier alteración del desarrollo que estuviese presente en 25% de embriones.

Por cada 12.6 familias se encontró una mutante insercional, dando un total de 489 mutantes recesivas y letales en la embriogénesis, además de 4 mutantes dominantes. Se encontraron mutantes afectadas en el desarrollo del cerebro, la notocorda, la cresta neural, la espina dorsal, los ojos, los oídos y otros órganos sensoriales (como la línea lateral), la mandíbula, el tejido muscular, la pigmentación, los riñones, el páncreas, el hígado, el estómago, el intestino, el corazón, los vasos sanguíneos, además de mutantes en las que se encontró alterado el crecimiento, el comportamiento o la motilidad. También se obtuvieron mutantes con defectos tan severos y generales que los embriones no se desarrollaban o presentaban una necrosis general muy temprana.

La metodología para identificar los genes mutados consiste en obtener DNA de los padres F2, de otros portadores F2 en la familia y de los embriones F3 que muestran el fenotipo. El DNA se corta con enzimas de restricción y se analiza con un ensayo tipo Southern, utilizando como sonda a un fragmento complementario a cierto segmento de DNA de origen retroviral. El objetivo del experimento es identificar una banda del mismo peso molecular entre los padres y los embriones con el fenotipo (que suponemos que es la misma). El encontrar la misma banda en otros miembros de la familia F2 (portadores) nos permite por medio de cruzas, confirmar que esa banda representa un fragmento de DNA que contiene la inserción retroviral flanqueada por el gen interrumpido y mutado. Posteriormente se toman los fragmentos de DNA cortados con las enzimas de restricción y se ligan en cierto plásmido, se selecciona la construcción del tamaño predicho (la suma del peso molecular de nuestra banda de interés y el plásmido) y se amplifican las secuencias flanqueantes al inserto por PCR inverso. Los productos amplificados se secuencian y dicha información se compara contra bases de datos de los genomas de otros organismos (como la del NCBI) utilizando el programa BLAST, lo anterior con la intención de determinar la identidad del gen mutado por su similitud con homólogos de otras especies.

Entre los más de 300 genes que se clonaron, se encontraron varias enzimas del metabolismo anabólico y catabólico, también DNA polimerasas, RNA polimerasa, factores transcripcionales, proteínas que participan en la replicación del ADN, la traducción de la información genética, el

tráfico vesicular o son componentes de la cromatina, diversas proteasas, chaperoninas, ATPasas, RNA helicasas, proteínas ribosomales, así como varios receptores y ligandos involucrados en la transducción de señales, también canales iónicos, glicoproteínas y además toda una gama de proteínas cuya función es totalmente desconocida (Maldonado 2003).

2. HIPÓTESIS

En la mutante de pez cebra hi1463, una inserción retroviral provoca un fenotipo nulo del gen LIMP II, que es un receptor de la membrana de los lisosomas. En consecuencia, dicha mutación producirá mayores alteraciones en órganos cuyo desarrollo tenga una mayor dependencia de la función de la membrana lisosomal (como el sistema nervioso y la notocorda) y alteraciones menores en órganos que no dependen tanto de la función lisosomal.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar los defectos en el desarrollo embrionario del pez cebra provocados por una mutación de tipo retroviral en el gen LIMP-II utilizando a la mutante hi1463.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- 4a. Genotipificar la cepa hi1463 de pez cebra por medio de PCR.
- 4b. Describir morfológicamente el fenotipo que presenta la mutante hi1463.
- 4c. Analizar la expresión del gen LIMP II en la cepa mutante 1463 y en la cepa silvestre utilizando la técnica de RT- PCR.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Mantenimiento de una colonia de peces cebra

Los peces adultos se mantienen en tanques de 2.7 litros con agua de acuario; se separando a los machos de las hembras. La hembra se identifica por un vientre prominente color plateado y el macho por el vientre plano y color amarillo. Cada tanque, que contiene 5 peces adultos, se etiqueta con los siguientes datos: el número de tanque, el sexo, la cepa a la que pertenecen los peces y la fecha de fecundación. Los peces alcanzan la madurez reproductiva entre 12 - 16 semanas. En nuestra estrategia de cruce, cada pareja puede aparearse una vez por semana y produce hasta 300 embriones, esta condición se mantiene hasta por 4.5 meses.

La alimentación de los peces depende de la edad en la que se encuentren; cabe añadir que también de esto depende el contenedor en donde se les coloque. De 0-5 días se encuentran en cajas de Petri, en donde fueron puestos al ser colectados. De 5-13 días se colocan en vasos de precipitados, poniendo 20 larvas en 80 ml de agua de acuario; el día 5 se alimentan de paramecio dos veces al día con un poco de alimento sintético después de la última ingesta. El día 6 y 7 se alimentan de paramecio tres veces al día, con un poco de alimento sintético después del último alimento. El día 8 y 9 se alimentan con 10 ml de paramecio 3 veces al día. El día 10 y 11 se les da 10 ml de paramecio, e inmediatamente después media pipeta (1 ml) de artemia sin hojuela tres veces al día. El día 12 se les da una pipeta de artemia 3 veces al día. El día 13 se transfieren al sistema del acuario, se les coloca en un cilindro con rejilla; desde este día y hasta el mes de edad se les proporcionan 3 comidas que incluyen artemia de 48 horas y de 24 horas con y sin hojuelas en cada comida. Desde 1 mes hasta los 4 meses se les coloca en contenedores de 2.7 litros con rejilla y se les proporcionan tres comidas al día que incluyen artemia de 48 horas con y sin hojuela cada una y artemia de 24 horas sin hojuela. Después de los 4 meses se colocan en un tanque normal, separando a los machos de las hembras.

Para su reproducción, los peces se colocan en un tanque con doble fondo que permite que los embriones queden en un compartimiento evitando que los padres se alimenten de ellos. Cada caja de cruces puede llevar un máximo de 4 peces, en este caso se colocó una pareja por tanque, procurando que los peces fueran del mismo tamaño. Cada caja se etiquetó con los siguientes datos: la cepa, el número de machos por el número de hembras, el número de tanque de donde provienen los machos, el número de tanque de donde provienen las hembras y el nombre del experimentador que realizó dichas cruces. Ya que la reproducción está ligada al ciclo circadiano, un estímulo de luz inicia el

cortejo para la liberación de los ovocitos y espermatozoides. Las cruces de peces se colocaron por la tarde, entre las 3:30 y las 4:30 y al siguiente día por la mañana o la tarde, entre las 8:45 a 10:00 y de 12:00 a 13:00 hrs, se revisaron para ver si había embriones, si fue así se recolectaron. Antes de la recolección, se devolvieron los peces a los tanques correspondientes, verificando que el número de tanque y el número de peces fuera el correcto, además de identificar que el sexo de cada pez fuera el correspondiente. Para coleccionar los embriones se hizo pasar el agua de la pecera, donde se encontraban, a través de una coladera de malla chica en donde los embriones son retenidos. Luego esta coladera se volteó en una caja de Petri de plástico y utilizando una pizeta se vertió agua de acuario preparada con azul de metileno (concentración 1µg/ml) para depositar los embriones en dicha caja de petri; el agua preparada de esta manera evita el crecimiento de hongos y bacterias. Posteriormente, los embriones recolectados se observaron al microscopio estereoscópico con el objeto de dejar en dicha caja únicamente a los embriones en buen estado, desechando a los ovocitos sin fertilizar y a los embriones muertos. El número máximo de embriones que debe contener cada caja es de 60. La caja con los embriones se mantuvieron dentro de una incubadora a una temperatura de 28.5 °C. Con el objetivo de mantener en buen estado los embriones seleccionados, la caja se limpió al primer día de desarrollo, cambiando el agua y eliminando embriones en mal estado. Y a los 5 días de desarrollo se colocan en vasos de precipitados con agua de acuario para comenzar su alimentación.

El agua de acuario contiene la mezcla de sales llamada “Instant Ocean” a una concentración final de 0.25 g/L, también contiene bicarbonato de sodio a una concentración final de 4.1 mg/L. El pH se debe mantener entre 6.8-7.3 y la conductividad entre 400 a 600 microOhms, además la concentración de nitrato debe ser menor a 10 ppm. El cloro, amonio y nitrito deben ser 0 ppm. Su temperatura debe mantenerse entre 26-29 °C.

5.2 Genotipificación de la cepa hi1463 de pez cebra

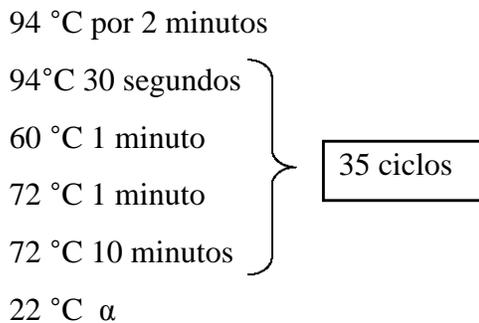
5.2.1 Obtención de la biopsia de la aleta caudal

Con una red se transfirió el pez adulto a una pecera que contenía 1 litro de agua de acuario con anestésico (500 ml Tricaina 0.5%) hasta que quedó anestesiado (entre 30 y 60 segundos) dependiendo del tamaño del pez, mientras más pequeño menos tiempo se requirió. Enseguida con una cuchara de plástico con hoyos se sacó al pez y se colocó sobre un área pequeña de parafilm que a su vez estaba sobre una toalla de papel humedecida con agua de acuario. Con un bisturí se cortaron 2/3 partes de la aleta caudal (la aleta eventualmente se regenera). El pez se colocó en un recipiente

con suficiente agua de acuario, mínimo 200 ml, etiquetado con un número que permitió reconocer a que muestra de biopsia pertenecía; en este recipiente permaneció una semana sin comer y sin cambios de agua. Con la punta del bisturí se colocó la biopsia en un tubo ependorff, previamente esterilizado, de 1.5 ml etiquetado con el mismo número que el del recipiente en el que se colocó al pez; este tubo contenía 50 µl de amortiguador de lisis (anexo 1), luego se incubó a 55°C por 4 horas y se mezcló brevemente. Se diluyeron 10 µl del lisado en 90 µl de agua desionizada. El tubo con el lisado ya diluido se colocó a 95 °C durante 5 minutos. Después se coló en hielo por un mínimo de 5 minutos y se tomaron 3 µl para hacer el PCR, o se guardaron a 40° C.

5.2.2 Reacción de PCR.

La mezcla de reacción contenía amortiguador para PCR 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Oligonucleótido MSL4 1mM, Oligonucleótido 1463c 1mM, 1463c1 1mM, Taq polimerasa (5U/µl) y 3 µl del lisado diluido de la biopsia y agua pura grado Milli Q. Los volúmenes de reacción fueron de 25 o 30 µl. El programa utilizado es el siguiente:



Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación son las siguientes:

1463c: 5`GTACTATTTACGCCACAGGGATTGTG3`

1453c1: 5`TCCCCTGTACGTAACATGATTGTGTA3`

MSL4: 5`GCTAGCTTGCCAAACCTACAGGT 3`

5.2.3 Electroforesis de DNA en gel de agarosa 2%.

Se preparó agarosa 2% disolviendo 4 g de agarosa en 200 ml TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X colocando el recipiente que los contenía en el microondas durante 1 minuto. En un vaso de precipitado se tomaron 70 ml de agarosa 2% y se le colocaron 1.5 µl de bromuro de etidio (5mg/ml). Se montó la cámara de electroforesis y se vertió el contenido del vaso. Cuando se solidificó el gel, este se cubrió con el buffer de corrida TBE 1X. Se diluyen los 25 µl de la mezcla de

PCR y 5 µl de buffer de carga; en cada carril se colocaron 20 µl de esta dilución. El gel se corrió a 100 voltios durante aproximadamente 35 minutos.

5.3 Observación *in vivo*, microscopia Nomarki y fotografía de embriones y larvas de pez cebra.

Para tomar las fotografías de los embriones y larvas mutantes en los diferentes estadios de desarrollo se uso una cámara digital (Sony DSC-F707) adaptada a un microscopio estereoscópico. Las fotos fueron mejoradas (contraste y brillo) con el programa Adobe Photoshop Version, pero siempre simultáneamente con el control silvestre. Para obtener las fotografías de la notocorda se utilizo un microscopio óptico Eclipse f600 (Nikon) con una cámara (Axiocam MrC Zeiss) adaptada y conectada a una computadora usando el programa AxionVision.

5.3.1 Observaciones de las estructuras de embriones silvestres y mutantes con el microscopio estereoscópico.

Embriones en estadio de esfera y anillo embrionario (5-6 hpf).

Los embriones utilizados provenían de la cruce de una pareja de la cepa hi1463 (portadores de una inserción retroviral). Se eligió una de las cajas con 60 embriones, que habían sido mantenidos a 28.5°C hasta el ese momento, de esta caja se tomaron 10 embriones y se colocaron en otra acomodándolos en la orientación requerida para tomar las fotografías. Las cajas que contenían a los embriones fotografiados se regresaron a la incubadora a 28.5 °C y se revisaron hasta el día tres del desarrollo; algunas de estas larvas presentaban el fenotipo característico de homocigos LIMP II -/-.

Alteraciones morfológicas en el cerebro (28 hpf)

Se quiso saber si los embriones homocigos presentaban alteraciones en el cerebro a las 28 hpf, pero en este tiempo es difícil observar el fenotipo característico de LIMP-/-; por lo tanto se observaron al microscopio estereoscópico todos los embriones que provenían de la cruce de una pareja de la cepa 1463 y que habían sido incubados a 28.5 °C hasta el momento en que se utilizaron, buscando alguna diferencia en la morfología del cerebro entre este grupo en comparación con embriones silvestres. Se observaron diferencias en 4 embriones, éstos se colocaron en cajas de Petri de vidrio separadas y etiquetadas con un número (1 - 4) y el signo -/-, que indicaba que era probablemente un embrión homocigo. En otras 2 cajas, etiquetadas con un número y el signo wt (silvestre) se colocaron 2 larvas silvestres, uno por caja.

Ya en su respectiva caja de Petri, los embriones se decorionaron, se acomodaron en una posición que permitiera ver la estructura del cerebro y se fotografiaron. Debido a que en este estadio la larva ya es sensible al tacto, cada caja de Petri se colocó en un recipiente con hielo durante 40 segundos aproximadamente con el propósito de anestesiar a la larva para poder acomodarla y tomar la fotografía. Inmediatamente estas larvas, en sus respectivas cajas de Petri, se incubaron a 28.5 °C. Las mismas larvas se observaron al microscopio a las 72 hpf, para constatar que aquellas larvas seleccionadas y marcadas como -/- presentaban el fenotipo del cuerpo curvo. Se tomaron las fotos de cada uno de estos peces.

Larvas silvestres y LIMP-/- de primero, segundo, tercero y quinto día de desarrollo.

Las larvas LIMP -/- se iban seleccionando según las diferencias morfológicas que presentaban en comparación con las silvestres, es decir la aparición del fenotipo mutante, y en los tiempos de desarrollo seleccionados (primero, segundo, tercero y quinto día). Todas provenían de una cruce de una pareja 1463 y se mantuvieron a 28.5 °C hasta en momento en que se fotografiaron.

5.3.2 Observación de la estructura de la notocorda con óptica Nomarski

La microscopía Nomarski es una técnica usada para observar detalles que no pueden ser visibles en preparaciones vivas. Se realiza con un microscopio compuesto equipado con óptica de contraste de interferencia diferencial y objetivos de un rango de 25X a 40X.

Las larvas homócigas utilizadas para estas fotografías provienen de diferentes cruces de parejas de la cepa hi1463. Se fotografiaron en el primero, segundo y tercer día de desarrollo. Estas larvas se seleccionaban de una caja que inicialmente contenía 60 embriones incubados a 28.5 °C, tomando en cuenta las diferencias que tenían en comparación con larvas silvestres en los mismos estadios.

Con una pipeta de transferencia, se colocó cada larva en una caja de Petri de plástico con agua de acuario con Tricaina 0.04% hasta que se anesthesiara, 60 segundos aproximadamente. Luego con otra pipeta se colocaba en un portaobjetos, este portaobjetos tiene pegados 2 cubreobjetos de cada lado, dejando un espacio de 1cm que funcionan como un puente; la larva se colocó en este espacio y luego se le colocó un cubreobjetos. La observación al microscopio óptico se hizo en objetivos de 10X y 20X.

5.4 Aislamiento de RNA total de embriones y larvas de pez cebra.

En un tubo eppendorff de 1.5 ml se colocaron 50 embriones o larvas, retirando la mayor cantidad de agua posible y se agregaron 0.8 ml del reactivo de trizol (Invitrogen) a temperatura ambiente (el trizol se guarda a 4 °C, y es un desnaturalizante muy potente que protege de RNAasas). Estas muestras se almacenaron congeladas a -80 °C, durante 2 mese aproximadamente, hasta que se realizó la extracción de RNA. Los estadíos seleccionados fueron de 500 células, 24 y 48 hpf, larvas del día 5 silvestres y larvas del día 5 con fenotipo LIMP-/-.

Para la extracción del RNA, se descongeló la muestra y se colocó en hielo. Con un pistilo de plástico desechable, estéril y libre de RNAasas se homogenizó la muestra extensivamente (se puede hacer a temperatura ambiente), inmediatamente se agregaron 0.2 ml de cloroformo, usando el vortex se mezcló durante 20 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Luego se centrifugó en la microfuga modelo “Minispin” (EPPENDORF) a 13 400 rpm por 15 minutos a 4°C, se formaron tres fases, utilizando una micropipeta (P200) con mucho cuidado se transfirió la fase superior acuosa que contiene el RNA a un tubo nuevo. Este paso determina la pureza de la muestra. A este tubo se le agregaron 0.5 ml de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos (Precipitación). Inmediatamente se microcentrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se formó un precipitado muy evidente; utilizando primero una micropipeta P1000 y luego una micropipeta P200 se retiró el sobrenadante sin llevarse el precipitado, el cual se lavo agregando 1ml de etanol 75% preparado con DEPC (dietilpirocarbonato, inhibe la acción de RNAasas), se microcentrifugó a 10 500 rpm por 5 minutos a 4°C; posteriormente se retiró el sobrenadante utilizando una micropipeta P1000 y luego una micropipeta P200 sin llevarse el precipitado; con el tubo abierto el precipitado se dejó a secar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregaron 136 µl de dH₂O-DEPC, 24µl de buffer de transcripción 10X (incubados a 37 °C por 5 minutos) y 80µl de DNAasa (ROCHE), en estricto orden. Se dejó incubar a 37°C por 1 hora. Se agregaron 300 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (se guarda en refrigeración), se mezcló enérgicamente por 20 segundos usando el vortex y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos (si el fenol se ve color rosa es que se oxidó y no sirve). Se microcentrifugó a 13 400 rpm por 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación se formaron tres fases, la fase inferior de fenol-cloroformo, una interfase y una fase superior acuosa con el RNA total. Utilizando una micropipeta P200 se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo (sin tomar absolutamente nada de la interfase), este paso determina la pureza de la muestra, al cual se le agregaron 0.5 ml de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente 10 minutos. Posteriormente se microcentrifugó a 13 400

rpm 10 minutos a 4°C. El precipitado es blanco y fácil de ver pero más pequeño que el anterior. Utilizando primero una micropipeta P1000 y luego una micropipeta P200 se retiró el sobrenadante. Se hizo un primer lavado, agregando 1 ml de etanol 75% preparado con dH₂O-DEPC, se microcentrifugó a 10 500 rpm por 5 minutos a 4°C; utilizando primero una micropipeta P100 y luego una micropipeta P200 se retiró el sobrenadante sin llevarse el precipitado, al cual se le realizó un segundo lavado de la misma manera que al anterior y después de retirar el sobrenadante, con el tubo abierto y a temperatura ambiente se dejó secar por 5 minutos. El RNA total aislado, libre de DNAsas se resuspendió en dH₂O-DEPC con: 1 µl por cada 5 embriones o larvas.

5.5 Cuantificación de ácidos nucleicos (RNA)

Se incubó la muestra a 65 °C por 10 minutos e inmediatamente se colocó en hielo por un mínimo de 2 minutos. Se diluyeron 5 µl en 700 µl de dH₂O-DEPC y se midió la absorbancia usando una celda de cuarzo de 1 ml en el espectrofotómetro (LKB-BOCHROM Ultrospec II) a 260 y 280 nm de longitud de onda.

Se calculó la pureza, concentración y rendimiento de la muestra con las siguientes fórmulas.

Pureza= $\text{abs } 260/\text{abs } 280$ (cualquier valor entre 1.8 y 2 es bueno y de 1.6 a 1.8 no es tan bueno pero se puede trabajar).

La concentración se calcula por la siguiente formula:

$$(\text{Densidad óptica } 260\text{nm}) (40) (\text{Veces de dilución}) = \text{Concentración de DNA en } \mu\text{g/mL}$$

Para conocer el rendimiento se multiplica la concentración por la cantidad de µl totales de muestra en el tubo.

5.6 Síntesis del cDNA por reverso transcripción (RT-PCR)

Se etiquetaron 2 tubos ependorff de 1.5 ml, a cada uno se le agregaron 2 µg de RNA total (el volumen a tomar depende de la concentración en la que se encuentre la muestra inicial), 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de Oligonucleótido dT, se completa un volumen de 10µl con dH₂O-DEPC por tubo. Se incubaron a 65 °C por 5 minutos y luego se colocaron en hielo durante un minuto. Se preparó la mezcla de reacción (+RT y -RT) para cada tubo. De la mezcla + RT que tenía 2µl de Buffer RT 10X, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2µl de DTT 0.1M, 1µl de la enzima “RNAasa out” (40 U/µl), 1 µl de Super script III (200 U/µl) se agregaron 10 µl al tubo marcado como “tubo 1” y 10 µl la mezcla -RT que tenía 2µl de Buffer RT 10X, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2µl de DTT 0.1M, 1µl de RNAasa out (40 U/µl), 1 µl dH₂O-DEPC, se colocaron en el tubo marcado como tubo 2. Luego los

tubos 1 y 2 se incubaron a 50 °C por 50 minutos y posteriormente se colocaron a 85 °C durante 5 minutos. Se pusieron en hielo 2 minutos y a cada tubo se le colocó 1µl de RNAasa H (2U/µl) incubandose 2 minutos a 37 °C y se colocaron en hielo. Se usaron 3µl del cDNA para la reacción de PCR.

5.7 Reacción de PCR

Para la amplificación de Actina, la cual se usa como control, la reacción de PCR contenía buffer 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0.2 mM, oligonucleótido Actin F1 y Oligonucleótido Actin R1 0.5 mM, Taq polimerasa (5 U/µl) y agua pura grado Milli Q. El volumen de reacción fue de 25 µl, 22 µl de la mezcla de reacción y 3µl de cDNA. El programa utilizado es el siguiente:

94 °C por 1 minuto
94°C por 15 segundos }
60 °C por 30 segundos } 35 ciclos
68 °C por un minuto }
72 °C por 10 minutos
22 °C α

Las secuencias de los oligonucleótidos de actina utilizados son las siguientes:

Actin F1: 5` CATCAGCATGGCTTCTGCTCTGTATGG 3`

Actin R1: 5` GACTTGTCAGTGTACAGAGACACCCTG 3`

Para la amplificación de LIMP II, la reacción de PCR contenía Buffer 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0.2 mM, Oligonucleótido 1463-3 y Oligonucleótido 1463-4 0.5 mM, Taq polimerasa (5 U/µl) y agua pura grado Milli Q. El volumen de reacción fue de 25 µl, 22 µl de la mezcla de reacción y 3µl de cDNA. El programa utilizado es el siguiente:

94 °C por 1 minuto
94°C por 15 segundos }
60 °C por 30 segundos } 35 ciclos
68 °C por un minuto }
72 °C por 10 minutos
22 °C α

Las secuencias de los oligonucleótidos de LIMP II utilizados son las siguientes:

1463-3: 5` GCA CCC ATTGTTGTGTCATTCCCT 3`

1463-4: 5` CATTCTTTCTCTGGCGGTTTCTGC 3`

5.8 Electroforesis en gel de agarosa

Se prepara un gel de agarosa 1%, disolviendo 2 g de agarosa en 200 ml TBE 1X, en un vaso de precipitados se tomaron 50 ml y se le colocan 2 µl de bromuro de etidio (5 mg/ml). Se montó la cámara para electroforesis y vertió el contenido del vaso. Cuando el gel solidificó, se cubrió con TBE 1X. Se mezclaron 25 µl de la mezcla de PCR y 5 µl de buffer de carga. En cada carril se cargaron 20 µl. El gel se corrió a 100 voltios aproximadamente 35 minutos.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación de peces portadores de la inserción retroviral

Para describir las alteraciones que se presentaron durante el desarrollo embrionario del pez cebra, causadas por la mutación en el gen LIMP II, primero fue necesario asegurar que el fenotipo que se estaba analizando correspondía a embriones y larvas en condiciones homocigas para dicha mutación. La mutación es causada por una inserción retroviral que se hereda de forma mendeliana y recesiva (Ámsterdam 1999), de acuerdo a esto solo un 25% de la descendencia de una pareja portadora de la mutación presentará el fenotipo mutante, ya que en este 25% la mutación se presenta en condición homociga. Para la identificación de peces portadores, se realizó la genotipificación de una colonia de peces de la cepa hi1463 a través de la amplificación de segmentos de DNA del gen LIMP II con la técnica de PCR, utilizando 3 oligonucleótidos diferentes en la misma mezcla de reacción; dos de ellos, 1463c y 1463c1, amplifican una región de 410 pb del gen no mutado; y 1463c con un tercero, MSL4, amplifican una región de 210 pares de bases del gen mutado, en este caso 104 pb corresponden a una región del gen y 106 corresponden a una región de la inserción retroviral (Fig.7 A). De esta manera, al obtener los productos de PCR y observar su movilidad electroforética en un gel de agarosa al 2%, observamos que, como era esperado, en algunos carriles había dos bandas, una de 410 pb y otra de 210 pb; y en otros solo una de 410 pb (Fig.7 B). Como cada carril corresponde a un pez, en aquellos en donde se obtiene una sola banda identificamos a peces silvestres, pues se amplificó la misma región en ambos alelos. En los carriles en donde se obtienen dos bandas identificamos peces portadores, pues se amplificó tanto el alelo mutado como el silvestre.

Como resultado de la genotipificación de una colonia de 64 peces de la cepa hi1463, se identificaron 28 peces silvestres y 36 peces heterocigos portadores de la inserción retroviral en LIMP II. Esto corresponde a 28% de peces silvestres y 56% de peces portadores, lo cual corresponde a la distribución mendeliana esperada para una cruce en que ambos padres son portadores. Así se obtuvieron a los peces portadores, que se utilizaron en las cruces para obtener de los embriones utilizados en los siguientes experimentos.

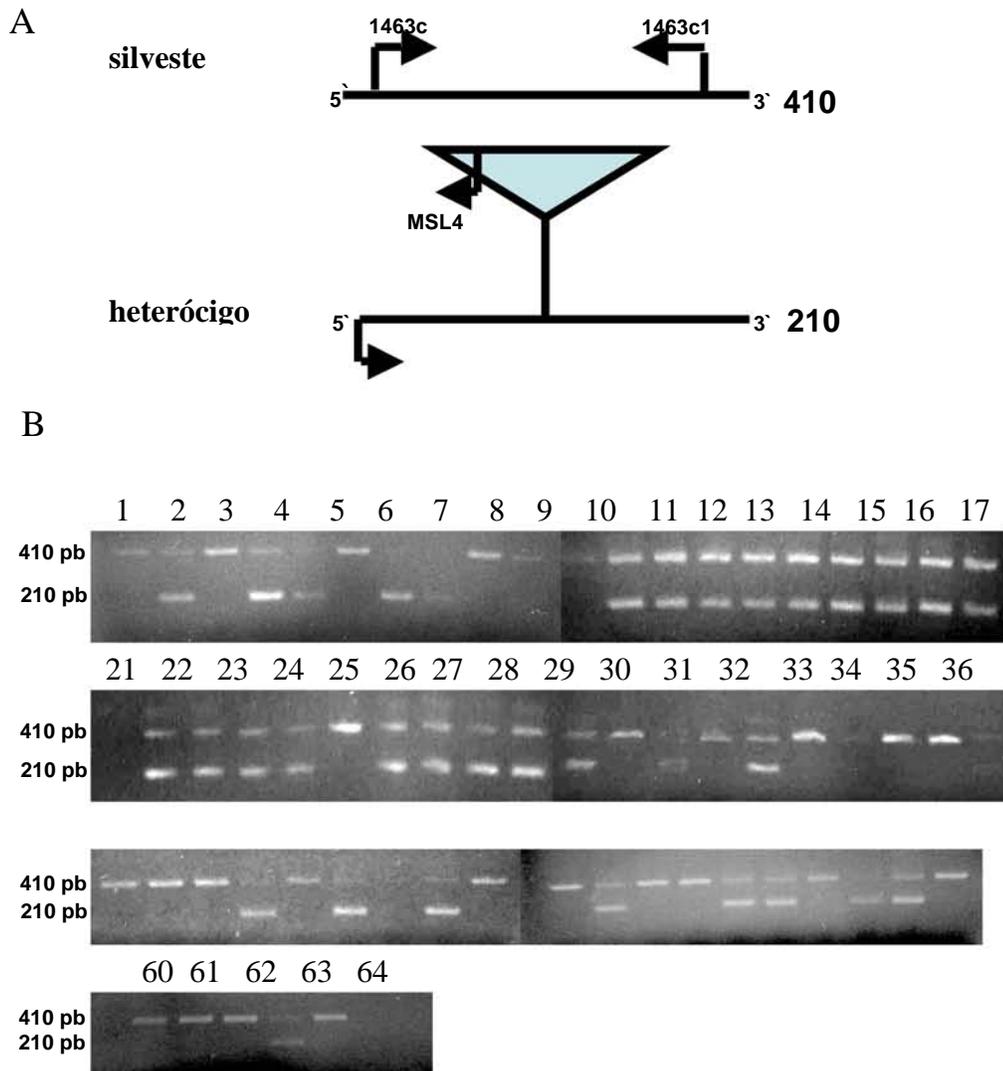


Figura 7. Resultados de la genotipificación por PCR de posibles mutantes en la cepa hi1463 de pez cebra. (A) En este diagrama se muestra la estrategia de genotipificación seguida, se indica el peso molecular de las bandas esperadas de acuerdo al segmento a amplificar. (B) Se presenta un gel de agarosa al 2% mostrando las dos bandas que representan la amplificación de dos productos de PCR de heterócigos. El superior (410 bp) corresponde a la amplificación del producto de los oligos 1463c y 1463c1 en un contexto genómico wt, mientras que la banda inferior representa la amplificación con los oligos 1463c y MSL4.

6.2 Alteraciones en estadios tempranos del desarrollo embrionario

El desarrollo del pez cebra está dividido en varios estadios, de acuerdo a características específicas que definen cada uno. De esta manera al observar a los embriones en el microscopio estereoscópico, es fácil identificar en que estadio se encuentra un embrión. La tasa de desarrollo depende de la temperatura a la que se encuentren; se sabe que entre 25°C - 33°C parecen desarrollarse normalmente. Incubándolos por largos periodos sobre o bajo dicho rango de temperatura se pueden producir anomalías (Kimmel et. al. 1995). Para la identificación del estadio de desarrollo de los embriones utilizados en este estudio, se manejó el tiempo de desarrollo estándar, definido como horas normalizadas después de la fertilización a 28.5°C, considerada como la temperatura óptima de desarrollo, indicadas como horas post fertilización.

En un grupo de 30 embriones provenientes de diferentes cruces de heterocigos, en donde se espera que 25% de los embriones sean homocigos, no se observaron diferencias entre ellos. Todos los embriones analizados en el estadio de esfera (4 hpf) presentaron un borde liso entre el vitelo y el blastodisco, así como una forma esférica (Fig.8 A y B) y todos los analizados en el estadio de anillo germinal (3 2/3 hpf) presentaban un engrosamiento anular en el margen del blastodermo así como también se observó que la mitad del vitelo estaba cubierta por el blastodermo (50 % de epibolia) (Fig.8 C). Las diferencias entre embriones homocigos y silvestres se presentaron a partir de las 28 hpf; la diferencia más evidente entre embriones provenientes de una misma puesta de una pareja de portadores era la falta de pigmentación, estos embriones hipopigmentados presentaron también alteraciones morfológicas en diferentes regiones del cerebro. Debido a que este fenotipo del cerebro es difícil de observar, se procedió a fotografiar a embriones candidatos a las 28 hpf; los mismos embriones se observaron y fotografiaron en el tercer día de desarrollo confirmando así que eran homocigos ya que presentaban el cuerpo curvo, lo que es característico de esta mutación (Fig.8 D - I). Morfológicamente, en peces silvestres se observó que una prominente subdivisión transversal del cerebro en el primordio cerebelar separaba el cerebro medio del cerebro posterior. Todo excepto la parte posterior del cerebro medio es esculpido por un surco horizontal distintivo que separaba al tectum (dorsal al surco) del tegmentum (ventral al surco). Las rombómeras daban a la superficie dorsal de la región del cerebro posterior una apariencia grumosa. En los homocigos principalmente se observaron tres regiones alteradas, una es la parte anterior del cerebro medio en donde se observa un abultamiento; la otra en el cerebro posterior, donde el límite de las rombómeras es más cercano a la parte dorsal de la larva; y la última, se encuentra en la región del primordio cerebelar en donde

también se observa un abultamiento. Es importante aclarar que estas tres alteraciones no se encontraron juntas en un mismo embrión, tal como se observa en la Figura 8.

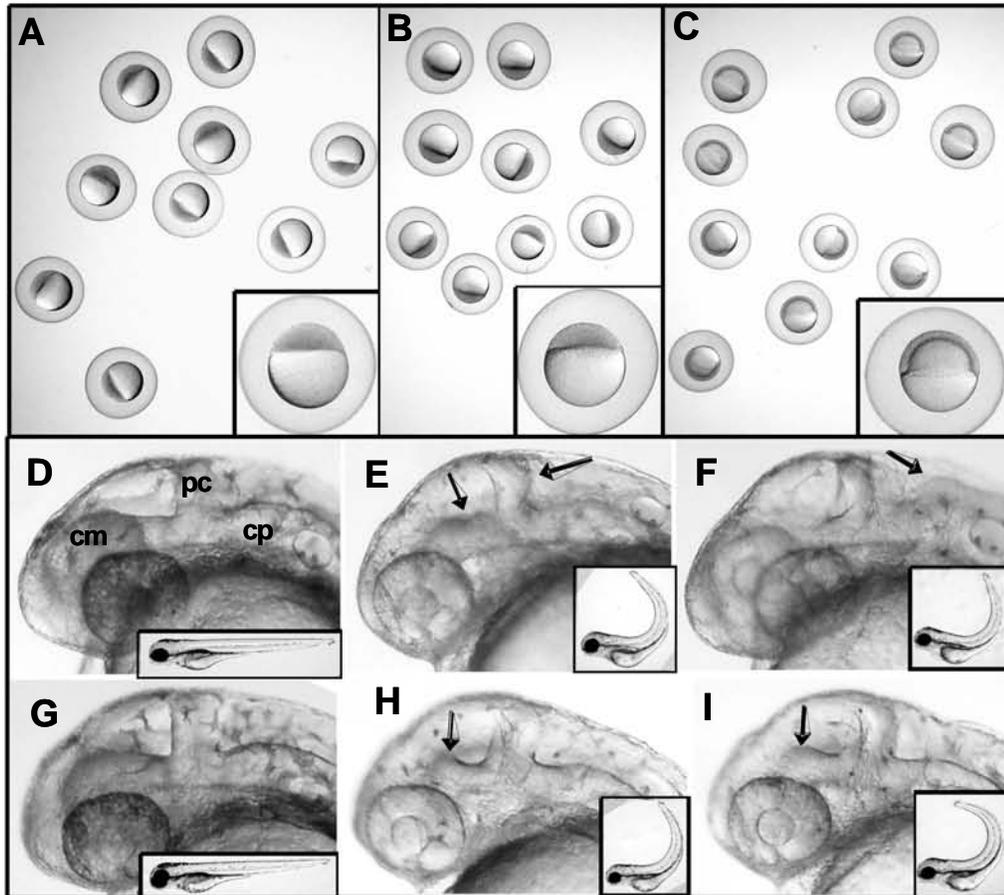


Figura 8. Fenotipo de la mutante hi1463 en estadios tempranos. (A y B) es el estadio de esfera (4 hpf) y (C) es el estadio de anillo germinal (5.7 hpf). En (A-C) se ven embriones provenientes de diferentes cruces heterocigas de hi1463 en donde se esperaba que 25% de los embriones sean homocigos, sin embargo no se apreciaron defectos en estas etapas de desarrollo embrionario. En los recuadros de (A - C) se ven ampliaciones de los embriones. En (D y G) hay embriones de 28 hpf en condición wt y en (E, F, H e I) embriones del mismo estadio pero que son homocigos. En 28 hpf los homocigos hi1463 presentaron alteraciones morfológicas del cerebro en desarrollo (flechas). Nótese la falta de pigmentación en los hi1463 homocigos. En los recuadros en (D - I) se observa exactamente el mismo pez 2 días después, lo cual confirma que son homocigos ya que la curvatura del cuerpo es característica de esta mutación. cm: cerebro medio, pc: primordio cerebelar, cp: cerebro posterior.

A las 30 hpf, además de la alteración en algunas regiones del cerebro (Fig.9 D), los homocigos comenzaron a presentar ligeras diferencias en el resto del cuerpo, en comparación con los silvestres (Fig. 9 A y C), como es una longitud menor del cuerpo y una hipopigmentación más evidente que a las 28 hpf (Fig.9 B y D).

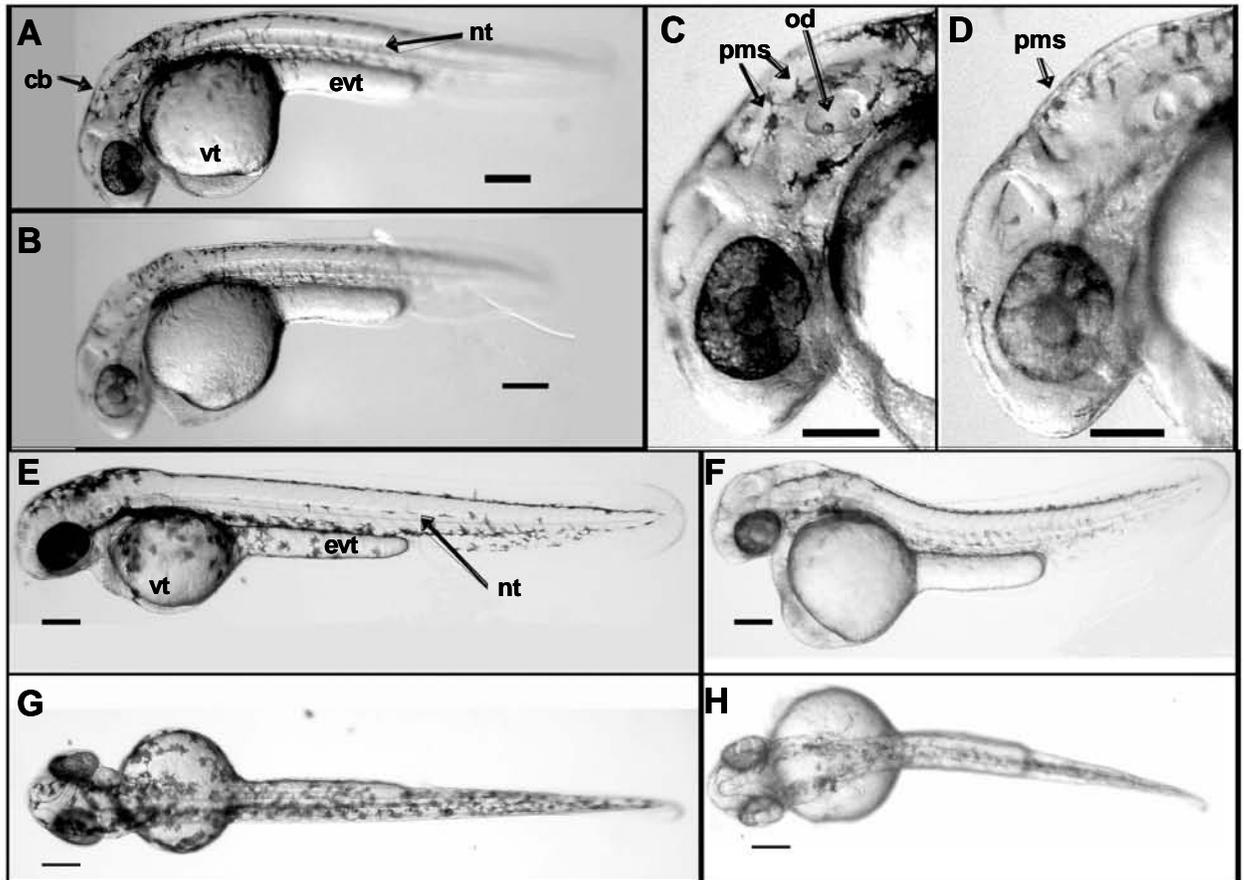


Figura 9. Fenotipo de la mutante hi1463 en el primer y segundo día del desarrollo embrionario. (A, C, E y G) corresponden a embriones silvestres y (B, D, F y H) a embriones mutantes hi1463. De (A - D) son del estadio de 30 hpf y de (E - H) son del estadio de 48 hpf. En el primer día de desarrollo en los embriones homocigos hi1463 la única anomalía importante que presentaron fue en la formación del cerebro, el cuerpo era más corto y hubo hipopigmentación. En el segundo día de desarrollo los embriones mutantes mostraron un retraso importante, que es evidente por el tamaño y forma del vitelo. La barra en (A - B) y (E-H) representa 250 μm y en (C-D) 150 μm . cb: cerebro, o: ojo, nt: notocorda, vt: vitelo, evt: extensión del vitelo, pm: pigmentos, od: oido.

6.3 Alteraciones en estadios tardíos de desarrollo embrionario

En el segundo y tercer día de desarrollo embrionario en las larvas silvestres ya se observaba una notocorda bien desarrollada y un juego completo de somitas. También apareció la sensibilidad al tacto, observándose una reacción de nado rítmico. En las larvas mutantes en el segundo día de desarrollo se presentaron anomalías morfológicas más evidentes; una de ellas es la curvatura del cuerpo (Fig.9 F - H) que aunque muy ligera en el segundo día, al tercer día se hizo más pronunciada (Fig.10 B, D y F) y para el día 5 se volvió más severa afectando gravemente la locomoción, las larvas nadan haciendo círculos (Fig.10 I y J). Cabe mencionar que no en todos los peces la curvatura del cuerpo se hace tan severa como en el pez de la Figura 10 I, en algunos se mantuvo a partir del tercer día de desarrollo. Otros no presentaron esta curvatura, sin embargo en una vista dorsal el tronco tenía forma de línea ondulada, también a partir del tercer día de desarrollo.

En el segundo día de desarrollo los embriones mutantes mostraron un retraso importante, evidente por el tamaño y forma del vitelo (Fig. 9 E y F). La pigmentación, que se observó disminuida a partir del segundo día de desarrollo, se va recuperando en el día tres y en el día cinco el patrón de pigmentación tiene una apariencia normal; sin embargo los melanocitos se vieron más expandidos (Fig.11 recuadros).

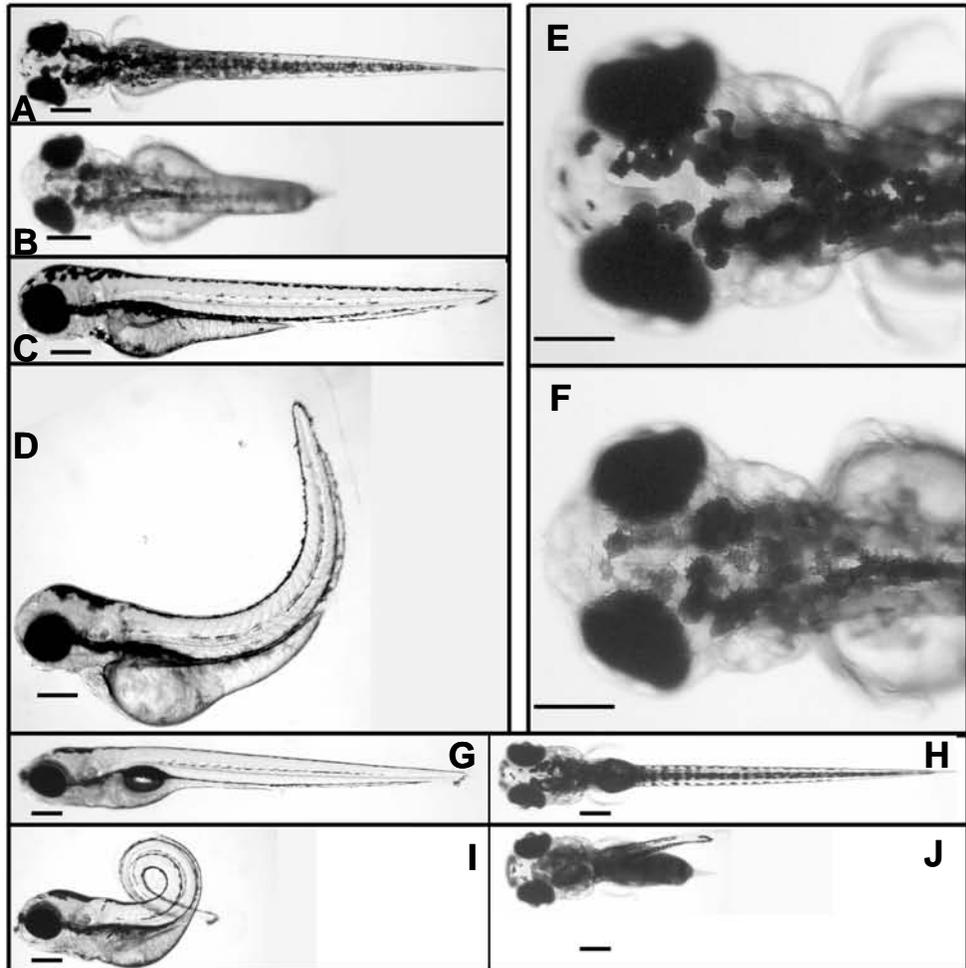


Figura 10. Fenotipo de la mutante hi1463 en el tercer y quinto día del desarrollo embrionario. (A,C,G y H) corresponden a larvas silvestres y (B, D, F, I, y J) a larvas mutantes hi1463. De (A - F) son larvas de 3 días de desarrollo y (G - J) de 5 días. En el tercer día de desarrollo las larvas mutantes hi1463 presentaron anomalías morfológicas evidentes; el cuerpo era curvo debido a defectos en la notocorda (D), sin embargo la pigmentación se recupera. En el día número 5 la curvatura del tronco fue más severa (I) lo que afectó notablemente la locomoción y la pigmentación se había recuperado por completo (J). La vejiga natatoria (indicada con la flecha) en las larvas mutantes no se formó (I). La barra en (A- D) y (G - J) representan 250 μm y en (E - F) 150 μm .

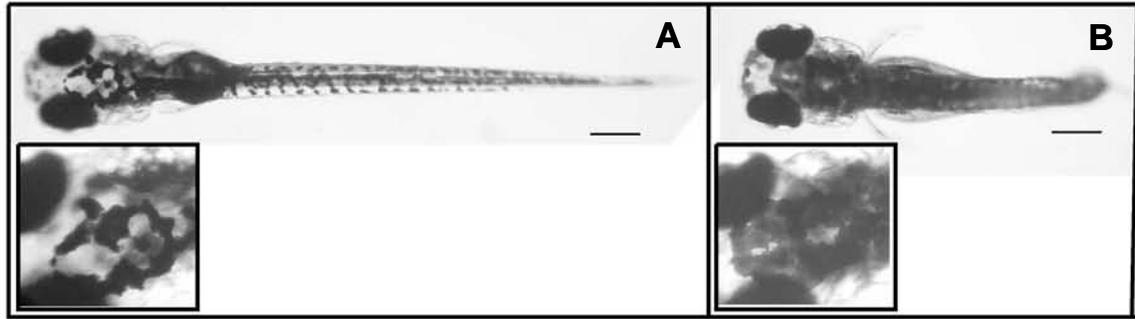


Figura 11. Defectos en la expansión de melanocitos en la mutante hi1463 en el quinto día del desarrollo embrionario. (A) corresponde a una larva silvestre y (B) a una larva mutante hi1463. Aunque las larvas mutantes recuperaron la pigmentación, los melanocitos se veían sumamente expandidos (ver recuadros). La barra de medida representa 250 μm .

6.4 Estructura de la notocorda de larvas homocigas de LIMP II.

La notocorda en las larvas silvestres se veía como un tubo a lo largo del cuerpo, formado por células con una gran vacuola (Fig. 13 A, C y D; Fig. 14 A y B). Esta estructura se origina mediante un proceso en el cual el cordomesodermo es especificado como un mesodermo de línea media, y enseguida hay una transición del cordomesodermo a notocorda, la cual se denomina “diferenciación notocordal”. Las características morfológicas que marcan la diferenciación de la notocorda son que las células del cordomesodermo desarrollan una gruesa membrana basal, la cual forma una vaina o tubo alrededor de la notocorda y acoplado al desarrollo de la membrana basal, cada célula adquiere una gran vacuola que ejerce presión de turgencia contra la vaina (Gong et. al. 2004). Ya que la mutación se hereda de forma mendeliana y como es recesiva, solo un 25% de la descendencia de una cruce heterociga de la mutante hi1463 presentará el fenotipo mutante; por esto se tomaron 14 embriones, de una caja de 60 para fotografiarlos, esperando que algún embrión de este grupo fuera homocigo y presentara alguna diferencia con los silvestres; a las 24 hpf, en la estructura de la notocorda de todos los embriones provenientes de esta cruce las células se eran grandes y con una morfología homogénea, más ordenadas en la región anterior que en la posterior posiblemente debido a que la notocorda se desarrolla antero-posterior (Fig.12). En algunas imágenes se logra observar una estructura que podría ser la vaina. En el segundo y tercer día de desarrollo embrionario las células de la notocorda en peces silvestres estaban más ordenadas y eran de mayor tamaño en la región anterior, que en el primer día (Fig.13 C y D, Fig.14 C y D). En los peces homocigos, en el segundo día de desarrollo, las células se ven de diferentes tamaños, formas y desorganizadas a lo largo de la notocorda (Fig.13 A y B). Al tercer día se mantiene tanto la condición desordenada como la heterogeneidad en la forma y tamaño de las células, sin embargo en algunas regiones se observan espacios, tal vez regiones de degeneración celular (Fig.14 C y D).

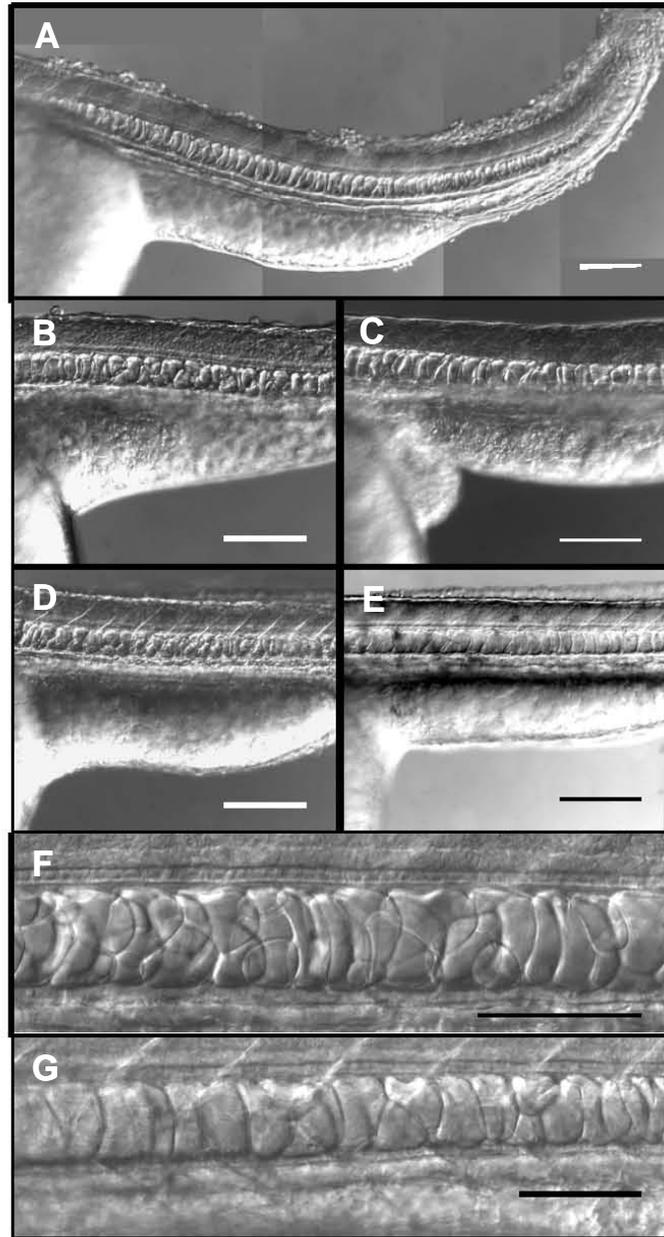


Figura 12. Imágenes en óptica Nomarski de la notocorda de embriones de pez cebra de 1 día de desarrollo. (A - G) son 7 embriones diferentes provenientes de una cruce heterociga de la mutante *hi1463* por lo que al menos uno debe de ser homócigo, sin embargo no se observó alguna diferencia en la notocorda de este grupo de embriones. (A - E) son fotos tomadas en el objetivo de 10 X y de (F y G) en el 20 X. La notocorda se desarrolla antero-posteriormente por lo que en algunas regiones anteriores las células ya estaban ordenadas y en zonas posteriores todavía no. La barra de medida representa 250 μm en (A - E) y 100 μm en (F y G).

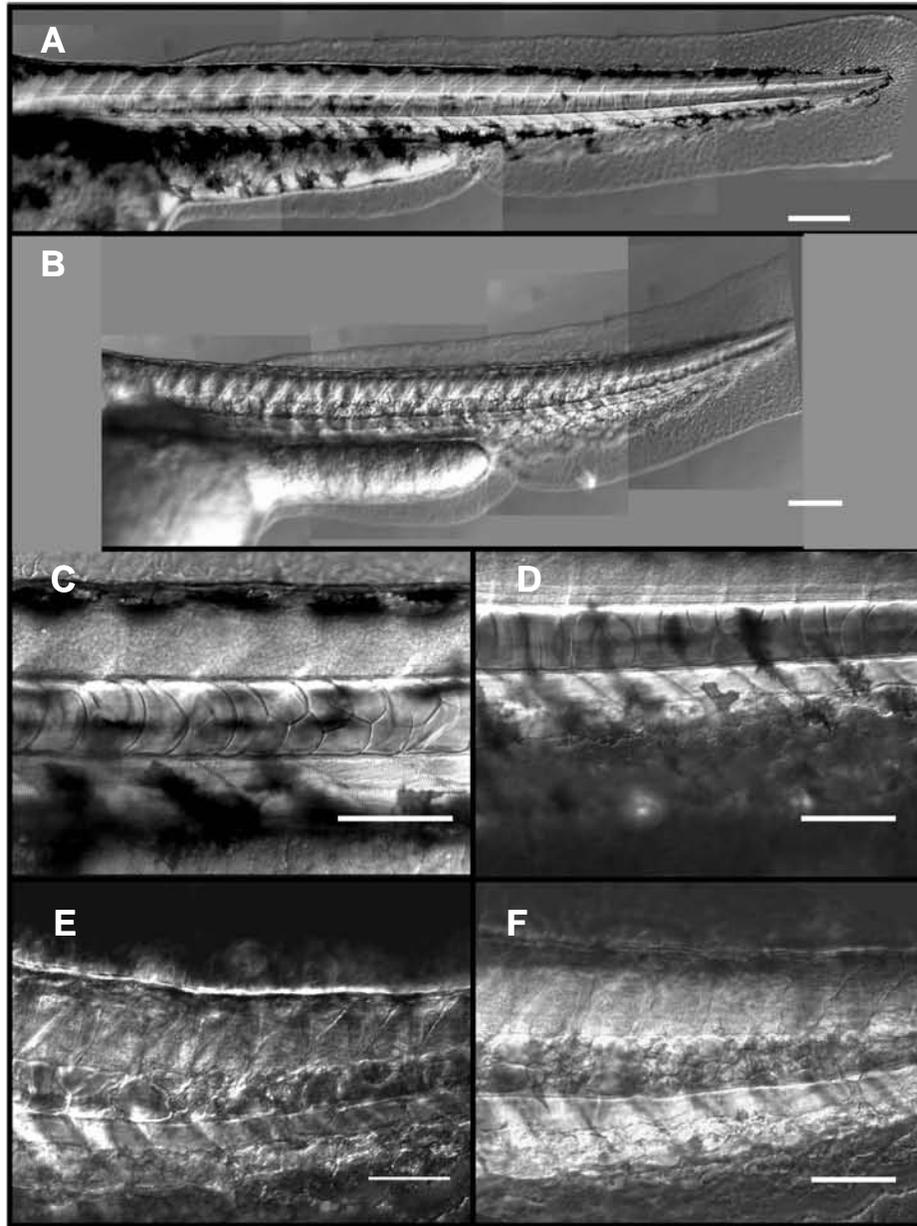


Figura 13. Imágenes en óptica Nomarski de la notocorda de larvas de pez cebra de 2 días de desarrollo. (A ,C y D) son larvas silvestres y (B, E y F) son homocigos, todos provenientes de una cruce heterociga de la mutante hi1463. (A - B) son fotos tomadas en el objetivo de 10 X y de (C - F) en el 20 X. El cuerpo de los peces silvestres era recto, mientras que la de los homócigos comenzaba a tomar ligeramente una forma curva (A - B). En algunas regiones de la notocorda en los peces homócigos las células eran más pequeñas y desordenadas (E- F). En la notocorda de lo peces silvestres las células eran grandes y ordenadas, una después de otra en la región anterior, en la parte posterior aun no adquirían esta disposición puesto que el desarrollo notocordal es antero-posterior. La barra de medida representa 250 μm en (A - B) y 150 μm en (C y F).

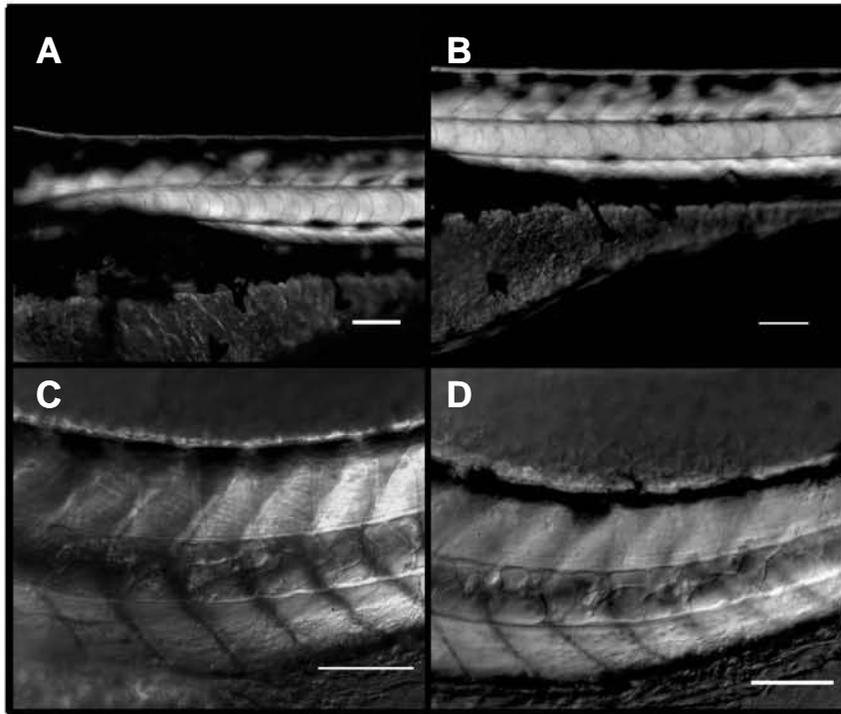


Figura 14. Imágenes en óptica Nomarski de la notocorda de larvas de pez cebra al tercer día de desarrollo. (A - B) son larvas silvestres y (C - D) son homócigos, todos provenientes de una cruce heterociga de la mutante hi1463. (A - D) son fotos tomadas en el objetivo de 10 X. El cuerpo de los peces silvestres era recto (A -B) mientras que la de algunos homócigos adquirió una forma curva muy pronunciada, debido a que las células de la notocorda están alteradas (C - D). En algunas regiones de la notocorda en los peces homócigos las células eran más pequeñas y desordenadas (C- D). La barra de medida representa 150 μ m en (A - E).

En el anexo 1 en la Tabla.1 se resumen las características observadas en las diferentes estructuras de los embriones analizados, tanto silvestres como mutantes, durante los estadios de desarrollo embrionario seleccionados.

6.5 Expresión de LIMP II en diferentes estadios de desarrollo.

Un aspecto importante que ayuda a inferir la función de un gen es el análisis espacio temporal de su expresión, y la técnica de RT-PCR uno de los métodos que se puede utilizar para este aspecto. Esta técnica consiste en aislar el mRNA de una muestra, en este caso de embriones en un estadio del de desarrollo específico y luego sintetizar cDNA (DNA copia) in vitro a partir de mRNA. Los mRNA aislados representan solo aquellos genes que se están expresando. Cada mRNA sirve como

molde para la síntesis de una cadena de DNA complementario. El proceso de transcripción de DNA en RNA se conoce como transcripción inversa, y es catalizado por una transcriptasa inversa. Enseguida el cDNA es amplificado por PCR, utilizando oligonucleótidos complementarios a una porción del mensajero. Luego los productos de la amplificación de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1% para observar en que períodos de desarrollo se expresa el gen.

Es este trabajo se realizó la técnica de RT-PCR usando muestras de embriones silvestres en diferentes periodos del desarrollo embrionario: 500 células, 24, 48 y 120 hpf, para observar la expresión temporal del gen LIMP II; así como para investigar su presencia o ausencia en larvas mutantes con 5 días de desarrollo.

Cuando se realizó la extracción del RNA total así como la síntesis de cDNA, se tomaron las precauciones necesarias para evitar la contaminación de las muestras, sin embargo para asegurar que lo que se amplificó por PCR y observó en el gel de agarosa no proviene de DNA genómico se realizó un control en la síntesis de cDNA. Uno de los componentes clave en la mezcla de reacción para la reverso transcripción es la enzima transcriptasa inversa, sin la cual no se sintetizaría el cDNA y por lo tanto no habría segmento que amplificar en la PCR y no observaríamos nada en el gel en el que corremos las muestras amplificadas. Nuestro control consistió en un tubo al cual se le agregaron todos los componentes de la mezcla de reacción menos la enzima. De esta manera, al hacer nuestro experimento teníamos 2 tubos, uno con la enzima (+RT) y otro sin ella (-RT); y por lo tanto en el gel de agarosa en donde se corrieran ambas muestras, amplificadas por PCR, se esperaría ver una banda en donde se colocó la mezcla +RT y que no hubiera nada en donde se colocó la mezcla -RT; de lo contrario esto significaría que nuestras muestras estaban contaminadas con DNA genómico. En nuestros resultados observamos que todas las muestras estaban libres de DNA genómico, haciendo confiable el análisis de la expresión en los estadios de desarrollo seleccionados. Otro aspecto que hay que tomar en cuenta es que la cantidad de mRNA sea la misma en todas las muestras de los diferentes estadios, para esto se utilizó un control de carga, en este caso se utilizaron oligonucleótidos de actina como control de carga ya que el gen de actina se transcribe en todos los estadios de desarrollo y en las mismas cantidades. De esta manera al observar una banda de actina de intensidad similar en todos los estadios aseguramos que el que se observó bandas LIMP II de intensidades distintas se debe al nivel de expresión del gen y no a que se colocó más o menos muestra de RNA.

En nuestros resultados se observó que no hay mRNA en la mutante en el día 5 de desarrollo (Fig.15), por lo tanto la inserción retroviral que interrumpe el gen provocó la ausencia del mRNA y como consecuencia el fenotipo mutante de los homócigos de LIMPII.

También se encontró que en embriones en el estadio de 500 células y a las 24 horas de desarrollo el mRNA de LIMP II no se presenta (Fig.16); y es hasta los días 2, 3 y 5 (Fig.15 y 16) del desarrollo cuando se presentó.

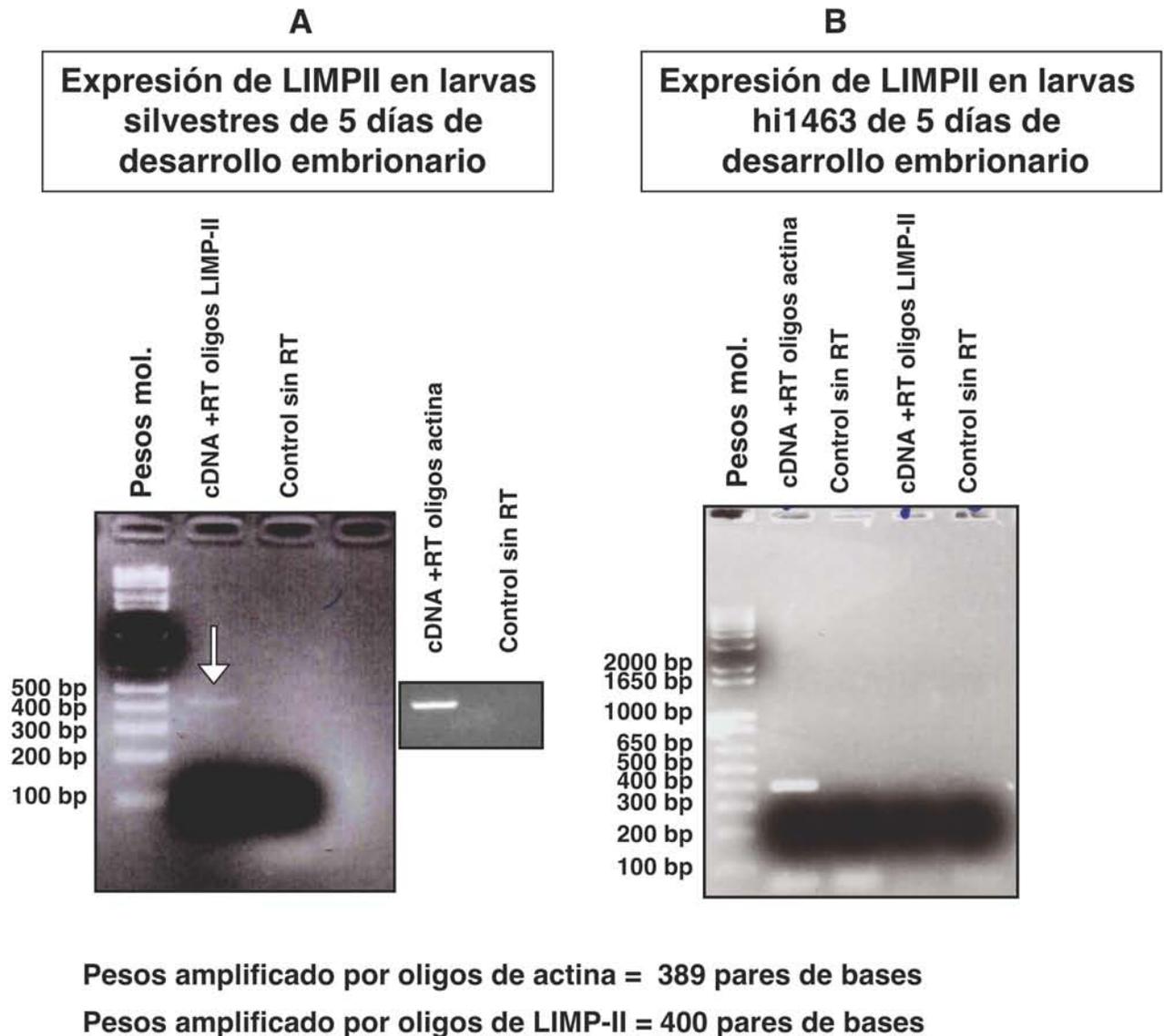


Figura 15. Geles de agarosa con productos de RT-PCR de larvas de 5 dpf con oligos de actina y LIM II. En (A) hay un gel 2% con productos aplicados con oligos de LIMPII de larvas silvestres de 5 días de desarrollo, en donde se observa una banda de 400 pb. En (B) hay un gel 1% con productos amplificados con oligos de LIMP II de larvas de 5 días de desarrollo, en donde no se observa ninguna banda. En ambos (A y B) se utilizaron oligos de actina como controles, obteniendo una banda de 389 pb.

Expresión del gen LIMP II en embriones silvestres de varios estadios de desarrollo embrionario

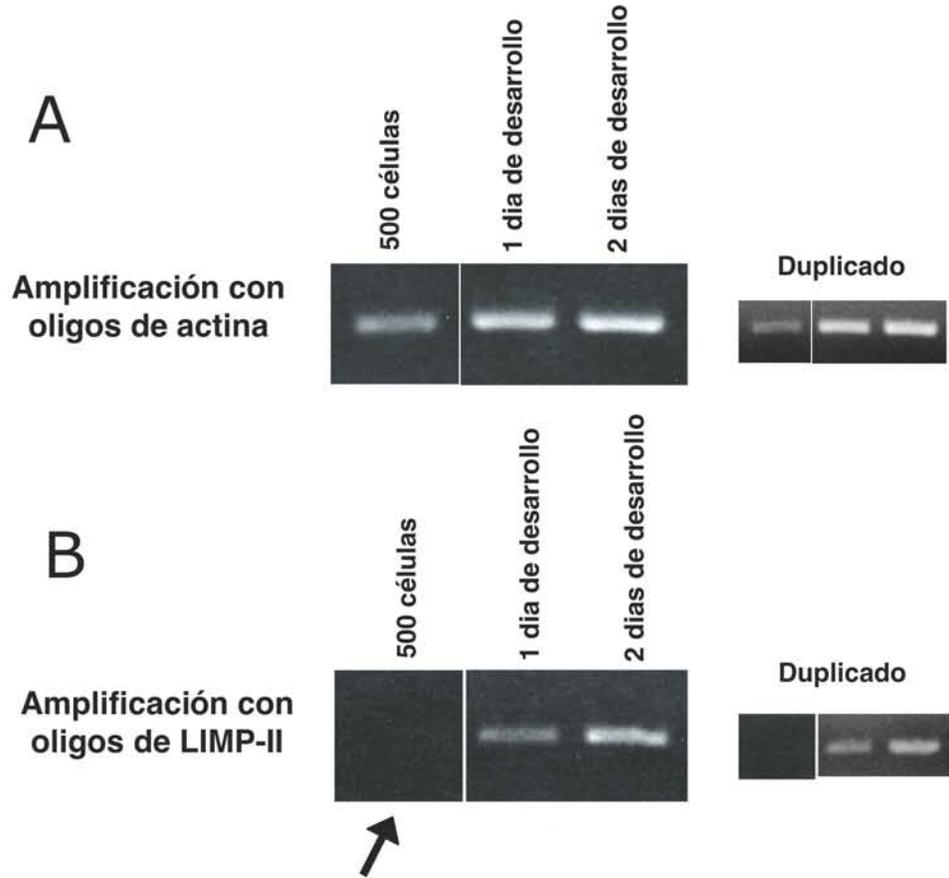


Figura 16. Geles de agarosa 1% con productos aplicados de RT-PCR de embriones y larvas de diferentes periodos de desarrollo, con oligos de LIMP II y Actina. En (A) se observa el control de actina para cada estadio, es una banda de 389 pb. En B se observan productos aplicados con oligos de LIMP II, en el estadio de 500 células no se observa ninguna banda pero en d1 y d2 pf se observa una banda de 400 pb.

7. DISCUSIÓN

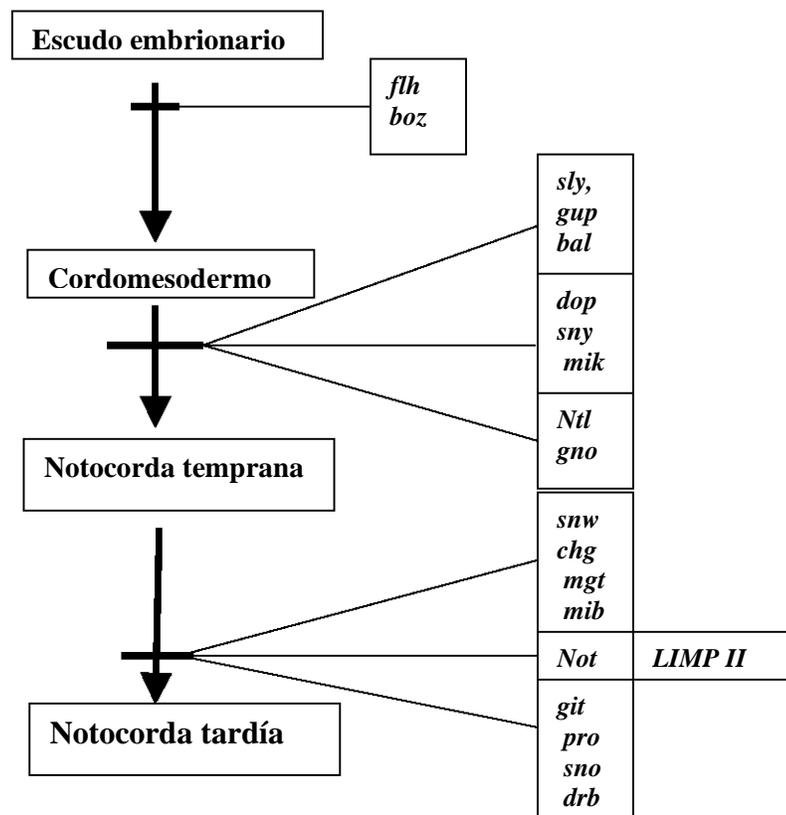
En la mutante hi1463 de pez cebrá se observan algunas alteraciones durante el desarrollo embrionario, como consecuencia de la falta de la proteína integral de membrana lisosomal LIMP II; lo cual se concluye a partir de los resultados del análisis de la expresión del gen LIMP II a través de RT-PCR que muestran que la inserción retroviral en los mutantes homocigos provoca la ausencia del mRNA (Fig. 5). Dichas alteraciones se presentaron hasta los estadios tardíos del desarrollo embrionario, a partir de las 28 hpf, ya que en los estadios de desarrollo temprano, estadio de esfera del periodo de blástula y el estadio de anillo germinal del estadio de gástrula, no se observaron alteraciones en los embriones mutantes analizados.

Se sabe que en el periodo de blástula, la división celular continúa y al mismo tiempo inicia la epibolia, la cual parece depender de microtúbulos funcionales que podrían estar bajo el control de genes cigóticos activados tempranamente, en el estadio de 512 células comienza la transcripción cigótica (Kimmel, 1995). Todos los embriones analizados, tanto mutantes como silvestres, en el estadio de esfera (4 hpf) presentaron un borde liso entre el vitelo y el blastodisco, así como una forma esférica (Fig. 8 A y B) lo cual podría reflejar que la ausencia de LIMP II no produce alteraciones en los procesos de desarrollo de periodos previos, ya que de lo contrario se hubiera observado alguna diferencia morfológica en los embriones analizados. Con respecto al periodo de gástrula, se sabe que la epibolia continúa y los movimientos celulares morfogenéticos comienzan, produciendo las capas germinales primarias y los ejes embrionarios y que los mRNA que se transcriben son los que determinan el destino celular, por ejemplo (Kimmel, 1995). El destino de las células del blastodermo parece ser fijado pronto después del comienzo de la gastrulación (Gilbert, 2003). En los embriones analizados en el estadio de anillo germinal (3 2/3 hpf) tampoco se observaron diferencias entre los embriones, ya que todos presentaban un engrosamiento anular en el margen del blastodermo, así como también se observó que la mitad del vitelo estaba cubierta por el blastodermo (50 % de epibolia). De acuerdo a lo anterior y considerando que el gen alterado en la mutante hi1463 codifica para una proteína de membrana lisosomal, podría ser que el producto de este gen no fuera necesario en los estadios tempranos, ya que de acuerdo a su ubicación en los lisosomas y a su función en estos, no parece tener ninguna relación con las proteínas necesarias para que los procesos de desarrollo temprano se lleven a cabo. Esto concuerda con los resultados

obtenidos a través del RT-PCR para los estadios seleccionados (Fig.15 y 16), en donde la presencia del mRNA de este gen se observa en estadios tardíos del primer y segundo día de desarrollo; y no se encuentra en el estadio de 500 células del periodo de blástula. Además las alteraciones morfológicas en el embrión se observan a partir de las 24 hpf, lo cual indica que el producto del gen ya es necesario a en este tiempo del desarrollo embrionario. Otra posible explicación es que el mRNA de LIMP-II es de origen materno, pero por algún error experimental no fuimos capaces de detectarlo en los RT-PCRs del estadio de 500 células. Si así fuera, se explicaría por que los defectos se ven hasta etapas posteriores del desarrollo; cuando se eliminan los mRNAs (4 hpf) o hasta que la proteína de LIMP II materna se vaya consumiendo, al no producirse mRNA de LIMP II cigótico aparecen los defectos fenotípicos de la mutante hi1463.

Las alteraciones que se observaron a las 28 hpf son una menor longitud y menor pigmentación en las larvas mutantes (Fig. 9). Sin embargo a lo largo de la notocorda las células presentan una morfología homogénea, similar a las células de los embriones silvestres indicando que no hay alteraciones en la estructura de los embriones mutantes (Fig. 12). En este tiempo, también se observó que algunas regiones del cerebro se ven alteradas (Fig. 8), y a las 48, 72 y 120 hpf otras alteraciones, además de las del cerebro, se hacen evidentes; el cuerpo del embrión se hace curvo y las células de la notocorda se ven alteradas. En estadios larvarios las células de la notocorda en los peces silvestres son grandes debido a que poseen una gran vacuola, y se alinean una tras otra en la región más anterior, y en la región posterior se ven desordenadas y más pequeñas. Esto se debe a que la diferenciación notocordal es antero-posterior y las células más anteriores empujan a las más posteriores aun no diferenciadas. En los peces mutantes las células presentaron un tamaño y forma heterogéneos a lo largo de la notocorda y en algunas regiones de esta se observaron algunos espacios, posiblemente son zonas de degeneración celular; pero ninguna célula tiene una apariencia normal. Estas observaciones nos lleva a considerar que LIMP II tiene un papel importante en la biogénesis de la notocorda y que posiblemente interactúe con otros genes implicados en dicho proceso. Existen mutantes que también presentan defectos en la notocorda y otras estructuras, algunos de estos son similares a los observados en LIMP II y se presentan en el mismo periodo. Estos genes han sido agrupados y ubicados en una vía de control de la morfogénesis notocordal en base a los fenotipos mutantes (Stemple et. al. 1996). Se agrupan en siete grupos, el primero está integrado por *flh* y *boz* los cuales parecen controlar la formación o el mantenimiento del cordomesodermo, ya que ambos mutantes no presentan cordomesodermo; el segundo grupo esta compuesto por *sly*, *gup* y *bal*, cuyas mutantes que fallan al hinchar vacuola y presentan defectos en

el cerebro y ojos, en el tercer grupo se encuentran las mutantes de *dop*, *sny* y *mik*, que fallan al hinchar la vacuola y el embrión se degenera; el cuarto grupo lo integran las mutantes *ntl* y *gno*, en quienes fallan al hinchar la vacuola y los segmentos posteriores no se especifican. Los grupos 2, 3 y 4 parecen estar involucrados en la diferenciación notocordal, ya que las alteraciones se observan desde las 24 hpf y las vacuolas de las células notocordales nunca se hinchan. En el quinto grupo están *snw*, *chg*, *mgt* y *mib*, cuyas mutantes presentan una notocorda más corta y las células son esféricas, en el sexto grupo únicamente se encuentra *not*, que presenta tanto degeneración de la notocordal como de las somitas; los genes *git*, *pro*, *son* y *drb* integran el séptimo grupo, los mutantes para estos genes tienen una notocorda más corta. Los grupos 5, 6 y 7 están involucrados en el mantenimiento de la estructura notocordal, ya que las alteraciones de la notocorda se observan hasta las 42 hpf, las vacuolas si se hinchan pero luego pierden su forma normal. Comparando el fenotipo de la mutante de LIMP II, en donde las alteraciones de la notocorda se observan hasta las 48 hpf, con el fenotipo de las mutantes antes mencionadas, LIMP II debe estar involucrado en el mantenimiento de la estructura notocordal interactuando con los genes propuestos para este proceso y específicamente con *not*, ya que en ambos mutantes se observan zonas de degeneración celular y células notocordales heterogéneas en forma y tamaño. El siguiente esquema es un modelo de morfogenesis notocordal propuesto por Stemple y colaboradores para los genes antes mencionados, en el cual podría ubicarse LIMP II de acuerdo a nuestros resultados.



Así también la forma curva del cuerpo en la mutante de LIMP II seguramente se debe a que las células de la notocorda pierden las grandes vacuolas y por lo tanto no ejercen presión de turgencia contra la vaina que las envuelve, perdiendo el soporte mecánico que le da al embrión o larva y alterando de esta manera la locomoción. Ya que LIMP II es una proteína integral de membrana lisosomal y se sabe que está involucrada en el mantenimiento y biogénesis de los lisosomas, podría estar jugando un papel directamente estructural en las vacuolas; tal vez de alguna manera interactúa con las otras proteínas necesarias para el mantenimiento de la estructura notocordal, recibiendo algunas de las señales importantes para el mantenimiento de la integridad de la membrana vacuolar durante el desarrollo embrionario.

Otras estructuras que también se vieron afectadas en la mutante son el cerebro y los melanocitos. Tal vez las alteraciones en la estructura del cerebro estén asociadas directamente a una alteración de las células precursoras de la notocorda; ya que parece que estas son capaces de inducir el tubo neural, y entonces al estar alterada su función de inductor en este tiempo en el cual se desarrolla del cerebro, falla al formar las regiones a un nivel morfológico. Se ha observado que la notocorda es necesaria para la formación adecuada del tubo neural, a través del efecto del gen *shh*, así como para la inducción de la base de la placa (Gong 2004). El tubo neural se forma por cavitación y este proceso está temporalmente acoplado al proceso de diferenciación notocordal. El tubo neural posteriormente formará las diferentes regiones del cerebro (Kimmel, 1995). Sin embargo en los embriones y larvas de peces cebras en los estadios tardíos no se observa alguna otra alteración relacionada con la falla en la función de señalización de la notocorda, o alteraciones similares a las de los ratones “Knockout” de LIMP II. Tal vez por que ocurre como en las mutantes “floating head” y “no tail”, en donde parece que la notocorda no es la única estructura capaz de establecer el tubo neural, ya que se ha observado que si la notocorda falla al formarse el tubo neural todavía se produce (Stemple et. al. 1996). Y se cree que posiblemente las células precursoras notocordales son entonces capaces de inducir el tubo neural o que la porción dorsal de los precursores somáticos pueden compensar la pérdida de una notocorda (Gilbert, 2003). Otra posibilidad es que algún otro gen esté compensando parcialmente la pérdida de LIMP II. La alteración de los melanocitos podría estar asociada a una alteración directa del sistema nervioso, debido al desarrollo anormal del cerebro o debido a que la mutante esté ciega como consecuencia de una función lisosomal inadecuada.

8. CONCLUSIONES

1.- En los estadios tempranos del desarrollo embrionario podría no ser necesario el producto del gen mutado pues no se presentan alteraciones morfológicas los embriones de estos estadios.

2.- Las alteraciones morfológicas en los embriones se observan hasta las 24 horas y por lo tanto suponemos que hasta entonces es necesario el producto del gen.

3.- El desarrollo embrionario del cerebro se altera en las larvas homocigas, lo cual se ve reflejado en la estructura cerebral en el estadio de prim 15.

4.- La mutación provoca un retraso en el desarrollo embrionario, reflejado en la hipopigmentación y tamaño del vitelo en el estadio de "pec-fin".

5.- El patrón de pigmentación se recupera, sin embargo los melanocitos están más extendidos en los mutantes.

6.- La forma curva del cuerpo es una consecuencia de la alteración de las células de la notocorda, que al perder su tamaño normal no ejercen presión de turgencia contra la vaina.

7.- El mRNA está presente en los días 2,3 y 5 del desarrollo embrionario en los embriones silvestres.

9. PERSPECTIVAS

Los estudios que hasta ahora se han realizados sobre la función proteína LIMP II muestran su importancia en la biogénesis y mantenimiento de lisosomas y endosomas; su importancia *in vivo* se ha realizado a través del análisis del fenotipo de ratones “knockout” de LIMP II. En donde se observa hidrinfrosis uni- o bilateral, sordera y neuropatía periférica. En algunas de estas alteraciones esta involucrado una falla en la función lisosomal. Estas observaciones fueron realizadas en ratones jóvenes y adultos. Sin embargo sería interesante saber cual es la función del LIMP II durante el desarrollo embrionario, ya que posiblemente nos ayudaría a mejorar nuestro entendimiento sobre lo observado en ratones adultos. Este trabajo es un primer acercamiento hacia la comprensión de dicha función.

En este trabajo, a través del análisis del fenotipo mutante de peces homócigos durante el desarrollo embrionario, en donde el mRNA está ausente; sabemos que la formación y tal vez la función adecuada de estructuras como la notocorda, el cerebro, los pigmentos y la vejiga natatoria dependen de la función del gen. Considerando que este análisis fenotípico solo se realizó a un nivel macro, es decir en estructuras muy evidentes, sería conveniente complementar esto con análisis histológicos tanto de los órganos alterados como de otros que se observan alterados en los ratones knockout de LIMP II. También es importante saber cual es la localización espacio-temporal del mRNA, pues en este trabajo solo se analizaron 3 estadios, a través de RT-PCR, lo cual no es suficiente para establecer en que estadio de desarrollo el gen comienza su transcripción, o si es un mRNA de origen materno; así como ver en que estructuras del embrión se está transcribiendo este mRNA a través de técnicas de hibridación *in situ*. Después de esto se debe evaluar, si es conveniente realizar un trabajo más específico a nivel molecular.

ANEXO 1

Anestésico: 500 ml de Tricaina al 0.5%.

Buffer de lisis: Elvis Buffer (KCl 50mM, NaCl 200 Mm, TRIS-HCl pH 8.0 10mM, Gelatin 0.01%, NP-40 0.45%, Tween-20 0.45%, EDTA 5mM. Se guarda en refrigeración) con Proteinasa K (PK) 0.2mg/ml (20 mg/ml en Buffer 20 Mm, TRIS-HCl pH 8.0 10 mM de CaCl₂, 50 % de glicerol. Se guarda a -20 °C). 10 µl de PK a 20 mg/ml por cada ml de Elvis Buffer.

TBE: Para preparar 1 L se agregan 54 g de Trisma base (SIGMA) y 27.5 g de ácido bórico. Se agregan también 20 ml de 0.5 M de EDTA pH 8.0 y se afora a 1 L con agua desionizada.

DEPC: Se pesa 1 g de Dietil-pirocarbonato (SIGMA) y se agrega a 1 L de agua desionizada, incubando 1 hora a 37 °C. Después se autoclavea por 20 minutos en ciclo de líquidos.

TIEMPO DE DESARROLLO	OBSERVACIONES EN LARVAS MUTANTES	OBSERVACIONES EN LARVAS SILVESTRES
4 hpf (estadio de esfera)	1. Borde liso entre el vitelo y el blastodisco 2. Embrión completo de forma esférica	1. Borde liso entre el vitelo y el blastodisco 2. Embrión completo de forma esférica
3 2/3 hpf (estadio de anillo germinal)	1. Engrosamiento anular en el margen del blastodermo 2. La mitad del vitelo estaba cubierta por el blastodermo	1. Engrosamiento anular en el margen del blastodermo 2. La mitad del vitelo estaba cubierta por el blastodermo
28 hpf	1. Hipopigmentación: no se observan melanocitos 2. Alteraciones en el cerebro: <ul style="list-style-type: none"> • Abultamiento en la parte anterior del cerebro medio. • El margen superior de las rombomeras están más cercanas al límite dorsal de la larva en el cerebro posterior. • Abultamiento en el primordio cerebelar. 	1. Pigmentación normal: comienzan a observarse los melanocitos. 2. Sin alteraciones en el cerebro.
24 hpf	1. La notocorda tienen una apariencia normal: células vacuoladas y con una morfología homogénea	1.- La notocorda tienen una apariencia normal: células vacuoladas y con una morfología homogénea
30 hpf	1. Hipopigmentación: los melanocitos son evidentes en menor cantidad que en silvestres 2. Alteraciones en el cerebro. 3. Menor longitud del tronco que el silvestre.	2. Mayor pigmentación que en estadios anteriores 2. Sin alteraciones en el cerebro. 3. Mayor longitud del tronco que el mutante.
2 días de desarrollo	1. Hipopigmentación 2. Ligera curvatura del cuerpo 3. Retraso en el desarrollo: evidente por un mayor tamaño del vitelo que el observado en silvestres y su forma redonda. 4. La notocorda tiene una apariencia anormal: las células no son vacuoladas y tienen una morfología y tamaño heterogéneo.	1.- Pigmentación normal. 2.- Cuerpo completamente recto. 3.- Tasa de desarrollo normal: el vitelo es de menor tamaño y la forma es ligeramente alargada. 4. La notocorda se ven normales: células son vacuoladas y con una morfología homogénea
3 días de desarrollo	1. La pigmentación comienza a recuperarse. 2. La curvatura del cuerpo se hace más pronunciada. 3.- La notocorda tiene una apariencia anormal: las células no son vacuoladas y tienen una morfología y tamaño heterogéneo. Se presentan regiones de degeneración celular	1.- Pigmentación normal. 2.- Cuerpo completamente recto. 3.- Las células de la notocorda se ven redondas, las de la parte anterior están ordenadas y son grandes; las de la parte posterior son más pequeñas.
5 días de desarrollo	1. Patrón de pigmentación aparentemente normal. 2. Melanocitos muy expandidos. 3. En algunos casos la curvatura del cuerpo se hace mayor afectando gravemente la locomoción, en otros casos permanece igual a partir del tercer día. Las larvas nadan haciendo círculos.	1.- patrón de pigmentación normal. 2.- Melanocitos no expandidos. 3.- Cuerpo completamente recto. Las larvas nadan en línea recta.

Tabla 1. Comparación entre las larvas silvestres y las larvas mutantes de acuerdo a las observaciones del fenotipo realizadas en varios estadios de su desarrollo embrionario.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, Bruce. Biología molecular de la célula. 2002, tercera edición, Omega pp. 654-659.
- Amsterdam A, et.al., 1999, A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Gen. and Dev* 13:2713-2724.
- Amsterdam A, Hopkins N. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in genes involved in development and disease. 2006. *TRENDS in Genetics* 30(10): 1-6.
- Amsterdam A, Insertional Mutagenesis in Zebrafish. 2003. *Dev. Dynamics* 2228:523-534.
- Attwood T, Corpas M, Gaulton A, Mitchell A, Moulton G, Nordle A, Paine K, Taylor P, Uddin A, Zygouri C. 2003. Database PRINTS. (<http://www.bioinf.man.ac.uk/dbbrowser/sprint/>)
- Barut B, Zon L. 2000. Realizing the potencial of zebrafish as a model for human disease. *Physiological Genomics* 2:49-51.
- Cleaver O, Krieg P. 2001. Notochord Patterning of the Endoderm, *Dev. Biol.*
- Correa R, Tergaonkar V, Ng J, Dubova I, Izpisua J, and Verma I. 2004. Characterization of NF- κ B/I κ B Proteins in Zebra Fish and Their Involvement in Notochord Development. *Mol. and Cell.Biol* 24(12): 5257–5268.
- Crombie, R, Silverstein R. 1998. Lysosomal Integral Membrane Protein II Bins Thrombospondin-1: Structure-function homology with the cell molecule adhesion CD36 defines a conserved recognition motif. *The Journal of Biological Chemistry* 273(9):4855-4863.
- Dodd A, Curtis P, Williams L, Love D. 2000. Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Human Molecular Genetics* 9(16):2443-2449.
- Driever W, Fishman M. 1996. The zebra fish: Heritable Disorders in Transparent Embryos. *Perspectives Series: Molecular Medicine in Genetically Engineered Animals* 97(8): 1788-1794.
- Elizabeth J, Robertson F, Maxfield H. Cell-cell signaling vertebrate development. Academic press, 1993, pp.139-148.
- Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Cell Biol.* 13 (3):137-146.
- Fiendelden M, Halgren R, Fong C, Staub C, Johnson L, Zachareuski T. 2002. Gestational and lactational exposure of male mice to Diethylstilbestrol causes long-term effects on the testis, sperm fertilizing ability *in vitro*, and testicular gene expression, *Endocrinology* 143(8):3044-3059.
- Gamp A, Tanaka Y, Lullmann R, Wittke D, D'Hooge R, De Deyn P, Moser T, Maier H, Hartmann D, Reiss K, Illert A, Figura K, Saftig P. 2003. LIMP-2/LGP85 deficiency causes

ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice. *Human Molecular Genetics*. 12(6):631-646.

- Gilbert, Scott F. *Developmental of Biology*, 7^a edición, U.S.A, Sinauer Associates, 2003, pp 345-351.

- Gong Zhiyuan and Korzh Vladimir, *Molecular aspects of Fish and Marine Biology: Fish development and Genetics, The zebrafish and Medaka Models*; ed. World Scientific, 2004. pp 99 - 110.

- Gunwald D, Streisinger G. 1992. Induction of recessive lethal and specific locus mutation in zebrafish with ethylnitrosourea. *Genet Res* 59:103-116.

- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins M, Hammerschmidt M, Kane D, Odenthal J, Van F, Jian Y, Heisenberg C, Kelsh R, Furutani-Seiki, M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nusslein-Volhard C. 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish *Danio rerio*. *Dev*. 123:1-36.

- Hart K, Wilcox M, 1993, A *Drosophila* encoding an Epithelial Membrane Protein with Homology to CD36/LIMP II. *J. Mol. Biol.* 234:249-253.

- Ingham P. 1997. Zebrafish genetics and its implications for understanding vertebrate development. *Human Molecular Genetics*, 6(10): 1755-1760.

- Janseen K, Rost R, Eichingers L, Schleicher M. 2001. Characterization of CD36/LIMP II Homologues in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 276(42): 38899-38910.

- Janseen K, Schleicher M. *Dictyostelium discoideum*: a genetic model system for the study of professional phagocytes Profilin, phosphoinositides and *Imp* gene family in *Dictyostelium*

-Lai W, Hsiao P, Guiguen Y, Chung B. 1998. Cloning of zebrafish cDNA for 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and P450_{scc}. *Endocr Res* 24:927-931.

- Kimmel C, Ballard W, Kimmel S, Ullman B, Schilling T. 1995. Stage of Embryonic Development of the Zebrafish, *Dev. Dynamics* 2003:253-310.

- Kuronita T, Eskelinen E, Fujita H, Saftig P, Himeno M, Tanaka Y. 2002. A role for the lysosomal membrane protein GLP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *Journal of cells Science*. 115: 4117- 4131.

- Kuronita K, Hatano T, Furuyama A, Hiroya Y, Masuyama N, Saftig P, Himeno M, Fujuta H, Tanaka Y. 2005. The NH₂ Terminal transmembrane and luminal domains of LGP85 are needed for the formation of enlarged endosomes/lysosomes. *Traffic* 6:895-906.

- Madigan M, Martinko J, Parker J., Brock Biología de los microorganismos, octava edición revisada, Prentice Hall Iberia, Madrid, 1999, pp 295-300.
- Maldonado E, Experimentación en el pez cebra, un modelo de biología del desarrollo. 2003. Mensaje Bioquímico XXVII:147-155.
- Nusslei-Volhard C, Wieschaus E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*, Nature 287: 795-801.
- Karskesisoglou I, Janssen K, Eichinger L, Noegel A, Scheleicher M. 1999. Identification at a Suppressor of the *Dictyostelium* Profilin-minus Phenotype as a CD36/LIMP-II Homologue. J Cell. Biol. 124 (1): 167-181.
- Knipper M, Claussen, Rüttiger L, Zimmermann U, Lüllmann-Rauch R, Eskelinen E, Schröder J, Schwake J, Saftig P. 2006. Deafness in LIMP2-deficient mice due to early loss of the potassium channel KCNQ1/KCNE1 in marginal cells of the stria vascularis. J. Physiol. 1(576):73-86.
- Nusslein-Volhard C, The identification of genes controlling development in flies and fishes. Lectura Nobel, 1995, pp285- 287.
- Odenthal J, Haffter P, Vogelsang E, Brand M, Van F, Furutani M, Granato M, Hammerschmidt M, Heisenberg C, Jian Y, Kane D, Kelsh R, Mullins M, Warga R, Alende M, Weinberg E, Nusslein-Volhard C. 1996. Mutation affecting the formation of the notochord en zebrafish, *Danio rerio*. Dev. 123:103-115.
- Pollard S, Parsons M, Kamei M, Kettleborough R, Thomas K, Pham V, Bae M, Scott A, Weinstein B, Stemple D. 2006. Essential and overlapping roles for laminin a chains in notochord and blood vessel formation, Devel. Biol. 289: 64 – 76
- Sandoval IV, Arredondo J, Alcalde J, Gonzalez Noriega A, Vandekerckhove J, Jiménez M, Rico M. 1994. The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes. J. Biol. Chem. 269(9):6622-6631.
- Stemple D, Solnica-Krezel L, Zwartkruis F, Neuhauss S, Schier A, Malicki J, Stainier D, Abdelilah S, Rangini Z, Mountcastle-Shah E and Driever W. 1996. Mutations affecting development of the notochord in zebrafish, Dev. 123:117-128 .
- Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. 1986. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). Nature 291: 293-296
- Streisinger G, Singer F, Walker C, Knauber D, Dower N. 1986. Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. Genetics 112:311-319.

- Tabuchi N, Akasaki K, Tsuji H. 2002. Ile (476), a constituent of di-leucine-based motif a major lysosomal membrane protein, GLP 85/LIMP II, is important for its proper distribution in late endosomes and lysosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 295:149-156.
- Udvardi A, Linney E. 2003. Windows into development: Historic, current and future perspectives on transgenic zebra fish. *Developmental Biology* 256: 1-17.
- Wixon J. 2000. *Danio rerio*, the zebra fish. *Yeast*, 17: 225-231.