



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Análisis del efecto de la pérdida de función de la
Rho GTPasa Rac1 en la expresión de selenoproteínas
durante el desarrollo embrionario del pez cebra.**

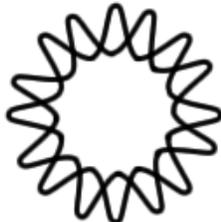
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

MARIO ADAN MENDIETA SERRANO.

Director de Tesis: Dr. Enrique Salas Vidal.





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.

Comité tutorial:

Dr. Fernando López Casillas.

Dr. Luis Cardenas Torres.

Dr. Enrique Salas Vidal.

Jurado de examen de grado:

Presidente Dr. Mario Zurita Ortega.

Secretario Dra. Susana Castro Obregón.

Vocal Dr. Jesús Aguirre Linares.

Suplente Dr. Takuya Nishigaki Shimizu

Suplente Dr. Enrique Salas Vidal

Dedicatorias

A Tania, por que la vida es mejor cuanto hay alguien con quien compartirla.

A mis padres, por todo su apoyo y ejemplo de vida.

A mi hermano, mi gran amigo y compañero de toda la vida.

A mis amigos.

Agradecimientos

Al Dr. Enrique Salas, por su apoyo, asesoría y guía a lo largo del posgrado.

Al comité tutorial y al jurado por sus críticas y comentarios que me ayudaron a mejorar enormemente este trabajo.

A todos los compañeros y compañeras del laboratorio por su apoyo y comentarios.

Al Instituto de Biotecnología, incluyendo a todos por su apoyo.

A la UNAM.

Este proyecto fue financiado por PAPIIT-UNAM IN219309 y IX201110.

Resumen.

Las Rho GTPasa son proteínas G que participan en la regulación de diferentes vías de señalización que controlan el comportamiento celular. En particular la Rho GTPasa Rac1 tiene un papel importante durante el desarrollo embrionario en animales. Para estudiar a mayor detalle las funciones que lleva a cabo esta Rho GTPasa, en nuestro grupo nos hemos enfocado en caracterizar a este gen en el pez cebra, en el cual la pérdida de función parcial de Rac1 fenocopia los efectos sobre la gastrulación descritos en otros organismos. Al caracterizar los efectos de la pérdida de función parcial de esta proteína sobre el transcriptoma se encontró que se afecta en particular la expresión de selenoproteínas como la glutatión peroxidasa 4 (Gpx4). Con base en estos antecedentes en el presente trabajo de maestría se propuso como objetivo caracterizar el efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 en el desarrollo y en la expresión de la Gpx4 en pez cebra. Primero se analizó el patrón normal de localización de Gpx4 y se encontró esta proteína tiene un patrón ubicuo durante el desarrollo. Sin embargo, a las 24 horas post fertilización se observó que se localiza principalmente en los miotomos, que son estructuras que se desarrollan en músculo. Interesantemente, se encontró acumulación de especies reactivas de oxígeno en los mioseptos, que son estructuras que delimitan a cada uno de los miotomos, en un patrón complementario al de la Gpx4. Por otro lado, la deficiencia de Rac1 afectó la morfogénesis de los miotomos, disminuyó los niveles de la Gpx4 y aumentó los niveles de especies reactivas de oxígeno. En conjunto estos datos aportan evidencia experimental a favor de que Rac1 participa en la regulación de la diferenciación de los miotomos. Por otro lado sugiere que Rac1 podría estar participando en regular la expresión de enzimas antioxidantes como la Gpx4, así como en modulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Rac1 en el desarrollo embrionario del pez cebra.	1
1.2 El desarrollo embrionario temprano del pez cebra y su uso comomodelo de estudio.	3
1.3 El uso del pez cebra para el análisis funcional de genes durante el desarrollo embrionario.	5
2. ANTECEDENTES INMEDIATOS	6
2.1 Expresión de Rac1 en el pez cebra y su posible papel en la regulación de selenoproteínas.	6
2.2 Las selenoproteínas y su importancia en el desarrollo embrionario.	8
2.2.1 Papel de la selenofosfato sintetasa 2 en la biosíntesis de selenoproteínas.	9
2.2.2 Selenoproteínas con actividad antioxidante, las glutatión peroxidasas y su papel en el mantenimiento del estado redox.	11
3. HIPÓTESIS.	13
4. OBJETIVOS.	13
4.1 Objetivo general.	13
4.2 Objetivos particulares	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	14
5.1 Animales.	14
5.2 Cultivo <i>in vitro</i> de embriones de pez cebra.	14
5.3 Clasificación de los embriones de pez cebra.	14
5.4. Inyección de oligonucleótidos tipo morfolino.	14
5.5 Anticuerpos.	15
5.6 Inmunolocalización de proteínas en embriones completos.	15
5.7. Tinción de embriones con el colorante redox sensible H ₂ DCFDA.	15
5.8 Microscopia confocal.	16
5.9 Análisis de imágenes.	16
5.10 Purificación de proteínas.	16
5.11 Electroforesis en gel, transferencia de proteínas e inmunodetección de proteínas.	17

6. RESULTADOS.	18
6.1 Efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 sobre el desarrollo embrionario del pez cebra.	18
6.1.2 Efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 en embriones de pez cebra.	18
6.1.3 Análisis del fenotipo de los embriones asociado a la pérdida de función de Rac1.	22
6.2 Efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 sobre la expresión de selenoproteínas en el desarrollo embrionario del pez cebra.	24
6.2.1 Patrón de localización de las glutatión peroxidasas, Gpx1 y Gpx4 durante el desarrollo embrionario temprano del pez cebra.	26
6.2.2 Detección de las glutatión peroxidasas Gpx1 y Gpx4 en embriones de pez cebra por western blot.	28
6.2.3 Efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 en la expresión de Gpx4 en el desarrollo embrionario del pez cebra.	32
6.3 La pérdida de función parcial de Rac1 afecta los niveles de ERO a las 24 hpf.	40
7. DISCUSIÓN.	41
7.1. Rac1 participa en la diferenciación muscular y en la morfogénesis de los miotomos.	44
7.1.1. Papel de Rac1 en la formación de las somitas y su posible repercusión en la morfogénesis de los miotomos.	45
7.1.2. Rac1 y su papel en la fusión de los mioblastos.	46
7.1.3. Rac1 y la morfogenesis de los miotomos.	47
7.2. Relación entre el patrón de la expresión de Gpx4 y la formación de ERO en los miotomos.	49
7.3. Rac1 regula la expresión de Gpx4 y su efecto en la formación de especies de oxígeno.	51
8. CONCLUSIONES	56
9. PERSPECTIVAS.	56
10. REFERENCIAS.	57

1. INTRODUCCIÓN

Las Rho GTPasas son una familia de proteínas que participan en vías de señalización que regulan una gran variedad de procesos celulares, algunos ejemplos son: la polarización, la adhesión célula-célula, la adhesión célula-matriz extracelular, el tráfico de membrana, la regulación de la dinámica del citoesqueleto y la regulación de la transcripción de diversos genes (Boettner and Van Aelst, 2002). Las Rho GTPasas funcionan como interruptores moleculares, que en su estado activo están unidas a GTP y en su estado inactivo están unidas a GDP. La conversión al estado activo ocurre por factores de intercambio de guanidín nucleótidos (GEFs, por sus siglas en inglés), de forma contraria la inactivación es promovida por proteínas activadoras de la actividad de GTPasa (GAPs, por sus siglas en inglés) (Boettner and Van Aelst, 2002). En su estado activo las Rho GTPasas se unen a moléculas efectoras que inician cascadas de señalización que afectan a una diversidad de procesos celulares incluidos los antes mencionados.

La caracterización de las funciones biológicas de varias de las Rho GTPasas han sido analizadas principalmente en células en cultivo, siendo las más estudiadas Rac1, Cdc42 y RhoA (Boettner and Van Aelst, 2002). Los estudios realizados en cultivos celulares han contribuido a la identificación de algunas de las vías de transducción de señales que están reguladas por éstas GTPasas. Sin embargo, apesar de que se conocen a detalle las funciones celulares de las Rho GTPasas, se entiende poco su participación en la regulación de vías de señalización en contexto de un organismo completo durante el desarrollo embrionario.

1.1. Rac1 durante el desarrollo embrionario de los vertebrados.

Rac1 es una de las Rho GTPasas más estudiadas, desde su identificación se le ha atribuido un papel muy importante en diversos procesos celulares como la reorganización del citoesqueleto de actina, la transformación celular, la inducción de síntesis de DNA, en la formación de superóxido, el direccionamiento axonal y la migración celular (Bosco et al., 2009). Sin embargo, sólo algunas de estas funciones han sido descritas en contexto del embrión completo y poco se sabe de la contribución de estas funciones en procesos durante el desarrollo embrionario de vertebrados.

La generación del ratón nulo para Rac1 demostró que está Rho GTPasa tiene un papel vital durante el desarrollo embrionario (Sugihara et al., 1998). Los ratones nulos para Rac1 se detienen en el desarrollo embrionario entre los días 6.0 y 7.5, y presentan defectos en la formación y migración de las capas germinales ectodermo, mesodermo y endodermo (Migeotte et al., 2010). De forma similar, en *Xenopus* la pérdida de función de *rac1*, utilizando dominantes negativos, también afecta al proceso de gastrulación, principalmente a nivel de los movimientos celulares de convergencia y extensión (Tahinci and Symes, 2003). Estas evidencias sugieren un papel determinante de Rac1 en la migración celular en el desarrollo embrionario.

La letalidad en los embriones nulos para Rac1 es un inconveniente para su estudio en etapas posteriores a la gastrulación durante el desarrollo embrionario, por lo que se ha explorado su función *in vivo* haciendo uso tanto de ratones nulos condicionales como de otros modelos animales.

Usando embriones de pollo y formas dominantes negativas de Rac1, se ha reportado que Rac1 participa en la transición mesénquima-epitelio indispensable para la formación de las somitas (Nakaya et al., 2004).

Por otro lado, usando embriones de pez cebra, *Xenopus* y ratón se ha descrito que Rac1 tiene un papel en la regulación de la migración de las células de la cresta neural. Las células de la cresta neural tienen una alta tasa de migración celular que les permite colonizar casi todos los tejidos embrionarios. Una vez que llegan a sus destinos, las células de la cresta neural pueden diferenciarse a diversos tipos celulares (neuronas, células gliales, tejido esquelético y conjuntivo, células adrenergicas o pigmentadas). En los modelos animales antes mencionados se ha encontrado evidencia a favor de que Rac1 regula la migración de las células de la cresta neural por medio de la formación de proyecciones celulares en el embrión (Matthews et al., 2008) (Thomas et al., 2010); (Fort et al., 2011).

Además se ha mostrado que Rac1 en conjunto con otras Rho GTPases regulan la migración de células endoteliales durante el proceso de angiogénesis. Estudios *in vivo* en ratón y pez cebra muestran que Rac1 participa en la regulación de la formación y desarrollo de los vasos sanguíneos en el embrión (Tan et al., 2008) (Epting et al., 2010).

Sumando estas evidencias, parece claro que Rac1 tiene un papel protagónico como regulador de la migración celular en diversos procesos del desarrollo embrionario. En los reportes antes mencionados se ha propuesto que la función reguladora de Rac1 sobre la migración celular y vía de señalización de Wnt podrían estar relacionadas.

La vía de señalización de Wnt es crítica durante el desarrollo normal de organismos multicelulares, y está involucrada en diferentes procesos como la gastrulación y la formación de las somitas (Lickert et al., 2005; Geetha-Loganathan et al., 2008) Sin embargo, aunque hay evidencia de una interacción entre Rac1 y la vía de señalización de Wnt durante el desarrollo embrionario en estos reportes no se ha establecido de forma directa el mecanismo mediante el cual Rac1 actúa sobre la vía de Wnt en el desarrollo embrionario, aun cuando se ha reportado que la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de Rac1 promueve la activación de la vía de Wnt en el desarrollo de las extremidades de ratón (Wu et al., 2008).

Sin embargo, a pesar del gran avance en el entendimiento de las funciones de Rac1 en el desarrollo embrionario, aún se desconoce si Rac1 podría estar regulando otros genes o vías de señalización importantes para el desarrollo del embrión. En nuestro laboratorio hemos decidido utilizar el pez cebra como modelo de estudio para explorar la función y los posibles genes regulados por Rac1 durante el desarrollo embrionario.

1.2. El desarrollo embrionario temprano del pez cebra y su uso como modelo de estudio.

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez teleosteo tropical de agua dulce que en los últimos años se ha convertido en un organismo muy utilizado para estudios del desarrollo embrionario.

Un trabajo clásico de la caracterización del desarrollo embrionario del pez cebra fue el realizado por Kimmel y colaboradores (Kimmel et al., 1995). El trabajo consistió en una descripción y clasificación del desarrollo embrionario del pez cebra basada en características morfológicas.

A continuación se presenta un resumen muy breve de los eventos que ocurren durante las primeras 24 horas del desarrollo embrionario del pez cebra, usando como referencia el trabajo publicado por Kimmel y colaboradores (Kimmel et al., 1995).

El huevo recién fecundado de pez cebra presenta un patrón de división

meroblástico, por lo que la división del huevo es incompleta y la posición del vitelo es telolecital, es decir, se encuentra en uno de los polos del huevo. Al polo donde ocurren las divisiones celulares se le llama polo animal y al polo donde se encuentra el vitelo se le denomina polo vegetal.

Una vez que el huevo es fertilizado (momento que se considera como las cero horas post-fertilización o hpf.), el desarrollo embrionario comienza con la formación de la primera célula (polo animal) por corrientes citoplasmáticas que ocurren dentro del vitelo (polo vegetal) (Fuentes and Fernandez, 2010). Estudios clásicos del desarrollo temprano en el pez cebra indican que las primeras divisiones celulares ocurren de manera rápida y metasincronizada, durante estas divisiones el desarrollo embrionario está regulado por componentes moleculares depositados por la madre en el vitelo (Kane and Kimmel, 1993; Olivier et al., 2010) (Mendieta-Serrano, et al., sometido). La sincronía en las primeras divisiones va disminuyendo de manera gradual hasta que se pierde durante el proceso que se conoce como la transición de la blástula media (TBM) donde además inician otros dos procesos muy importantes, como la migración celular y la activación de la expresión del genoma del embrión (Kane and Kimmel, 1993). Una vez que las células del embrión son mótils, se inicia un proceso llamado epibolia y algunas horas después la gastrulación, ambos procesos se caracterizan por la ocurrencia de una serie de movimientos celulares de manera concertada que generan a las tres capas germinales (el mesodermo, el endodermo y el ectodermo) que posteriormente se diferenciarán a cada uno de los tejidos que componen al organismo adulto (Kimmel et al., 1995). Después de la gastrulación ocurre la segmentación, en este momento del desarrollo embrionario el tejido del mesodermo paraxial se divide en “paquetes” longitudinales (somitas) en la región dorsal del embrión. A su vez las somitas se regionalizan y diferencian en dermatomo, en miotomos y en esclerotomos, que son los precursores de la dermis, del músculo y del cartílago y hueso de manera muy general (Gilbert, 2006). Además, durante la segmentación se elonga la talla el embrión, principalmente en la región posterior del embrión (cola), se forman los primordios de los órganos como el ojo, la vesícula ótica y el corazón. A partir de las 24 hpf, la morfología del embrión permite reconocer claramente la parte más anterior (cabeza) y la más posterior (cola), además se pueden observar los ojos, la circulación sanguínea, la pigmentación, la regionalización del cerebro en formación y los primeros movimientos de

la cola (Kimmel et al., 1995).

1.3. El uso del pez cebra para el análisis funcional de genes durante el desarrollo embrionario.

El pez cebra no sólo ha sido usado como modelo de estudio del desarrollo embrionario, también se ha utilizado ampliamente para el análisis de la función y regulación tanto de genes como de las vías de señalización en un contexto *in vivo*. A continuación se describen algunas de las ventajas que tiene el pez cebra para la caracterización funcional de genes y de vías de señalización.

En el 2007, se presentó la secuenciación del genoma de *D. rerio* que prácticamente está terminada y disponible vía Internet (Hubbard et al., 2007). La disponibilidad de la secuencia del genoma del pez cebra permite la identificación y clonación de los genes de interés con relativa facilidad. Con estas secuencias se pueden generar vectores de expresión para realizar estudios de ganancia de función o bien se pueden diseñar oligonucleótidos antisentido para estudios de pérdida de función parcial. Los morfolidos son un tipo de oligonucleótidos antisentido que han sido muy utilizados en estudios de pérdida de función de genes en embriones completos. En los morfolidos los anillos de ribosa, normalmente unidos por enlaces fosfodiéster, son substituidos por anillos tipo morfolidos unidos por enlaces de fosforodiamidato. (Deiters and Yoder, 2006). Los morfolidos antisentido han probado ser muy efectivos para inhibir la traducción o el procesamiento de ARN mensajeros, son muy específicos y estables ya que no son degradados por ARNasas, además presentan baja toxicidad en ensayos en embriones completos tanto en *Xenopus* como en *Danio rerio*. Normalmente los morfolidos se inyectan en embriones de pez cebra cuando se encuentran en la etapa de una célula (0.25 hpf.) y han probado generar fenotipos similares (fenocopiar) a mutantes de los genes contra los cuales están diseñados (Nasevicius and Ekker, 2000).

Tomando en cuenta éstas características, el pez cebra es un buen candidato para el estudio tanto de la función biológica como de los genes o vías de transducción de señales reguladas por Rac1 en contexto de un organismo completo durante el desarrollo embrionario.

2. ANTECEDENTES INMEDIATOS

2.1. Expresión de Rac1 en el pez cebra y su posible papel en la regulación de selenoproteínas

En el pez cebra se han identificado y anotado 32 Rho GTPasas que son ortólogos a los 23 genes presentes en el genoma humano. Estos genes se han clasificado en ocho subfamilias Rac, Cdc42, Rho, RhoD, Rnd, RhoBTB, Rhot and RhoH. La subfamilia Rac consiste de 4 genes; dos ortólogos del gen *RAC1* humano, *rac1* y *rac1l* y un ortólogo para cada uno de los genes *RAC2* y *RAC3* humanos (Salas-Vidal et al., 2005).

La proteína Rac1 a nivel de secuencia primaria muestra un alto grado de identidad y similitud comparado con el ortólogo RAC1 de humano (98% y 100% respectivamente); mientras que la proteína Rac1l muestra un grado más bajo de identidad y similitud cuando se compara con la secuencia de la proteína ortóloga de humano (70.8% y 79%, respectivamente) (Salas-Vidal *et. al.*, 2005).

Respecto a la organización intrón-exón, el gen *rac1* de pez cebra está altamente conservada cuando se compara con el gen *RAC1* de humano que tiene seis exones, mientras que el gen completo de *rac1l* está formado por un solo exón. Esta evidencia sugiere fuertemente que la proteína Rac1 es el homólogo funcional de la proteína de humano (Salas-Vidal *et. al.*, en preparación). Además, cuando se compara la secuencia de la proteína RAC1 humana con los ortólogos se observa que la secuencia primaria de la proteína está altamente conservada en diferentes organismos (*D. melanogaster*, *C. elegans*, *X. laevis*, *G. gallus* y *M. musculus*) (Salas-Vidal *et. al.*, 2005). En cambio el gen *rac1l* posiblemente se originó por un evento de retrotranscripción e inserción en el genoma. Este punto es interesante ya que se han encontrado 4 copias de *RAC1* de humano que presentan características de pseudogenes (Salas-Vidal et al, 2005)

Recientemente en el laboratorio se analizó la función de Rac1 en el desarrollo embrionario temprano de pez cebra utilizando morfolinós, que inhiben la traducción de los mensajeros de *rac1*. En éste análisis se observó que la pérdida de la función de Rac1 tiene diversos efectos en el desarrollo, de forma particular los embriones a las 24 hpf presentan diferentes defectos que incluyen: microoftalmia, disminución de la talla total de los embriones y defectos en la morfología tanto de las estructuras céfalicas como de la región

caudal (Salas-Vidal *et al.*, en preparación).

Además del análisis morfológico, en los embriones con pérdida de función parcial de Rac1, se realizó un análisis global del transcriptoma utilizando microarreglos con el propósito de analizar que genes o vías de señalización se afectaban con la pérdida de función de Rac1 y elucidar posibles blancos regulados por esta proteína. Del análisis de microarreglos se observó que 781 genes cambian significativamente, 440 bajan su expresión y 341 aumentan su expresión en respuesta a la pérdida de la función parcial de Rac1 (Salas-Vidal *et al.*, en preparación). A partir del análisis de los cambios de expresión global a nivel de ARN mensajero, se encontró un grupo de ARN mensajeros que disminuía su expresión. La detección de este grupo de ARN mensajeros llamó la atención porque codifican para proteínas que contienen selenio (anotadas como selenoproteínas) y está reportado que proteínas de este tipo tienen una función antioxidante.

De las selenoproteínas analizadas por microarreglos, se observó que las que disminuyeron sus niveles de expresión en mayor proporción fueron las glutatión peroxidasas, *gpx1b*, *gpx4a* y *gpx4b* (la disminución fue de -4.0, -1.8 y -1.9 veces, respectivamente). Además de las glutatión peroxidasas, resultó muy interesante la disminución de expresión de la selenofosfato sintetasa 2 (*sps2*), que es una enzima involucrada en la síntesis de las selenoproteínas (Xu *et al.*, 2007)

Hay que señalar que este grupo de genes resultó muy interesante, porque fue el único grupo de transcritos en el análisis por microarreglos donde todos los genes disminuían su expresión, hay que remarcar que no se observó algo similar en ninguna otra familia de proteínas analizadas.

Otro aspecto que hace aún más interesante a este grupo de selenoproteínas, es el hecho de que no hay evidencia previa de que Rac1 tenga un papel en la regulación de estas proteínas. Este resultado podría ser la primer evidencia del papel regulatorio Rac1 sobre genes que codifican para proteínas antioxidantes.

Con base en estos hallazgos el presente trabajo está enfocado en verificar si la expresión de estas selenoproteínas (*gpx1b*, *gpx4a*, *gpx4b* y *sps2*) están bajo la regulación de Rac1 y cual podría ser su importancia biológica durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

Dada la importancia de las selenoproteínas para este trabajo en particular de las glutatión peroxidasas *gpx1b*, *gpx4a*, *gpx4b* y la selenofosfato sintetasa *sps2*, a continuación se hace una descripción general de sus características y de su función.

2.2. Las selenoproteínas y su importancia en el desarrollo embrionario.

Las selenoproteínas son proteínas que tienen la particularidad de tener un átomo de selenio unido a la estructura primaria de la proteína. El átomo de selenio es incorporado a las selenoproteínas como el aminoácido selenocisteína (Sec) que tiene una estructura idéntica a la cisteína, sólo cambia el átomo de azufre por uno de selenio (más adelante se presenta a mayor detalle la biosíntesis de selenoproteínas en eucariontes).

Se han identificado más de 20 selenoproteínas en varios eucariontes incluyendo a vertebrados como el humano y el pez cebra. Es importante señalar que de las selenoproteínas identificadas con una actividad biológica descrita, todas tienen en común que en su centro catalítico ocurren reacciones de óxido-reducción (Conrad, 2009); esta característica le permite a las selenoproteínas llevar a cabo diferentes funciones como el metabolismo del peróxido de hidrógeno (glutatión peroxidasas), el metabolismo de la hormona tiroidea (diodinasas), la biosíntesis de selenocisteína (SPS2) o la remoción de lípidos peroxidados (Gpx4).

Sin embargo, de las 25 selenoproteínas identificadas en eucariontes la mayoría no se han caracterizado (Steinbrenner y Seis, 2009). Además hasta el momento, para la mayor parte de las selenoproteínas anotadas en los genomas no hay evidencia experimental de su función biológica o de su expresión en ningún tipo celular u organismo.

En los últimos años el estudio del papel fisiológico de las selenoproteínas a generado gran interés, principalmente porque se han identificado patologías asociadas a mutaciones en los genes que codifican para selenoproteínas.

En el caso de los mamíferos, la biosíntesis de las selenoproteínas depende de un ARN de transferencia (tRNA) específico para selenocisteína (tRNA^{sec(ser)}) que en ratón está codificado en el gen *Trsp*. En los ratones nulos para *Trsp* *-/-* no se expresa el tRNA de transferencia que codifica para selenocisteína. En estos embriones no se incorpora el aminoácido selenocisteína a las selenoproteínas y como consecuencia se genera una pérdida de expresión generalizada de selenoproteínas. El principal hallazgo de este reporte es que los embriones nulos para *Trsp* mueren alrededor del día 6.5 post-coito; lo cual demuestra

que las selenoproteínas son esenciales durante el desarrollo embrionario (Bösl et al, 2007).

La letalidad asociada a la pérdida de función de *Tsrp* a hecho que se generen diferentes ratones nulos para *Trsp* que no expresan este gen de forma específica en diversos tejidos, con la intención de elucidar el papel fisiológico de las selenoproteínas.

Usando estos ratones como herramienta para identificar la función de las selenoproteínas en diferentes tejidos, se tiene evidencia que la expresión de las selenoproteínas es importante en el desarrollo de las células endoteliales y la función del músculo cardíaco (Shrimali *et al.*, 2007), en el crecimiento esquelético (Downey *et al.*, 2009), en el crecimiento de los queratinocitos y en el desarrollo cutáneo (Sengupta *et al.*, 2010), así como en la función hepática (Carlson *et al.*, 2004).

Aunque la mayor parte de los reportes relacionados con la función de las selenoproteínas ha sido estudiado en modelos murinos, recientemente se ha comenzado a analizar la función de las selenoproteínas en otros modelos animales como el pez cebra. Un ejemplo es la caracterización de la selenoproteína N (SlpN) en pez cebra. La pérdida de función de SlpN en embriones de pez cebra muestra que la SlpN tiene un papel en la organización muscular durante el desarrollo embrionario (Deniziak *et al.*, 2006).

En suma, estas evidencias sugieren que la presencia de una o varias selenoproteínas pueden ser vital durante el desarrollo embrionario y en la función de diferentes tejidos.

2.2.1. Papel de la selenofosfato sintetasa 2 en la biosíntesis de selenoproteínas.

En el caso de los eucariontes el selenio tiene la particularidad de no encontrarse coordinado a la estructura de las proteínas como se ha observado con otros elementos traza presentes en otras proteínas (por ejemplo, el magnesio en la clorofila o el fierro en la hemoglobina), sino que es incorporado en forma del aminoácido selenocisteína (Xu *et al.*, 2007).

A diferencia de otros aminoácidos, la biosíntesis de la selenocisteína ocurre durante la síntesis del ARN de transferencia específico para selenocisteína. La síntesis de selenocisteína consiste en la conversión de un seril-ARNt^{Sec} a un selenocisteil-ARNt^{Sec} usando monoselenofosfato (SeP) como molécula donadora de selenio.

El monoselenofosfato es sintetizado por la selenofosfato sintetasa 2 (Sps2) que es una selenoproteína, esta enzima cataliza la conversión de selenito (una modificación del selenato que es una fuente de selenio en la naturaleza) a selenofosfato hidrolizando ATP

como fuente de energía. Posteriormente el monoselenofosfato se une al seril-ARNt^{Sec} formando el aminoácido selenocisteína para la síntesis de selenoproteínas (Xu *et al.*, 2007).

La selenofosfato sintetasa que sintetiza el monoselenofosfato en bacterias es SelD y en *Drosophila* la Sps2. Además de Sps2, existe otra selenofosfato sintetasa en animales; la Sps1. Sin embargo, está reportado que la Sps1 no es una selenoproteína y no está involucrada directamente en la síntesis de selenocisteína, sino que está involucrada en el metabolismo celular del selenio (Xu *et al.*, 2007).

En el pez cebra se han identificado los ortólogos de los genes *sps1* y *sps2* de mamífero, anotados como *sephs1* y la *sps2* respectivamente (Thisse *et al.*, 2003). Sin embargo, aún no hay estudios funcionales de éstas selenofosfato sintetisas *in vivo*.

En el caso tanto de la *sephs1* como de la *sps2*, se tiene evidencia por hibridación *in situ* que los ARN mensajero de ambas selenofosfato sintetisas se expresan durante el desarrollo embrionario del pez cebra. En embriones de pez cebra a las 24 hpf el mensajero de *sephs1* se expresa en la región cefálica, mientras que el mensajero de *sps2* se expresa en la región cefálica y en las somitas (Thisse *et al.*, 2004).

Por otro lado, se han realizado estudios funcionales en *Drosophila* que muestran que la pérdida de función de SelD promueve la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) e induce la muerte celular (Morey *et al.*, 2003). De manera adicional, otro grupo observó que la actividad de esta enzima participa normalmente en promover no solo la sobrevivencia celular sino también la proliferación celular en discos imagales en *Drosophila* (Alsina *et al.*, 1999).

Lo anterior sugiere SelD tiene un papel importante en la regulación del estado redox de la células del embrión al controlar la biosíntesis de selenoproteínas durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*. Por lo que es posible que el ortólogo Sps2 tenga una importancia similar durante del desarrollo embrionario del pez cebra.

2.2.2. Selenoproteínas con actividad antioxidante, las glutatión peroxidasas y su papel en el mantenimiento del estado redox.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) es un término que agrupa a un conjunto moléculas y radicales libres derivados de oxígeno molecular. Ejemplos de éstas ERO son el superóxido y el peróxido de hidrógeno.

La producción de las ERO está generalmente asociada a la respiración aeróbica, a fuentes enzimáticas (NADPH oxidasas) y a diversos procesos celulares tanto catabólicos como anabólicos. Por su naturaleza oxidativa las ERO en altas concentraciones son capaces de generar daño a diferentes macromoléculas incluyendo el ADN, proteínas y lípidos (Bokov *et al.*, 2004); pero también se ha reportado que las ERO pueden funcionar como moléculas señalizadoras.

Se ha descrito que las ERO funcionan como segundos mensajeros que modulan vías de señalización que controlan diversos procesos celulares (como la muerte celular, la proliferación, la diferenciación, entre otros) asociados a eventos del desarrollo embrionario como la morfogénesis y la angiogénesis (Covarrubias *et al.*, 2008).

La concentración de las ERO en la célula está modulada por el balance entre oxidantes (generación de ERO) y antioxidantes involucrados en el metabolismo y detoxificación de ERO (Conrad, 2009).

De manera general los antioxidantes pueden ser clasificados en enzimáticos o no enzimáticos, ambos grupos de antioxidantes están encargados de la defensa en contra de la citotoxicidad asociada a las ERO.

Dentro del grupo de las enzimas antioxidantes se encuentran las selenoproteínas denominadas glutatión peroxidasas. Hay que recalcar que las glutatión peroxidasas no son las únicas enzimas antioxidantes, ya que existen en la célula otros antioxidantes enzimáticos como las superóxido dismutasas que metabolizan el superóxido y las catalasas que también metabolizan peróxidos. Sin embargo, de estos antioxidantes enzimáticos sólo las glutatión peroxidasas son selenoproteínas (Herbette *et al.* 2007).

Como se mencionó anteriormente, las glutatión peroxidasas (Gpx's) son selenoproteínas ampliamente reconocidas como enzimas encargadas de descomponer el peróxido de hidrógeno dentro de la célula (Gromer *et al.*, 2005). Actualmente se conocen seis glutatión peroxidasas en mamíferos pero de estas sólo 4 están clasificadas como selenoproteínas: Gpx1 que es la peroxidasa más abundante, Gpx2 que se expresa mayoritariamente en el tracto gastrointestinal, Gpx3 que esta presente de forma extracelular en el plasma y la Gpx4, que realiza diversas funciones como la reducción de lípidos peroxidados y la maduración del esperma (Arthur 2001). Dada la relevancia de la glutatión peroxidasa 4 para la presente tesis, a continuación se describe su importancia

durante el desarrollo embrionario.

La Gpx4 es una proteína monomérica con actividad antioxidante que tiene la particularidad de metabolizar lípidos peroxidados. A diferencia de otras glutatión peroxidadasas, la pérdida de función de Gpx4 es letal durante el desarrollo embrionario. Los embriones nulos para Gpx4 mueren a los 7.5 días del desarrollo. Esto es muy interesante ya que los embriones de ratón con pérdida de función de otras glutatión peroxidadasas (Gpx1, Gpx2 o Gpx3) son viables y aparentemente no tienen ningún defecto embrionario (Gromer *et al.*, 2005). Esto sugiere que la función de Gpx4 es relevante durante el desarrollo embrionario y a diferencia de las otras Gpx's, su función no puede ser suplida por otra proteína antioxidante.

De manera adicional, está reportado que la Gpx4 es importante en la regulación del estado redox celular durante el desarrollo embrionario, porque cuando se bloquea la actividad de esta GPx en extremidades de embriones de ratón, se provoca un aumento en la concentración de ERO y se promueve la muerte celular (Schnabel *et al.*, 2006).

Otro hallazgo interesante es que la regulación de la expresión de Gpx4 puede ser a nivel traduccional. Se ha reportado que el mensajero de Gpx4 tiene secuencias de unión a la proteína Grsf1 (del inglés, G-rich RNA sequence binding factor 1). Grsf1 es una proteína de unión a ARN capaz de regular la transcripción de los mRNA a los que se une (Park *et al* 2002). Se sabe que la unión de Grsf1 al mRNA de Gpx4, produce un incremento en la traducción de los mensajeros de Gpx4 esencial para el desarrollo embrionario del cerebro (Ufer *et al.*, 2008).

Tomando la evidencia obtenida por microarreglos de la pérdida de función parcial de Rac1 en pez cebra y la importancia de la síntesis y función de las selenoproteínas en los animales, ésto sugiere que Rac1 podría tener un papel importante en la regulación de la expresión de selenoproteínas indispensables durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

3. HIPÓTESIS.

La Rho GTPasa Rac1 regula la expresión de selenoproteínas como Gpx1 y Gpx4 durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

4. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Analizar el efecto de la disminución de de Rac1 sobre la expresión de selenoproteínas durante el desarrollo embrionario temprano en pez cebra.

Objetivos particulares.

1. Analizar el patrón de localización de las glutatión peroxidasas Gpx1 y Gpx4 durante el desarrollo embrionario temprano del pez cebra.
2. Analizar el efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 sobre el desarrollo embrionario temprano del pez cebra
3. Analizar el efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 sobre la formación de las somitas y miotomos.
4. Analizar el efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 sobre los niveles de las glutatión peroxidasas Gpx1 y Gpx4.
5. Analizar el efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en embriones completos por medio de la tinción con colorantes sensibles a ERO.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Animales.

Todos los embriones fueron obtenidos de peces cebra silvestres que provienen de un acuario local. Los peces fueron mantenidos en cautiverio en peceras de vidrio de 40 litros en un volumen de 30 litros de agua a una temperatura de 26°C en una densidad máxima de 25 peces por pecera. Los peces se mantuvieron con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad y fueron alimentados cuatro veces al día; las condiciones del agua (amonio y cobre) se monitorearon cada semana con recambios de agua preparada (agua desionizada por osmosis inversa mezclada con sales: CaSO₄ 0.15 g/l, NaHCO₃ 0.1 g/l, instant ocean 0.1 g/l) de 10 litros diarios (Westerfield, 2000.).

5.2. Cultivo *in vitro* de embriones de pez cebra.

Los peces cebra machos y hembras fueron colocados en una red una noche anterior a la mañana de la cruce para permitir que los huevos recién fecundados fueran depositados en el fondo del acuario y así evitar que fueran comidos por los peces adultos. Los embriones fueron colectados al inicio del fotoperíodo de luz que es cuando los peces se estimulan para la ovoposición y fertilización, los embriones se succionaron con una pipeta del fondo de la pecera y fueron separados para la limpieza de detritos. Los embriones de pez cebra fueron cultivados *in vitro* en cajas petri de 100 mm con agua de embrión (agua destilada, instant ocean 40 g/l, azul de metileno 0.1%) a una temperatura de 28°C (Westerfield, 2000) permitiendo el desarrollo embrionario hasta cada una de las etapas según la clasificación hecha por Kimmel *et al.*, en 1995.

5.3. Clasificación de los embriones de pez cebra.

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

5.4. Inyección de oligonucleótidos tipo morfolino.

Para inducir la pérdida de función parcial de Rac1 se utilizó un morfolino (*rac1MO* 1; Gene-Tools LLC, Oregon) diseñado contra la secuencia de *rac1* (este morfolino ya fue utilizado previamente por Salas-Vidal *et al.* en preparación) y se utilizó como control un morfolino control estándar (StdCtrlMO).

StdCtrlMO: 5'- CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA- 3'

*rac*IMO: 5'- GACCACACACTTTATGGCCTGCATC- 3'

El *rac*IMO se une al codón de inicio de la secuencia de *rac1*. Los morfolinós fueron disueltos y diluidos en solución tampón Danieau y se inyectaron en embriones fertilizados en la etapa de una célula y después se incubaron a 28°C para su análisis.

5.5. Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados fueron IgG de conejo anti Gpx1/2, IgG de conejo anti Gpx4, IgG de conejo anti Rac1 e IgG de conejo anti β tubulina (sc-30147, sc-50497, sc-217, sc-9104 respectivamente; todos de Santa Cruz Biotechnology)

5.6. Inmunolocalización de proteínas en embriones completos.

Los embriones de cada una de las etapas de interés fueron fijados a 4°C por toda la noche en paraformaldehído al 4% en PBS, lavados 3 veces en solución tampón de bloqueo (PBS 1x, BSA 0.1%, tritón TX 100 1%), fueron decorionados manualmente y se bloquearon 2 horas en solución tampón de bloqueo a temperatura ambiente. Para detectar las proteínas Gpx1b, Gpx4a y Gpx4b, los embriones fueron incubados con el anticuerpo primario correspondiente diluido 1:100 en solución tampón de bloqueo, y posteriormente se incubaron en anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado al colorante fluorescente Alexa Fluor 488 o 647 (Molecular Probes) diluido 1:100 en solución tampón de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente. Después los embriones fueron incubados con Sytox green (Molecular probes) 1:2500 por 1 hora a temperatura ambiente (para la visualización de núcleos) o con faloidina Alexa 594 (Invitrogen) 1:50 a 4°C en agitación suave por toda la noche (para la visualización de actina polimerizada). Los embriones fueron lavados tres veces y montados en metilcelulosa 3.5% en PBS para el análisis por microscopía de epifluorescencia o por microscopía confocal.

5.7. Tinción de embriones con el colorante redox sensible H₂DCFDA.

Los embriones fueron decorionados manualmente sobre agarosa al 1% teniendo especial cuidado de no causar daño mecánico a los embriones, después se tiñieron con H₂DCFDA (Molecular probes) disuelto en agua a una concentración final de 30 μ M por 30 minutos a 28°C. Posteriormente se lavaron con agua de embrión y se montaron en agarosa de bajo punto de fusión al 1% y fueron visualizados por microscopía confocal o epifluorescencia.

5.8. Microscopia confocal.

Los embriones teñidos con colorantes fluorescentes fueron montados en agarosa de bajo punto de fusión al 1% o en metilcelulosa al 2.5%, después fueron visualizados en un microscopio invertido Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany) con un objetivo Zeiss 10X Plan-Neofluoar Ph1 apertura numérica (AN) de 0.3. Los embriones teñidos con sytox Green o H₂DCFDA fueron excitados con una longitud de onda de 488 nm con una potencia de láser al 3% o 5% y al 1% respectivamente; se empleó un filtro de emisión BP 500-530 IR; y se mantuvo la apertura del iris a 105 µm. En el caso de los embriones marcados con el anticuerpo secundario Alexa 647 fueron excitados con una longitud de onda de 633 nm con una potencia de láser al 50%; se empleó un filtro de emisión BP 650-710 IR; y se mantuvo la apertura del iris a 105 µm. Se realizó el modo de adquisición directa de imágenes o con filtrado Kalman bajo (kalman 2) para disminuir el blanqueo de los colorantes fluorescentes y en el caso del uso del filtro Kalman para disminuir el ruido en las imágenes. El paso en Z fue de 10 µm aproximadamente dependiendo de la etapa de desarrollo del embrión. Las imágenes fueron obtenidas a una resolución de 512 píxeles por 512 píxeles.

5.9. Análisis de imágenes.

Las imágenes confocales fueron obtenidas con el programa LSM Image Zeiss y se guardaron como series de paso en z en formato LSM. El análisis de las imágenes fue realizado con el software libre ImageJ v.1.37 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y con el software LSM Image Browser de Zeiss. A partir de las series de cortes ópticos se realizaron proyecciones de intensidad máxima (completas y parciales) para visualizar estructuras internas; en algunos casos se eligieron cortes ópticos individuales para resaltar algunas observaciones. La cuantificación de las imágenes fue realizado con ImageJ v.1.37 y se usó la prueba de t Student para el análisis estadístico.

Para la presentación de las imágenes (mosaicos) se utilizó el programa Adobe Photoshop 7. A excepción de las proyecciones de máxima intensidad, las imágenes no se sometieron a ningún procesamiento adicional durante el análisis o presentación de las imágenes.

5.10. Purificación de proteínas.

Extractos proteicos totales fueron preparados siguiendo el protocolo de Link y colaboradores (Link *et al.*, 2006) con ligeras modificaciones. Los embriones de pez cebra clasificados por etapas fueron decorionados manualmente. Posteriormente se les eliminó el vitelo en solución tampón desvitelizante (55 mM NaCl, 1.8 mM KCL, 1.25 mM NaHCO₃), y los embriones se lavaron dos veces en solución tampón de lavado (110 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 2.7 mM CaCl₂, 10 mM Tris/Cl pH 8.5) y se resuspendieron e incubaron en solución tampón de lisis (250 µl Tris 1 mM pH 7.4, 1 tableta de inhibidor Mix (Complete, Mini, EDTA-free. Roche), 25 µl NP40, agua MilliQ a 10 ml) por 30 minutos a 4°C con agitación moderada, después las muestras fueron centrifugadas por 10 min. A 13,000 rpm y las proteínas solubles fueron recuperadas.

5.11. Electroforesis en gel, transferencia de proteínas e inmunodetección de proteínas.

El western blot fue realizado como fue descrito previamente (Schnabel *et al.*, 2005). Brevemente, las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de sulfato-poliacrilamida dodecil de sodio al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa 0.45 µm; se bloquearon con 5% de leche sin grasa disuelta en TBST (50 mM Tris-tamponeado salino pH 7.5, 0.05% Tween 20), y se incubaron con el anticuerpo primario indicado diluído 1:1000 en solución de bloqueo western (5% de leche sin grasa disuelta en TBST). Después de tres lavados con TBST, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario apropiado (diluído 1:5000 en solución de bloqueo) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) y las proteínas fueron visualizadas con Lumiglo (Signalling Science Technology) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6. RESULTADOS.

6.1. Efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 sobre el desarrollo embrionario del pez cebra.

El presente trabajo se inició con el análisis de la pérdida de función parcial de Rac1 inyectando embriones silvestres con el *rac1MO*. Este análisis tenía dos propósitos: 1) Estandarizar la técnica de inyección en embriones de pez cebra, en particular la inyección del *rac1MO* era determinante para continuar con el análisis de las selenoproteínas en embriones con pérdida de función parcial de Rac1. 2) Verificar que los resultados obtenidos previamente por Salas *et al.* (Salas *et al* en preparación) relacionados con la pérdida de función parcial de Rac1 eran reproducibles en embriones silvestres. Hay que recordar que los experimentos de Salas y col. se realizaron con embriones de la cepa TL y en nuestro caso usamos embriones silvestres (obtenidos de cruzas naturales de peces silvestres adquiridos en un acuario local). Aunque los fenotipos de la cepa TL y de los embriones locales son silvestres, había la posibilidad de que hubiera diferencias en la penetrancia del fenotipo asociado a la pérdida de función parcial de Rac1. Ya que está reportado que el efecto de pérdida de función usando morfolinós puede variar dependiendo de la cepa de peces que se utilice para los ensayos de pérdida de función (Poulton et al., 2010).

En la siguiente sección se describen los resultados relacionados con el efecto de pérdida de función parcial de Rac1 en embriones silvestres.

6.1.2. Efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 en embriones de pez cebra.

Para inducir la pérdida de función parcial de Rac1, los embriones silvestres en la etapa de una célula fueron inyectados con un oligonucleótido antisentido (morfolino) que inhibe la traducción del mRNA de *rac1* (*rac1MO*). La inhibición ocurre porque éste morfolino está diseñado para que hibride con el ATG del mRNA de *rac1*. La unión del morfolino al mRNA genera un impedimento estérico que evita la unión del ribosoma al mensajero y como consecuencia se inhibe la traducción del mensajero disminuyendo la cantidad de la proteína Rac1 endógena. Como control, se inyectó un morfolino control estándar (StdCtrlMO) el cual se corroboró que no tiene efectos durante el desarrollo embrionario (Fig. 1A). El stdctrlMO no inhibe ningún mensajero y no tiene actividad

biológica en los embriones. Ambos morfolidos se inyectaron a una cantidad final de 7.5 ng por embrión.

Se observó que a las 24 hpf. Los embriones que fueron inyectados con el morfolino *rac1MO* presentaron diferentes defectos morfológicos. De forma general, los defectos observados en estos embriones fueron: una disminución de la longitud total de los embriones, defectos en el desarrollo de las estructuras cefálicas, y defectos en la región caudal y en la forma de los miotomos (fig. 1B). En conjunto estas características morfológicas fueron consideradas como el fenotipo asociado a la pérdida de función parcial de Rac1. Además, no se detectó que hubiera diferencias en la penetrancia del efecto del morfolino *rac1MO* entre los embriones de la cepa TL usados por Salas-Vidal y col. y los embriones silvestres usados en el presente trabajo.

Otra particularidad de los embriones inyectados con el *rac1MO*, fue que a las 24 hpf. prácticamente no presentaban movimiento caudal. Esto llamó la atención ya que es muy característico que los embriones a las 24 hpf. presenten contracciones musculares en la región caudal. Este hallazgo fue reproducible en cada experimentos y como se muestra en el video 1, prácticamente todos los embriones control tienen movimiento caudal (derecha, *stdctrlMO*), mientras que la mayoría de los embriones con pérdida de función parcial de Rac1 no presentan movimiento y sólo unos cuantos tienen contracciones musculares pero muy esporádicas (izquierda, *rac1MO*).

Este defecto en el movimiento de la cola observado en los embriones deficientes de Rac1 podría estar relacionado con la alteración en el desarrollo de las somitas y de uno de sus derivados los miotomos como se observa en la figura 1.

Para corroborar este hallazgo, se realizaron tinciones con faloidina en embriones con pérdida de función parcial de Rac1 para reconocer los filamentos de actina (f-actina) y nos enfocamos en analizar la parte media de la región caudal. En las tinciones de los embriones inyectados con el morfolino *stdctrlMO* se observó la deposición de f-actina polimerizada característica en embriones a las 24 hpf. Esta deposición de f-actina se localiza principalmente en los límites entre cada miotomo (que tienen forma de cabeza de flecha) y en fibras que se extienden longitudinalmente a lo largo del eje antero-posterior y que atraviesan perpendicularmente a cada miotómo (fig. 2)

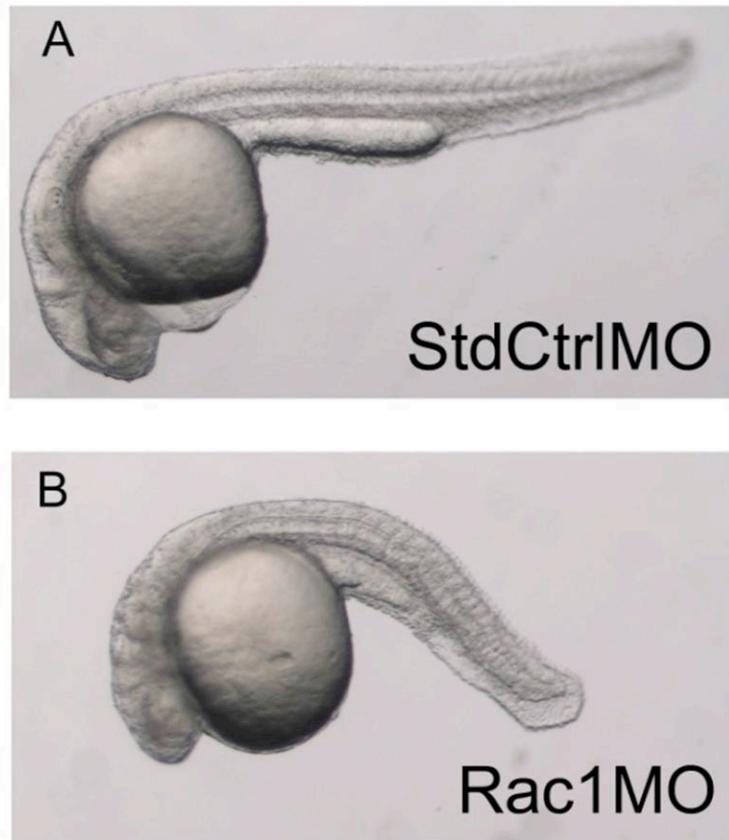


Figura 1. Fenotipo de los embriones con pérdida de función de Rac1 a las 24 hrs. Imágenes de campo claro de los embriones inyectados con StdCtrlMO (A) o *rac1*MO (B.)

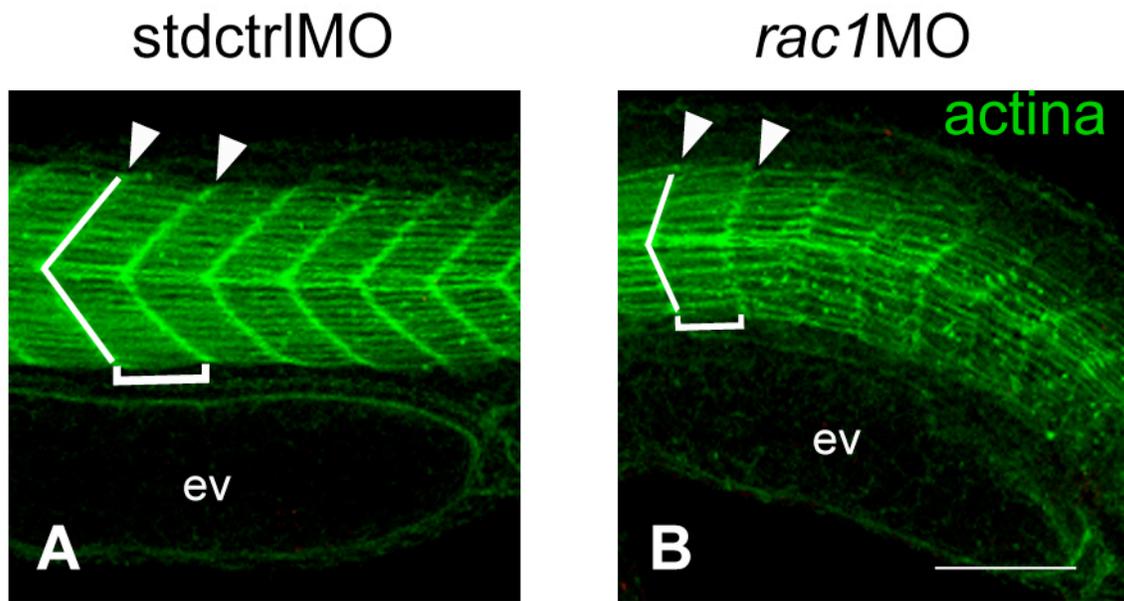


Figura 2. Efecto de la pérdida de función de Rac1 en los miotomos a las 24 hrs. Proyecciones de máxima intensidad de series de cortes ópticos obtenidos por microscopia confocal de embriones inyectados con StdCtrlMO (A) o *rac1*MO (B). En verde se muestra los filamentos de actina polimerizada detectada con faloidina-alexa 488. Las cabezas de flecha señalan los mioseptos y los corchetes señalan la extensión del miotomo. Las líneas blancas muestran la forma de cabeza de flecha que presentan los embriones stdctrlMO, mientras que en los embriones *rac1*MO se pierde la forma angular de los miotomos. ev, extensión del vitelo Barra de escala=100 μ m.

En contraste, los miotomos de los embriones con pérdida de función parcial de Rac1 tienen alterada la forma normal de cabeza de flecha y se observan más redondeados (fig. 2). Hay que destacar que el defecto morfológico en los miotomos de los embriones deficientes de Rac1 fue más evidente con las tinciones con faloidina en comparación con las imágenes obtenidas por microscopía de campo claro.

Estos resultados sugieren que Rac1 podría tener un papel en el desarrollo de las somitas y a su vez podrían estar relacionados con las contracciones musculares de la región caudal.

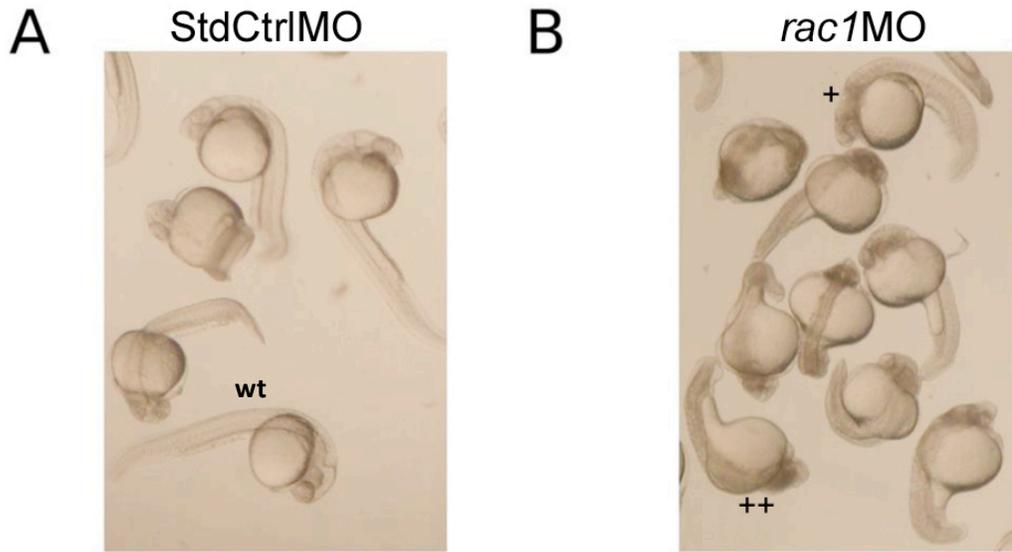
Las tinciones de faloidina se realizaron en colaboración con Jorge Medel estudiante de licenciatura y forman parte de los resultados de su tesis de licenciatura. (Jorge Medel, 2011).

6.1.3. Análisis de la penetrancia del fenotipo asociado a la pérdida de función parcial de Rac1

Durante el presente trabajo se realizaron varias inyecciones con el *rac1MO* para estandarizar la técnica de inyección de morfolinós, en estos ensayos se observó que en general los embriones presentaban defectos morfológicos como los mostrados en la figura 1. Sin embargo, se observaron diferentes grados de penetrancia de estos defectos. A partir de esta observación se realizó un análisis a mayor detalle y se observó que efectivamente los embriones inyectados con *rac1MO* presentaban diferentes grados de severidad en los defectos en su desarrollo en comparación con los inyectados con *stdctrlMO*. Estas diferencias en la penetrancia del fenotipo asociado a la pérdida de función parcial de Rac1 se agruparon en dos clases de fenotipo, el fenotipo moderado (+) que incluye embriones que presentaron una disminución en la talla total y un encorvamiento de la región caudal del embrión (fig. 3B señalado con +); el fenotipo severo (++) que incluye embriones que presentaron una reducción en el tamaño de las estructuras cefálicas y de la longitud de la región caudal del embrión (fig. 3B señalado con ++).

En la figura 3 se muestra la distribución observada del fenotipo asociado a la pérdida de función parcial de Rac1 y que fueron agrupados en las dos categorías (fig. 3D). En al menos tres inyecciones independientes se observó una incidencia equivalente para los fenotipos moderado (+) y severo (++) ambos del 30% aproximadamente (tabla fig. 3C).

Una vez que se realizó el análisis de los efectos a nivel morfológico en los



	wt	moderado (+)	severo (++)	Muertos	n	n _{exp}
StdCtrlMO	83.3 ± 9.9%	0.0%	0.0%	16.7 ± 9.9%	382	3
<i>rac1</i> MO	0.0%	33.3 ± 6.1%	36.1 ± 4.5%	30.6 ± 5.3%	418	3

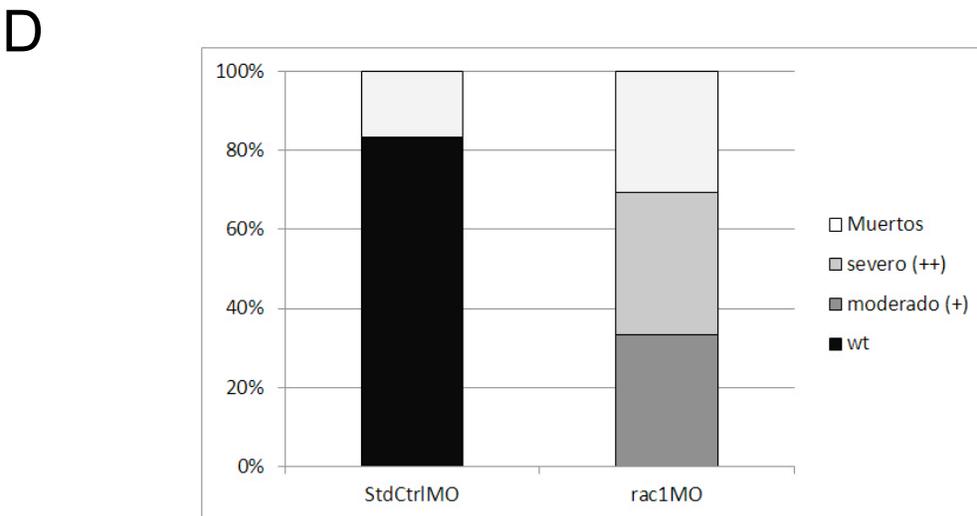


Figura 3. Efecto de la pérdida de función de Rac1 a las 24hrs. Imágenes de campo claro (A y B) representativas del fenotipo de los embriones inyectados con StdCtrlMO (A) y *rac1*MO (B). En (B) se observa embriones clasificados en fenotipo moderado (+) o fenotipo severo (++). (C) Distribución porcentual de los fenotipos asociados a la pérdida de función de Rac1 clasificados como fenotipo moderado (+) o fenotipo severo (++). (D) Gráfico que muestra los datos presentados (C). wt, fenotipo silvestre; n, número total de embriones; n_{exp}, número de repeticiones experimentales independientes.

embriones con pérdida de función parcial de Rac1, se evaluó por “western blot” la eficiencia del *rac1MO* para inhibir la expresión de la proteína Rac1.

En el análisis por “western blot” se observó un decremento en la cantidad de la proteína Rac1 en los embriones inyectados con el *rac1MO* comparados con los embriones control. Además se detectó que el nivel de la disminución de la proteína Rac1 está relacionada con el grado de severidad del fenotipo (fig. 4). En los embriones con fenotipo moderado (+, figura 4B) se observó una reducción de 0.18 veces con respecto a los embriones inyectados con *stdCtrlMO* (fig. 4A), de forma esperada los embriones con fenotipo severo (++, fig. 4B) presentaron una reducción de 0.48 veces respecto a los embriones inyectados con *stdCtrlMO* (fig. 4A). Como control de carga se utilizó beta tubulina, sin embargo, se observó un aumento en la cantidad de tubulina en embriones con fenotipo moderado (+) (1.26 veces, fig. 4B). Además, el aumento es mayor en los embriones con fenotipo severo (++) (1.69 veces fig. 4B) en comparación con los embriones *stdCtrlMO*. Sorprendentemente, se observó una relación inversa entre la pérdida de función parcial de Rac1 y los niveles de beta tubulina en 4 experimentos independientes, pero hasta el momento no se tiene una explicación de como Rac1 podría estar alterando los niveles de beta tubulina. En vista de este resultado se tiene que utilizar otra proteína como referencia de carga que no cambie su expresión durante la pérdida de función parcial de Rac1 por ejemplo GAPDH o una MAPK como p38.

Una vez que se verificó el efecto y la eficiencia del *rac1MO*, se continuó con el análisis del efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 en la expresión de selenoproteínas.

6.2. Efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 sobre la expresión de selenoproteínas en el desarrollo embrionario del pez cebra.

Resultados preliminares sugieren que la pérdida de función parcial de Rac1 reduce la nivel de los transcritos que codifican para las selenoproteínas *gpx1b*, *gpx4a*, *gpx4b*, *sps2*. Como estrategia se decidió enfocarse en las glutatión peroxidasas *gpx1b*, *gpx4a*, *gpx4b*, ya que son proteínas de las cuales se tiene información reportada acerca de su función tanto celular como en el desarrollo de organismos vertebrados, y además hay metodologías para su detección.

Se analizaron los patrones de localización de las Gpx1b, Gpx4a y Gpx4b usando

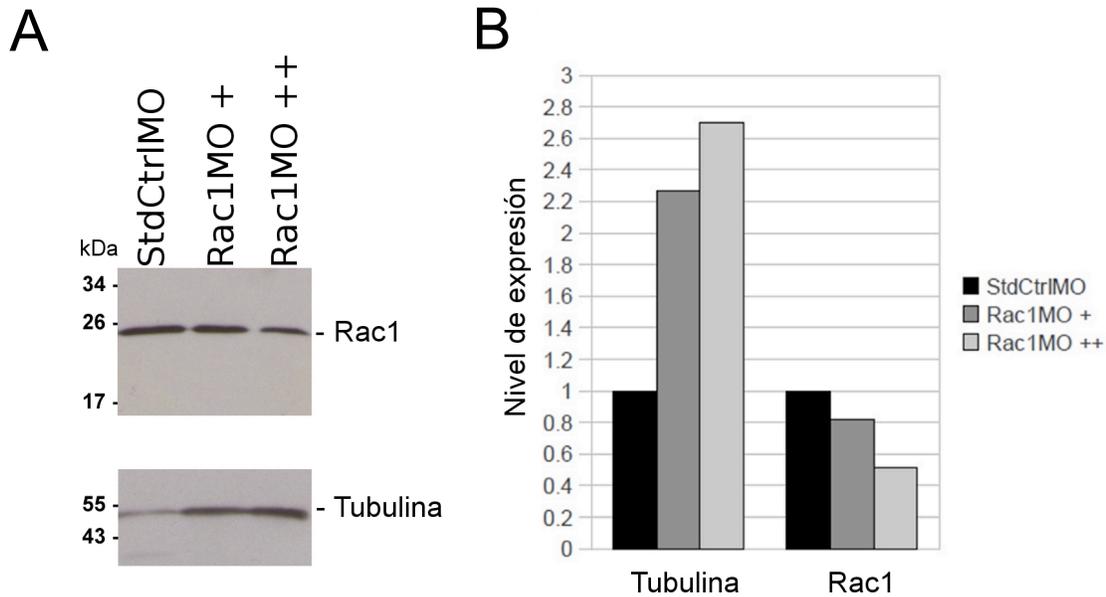


Figura 4. Efecto de la inyección del *rac1MO* en la expresión de la proteína Rac1 a las 24hrs. Detección por “western blot” de Rac1 en extractos proteicos totales de embriones de pez cebra a las 24 hpf que fueron inyectados con stdctrlMO o con *rac1MO*. Para la detección se usó un anticuerpo anti-Rac1 y anti tubulina (control de carga). (A) Expresión de Rac1 en embriones control (stdctrlMO) y embriones deficientes de Rac1 que presentan el fenotipo moderado (Rac1MO+) o el fenotipo severo (Rac1MO ++). (B) Gráfico de la cuantificación del nivel de expresión de Rac1 presentado en (A); los niveles de expresión de la proteína están expresados en unidades arbitrarias en comparación al control.

inmunofluorescencia en embriones completos, y de forma alternativa se evaluó la expresión de las Gpx1b, Gpx4a y Gpx4b por western blot.

Establecer estas metodologías era de suma importancia, ya que hasta el momento no hay reportes que muestren la localización o la detección por “western blot” de las Gpx1a, Gpx4a y Gpx4b en embriones de pez cebra. Estos resultados sirvieron como referencia para compararlos con los efectos producidos por la pérdida de función Rac1 presentados más adelante.

6.2.1. Patrón de localización de las glutatión peroxidasas, Gpx1 y Gpx4 durante el desarrollo embrionario temprano del pez cebra.

El objetivo principal de este trabajo era evaluar si la pérdida de función parcial de Rac1 tiene un efecto en la expresión de Gpx1b, Gpx4 y Gpx4b usando las técnicas de inmunofluorescencia y “western blot”.

Sin embargo, ambas técnicas dependen del uso de anticuerpos que detecten de manera específica las proteínas de interés y no hay anticuerpos contra las GPx's de pez cebra. Se utilizaron dos anticuerpos comerciales: un anticuerpo anti-Gpx1/2 que reconoce a las Gpx1, Gpx2 humanas y un anticuerpo anti-Gpx4 que reconoce a la Gpx4 de humano. Se verificó que estos anticuerpos detecten de manera específica a las Gpx's de pez cebra

En adelante se indicará a la proteína Gpx1b como Gpx1, y a las Gpx4a y Gpx4b como Gpx4, ya que no tenemos certeza si con los anticuerpos usados en este trabajo se pueden diferenciar las isoformas tanto de las Gpx1, Gpx2 o de las Gpx4 del pez cebra.

Para examinar la localización de las glutatión peroxidasas se realizó un primer ensayo de inmunolocalización de las proteínas Gpx1/2 y Gpx4 en embriones completos.

Como se puede observar en la figura 5 los anticuerpos Gpx1/2 (fig. 5A) y Gpx4 (fig. 5B) permiten visualizar una señal positiva de mayor intensidad que el control negativo que sólo fue incubado con el anticuerpo secundario acoplado a la molécula fluorescente Alexa 488 (fig. 5C). En este ensayo, se encontró que las proteínas se expresan de manera ubicua en los embriones cuando se analizó por epifluorescencia.

Posteriormente se realizaron inmunotinciones y se visualizaron por microscopia confocal para detectar la localización de las proteínas Gpx1/2 y Gpx4 a lo largo del desarrollo embrionario del pez cebra. Estos ensayos se realizaron con la intención de tener una perspectiva general de la expresión y localización de las Gpx1/2 y Gpx4 durante el

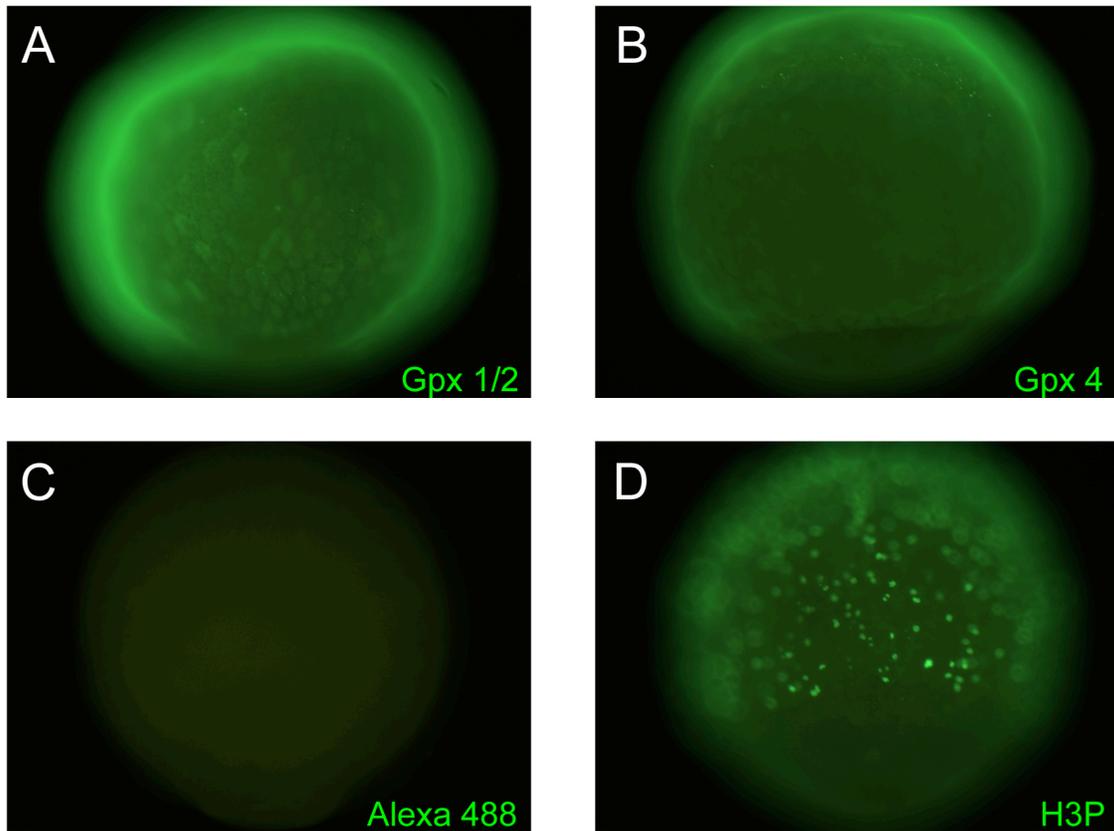


Figura 5. Localización de las proteínas Gpx1 (Gpx1/2) y Gpx4 en embriones en etapa de 70-90% de epibolia. Imágenes de inmunofluorescencia convencional de la localización las Gpx1 (A) y Gpx4 (B) (verde). Las proteínas Gpx1 y Gpx4 fueron inmunodetectadas usando anticuerpos anti Gpx 1/2 y anti Gpx4 respectivamente (verde). (C) Control negativo, embrión incubado solo con el anticuerpo secundario Alexa 488. (D) Control positivo, embrión incubado con anticuerpo primario anti H3-P (marcador de mitosis) y después incubado con anticuerpo secundario Alexa 488 (verde).

desarrollo embrionario.

De manera general se puede observar en las figuras 6 y 7 que las proteínas Gpx1 y Gpx4 se expresan de manera ubicua en todo el embrión durante las diferentes etapas a lo largo del desarrollo embrionario. En general, no se detectó ningún patrón diferencial de localización entre Gpx1 y Gpx4 durante las etapas de las primeras divisiones hasta la somitogenesis, al menos no al nivel de resolución del objetivo 10X que fue usado para la adquisición de las imágenes.

Sin embargo, a las 24 hpf. se observó un patrón de localización de la Gpx4 muy interesante en la parte caudal de los embriones. Se detectó que Gpx4 se localiza principalmente en el zona central de cada miotomo (Fig 8B, marcado con cabezas de flechas blancas) y en una línea a lo largo del eje antero-posterior que coincide con el miosepto horizontal que atraviesa perpendicularmente a cada miotomo (Fig 8B cabeza de flecha amarilla). Además, se puede observar en la sobreposición con los núcleos que la Gpx4 está restringida a la parte más central del miotomo (fig. 8C y 8c). Cabe señalar que la expresión de Gpx4 es más intensa en los miotomos más anteriores y va disminuyendo de forma gradual en los mitomos más posteriores (fig. 8B). Además se observó que la Gpx4 se distribuye en tres arreglos longitudinales que van a lo largo del eje antero-posterior (fig. 8E) y que coinciden espacialmente con la placa del piso neural (figs. 8E y 8e, cabeza de flecha amarilla), la notocorda (figs. 8E y 8e, corchete blanco) y la hipocorda (figs. 8E y 8e, corchete amarillo).

Estas observaciones son muy interesantes y sugieren que la Gpx4 podría tener una función durante el desarrollo de las estructuras embrionarias como el tubo neural, la notocorda o los miotomos.

6.2.2. Detección de las glutatión peroxidasas Gpx1 y Gpx4 en embriones de pez cebra por “western blot”

Para corroborar la expresión de las proteínas Gpx1 y Gpx4 y tener más evidencia de la especificidad de los anticuerpos se realizaron ensayos por “western blot” usando los anticuerpos que reconocen a las Gpx1 y Gpx4 del pez cebra.

En el caso de las glutatión peroxidasas, Gpx1b (163 aa.; 16.3 kDa), Gpx4a (163 aa.; 18.6 kDa) y Gpx4b (170 aa.; 19.2 kDa), tienen pesos moleculares muy similares por lo que deberían ser detectadas entre los 17 y 28 kDa y los 15 a 25 kDa respectivamente. Sin

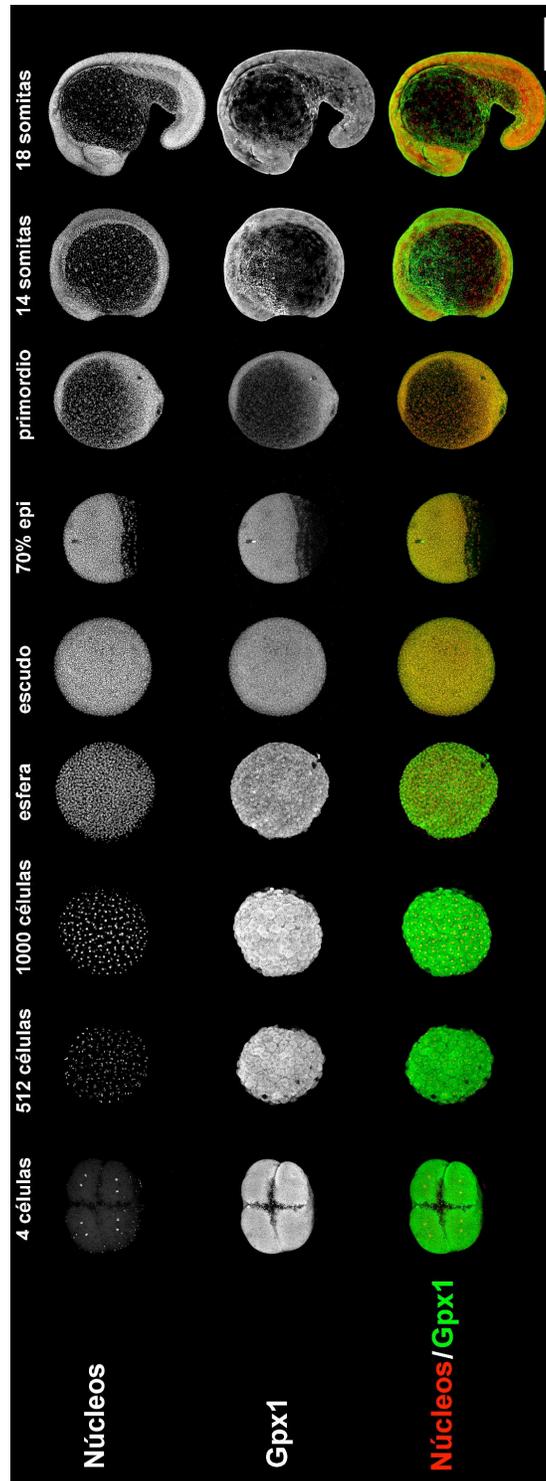


Figura 6. Patrón de inmunolocalización de la proteína Gpx1 durante el desarrollo embrionario del pez cebra. Proyecciones de máxima intensidad de series de cortes ópticos obtenidos por microscopia confocal de la localización de los núcleos y Gpx1 (en escala de grises) y la sobreposición de ambos (rojo y verde, respectivamente). La proteína Gpx1 fue inmunodetectada usando el anticuerpo anti Gpx 1/2 (verde). Los núcleos fueron visualizados con sytox green (rojo). Barra de escala=500 μ m.

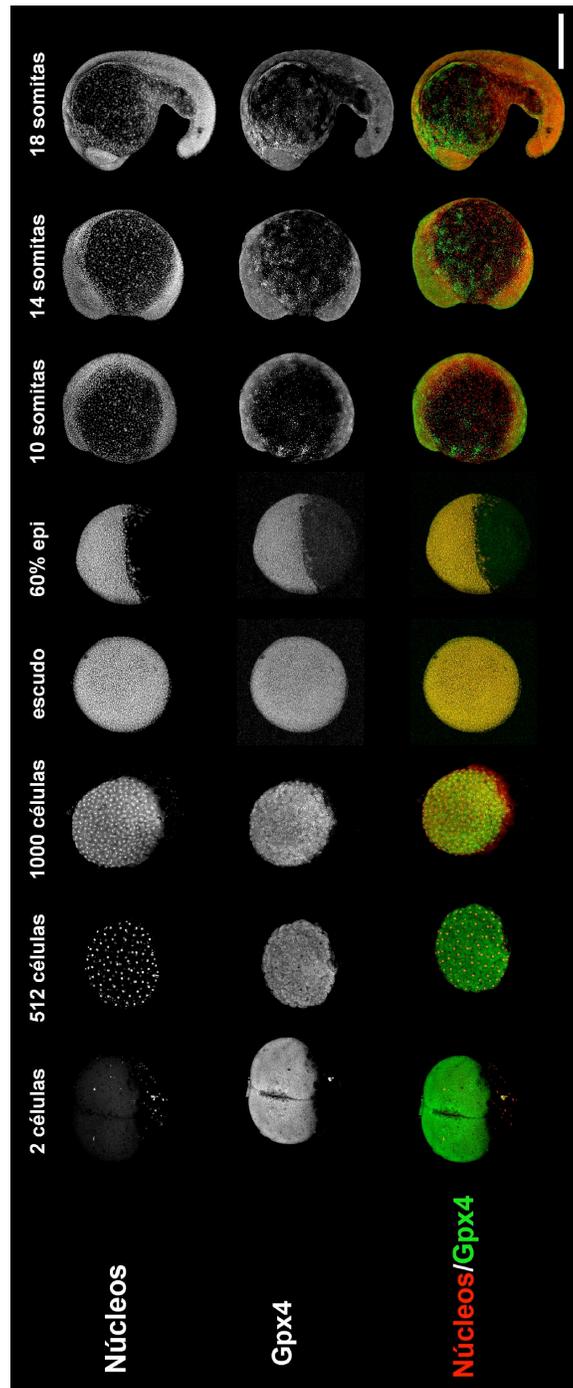


Figura 7. Patrón de inmunolocalización de la proteína Gpx4 durante el desarrollo embrionario del pez cebra. Proyecciones de máxima intensidad de series de cortes ópticos obtenidos por microscopia confocal de la localización de los núcleos y Gpx4 (en escala de grises) y la sobreposición de ambos (rojo y verde, respectivamente). La proteína Gpx4 fue inmunodetectada usando el anticuerpo anti Gpx 4 (verde). Los núcleos fueron visualizados con sytox green (rojo). Barra de escala=500 μ m.

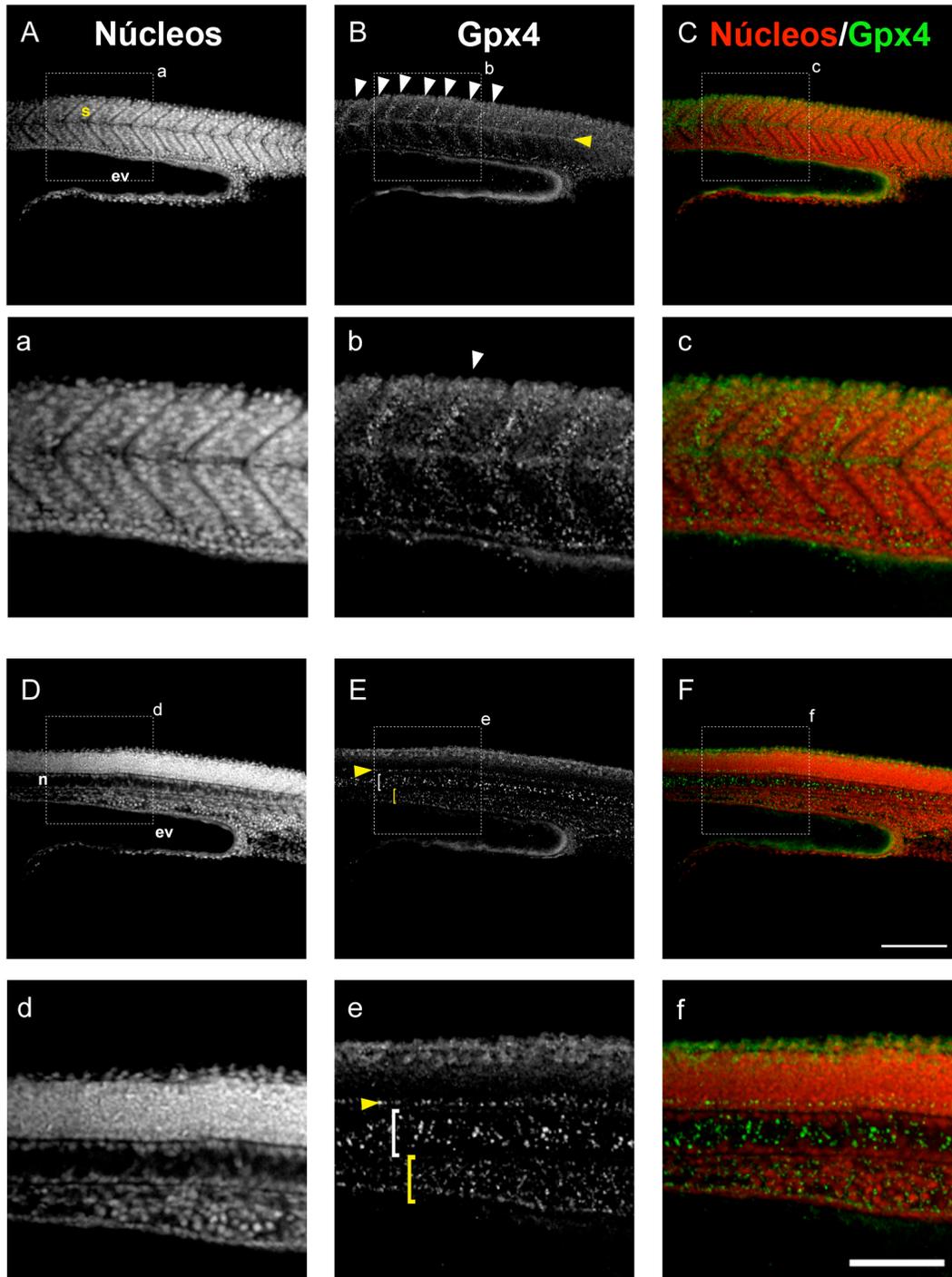


Figura 8. Localización de la proteína Gpx4 a las 24 hrs. Cortes ópticos obtenidos por microscopia confocal de la localización los núcleos y Gpx1 (en escala de grises) y la sobreposición de ambos (rojo y verde, respectivamente). La proteína Gpx4 fue inmunolocalizada usando el anticuerpo anti Gpx4 (verde). Los núcleos fueron visualizados con sytox green (rojo). En A-C se muestra un corte óptico lateral de la región caudal de un embrión a las 24 hrs. que permite reconocer las somitas y la extensión del vitelo. En D-F se muestra un corte lateral más interno que permite reconocer estructuras como la notocorda. s, somita; n, notocorda; ev, extensión del vitelo. Barra de escala=200 μ m.

embargo, en la membrana incubada con anti-Gpx1/2 se observaron 3 bandas muy intensas: la primera entre 28 y 36 kDa, la segunda entre 36 y 55 kDa; y una tercera entre 55 y 72 kDa (fig. 9A), no obstante, ninguna coincidió con el peso molecular teórico de la proteína Gpx1b (fig 9A, flecha). En el caso de la membrana incubada con anti-Gpx4 se observaron 2 bandas: una tenue de 35 kDa y otra más intensa con un peso poco mayor a 15 kDa (fig. 9B). Por los pesos moleculares teóricos de las Gpx4a y Gpx4b, la segunda banda puede ser alguna o ambas Gpx4 de pez cebra. Además este resultado mostró que con el anticuerpo anti-Gpx4 no se puede detectar de forma individual a las Gpx4a y Gpx4b. Finalmente, en la membrana incubada con anti- β -tubulina se observó una banda del tamaño esperado de 49 kDa (fig. 9C).

Estos resultados mostraron que el anticuerpo anti-Gpx4 pueden reconocer a las proteínas Gpx4 de pez cebra, sin embargo el anticuerpo anti-Gpx1 aparentemente no reconoció la proteína Gpx1 de pez cebra por ensayos de ‘western blot’. Este hecho, hizo que nos enfocáramos en la Gpx4. Para los análisis posteriores se utilizó el anticuerpo anti-Gpx4 para la detección de las Gpx4 de pez cebra tanto por inmunofluorescencia como por western blot.

6.2.3. Efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 en la expresión de Gpx4 en el desarrollo embrionario del pez cebra.

La pregunta principal de este trabajo es si la pérdida de función parcial de Rac1 tiene un efecto en la expresión de selenoproteínas, en particular de la Gpx4. Para contestar esta pregunta se usaron metodologías establecidas previamente: 1) la inyección del *rac1MO*

para la inducción de la pérdida de función parcial de Rac1, 2) la localización de Gpx4 durante el desarrollo embrionario por inmunofluorescencia y 3) la detección de la Gpx4 por western blot.

Para analizar la expresión y localización de Gpx4 en embriones con pérdida de función parcial de Rac1, se realizaron inmunotinciones en embriones completos usando el anticuerpo anti-Gpx4. En estos ensayos se comparó la intensidad de la señal positiva de fluorescencia (generada por la detección de Gpx4) entre los embriones inyectados con *rac1MO* y los embriones control inyectados con *stdctrlMO*. En este estudio se analizaron embriones en etapas de escudo, 70% epibolia y embriones de 24 hrs. Esto con el propósito

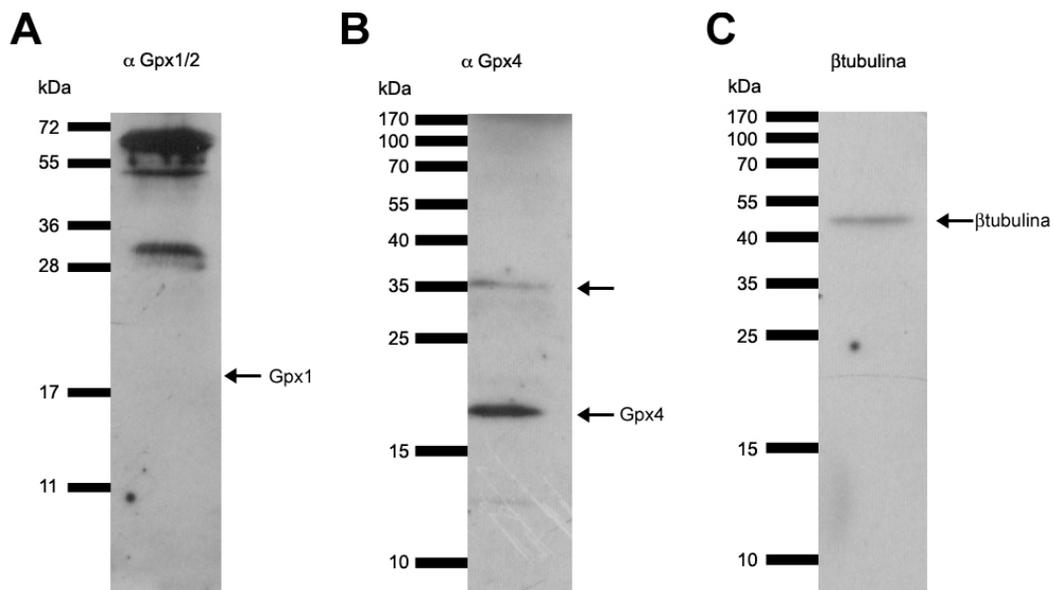


Figura 9. Detección por “western blot” de las proteínas Gpx1, Gpx4 y β -tubulina en extractos proteicos totales de embriones silvestres de pez cebra a las 24 hpf . Extractos proteicos totales fueron separados por electroforesis en gel y transferidos a membranas de nitrocelulosa. (A) membrana incubada con anti Gpx1/2 para inmunodetectar a Gpx1. (B) membrana incubada con anti Gpx4 para inmunodetectar las Gpx4a y Gpx4b. (C) membrana incubada con anti β -tubulina para inmunodetectar a β -tubulina

de explorar desde que momento en el desarrollo había un cambio de expresión de Gpx4 en los embriones con pérdida de función parcial de Rac1.

En este análisis se detectó una tendencia de disminución de la señal positiva para Gpx4 en los embriones inyectados con *rac1MO* en las etapas de escudo (fig. 10A), 90% de epibolia (fig. 10C) y 24 hrs (fig. 10E), cuando se compararon con los embriones control. Sin embargo, no se encontró que las diferencias fueran estadísticamente significativas (evaluado por prueba de t student $p < 0.05$).

No obstante la diferencia no es tan evidente probablemente por la penetrancia en el fenotipo (fig. 3B). Tomando este hecho en consideración se decidió volver a analizar los embriones deficientes de Rac1 agrupándolos en las categorías de fenotipo moderado (+) y fenotipo severo (++) como se mostró en la figura 3 para su análisis por inmunofluorescencia.

Encontramos que en los embriones que presentan el fenotipo más severo hay una disminución de Gpx4 muy evidente. Como se muestra en la figura 11, los embriones inyectados con *stdCtrlMO* presentaron una expresión de Gpx4 en la parte media de cada miotomo, además se detectó un gradiente de expresión de Gpx4 en los miotomos a lo largo del eje antero-posterior que va disminuyendo en dirección posterior (figs. 11B y 11C) ambas observaciones coinciden a lo previamente observado en la figura 8. De forma contraria, en los embriones con pérdida de función parcial de Rac1 se observó que la señal para Gpx4 disminuye un 42% con respecto a los embriones inyectados con *stdCtrlMO* (figs. 11E, 11H y 11J). y no se observaron los patrones de localización de Gpx4 que ocurren en los embriones control.

De forma alternativa al análisis por inmunodetección de Gpx4, se verificó por “western blot” la expresión de Gpx4 en los embriones con pérdida de función parcial de Rac1 (fig. 12). De forma similar que en el análisis por inmunofluorescencia, se observó que en los embriones inyectados con *rac1MO* que presentaron el fenotipo severo (++) hubo una disminución de 0.31 veces la expresión de la proteína Gpx4 con respecto al control (fig. 12B). Además, se observó de nuevo el aumento de la beta tubulina en los embriones con pérdida de función parcial Rac1 (fig. 12B), esta observación coincide con los resultados presentados en la figura 4.

Sumando los resultados obtenidos por “western blot” e inmunofluorescencia,

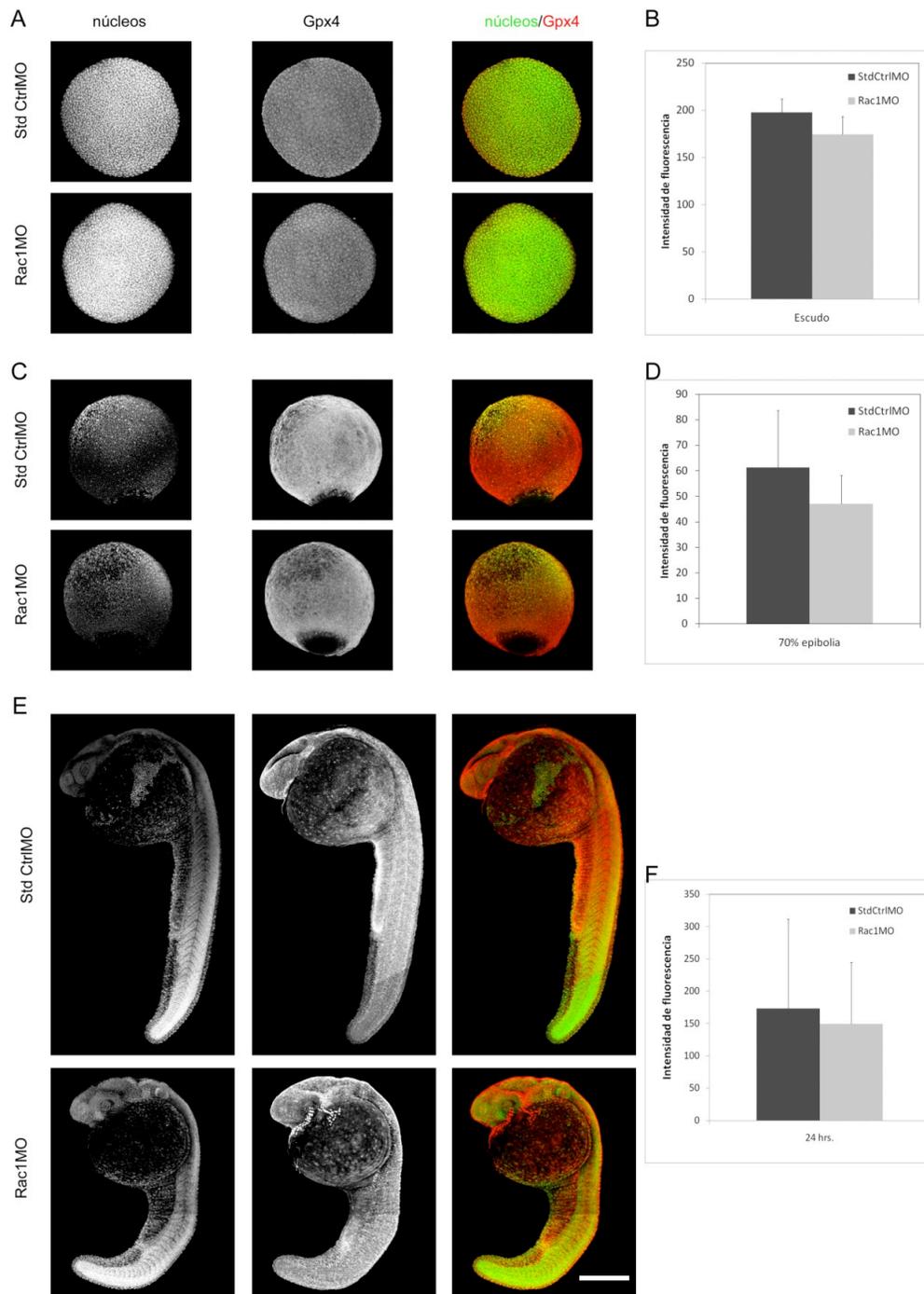


Figura 10. Efecto de la pérdida de función de Rac1 sobre la expresión de Gpx4 en embriones en etapa de escudo, 90% de epibolia y de 24 hrs. Proyecciones de máxima intensidad obtenidas por microscopia confocal de la localización de los núcleos y Gpx4 (en escala de grises) y la sobreposición de ambos (verde y rojo, respectivamente) de embriones inyectados con StdCtrlIMO o con Rac1MO. (A) Embriones en etapa de escudo, (C) en etapa de 90% de epibolia y (E) a las 24hrs. (C, D y F) muestran los graficos de la cuantificación de la intensidad de la señal positiva para Gpx4. Barra de escala=500 μ m.

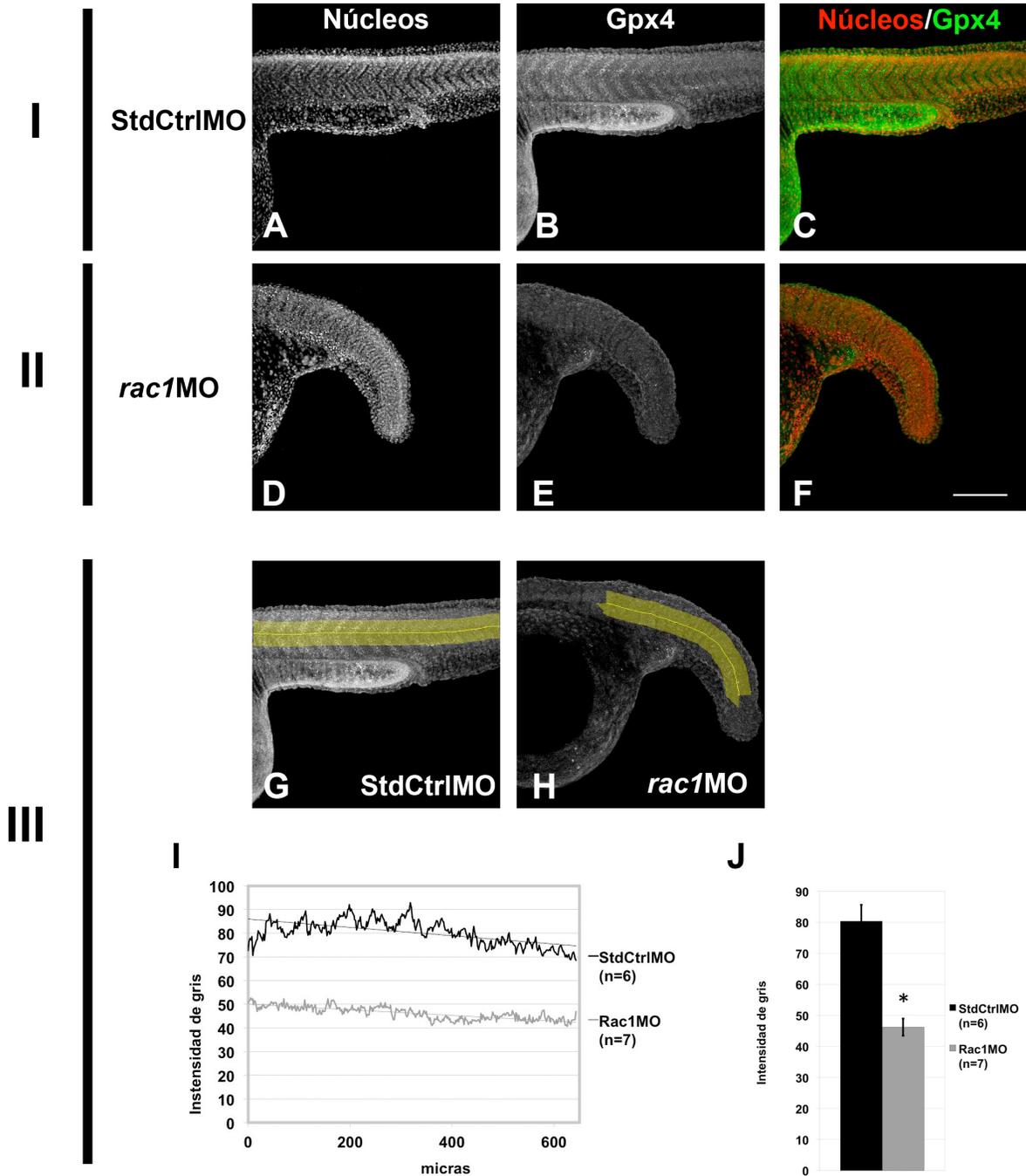


Figura 11. Efecto de la pérdida de función de Rac1 sobre la expresión de Gpx4 en embriones a las 24 hrs del desarrollo. Proyecciones de máxima intensidad obtenidas por microscopia confocal de embriones inyectados con StdCtrlIMO (I) y Rac1MO (II). (A y D) embriones teñidos con sytox green para visualizar núcleos. (B, E, G y H) Imágenes de la inmunolocalización de Gpx4. (C y F) Imágenes de la sobreposición de los núcleos (rojo) y de Gpx4 (verde). (III). (I) Gráfica que representa la distribución de la intensidad de la señal positiva de Gpx4 a lo largo de las región de interés (RDI's) mostradas en (G) y (H). (J) Gráfico de la intensidad media de la señal positiva para Gpx4 en la RDI. (G y H) RDI (en amarillo) utilizadas para cuantificar la expresión de Gpx4 en embriones control y embriones *rac1*MO respectivamente. (*) estadísticamente significativo $p < 0.05$. Barra de escala=200 μ m.

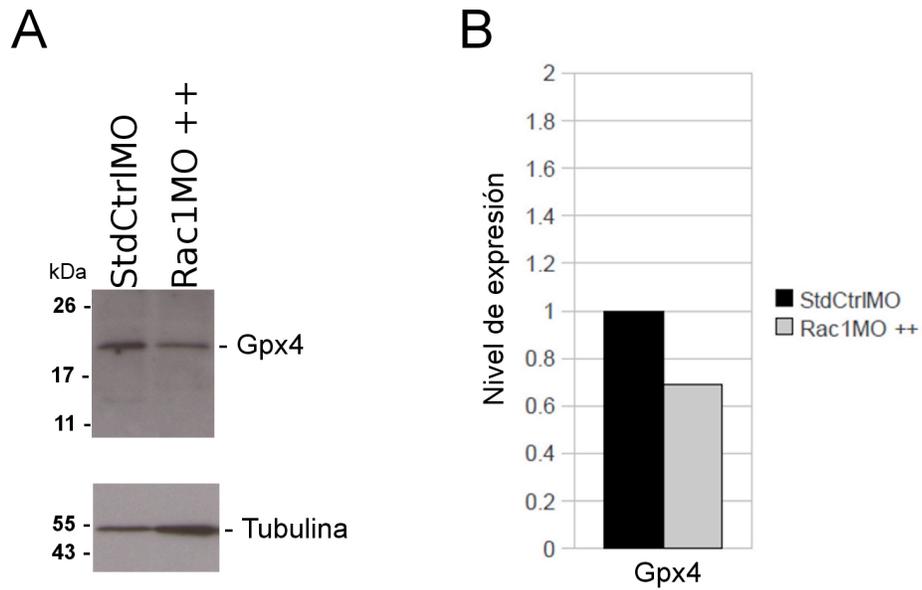


Figura 12. Niveles de expresión de Gpx4 en embriones con pérdida de función de Rac1 a las 24hrs. Detección por westernblot de Gpx4 en extractos proteicos totales de embriones de pez cebra a las 24 hpf que fueron inyectados con stdctrlMO o *rac1*MO. Para la detección se usó un anticuerpo anti-Gpx4 y anti tubulina (control de carga). (A) Expresión de Gpx4 en embriones control (stdctrlMO) y embriones deficientes de Rac1 que presentan el fenotipo severo (Rac1MO ++). (B) Gráfico de la cuantificación del nivel de expresión de Gpx4 presentado en (A); los niveles de expresión de la proteína están expresados en unidades arbitrarias en comparación al control.

demuestran que hay una disminución de la expresión de Gpx4 asociada a la pérdida de función parcial de *rac1* a las 24 hpf. Además, los resultados obtenidos correlacionan con los con los resultados obtenidos por microarreglos (ver sección 2.1). Esto resulta muy interesante, ya que esta evidencia puede sugerir que Rac1 tenga un papel en la regulación la expresión de Gpx4. Estos resultados serán discutidos más adelante.

6.3. La pérdida de función parcial de Rac1 afecta los niveles de especies reactivas de oxígenos a las 24 hpf.

En fibroblastos embrionarios de ratón con pérdida de función parcial de Rac1 se incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno (Debidda *et. al.* 2006). Tomando en cuenta este reporte y la evidencia previamente observada decidimos analizar si la pérdida de función parcial de Rac1 afecta la formación de ERO en embriones completos.

Se analizaron embriones con pérdida de función parcial de Rac1 y embriones inyectados con el *stdCtrlMO* que fueron teñidos con el colorante redox sensible carboxi- H_2DCFDA (DCFDA). Éste colorante, ha sido empleado para medir de manera indirecta la formación de ERO tanto en células individuales como embriones completos (Salas-Vidal *et al.*, 1998).

El DCFDA es una molécula permeable a la membrana plasmática y dentro de la célula puede ser oxidado por ERO convirtiéndose en diclorofluoresceína que es un compuesto fluorescente que puede ser detectado por epifluorescencia o microscopía confocal.

Antes de analizar la formación de ERO en los embriones con pérdida de función parcial de Rac1 se realizaron ensayos de tinción con DCFDA en embriones silvestres vivos en diferentes etapas y se visualizaron por microscopía de fluorescencia (figs. 13A-E). En estos ensayos se observó que los embriones en etapa de 8 somitas (fig. 13C), 14 (fig. 13D), de 20 somitas (fig. 13E) y de 24 hpf (fig. 13B) presentaron un patrón de tinción de DCFDA más intenso en los límites entre somitas (13c-e) y en los límites de cada uno de los miotomos. También se observó tinción de DCFDA en la periferia del vitelo a lo largo del eje antero-posterior (figs. 13C-E). De forma contraria en el control negativo que sólo fue incubado con DMSO no se detectó fluorescencia (fig. 13A).

Se realizaron tinciones con DCFDA y se observó que el patrón de tinción en los

mioseptos (que son los límites entre los miotomos) ocurrió de manera reproducible en embriones clasificados en etapas correspondientes a la somitogénesis y a las 24 hpf. Por lo que este patrón de tinción con DCFDA fue considerado como el patrón de formación de ERO silvestre y se usó como referencia para los análisis posteriores.

Una vez que se estableció el patrón de tinción con DCFDA en embriones silvestres vivos, se analizó el patrón de tinción en los embriones silvestres por microscopia confocal. En este análisis se observó un patrón de fluorescencia similar al observado en embriones silvestres que fueron analizados por microscopía de fluorescencia. En estos embriones, se observó que la tinción con DCFDA se acumula principalmente en las regiones cefálicas, en la región dorsal de la extensión de vitelo y en los mioseptos (Fig. 13G y H).

Tomando como referencia el patrón de tinción de DCFDA en los embriones silvestres, se realizó un análisis para determinar si había una diferencia en la formación de ERO cuando hay pérdida de función parcial de Rac1. Para este análisis se comparó la intensidad de fluorescencia (generada por la tinción con DCFDA) en embriones inyectados con *rac1MO* y en embriones inyectados con el *stdctrlMO*. Además se hizo un análisis cuantitativo enfocándose en dos regiones de interés: 1) la región cefálica y 2) en los miotomos. Como control positivo se incluyó un embrión al cual se le generó daño mecánico usando una pinza. Se sabe que el daño mecánico provoca la producción ERO en la zona dañada (Fig.14A). Como control negativo se presenta un embrión que sólo fue incubado con DMSO (Fig.14B).

Al analizar la tinción de DCFDA en los embriones control se detectó un patrón de tinción similar a lo previamente observado en la figura 13 (fig 14E, en color azul). De forma contraria, en los embriones inyectados con *rac1MO* se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia en comparación con los embriones control (fig. 14D y fig. 14E zonas en color verde o rojo). En los embriones deficientes de Rac1 se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia en la región cefálica (fig. 14E, marcado con b), en la región dorsal del vitelo y en los mioseptos (fig. 14E, marcado con d). Sin embargo aunque hay un cambio en la intensidad de la tinción con DCFDA en los embriones deficientes de Rac1, el incremento ocurre en las mismas regiones que en los embriones *stdCtrlMO*. Por otro lado, en el control positivo las zonas con daño mecánico son positivas para la tinción con DCFDA (fig. 14A). Mientras que el control negativo que sólo fue

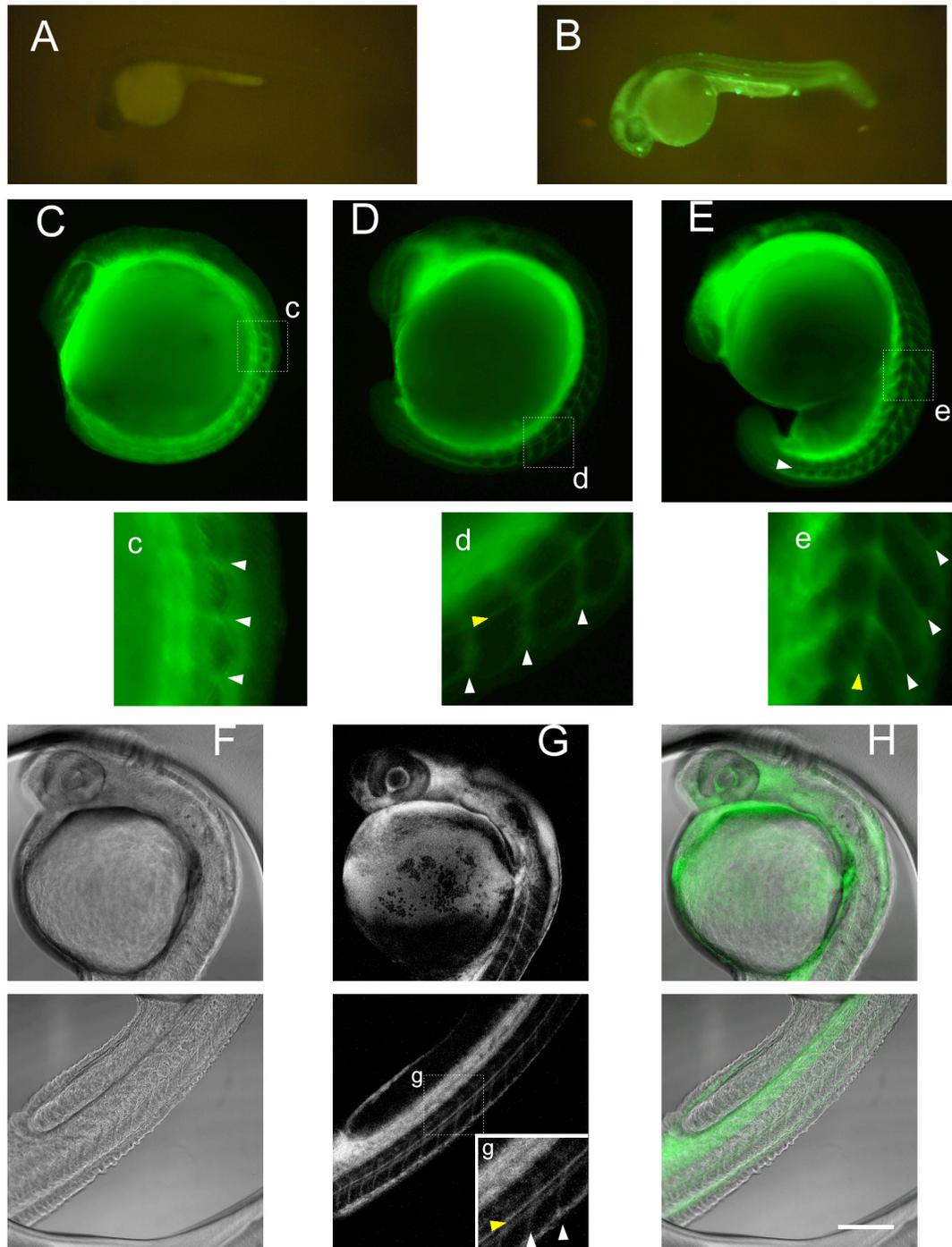


Figura 13. Patrón de tinción con carboxi-H₂DCFDA en embriones silvestres vivos en diferentes etapas del desarrollo. (A-E) Imágenes de embriones teñidos con carboxi-H₂DCFDA diluido en DMSO analizados por microscopía de fluorescencia o confocal. (A-E) Imágenes del patrón de tinción con carboxi-H₂DCFDA (verde) visualizadas por microscopía de fluorescencia. (A) Control negativo. Embrión a las 24 hrs incubado en DMSO al 1%. (B) Embrión a las 24 hpf. (C) 10 somitas. (D) 14 somitas. (E) 18 somitas. (F-G) Imágenes del patrón de tinción con carboxi-H₂DCFDA visualizadas por microscopía confocal. (F) Luz transmitida. (G) Proyección de máxima intensidad de serie de cortes del patrón de tinción con carboxi-H₂DCFDA (en escala de grises). (H) Sobreposición de (F) y (G), patrón de tinción con carboxi-H₂DCFDA en verde. (c-e y g) Imágenes a mayor aumento que permiten visualizar el patrón de tinción en las somitas. Cabezas de flechas blancas señalan los mioseptos. Cabezas de flechas amarillas señalan el miosepto horizontal. Barra de escala=200 μ m.

incubado con DMSO no se detectó fluorescencia (fig.14B).

Además, se realizó un análisis cuantitativo que reveló que el aumento de la intensidad de la señal del DCFDA en los embriones deficientes de Rac1 en comparación con el control es estadísticamente significativo cuando se evaluó por prueba de t-student $p < 0.05$ (Fig. 14F). La cuantificación se realizó en dos regiones de interés que corresponden a la región cefálica y en los miotomos.

Estos resultados muestran que la pérdida de función parcial de Rac1 induce un aumento en la tinción con DCFDA, lo que indica de manera indirecta que hay un incremento en la formación de ERO. Por otro lado estos datos sugieren que Rac1 podría tener un papel en la regulación del estado oxidativo durante el desarrollo embrionario.

7. DISCUSION

En el presente trabajo encontramos evidencia de que la pérdida de función parcial de Rac1 afecta el proceso de la morfogénesis de los miotomos y provoca una disminución de expresión de la selenoproteína Gpx4. La disminución en Gpx4 podría tener repercusiones en la formación de ERO y en el balance redox en el embrión.

Usando morfolidos como herramienta para el estudio de la función de Rac1 durante el desarrollo embrionario, observamos que la deficiencia de Rac1 provoca defectos en la morfogénesis de los miotomos (fig. 1). Usando microscopía confocal y tinciones de actina polimerizada se detectó que la pérdida de función parcial de Rac1 afecta la arquitectura del citoesqueleto de actina depositado en los miotomos (fig. 2). En conjunto estas observaciones sugieren que Rac1 podría estar involucrado en la diferenciación y morfogénesis de los miotomos durante el desarrollo embrionario.

Por otro lado, se validaron los resultados previos del análisis del transcriptoma de embriones, ya que estos hallazgos correlacionan con los resultados obtenidos por microarreglos en donde se observó que la pérdida de función de Rac1 disminuye la expresión de *gpx4a* y *gpx4b*.

Al evaluar los niveles de expresión de Gpx4 en los miotomos de embriones deficientes de Rac1 observamos una disminución de la expresión de Gpx4 (fig. 11). De manera alternativa esta disminución de Gpx4 en embriones deficientes de Rac1 fue corroborada por ensayos de westernblot (fig. 12).

Dadas la características de Gpx4 como una enzima con función antioxidante,

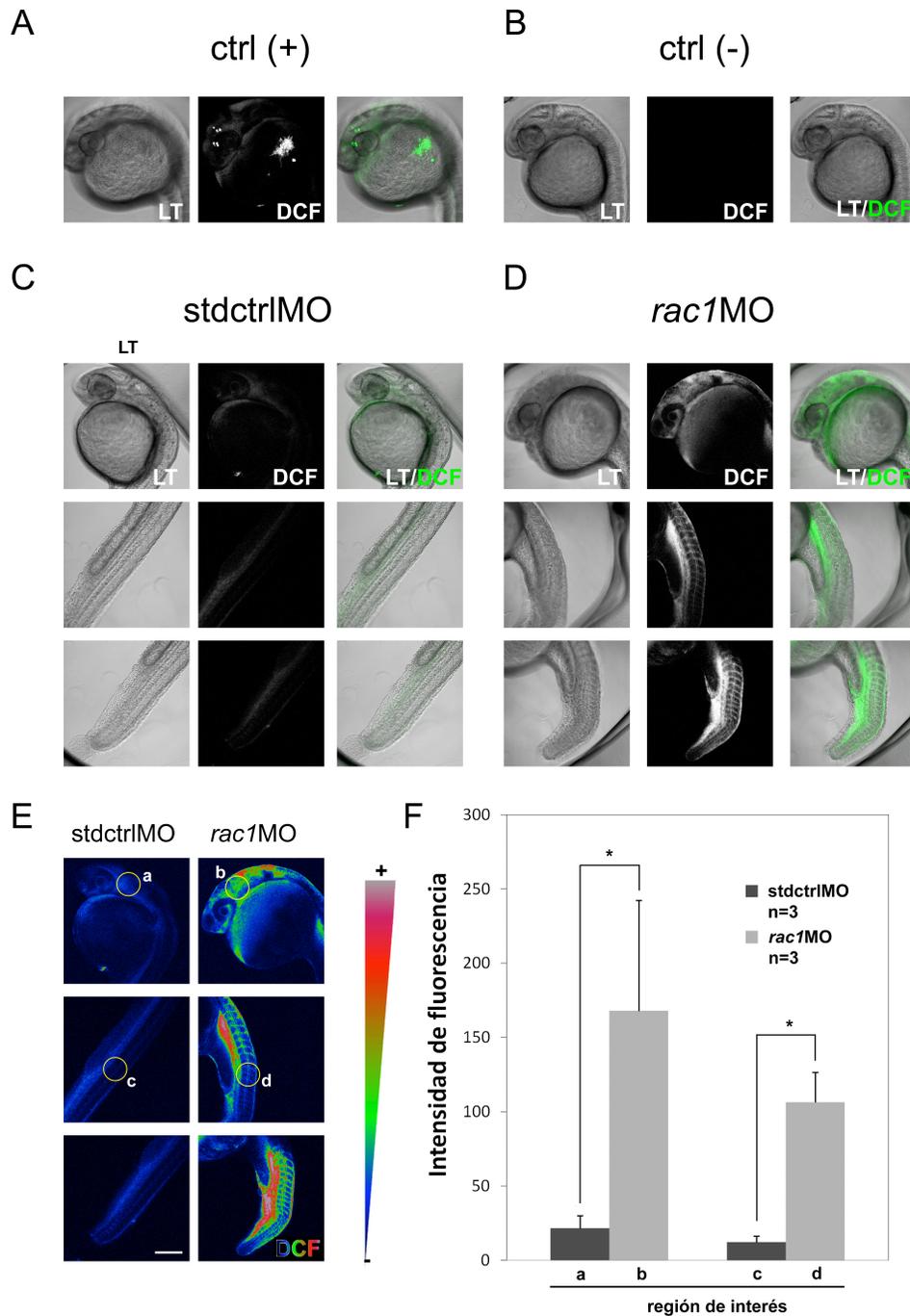


Figura 14. Efecto de la pérdida de función de Rac1 sobre patrón de tinción de carboxi-H₂DCFDA (DCF) a las 24 hrs. (A-E) Proyecciones de máxima intensidad por microscopia confocal de luz transmitida (LT), tinción con DCF (en escala de grises) y la sobreposición de ambos (LT, grises y DCF verde). Para visualizar el patrón de tinción con DCF en embriones inyectados con StdCtrlMO y *rac1*MO, los embriones fueron incubados con DCF disuelto en DMSO al 1%. (A) Control positivo, embrión que sufrió daño mecánico. (B) Control negativo, embrión incubado en DMSO al 1%. (E) Codificación en colores falsos del patrón de tinción con DCF presentado en (C y D), círculos amarillos que representan las regiones de interés para la cuantificación (a y b, región cefálica; b y d, miotomos). (F) Cuantificación de las regiones de interés señaladas en E. (*) estadísticamente significativo $p < 0.05$. Barra de escala=200 μm .

decidimos evaluar si la disminución de la expresión de Gpx4 tenía un efecto sobre la formación de ERO usando tinciones con el colorante redox sensible DCF en embriones vivos (fig. 13). Al analizar el efecto de la pérdida de función de Rac1 sobre la formación de ERO se observó un incremento de la intensidad de la tinción de DCF en la región cefálica y en los mioseptos verticales comparado con los controles (fig. 14). Indicando que la pérdida de función de Rac1 provoca un incremento de ERO en los tejidos embrionarios.

En conjunto estos resultados, representan la primera evidencia de una relación entre la Rho GTPasa Rac1 y una enzima antioxidante (Gpx4) durante el desarrollo embrionario. Sin embargo el mecanismo molecular por medio del cual Rac1 regula la expresión de Gpx4 en el embrión permanece desconocido.

Para discutir los resultados obtenidos en el presente trabajo, en las siguientes secciones se discutirá primero y de manera independiente como Rac1 podría estar participando en la diferenciación muscular y la morfogénesis. En la segunda parte se discutirá la posible relación entre los patrones de expresión de Gpx4 y de la formación de ERO en los miotomos del pez cebra. Finalmente, en la tercera parte se discutirá el posible papel de Rac1 como regulador de la expresión de selenoproteínas y la modulación del estado redox en el desarrollo de los miotomos.

7.1. Rac1 participa en la diferenciación muscular y en la morfogénesis de los miotomos.

El pez cebra presenta una estructura muscular lateral segmentada que se compone por miotomos separados por mioseptos. Los miotomos se organizan en un arreglo repetitivo de “formas de cabezas flechas” que apuntan en dirección postero-anterior (te Kronnie G 2000). Este arreglo particular de la musculatura es muy evidente en los embriones de pez cebra desde la somitogenesis (a partir de las 18 hpf.) y se conserva hasta la etapa adulta (Kimmel et al., 1995). En el caso del pez cebra adulto, la mayor parte de la musculatura se compone por fibras de músculo esquelético.

Durante el desarrollo embrionario el músculo esquelético se genera a partir del mesodermo paraxial a través de una serie de procesos celulares regulados que se pueden resumir de manera general en tres pasos: 1) el compromiso de las células del mesodermo en su diferenciación como mioblastos (precursores musculares), 2) la diferenciación terminal de los mioblastos, acompañada de una fusión célula-célula, y 3) ensamblaje de las

miofibrillas contráctiles compuestas por sarcómeros formados por miosina que se alternan con filamentos de actina (Hinits and Hughes, 2007)

En nuestros experimentos, se observó que en los embriones deficientes de Rac1 había una disminución o incluso la ausencia de contracción muscular en la región caudal, la cual ocurre de manera normal en los embriones control a las 24 hpf (Juryneec et al., 2008).

Además, observamos que en los embriones con pérdida de función parcial de Rac1 los miotomos pierden la forma de cabeza de flecha y presentan una forma redondeada.

El hecho de que la pérdida parcial de Rac1 provoque cambios en la contracción muscular normal podría estar relacionado con los defectos en la arquitectura de los miotomos donde ocurre la diferenciación de las células musculares en los embriones. Los aterior sugiere que probablemente Rac1 participa en el proceso de diferenciación muscular durante el desarrollo embrionario.

Con el objetivo de discutir las ideas que sugieren un papel de Rac1 en la formación de la estructura muscular a continuación se presentan los diferentes escenarios en los cuales Rac1 podría estar involucrado durante el proceso de diferenciación muscular.

7.1.1. Papel de Rac1 en la formación de las somitas y su posible repercusión en la morfogénesis de los miotomos.

Las somitas son estructuras embrionarias que se forman a partir del mesodermo paraxial en un proceso denominado segmentación. Durante la segmentación la somitas se forman por pares y se localizan a cada lado de la notocorda y del tubo neural a lo largo de la extensión de ambas estructuras (Stickney et al., 2000). El proceso de formación de las somitas ocurre por cambios en las propiedades de adhesión de las células del mesodermo presomítico (MPS) que resultan en una transición de tipo mesénquima-epitelio (TME) que forma el epitelio que rodea a cada somita. El resultado final de esta TME es la individualización de cada somita que consta de un mesénquima interno rodeado por un epitelio (Duband et al., 1987).

En el caso del pollo, el proceso de la TME que ocurre durante la formación de las somitas está regulado por las Rho GTPasas Rac1 y Cdc42. Usando formas dominantes negativas y constitutivamente activas de Rac1 se ha observado que Rac1 participa en la regulación de la formación del epitelio de las somitas (Nakaya et al., 2004). Cabe señalar que la participación de las Rho GTPasas durante la formación de las somitas en vertebrados

ha sido poco explorada y su estudio se ha enfocado sólo en embriones de pollo, por lo que aún hay muchas preguntas sin responder.

En nuestros ensayos de pérdida de función parcial de Rac1 usando morfolidos, observamos que los embriones deficientes de Rac1 presentan defectos en las somitas desde su formación, que se hacen más evidentes posteriormente cuando se desarrollan en miotomos. De acuerdo con lo reportado por Nakaya y col. cabe la posibilidad de que la función de Rac1 durante la somitogenesis este conservada en los vertebrados incluyendo el pez cebra.

A partir de esta hipótesis se podría sugerir que parte de los defectos que observamos en la arquitectura alterada de los miotomos de los embriones deficientes de Rac1, sea una consecuencia de un defecto previo durante la formación de la estructura de las somitas.

Si bien en nuestros ensayos no analizamos a detalle si las somitas de los embriones deficientes de Rac1 presentaban defectos como los reportados previamente en pollos (Nakaya et al., 2004). Sería interesante evaluar si la función de Rac1 durante la TME que ocurre en la somitogenesis esta conservada en organismos vertebrados. Asimismo sería interesante evaluar y comparar la función de Rac1 durante la somitogenesis usando el morfolino contra Rac1 y la forma dominante negativa de Rac1 para estudiar la contribución de Rac1 a la TME y su efecto posterior en la formación de los miotomos en embriones de pez cebra.

7.1.2. Rac1 y su papel en la fusión de los mioblastos.

En el pez cebra, como en otros organismos la generación del músculo esquelético involucra la diferenciación de los mioblastos a músculo esquelético. En particular, la diferenciación de los mioblastos involucra un proceso de fusión célula-célula que genera paquetes de miofibras multinucleadas (miotubos) que le dan al músculo esquelético sus propiedades (Rochlin et al., 2010). Estudios en *Drosophila* han llevado a la propuesta de un modelo de cómo puede ocurrir la formación de los miotubos por la fusión célula-célula entre mioblastos. De manera general el proceso de fusión célula-célula involucra: 1) la migración de una de las células hacia la célula con la que se fusionará, 2) la localización de moléculas involucradas en el reconocimiento entre ambas células en el sitio donde ocurrirá el primer contacto célula-célula, 3) localización de las proteínas que son parte fundamental de la maquinaria de fusión en el sitio de la fusión de ambas células, 4) ruptura de las

membranas en el sitio de fusión que genera la continuidad entre ambos citoplasmas, y finalmente la adición de un núcleo más al miotubo en crecimiento. Este proceso de fusión ocurre de manera iterativa hasta que el miotubo alcanza su tamaño final (Rochlin et al., 2010).

Hay que señalar que a lo largo del proceso de fusión célula-célula de los mioblastos involucra rearrreglos del citoesqueleto de actina, de hecho la adhesión entre ambas células induce una acumulación de actina en el sitio donde se fusionarán ambas células que es primordial para que ocurra la fusión célula-célula (Richardson et al., 2007). Además, se ha demostrado que Rac1 es esencial para la reorganización del citoesqueleto de actina en los sitios de contacto donde se fusionarán los mioblastos (Haralalka et al., 2011). Y a su vez se ha demostrado por estudios de pérdida de función de Rac1 realizados en *Drosophila*, pez cebra y ratón que la deficiencia de Rac1 afecta la fusión de los mioblastos (Luo et al., 1994; Srinivas et al., 2007; Vasyutina et al., 2009). No obstante, en el caso del reporte realizado en pez cebra, no se profundiza en el análisis de la pérdida de función parcial de Rac1 y sólo se enfocan en caracterizar el efecto en la fusión de los mioblastos usando marcadores de membrana (Srinivas et al., 2007).

En nuestros ensayos inicialmente analizamos la deposición de actina polimerizada en los embriones control a las 24 hpf. y se encontró una deposición de actina en los mioseptos y en fibras lineales que atraviesan de manera transversal cada miotomo que coincide con lo previamente reportado (Mei et al., 2009; Sanger et al., 2009)

De forma interesante, en los embriones con pérdida de función parcial de Rac1 observamos defectos en la organización de las fibras de actina localizadas a lo largo de la región caudal en estos embriones (fig. 2).

Esta observación en si misma es muy interesante y posiblemente sea una consecuencia del defecto en la fusión de los mioblastos que se sabe que ocurre en los embriones deficientes de Rac1.

Aunque nuestra hipótesis sugiere que los defectos en la estructura de los filamentos de actina es consecuencia de una alteración en la fusión de los mioblastos por la deficiencia de Rac1, no descartamos la idea de que las alteraciones en el citoesqueleto de actina sea un defecto independiente de la fusión de los mioblastos. Sin embargo sería conveniente corroborar en nuestros ensayos de pérdida de función parcial de Rac1 si la fusión de

mioblastos y los cambios en la organización del citoesqueleto de actina ocurren de manera simultánea o son eventos independientes.

7.1.3. Rac1 y la morfogenesis de los miotomos.

Los miotomos son estructuras embrionarias muy características debido a su arreglo y forma particulares (fig. 2). Sin embargo, el mecanismo responsable de modelar la forma de los miotomos permanece desconocido. Se ha sugerido previamente que la generación de la forma de los miotomos está relacionado con la diferenciación de un tipo particular de mioblastos denominados células pioneras musculares (Halpern et al., 1993).

Durante la diferenciación del miotomo las primeras células en diferenciarse como precursores musculares son las células pioneras musculares. Estas células migran lateralmente desde el interior del miotomo (su localización inicial es adyacente a la notocorda) hacia su destino final que se localiza en la parte más lateral del miotomo en la misma posición donde se formará el miosepto horizontal (Stickney et al., 2000). La especificación de las células pioneras musculares es en respuesta a la señalización por hedgehog (Hh) desde la notocorda (Lewis et al., 1999). Durante su migración las células pioneras musculares cambian de forma para generar un andamiaje para la elongación de los precursores musculares presentes en el miotomo (Henry et al., 2005). Además se ha observado que la elongación de las células pioneras musculares coincide con el cambio de la forma del miotomo que inicialmente es redondeada y posteriormente toma la forma de cabeza de flecha característica de los miotomos a las 24 hpf. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado de forma puntual si las células pioneras musculares participan en la morfogénesis del miotomo.

En los proyectos de mutagénesis a gran escala en pez cebra, se ha identificado un grupo de mutantes distintivos por el fenotipo que presentan en los miotomos. Este grupo de mutantes tienen en común que los miotomos de los embriones pierden su forma de cabeza de flecha y toman una morfología redondeada (van Eeden et al., 1996). A los mutantes que presentan miotomos redondeados se les ha denominado como tipo “U”. Es interesante mencionar que en los embriones mutantes tipo “U” y los mutantes sin notocorda (como *boz* o *ntl*) tienen en común que los embriones carecen de células pioneras musculares (van Eeden et al., 1996). Estas observaciones llevaron a la propuesta de que la notocorda envía señales que inducen la diferenciación de las células pioneras musculares.

Por otro lado, se identificó que dos de las mutantes tipo “U”, que codifican para los genes *shh* y *Gli2* son parte fundamental de la vía de señalización de Hh. En estas mutantes los embriones desarrollan notocordas pero no presentan células pioneras musculares (Schauerte et al., 1998; Karlstrom et al., 1999). Estas evidencias sugieren que la mayoría de los genes tipo “U” se requieren en la señalización de Hh que es esencial para la diferenciación (Lewis et al 1999) y migración de las células pioneras musculares (Daggett et al., 2007; Yin and Solnica-Krezel, 2007).

En nuestros experimentos observamos que los miotomos en embriones deficientes de *Rac1* no presentan la forma de cabeza de flecha distintiva de estas estructuras embrionarias, y por el contrario los miotomos presentan una forma más redondeada (fig. 2) que es similar a la morfología que se observa en las mutantes tipo “U”. Estas observaciones podrían sugerir que los embriones deficientes de *Rac1* carecen de células pioneras musculares al igual que en las mutantes tipo U probablemente por un defecto en la diferenciación de estas células.

Además dado que en los embriones deficientes de *Rac1* tienen miotomos tipo “U” y presentan notocordas, esto podría sugerir que en estos embriones la diferenciación de las células pioneras musculares probablemente este afectada a nivel de la señalización de Hh como ocurre en las mutantes tipo “U”.

A partir de este hecho la hipótesis que proponemos es que *Rac1* participa en la señalización por Hh para la diferenciación de las células pioneras musculares en el miotomo. Esta hipótesis se apoya en las evidencias mencionadas anteriormente y en un reporte reciente en donde se muestra que la migración de fibroblastos embrionarios de ratón depende de la activación de *Rac1* en respuesta a la señalización por Hh (Polizio et al., 2011). Esta evidencia abre todo un panorama de preguntas relacionadas acerca de la regulación de *Rac1* en respuesta a la activación de la vía de Hh en el desarrollo embrionario, en particular en el proceso de diferenciación de las células musculares pioneras.

Finalmente, sería interesante analizar cual es el efecto de la pérdida de función parcial de *Rac1* en el proceso de diferenciación de las células pioneras musculares usando marcadores específicos para estas células. Además esta información sería relevante para la elucidación del proceso de morfogénesis de los miotomos que hasta el momento permanece

desconocido.

7.2. Relación entre el patrón de la expresión de Gpx4 y la formación de ERO en los miotomos.

Las selenoproteínas son proteínas que participan en diversas funciones, una muy importante es que funcionan como antioxidantes que mantienen la homeostasis del estado redox celular. Sin embargo, poco se sabe acerca de la regulación de la expresión de selenoproteínas antioxidantes durante el desarrollo embrionario.

Recientemente se ha identificado la presencia de selenoproteínas que son importantes por su función antioxidante en diferentes procesos durante el desarrollo embrionario. Por ejemplo, la selenoproteína W participa en la protección de las neuronas de daño por estrés oxidativo durante el desarrollo neuronal en ratas (Chung et al., 2009). Por otro lado, se ha descrito que la selenoproteína N es importante para el desarrollo muscular y su protección al daño oxidativo (Denziak et al., 2007; Jurynek et al., 2008; Arbogast et al., 2009). En el caso de Gpx4, se ha descrito que participa durante la morfogénesis de las extremidades embrionarias de ratón delimitando las zonas de muerte celular activadas por ROS durante la individualización de los dígitos (Schnabel et al., 2006). En conjunto estas evidencias sugieren que las selenoproteínas participan en modular el comportamiento celular en respuesta a ERO durante el desarrollo embrionario.

En el presente trabajo encontramos que la selenoproteína Gpx4 se expresa en los miotomos de embriones de pez cebra a las 24 hpf, principalmente en la parte central de cada miotomo (fig. 10). Sin embargo hasta el momento se desconoce cual es el papel de esta selenoproteína en los miotomos de pez cebra. Una posibilidad es que Gpx4 tenga una función antioxidante en los precursores musculares localizados en el miotomo. Ya que se sabe que la diferenciación de los precursores musculares disminuye en presencia de altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno y a su vez se ha demostrado en cultivos *in vitro* de mioblastos que la expresión de enzimas antioxidantes es inducible por el aumento en la concentración de ERO (Franco et al., 1999). Por otro lado, en estudios realizados *in vitro* la contracción muscular promueve la formación de ERO y en respuesta a este incremento se promueve la expresión de antioxidantes (Jackson, 2008).

Otra observación interesante es que la expresión de Gpx4 en los miotomos es mayor en los miotomos más anteriores en comparación con los posteriores (figura 8B y 11B). Este

hallazgo está relacionado con el patrón de diferenciación de los miotomos que al igual que la formación de las somitas ocurre de forma anteroposterior (Stickney et al., 2000). En el caso de las somitas, se ha reportado que las más diferenciadas son las más anteriores, las cuales tienen una tasa metabólica y de formación de especies reactivas de oxígeno más alta en comparación con las somitas menos diferenciadas con una localización más posterior (Ozbudak et al., 2010). En este caso se puede especular que los miotomos más diferenciados y anteriores producen más ROS y en respuesta hay una mayor expresión de antioxidantes (incluyendo Gpx4) en comparación con los miotomos menos diferenciados y posteriores. Esto podría ser confirmado realizando un análisis a mayor detalle de la formación y metabolismo de ERO en los miotomos de pez cebra.

En resumen, sumando las observaciones y evidencias presentadas anteriormente, se propone que la Gpx4 es uno de los antioxidantes involucrados en el metabolismo de las ERO en las células de los miotomos durante desarrollo de estas estructuras.

Además, es interesante que al analizar la sobreposición de las imágenes del patrón de expresión de Gpx4 y del patrón de formación de ERO observamos una relación complementaria entre ambos patrones (fig. 15). Se encontró que en las zonas donde se expresa menos Gpx4 (mioseptos y zonas adyacentes) hay una señal de formación de ERO más intensa. De manera contraria, en las regiones centrales de los miotomos donde hay una alta expresión de Gpx4 aparentemente no hay señal de ERO (fig. 15E).

Suponemos que la ausencia de ERO en la parte central de los miotomos se debe a la expresión de antioxidantes incluyendo a Gpx4 que mantienen los niveles de ERO bajos. Mientras que en los mioseptos hay mayor formación/acumulación de ERO debido a que hay una menor expresión de antioxidantes.

Hasta el momento no hay información previa publicada acerca de la relación entre patrones de expresión de antioxidantes y su correlación con patrones de formación de ERO durante el desarrollo embrionario del pez cebra, sin embargo esta formación de patrones de ERO delimitados por la expresión de antioxidantes ha sido descrita como un proceso importante que ocurre durante la morfogénesis de la extremidad de ratón (Schnabel *et. al.* 2006). Lo anterior sugiere que la relación complementaria entre el patrón de expresión de Gpx4 y de la formación de ERO podría tener un papel en el desarrollo de los miotomos en el pez cebra, lo cual sería interesante explorar en el futuro.

7.3. Rac1 regula la expresión de Gpx4 y su efecto en la formación de especies de oxígeno.

En el presente trabajo encontramos que la selenoproteína Gpx4 podría estar bajo la regulación de Rac1, lo cual es interesante ya que hasta el momento se desconoce cual es el mecanismo molecular que regula la expresión de Gpx4 durante el desarrollo embrionario, en particular en el pez cebra.

Para validar el efecto de Rac1 sobre la expresión de Gpx4 usamos ensayos de pérdida de función de Rac1 en embriones a las 24 hpf.

En estos ensayos encontramos una disminución de la expresión de Gpx4 en los embriones, esto es interesante ya que los resultados de microarreglos que muestran una disminución de los transcritos que codifican para Gpx4 fueron analizados en embriones a las 6 hpf, mientras que los ensayos de pérdida de función parcial de Rac1 analizados en el presente trabajo se detectó una disminución de la proteína Gpx4 a las 24 hpf, lo que sugiere que el efecto de la pérdida de función parcial Rac1 sobre la expresión de Gpx4 se mantiene desde las 6 hpf hasta las 24 hpf. Los resultados anteriores nos llevaron a proponer que la disminución de Gpx4 asociada a la pérdida de función parcial de Rac1 tendría un efecto en la formación de ERO, por el hecho de que Gpx4 es una proteína con función antioxidante.

Al analizar la formación de ERO en los embriones con pérdida de función parcial de Rac1 se observó un incremento en la formación de ERO en comparación con los embriones control (fig. 14). Esta observación apoya nuestra hipótesis de que la disminución de Gpx4 asociada a la pérdida de función parcial de Rac1 tiene un papel en el metabolismo de ERO en el pez cebra. El incremento de ERO en los embriones deficientes de Rac1 ocurrió de forma localizada en regiones similares que en los embriones control. Esto sugiere que Gpx4 es parte del sistema antioxidante expresado en los miotomos y la disminución de Gpx4 es suficiente para que se altere el balance redox.

Sumando los resultados del cambio de expresión de Gpx4 y de la formación de ERO, creemos que la disminución de la expresión de Gpx4 en embriones deficientes de Rac1 podría implicar una disminución en la concentración de antioxidantes y por ende una disminución en la eficiencia con que se metabolizan las ERO en las células del miotomo, lo que tiene como consecuencia un aumento en la concentración de ERO. Este hecho podría ser explicado por tres hipótesis: 1) la pérdida de función parcial de Rac1 induce la

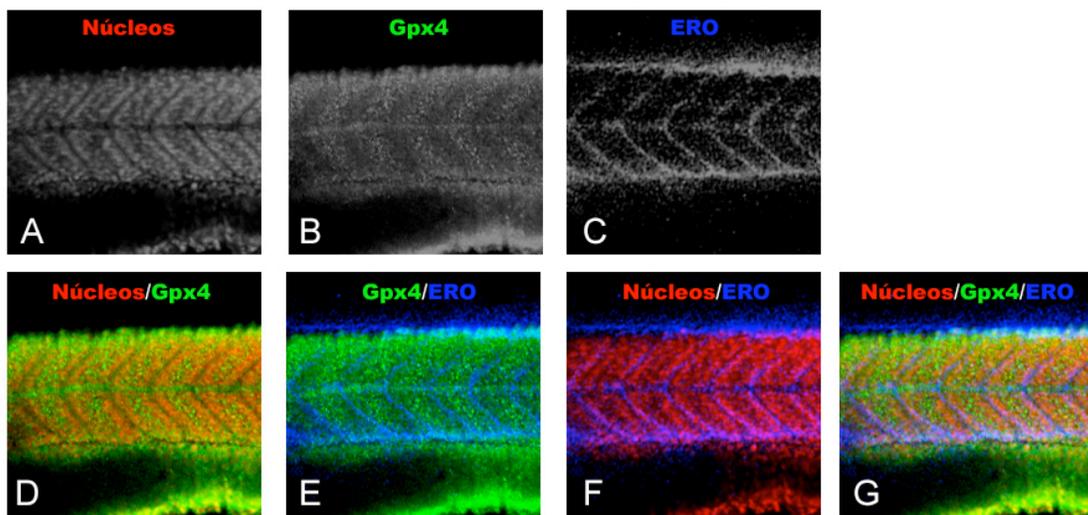


Figura 15. Localización de núcleos, Gpx4 y ERO en embriones silvestres a las 24 hrs. (A-E) Cortes ópticos obtenidos por microscopía confocal de la señal de núcleos (A, sytox green), Gpx4 (B, anticuerpo anti Gpx4) y ERO (C, carboxi-H2DCFDA) de embriones a las 24 hrs. En D a F se muestra la sobreposición de dos señales y en G la sobreposición de las tres señales. Las imágenes A y B son en el mismo corte óptico. C es un corte óptico adquirido en otra sesión de un embrión diferente que A y B que fue alineado manualmente para la sobreposición.

disminución tanto de Gpx4 así como de otras enzimas antioxidantes que pueden ser selenoproteínas y en respuesta hay un aumento de expresión de otros antioxidantes como catalasas o superóxido dismutasas, sin embargo esta respuesta celular no es suficiente para mantener los niveles normales de ERO. 2) la disminución de Gpx4 no induce la expresión de otros antioxidantes y los antioxidantes que se expresan de forma normal en los miotomos no tienen la capacidad de reducir las ERO a los niveles normales. 3) Que el aumento en la formación de ERO asociado a la pérdida de función parcial de Rac1 sea independiente de la disminución de Gpx4. En este caso, se ha observado que la pérdida de función parcial de Rac1 en fibroblastos embrionarios de ratón induce un aumento en las ERO (Debidda et al., 2006). En ese trabajo se sugiere que la deficiencia de Rac1 induce la expresión de Rac3 que también es una Rho GTPasa. Sin embargo hasta el momento se desconoce cual es el mecanismo por el cual la sobreexpresión de Rac3 podría estar induciendo un aumento en la producción ERO.

Una posibilidad es que se ha descrito que Rac3 es capaz de activar la producción de superóxido por medio de NADPH oxidasas y de esta manera inducir la formación de ERO (Miyano et al., 2009). Sería interesante evaluar si en los embriones deficientes de Rac1 hay una sobreexpresión de Rac3 y si este aumento en la expresión esta relacionado con el aumento en la producción de ERO en los embriones de pez cebra.

En resumen nuestros resultados sugieren que la expresión de Gpx4 podría ser regulada por Rac1. Sin embargo, de forma inmediata no podemos establecer cual podría ser el mecanismo molecular o el nivel de regulación de Rac1 sobre Gpx4, ya que hasta el momento no hay reportes que demuestren puntualmente un regulación directa o indirecta entre ambas proteínas. Aunque este hecho no nos limita a especular que Rac1 podría regular la expresión de Gpx4 basado en la literatura disponible. Por lo que a continuación se presentan dos posibles mecanismos mediante los cuales Rac1 podría regular la expresión de Gpx4

1. Se sabe que la inducción de la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes depende de la activación de diferentes vías de señalización sensibles a ERO (como por ejemplo la vía de las MAP cinasas o de NfκB) lo que promueve la expresión de antioxidantes que protegen a la célula de daño por ERO (Ji, 2007). En nuestro laboratorio se tiene resultados por microarreglos que sugieren que Rac1 podría regular diferentes

cascadas de señalización en particular la de las MAP cinasas, por lo que no se descarta que Rac1 podría estar involucrada en alguna de las vías de señalización que activan la expresión de antioxidantes y en particular de Gpx4. Este hecho hace relevante identificar los genes que podrían estar siendo regulados por Rac1 y de esta forma elucidar cual es el mecanismo de regulación de Rac1 sobre la selenoproteína Gpx4.

2. Basados en la literatura disponible se ha reportado que en embriones de ratón, la expresión de Gpx4 puede ser modulada por Grsf1 que es una proteína de unión a ARNs mensajeros la cual promueve la traducción de los transcritos a los que se une (Ufer et al., 2008). A su vez, se ha demostrado que la expresión de Grsf1 disminuye notablemente en embriones de ratón nulos condicionales para β -catenina. Lo que sugiere que la expresión de Grsf1 esta bajo el control de β -catenina (Lickert et al., 2005). Por otro lado, en los mismos resultados del análisis de expresión global en embriones de pez cebra con pérdida de función parcial de Rac1 donde se detectó la disminución de Gpx4, se encontró que β -catenina disminuye su expresión en embriones deficientes de Rac1 (Salas-Vidal et al, en preparación). Además se sabe que Rac1 promueve la estabilización y traslocación de β -catenina al núcleo donde activa la expresión de diferentes genes (Wu et al., 2008). Estas evidencias nos llevan a proponer una vía de señalización por la cual Rac1 podría estar regulando la expresión de Gpx4 que se presenta en la figura 16A.

Finalmente sumando lo discutido en las secciones anteriores creemos que Rac1 podría estar involucrado por un lado en el desarrollo muscular y por otro parte en la expresión de antioxidantes como Gpx4 y la formación de ERO, sin embargo no se descarta que los efectos de la pérdida de función parcial de Rac1 estén relacionados.

Proponemos que en los embriones silvestres Rac1 participa en la regulación de la expresión de antioxidantes (como la selenoproteína Gpx4) que mantienen en homeostasis los niveles de ERO en los miotomos (fig. 16A). Por otro lado cuando se induce la pérdida de función parcial de Rac1 hay una disminución de Gpx4 y un aumento en la formación de ERO, que puede ser consecuencia de la disminución del antioxidante Gpx4 y/ o por una sobreexpresión de Rac3 que en conjunto con la NADPH oxidasa contribuye a la formación y aumento de la concentración de ERO en los miotomos (fig. 16B). A su vez el aumento en la formación de ERO altera la homeostasis en las células de los miotomos, lo que podría estar relacionado con defectos en el desarrollo y diferenciación muscular en los miotomos.

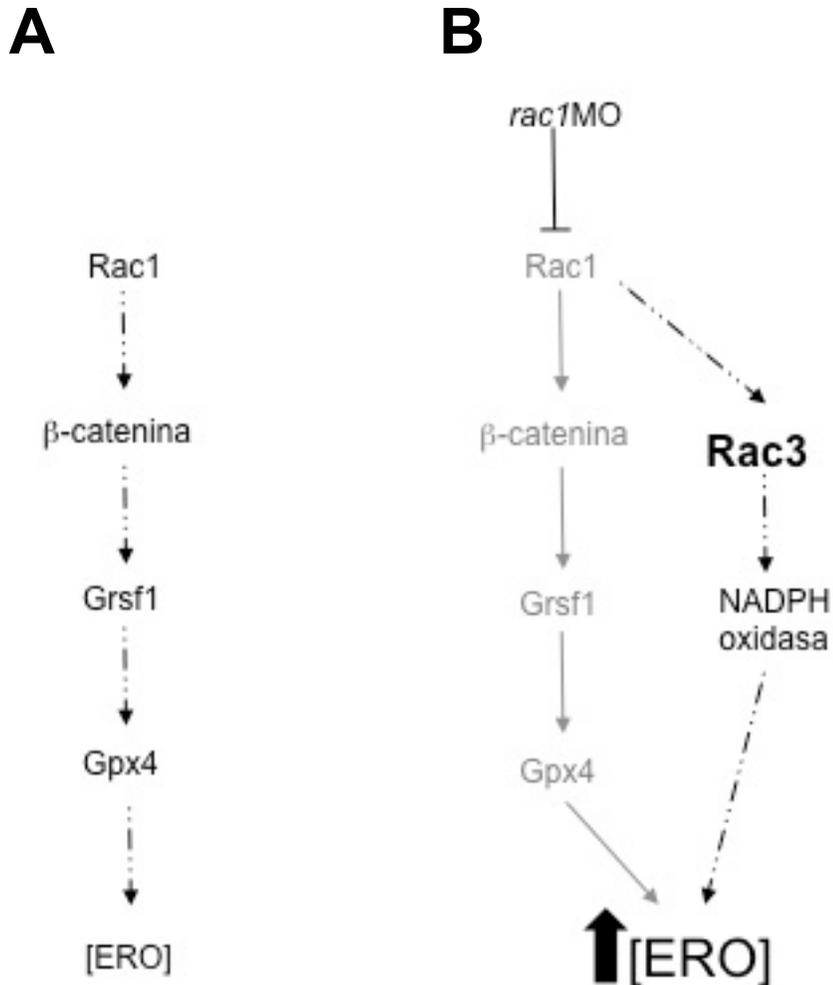


Figura 16. Modelo donde se presenta la propuesta de la vía de regulación de Rac1 sobre la expresión de Gpx4 y su efecto en la formación de ERO en embriones de pez cebra. En (A) se presenta la regulación de Rac1 sobre Gpx4 en embriones silvestres. En (B) se muestra el efecto de la pérdida de función de Rac1 en el modelo de regulación de Rac1 sobre Gpx4. Las letras en gris indican una disminución de la expresión de los componentes involucrados en la vía de señalización por el efecto de la inyección del *rac1MO*. Las líneas con trazo sólido indican que hay evidencia reportada durante el desarrollo embrionario relacionada a las vías señaladas. Las líneas punteadas indican que se desconoce si las vías señaladas ocurren *in vivo* durante el desarrollo embrionario.

8. CONCLUSIONES

1. En los embriones deficientes de Rac1 a las 24 hpf. se observaron defectos morfológicos, de forma particular se detectaron alteraciones en la forma de los miotomos y en la organización del citoesqueleto de actina presente en estas estructuras.
2. Se detectó una disminución en la expresión de la selenoproteína Gpx4 en los embriones con pérdida de función parcial de Rac1 a las 24hrs, lo que sugiere una regulación de la expresión de Gpx4 por Rac1.
3. Adicionalmente, se observó un aumento en la formación de ERO en los embriones con pérdida de función parcial de Rac1 a las 24 hrs.

9. PERSPECTIVAS.

1. Realizar los ensayos de rescate del fenotipo asociado a la pérdida de función parcial de Rac1 inyectando los mensajeros de *rac1* y *gpx4*. Esto con el propósito de evaluar la especificidad de los efectos en el desarrollo asociado a la pérdida de función parcial de Rac1 .
2. Evaluar el efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 sobre los niveles de expresión de las selenoproteínas *gpx1b*, *gpx4a*, *gpx4b* y *sps2* por PCR cuantitativo para validar los resultados obtenidos por microarreglos. Estos resultados nos darán más evidencia acerca del nivel de regulación de Rac1 sobre estas proteínas.
3. Identificar si existe una relación regulatoria entre Rac1 y la selenoproteína Gpx4 y a su vez analizar las posibles vías de señalización por las cuales Rac1 podría estar regulando a la selenoproteína Gpx4.
4. Evaluar cual es el mecanismo por el cual la pérdida de función parcial de Rac1 induce un aumento en la producción de ERO en embriones de pez cebra.
5. Evaluar cual es el papel de las ERO en el desarrollo embrionario del pez cebra y en particular en la morfogénesis de los miotomos.
6. Analizar el efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 en la activación de la vía de Hedgehog durante la diferenciación de las células pioneras musculares.
7. Analizar el efecto de la pérdida de función parcial de Rac1 en la expresión de Rac3 y su repercusión en la formación de ERO.

10. REFERENCIAS.

- Arbogast S, Beuvin M, Fraysse B, Zhou H, Muntoni F, Ferreiro A. 2009. Oxidative stress in SEPN1-related myopathy: from pathophysiology to treatment. *Ann Neurol* 65:677-686.
- Boettner B, Van Aelst L. 2002. The role of Rho GTPases in disease development. *Gene* 286:155-174.
- Bosco EE, Mulloy JC, Zheng Y. 2009. Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades. *Cell Mol Life Sci* 66:370-374.
- Chung YW, Jeong D, Noh OJ, Park YH, Kang SI, Lee MG, Lee TH, Yim MB, Kim IY. 2009. Antioxidative role of selenoprotein W in oxidant-induced mouse embryonic neuronal cell death. *Mol Cells* 27:609-613.
- Daggett DF, Domingo CR, Currie PD, Amacher SL. 2007. Control of morphogenetic cell movements in the early zebrafish myotome. *Dev Biol* 309:169-179.
- Debidda M, Williams DA, Zheng Y. 2006. Rac1 GTPase regulates cell genomic stability and senescence. *J Biol Chem* 281:38519-38528.
- Deniziak M, Thisse C, Rederstorff M, Hindelang C, Thisse B, Lescure A. 2007. Loss of selenoprotein N function causes disruption of muscle architecture in the zebrafish embryo. *Exp Cell Res* 313:156-167.
- Epting D, Wendik B, Bennewitz K, Dietz CT, Driever W, Kroll J. 2010. The Rac1 regulator ELMO1 controls vascular morphogenesis in zebrafish. *Circ Res* 107:45-55.
- Fort P, Guemar L, Vignal E, Morin N, Notarnicola C, Barbara Pde S, Faure S. 2011. Activity of the RhoU/Wrch1 GTPase is critical for cranial neural crest cell migration. *Dev Biol* 350:451-463.
- Franco AA, Odom RS, Rando TA. 1999. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 27:1122-1132.
- Fuentes R, Fernandez J. 2010. Ooplasmic segregation in the zebrafish zygote and early embryo: pattern of ooplasmic movements and transport pathways. *Dev Dyn* 239:2172-2189.
- Geetha-Loganathan P, Nimmagadda S, Scaal M, Huang R, Christ B. 2008. Wnt signaling in somite development. *Ann Anat* 190:208-222.
- Gilbert SF. 2006. *Developmental Biology*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc. .
- Halpern ME, Ho RK, Walker C, Kimmel CB. 1993. Induction of muscle pioneers and floor plate is distinguished by the zebrafish no tail mutation. *Cell* 75:99-111.
- Haralalka S, Shelton C, Cartwright HN, Katzfey E, Janzen E, Abmayr SM. 2011. Asymmetric Mbc, active Rac1 and F-actin foci in the fusion-competent myoblasts during myoblast fusion in *Drosophila*. *Development* 138:1551-1562.
- Henry CA, McNulty IM, Durst WA, Munchel SE, Amacher SL. 2005. Interactions between muscle fibers and segment boundaries in zebrafish. *Dev Biol* 287:346-360.
- Hinits Y, Hughes SM. 2007. Mef2s are required for thick filament formation in nascent muscle fibres. *Development* 134:2511-2519.
- Jackson MJ. 2008. Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? *Free Radic Biol Med* 44:132-141.
- Ji LL. 2007. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol* 42:582-593.

- Juryneec MJ, Xia R, Mackrill JJ, Gunther D, Crawford T, Flanigan KM, Abramson JJ, Howard MT, Grunwald DJ. 2008. Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12485-12490.
- Kane DA, Kimmel CB. 1993. The zebrafish midblastula transition. *Development* 119:447-456.
- Karlstrom RO, Talbot WS, Schier AF. 1999. Comparative synteny cloning of zebrafish you-too: mutations in the Hedgehog target *gli2* affect ventral forebrain patterning. *Genes Dev* 13:388-393.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253-310.
- Lewis KE, Currie PD, Roy S, Schauerte H, Haffter P, Ingham PW. 1999. Control of muscle cell-type specification in the zebrafish embryo by Hedgehog signalling. *Dev Biol* 216:469-480.
- Lickert H, Cox B, Wehrle C, Taketo MM, Kemler R, Rossant J. 2005. Dissecting Wnt/beta-catenin signaling during gastrulation using RNA interference in mouse embryos. *Development* 132:2599-2609.
- Luo L, Liao YJ, Jan LY, Jan YN. 1994. Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* *Drac1* is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev* 8:1787-1802.
- Matthews HK, Marchant L, Carmona-Fontaine C, Kuriyama S, Larrain J, Holt MR, Parsons M, Mayor R. 2008. Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development* 135:1771-1780.
- Mei J, Li Z, Gui JF. 2009. Cooperation of *Mtmr8* with PI3K regulates actin filament modeling and muscle development in zebrafish. *PLoS One* 4:e4979.
- Migeotte I, Omelchenko T, Hall A, Anderson KV. 2010. Rac1-dependent collective cell migration is required for specification of the anterior-posterior body axis of the mouse. *PLoS Biol* 8:e1000442.
- Miyano K, Koga H, Minakami R, Sumimoto H. 2009. The insert region of the Rac GTPases is dispensable for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Biochem J* 422:373-382.
- Nakaya Y, Kuroda S, Katagiri YT, Kaibuchi K, Takahashi Y. 2004. Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of *Cdc42* and *Rac1*. *Dev Cell* 7:425-438.
- Olivier N, Luengo-Oroz MA, Duloquin L, Faure E, Savy T, Veilleux I, Solinas X, Debarre D, Bourguin P, Santos A, Peyrieras N, Beaurepaire E. 2010. Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy. *Science* 329:967-971.
- Ozbudak EM, Tassy O, Pourquie O. 2010. Spatiotemporal compartmentalization of key physiological processes during muscle precursor differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4224-4229.
- Polizio AH, Chinchilla P, Chen L, Kim S, Manning DR, Riobo NA. 2011. Heterotrimeric Gi Proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J Biol Chem*.
- Poulton LD, Nolan KF, Anastasaki C, Waldmann H, Patton EE. 2010. A novel role for Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligand (*Gitrl*) in early embryonic zebrafish

- development. *Int J Dev Biol* 54:815-825.
- Richardson BE, Beckett K, Nowak SJ, Baylies MK. 2007. SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* 134:4357-4367.
- Rochlin K, Yu S, Roy S, Baylies MK. 2010. Myoblast fusion: when it takes more to make one. *Dev Biol* 341:66-83.
- Salas-Vidal E, Lomeli H, Castro-Obregon S, Cuervo R, Escalante-Alcalde D, Covarrubias L. 1998. Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp Cell Res* 238:136-147.
- Sanger JW, Wang J, Holloway B, Du A, Sanger JM. 2009. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in zebrafish. *Cell Motil Cytoskeleton* 66:556-566.
- Schauerte HE, van Eeden FJ, Fricke C, Odenthal J, Strahle U, Haffter P. 1998. Sonic hedgehog is not required for the induction of medial floor plate cells in the zebrafish. *Development* 125:2983-2993.
- Schnabel D, Salas-Vidal E, Narvaez V, Sanchez-Carbente Mdel R, Hernandez-Garcia D, Cuervo R, Covarrubias L. 2006. Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death. *Dev Biol* 291:291-299.
- Srinivas BP, Woo J, Leong WY, Roy S. 2007. A conserved molecular pathway mediates myoblast fusion in insects and vertebrates. *Nat Genet* 39:781-786.
- Stickney HL, Barresi MJ, Devoto SH. 2000. Somite development in zebrafish. *Dev Dyn* 219:287-303.
- Sugihara K, Nakatsuji N, Nakamura K, Nakao K, Hashimoto R, Otani H, Sakagami H, Kondo H, Nozawa S, Aiba A, Katsuki M. 1998. Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17:3427-3433.
- Tahinci E, Symes K. 2003. Distinct functions of Rho and Rac are required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Dev Biol* 259:318-335.
- Tan W, Palmby TR, Gavard J, Amornphimoltham P, Zheng Y, Gutkind JS. 2008. An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *Faseb J* 22:1829-1838.
- Thomas PS, Kim J, Nunez S, Glogauer M, Kaartinen V. 2010. Neural crest cell-specific deletion of Rac1 results in defective cell-matrix interactions and severe craniofacial and cardiovascular malformations. *Dev Biol* 340:613-625.
- Ufer C, Wang CC, Fahling M, Schiebel H, Thiele BJ, Billett EE, Kuhn H, Borchert A. 2008. Translational regulation of glutathione peroxidase 4 expression through guanine-rich sequence-binding factor 1 is essential for embryonic brain development. *Genes Dev* 22:1838-1850.
- van Eeden FJ, Granato M, Schach U, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, Warga RM, Allende ML, Weinberg ES, Nusslein-Volhard C. 1996. Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123:153-164.
- Vasyutina E, Martarelli B, Brakebusch C, Wende H, Birchmeier C. 2009. The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8935-8940.
- Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, Long F. 2008. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133:340-

353.

Yin C, Solnica-Krezel L. 2007. Convergence and extension movements affect dynamic notochord-somite interactions essential for zebrafish slow muscle morphogenesis. *Dev Dyn* 236:2742-2756.