

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR

MECANISMOS MOLECULARES DE PROLIFERACIÓN Y
DIFERENCIACIÓN DURANTE EL DESARROLLO
EMBRIONARIO DEL PEZ MEDAKA (*ORYZIAS LATIPES*).

ANA VIRGINIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 1 d'octubre de 2010 davant un tribunal format per:

- Dra. Deborah Burks
- Dra. Paola Bovolenta Nicolao
- Dr. Fernando Casares Fernández
- Dr. José Luis Gómez Skarmeta
- Dr. Francisco Pérez Sánchez

Va ser dirigida per:
Dr. José Luis Mullor Sanjosé

©Copyright: Servei de Publicacions
Ana Virginia Sánchez Sánchez

Dipòsit legal: V-3373-2011
I.S.B.N.: 978-84-370-8001-7

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**DEPARTAMENTO DE DIFERENCIACIÓN DE
CÉLULAS TRONCALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
PRÍNCIPE FELIPE**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
SANITARIA
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
HOSPITAL LA FE**



**MECANISMOS MOLECULARES DE PROLIFERACIÓN
Y DIFERENCIACIÓN DURANTE EL DESARROLLO
EMBRIONARIO DEL PEZ MEDAKA (*Oryzias latipes*)**

Tesis Doctoral presentada por Dña. ANA VIRGINIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ.

Director de Tesis Doctoral: Dr. JOSÉ LUIS MULLOR SANJOSÉ.

Tutora de Tesis Doctoral: Dra. ISABEL FARIÑAS GÓMEZ.

Valencia, a 26 de abril de 2010.

El Dr. José Luis Mullor Sanjosé, Investigador Principal de la Fundación para la Investigación Hospital La Fe, como director de tesis doctoral, y la Dra. Isabel Fariñas Gómez, Profesora Catedrática del Departamento de Biología Celular y Parasitología, de la Facultad de Biología de la Universidad de Valencia, como tutora de tesis doctoral.

Informan:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “MECANISMOS MOLECULARES DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ MEDAKA (*Oryzias latipes*)”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por la Licenciada en Biología ANA VIRGINIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ.

Revisado el presente trabajo, consideramos que cumple los requisitos necesarios para ser presentado ante el Tribunal constituido al efecto, para la obtención del grado de Doctora.

Valencia a 26 de abril de 2010.

**Fdo. Dr. José Luis Mullor Sanjosé
Como Director de tesis doctoral.**

**Fdo. Dra. Isabel Fariñas Gómez
Como Tutora de tesis doctoral.**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis doctoral, Dr. José Luis Mullor, la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por el tiempo que ha invertido en mí y por haberme introducido en el campo del desarrollo embrionario que tanto me gusta. Además de estudiar en su laboratorio el desarrollo de los peces Medaka, también he aprendido lo que implica la puesta en marcha de un laboratorio de investigación y el establecimiento prácticamente desde cero de nuevas líneas de investigación. Estoy convencida que todos estos conocimientos me van a ser de gran ayuda en el futuro.

Quiero agradecerle a mi tutora de tesis, Dra. Isabel Fariñas, la excelente tarea que ha realizado como nexo entre la Universidad y mi trabajo de investigación, así como sus valiosos consejos en la realización de este trabajo.

En todo este tiempo encaminado hacia la investigación científica, he tenido la suerte de conocer a personas maravillosas con las que he compartido momentos inolvidables y de las que he aprendido las bases fundamentales, no sólo en el ámbito científico, sino también para crecer como persona. A todos vosotros sólo puedo deciros una cosa: GRACIAS.

Muy especialmente quiero agradecer la finalización de este trabajo a dos personas que para mí son dos tesoros, pues sin ellas no habría podido llegar tan lejos. Son mis compañeras y sobre todo amigas Arantxa y Ester. Sin lugar a dudas, haberlas conocido y haber compartido con ellas este tiempo ha sido lo mejor de esta aventura. Cuántos buenos momentos juntas, cuánto os echo de menos. Si mi mundo fuera perfecto, las tres volveríamos a trabajar juntas muy pronto. Gracias por vuestra ayuda.

No podría olvidarme de dar las gracias a mis queridas compañeras y amigas: Lydia por su constante búsqueda de la felicidad, Ida por su espíritu del norte, Neus por aportar su aire fresco, Horten por demostrar que

sí se puede y Bea por apuntarte siempre a todo. Gracias por las alegrías que me habéis dado. Estoy segura que os va a ir muy bien en los nuevos proyectos que decidisteis empezar, os deseo lo mejor.

Muchas gracias a Lucía, por ser un ejemplo de constancia a seguir, mucho ánimo pues te mereces alcanzar tus sueños, y gracias también al resto de compañeras del I17. Helen por ser capaz de hacerlo todo y más. Maria Grazia y las demás, por tantas comidas que hemos compartido, siempre con prisas y sin tiempo, pero casi siempre con algo divertido que contar. Gracias por tantos buenos momentos.

Me siento afortunada por haber conocido a Marina, capaz de idear las mejores sorpresas y de convertir lo más sencillo en un acontecimiento inigualable. A Lourdes, por tu maravillosa sonrisa, deberías sonreír a todas horas. A Mara, por ser un pedazo de pan y porque te mereces ser feliz. A Eva, por las horas divertidas en tu cueva y por buscar siempre la mejor foto, incluso cuando yo ya no te podía pedir más. A Anna, porque los inicios fueron mucho mejores junto a ti. Y especialmente a Anuschcka, por todos tus sabios consejos y porque te mereces llegar a lo más alto en todos los aspectos. Todas vosotras sois y seréis mis amigas.

Gracias también a mis vecinos del I23, Lorena, M^a Jesús, Silvia y los demás, por haber sido tan buenos compañeros, ha sido estupendo teneros al lado. También gracias a Bet y a Laura, por cada una de las veces que nos encontrábamos en el pasillo y por tantas risas. A Alicia, por ayudarme cada vez que me surgió un problema en el citómetro. A Isabel, por ser capaz de irse muy lejos para alcanzar lo que de verdad importa. A José y Alejandro, por ser los chicos de nuestro grupo, no sé como pudisteis resistirlo. A mis nuevos compañeros en la Fe, os deseo mucha suerte.

También quiero compartir este trabajo con mis amigos de Barcelona, donde comencé en el mundo de la investigación. A Iulia, por ser mi apoyo y por tu alegría en todo. A Jordi, por ser un buen amigo, siempre dispuesto a ayudar y porque sé que estás ahí. A Mila, por ser una luchadora

y por ser capaz de demostrar lo mucho que vales. Y a todos los demás compañeros del ICMAB.

Dedico esta tesis a mis mejores amigos, pues aunque el trabajo en el laboratorio me ha dejado poco tiempo para pasarlo con vosotros, sin lugar a dudas esos momentos que compartimos han valido la pena, y aún más que eso.

Principalmente quiero agradecerle todo su apoyo a mi amiga Keles que tanto me entiende y me ayuda y de la que me siento muy orgullosa. Sé que vas a llegar muy lejos y siempre podrás contar conmigo.

A mis amigas biólogas M^a Carmen y Amparo, pues aunque hemos seguido distintos caminos siempre hemos tenido mucho en común y siempre hemos encontrado la manera de mantener el contacto.

A mis queridas amigas Laura, Rebeca y Rocío, por toda una vida juntas y por todo lo que me habéis dado. Sabéis que sois muy especiales para mí.

Tengo la suerte de formar parte de una gran familia. A ellos se lo debo todo y mil gracias por eso. Mis padres me han dado lo mejor y me han enseñado lo que de verdad merece la pena. Mis hermanos no me fallan y sé que puedo contar con ellos. Mis abuelos siempre nos han dado todo su cariño. Al resto, gracias por tantos momentos inolvidables.

Toni, eres quien más te mereces este agradecimiento. Sin tu apoyo, sin tus ánimos y sin tus consejos no habría podido llegar hasta aquí. Sabes que eres mi felicidad.

*A mi familia
y a Antonio*

“El concepto de embrión es algo asombroso, y formarse como embrión es la cosa más difícil que jamás tendremos que hacer. Para convertirnos en embrión, tuvimos que construirnos a nosotros mismos a partir de una sola célula. Tuvimos que respirar antes de tener pulmones, hacer la digestión antes de tener estómago, fortalecer los huesos cuando éramos carnosos, y formar grupos ordenados de neuronas antes de saber cómo pensar. Una de las diferencias básicas entre nosotros y una máquina es que a una máquina nunca se le pide funcionar hasta que está finalmente construida. Cada ser vivo debe funcionar para construirse a sí mismo”.

Dr. Scott F. Gilbert en su libro *Developmental Biology*.

Durante la realización de este trabajo de tesis doctoral y en relación a la investigación llevada a cabo, Ana Virginia Sánchez Sánchez ha participado en los siguientes artículos:

- Sánchez-Sánchez AV, Camp E, Mullor JL. 2010. Fishing pluripotency mechanisms in vivo. **Int J Biol Sci**. Review. *In press*.
- Sánchez-Sánchez AV, Camp E, Leal-Tassias A, Atkinson S, Armstrong L, Díaz-Llopis M, Mullor JL. 2010. Nanog regulates primordial germ cell migration through *Cxcr4b*. **Stem Cells** *In press*.
- Sánchez-Sánchez AV, Camp E, García-España A, Leal-Tassias A, Mullor JL. 2010. Medaka Oct4 is expressed during early embryo development, primordial germ cells and adult gonads. **Dev. Dyn.** 239:672-679.
- Sánchez-Sánchez AV, Camp E, Leal-Tassias A, Mullor JL. 2010. Wnt signaling has different temporal roles during retinal development. **Dev Dyn.** 239:297-310.
- Camp E, Sánchez-Sánchez AV, García-España A, Desalle R, Odqvist L, O'Connor JE, Mullor JL. 2009. Nanog regulates proliferation during early fish development. **Stem Cells** 27:2081-2091. Coautora primera.

Además, ha participado en los siguientes congresos internacionales:

- Sánchez-Sánchez AV, Camp E, Leal-Tassias A y cols. Wnt signaling has different temporal roles during retinal development. 1st SEBD-SFBD joint meeting. Development, Stem Cells and Evolution. Toulouse. 7 al 10 de Noviembre, 2009. **Póster**.
- Sánchez-Sánchez AV, Camp E, García-España A y cols. Nanog Regulates Proliferation during early fish development. 1st SEBD-

SFBD join meeting. Development, Stem Cells and Evolution. Toulouse. 7 al 10 de Noviembre, 2009. **Póster.**

- Sánchez-Sánchez AV, Leal-Tassias A, Mullor JL. Canonical Wnt signaling regulates cell cycle progression of retinal progenitors in Medaka. Join meeting of the British and Spanish developmental societies. Sevilla. 24 al 27 de Septiembre, 2008. **Exposición oral.**
- Sánchez-Sánchez AV, Leal-Tassias A, Mullor JL. Canonical Wnt signaling regulates cell cycle progression of retinal progenitors in Medaka. Society for Developmental Biology 67th Annual Meeting. University of Pennsylvania. Philadelphia. 26 al 30 de junio de 2008. **Póster.**

Finalmente, ha ampliado sus conocimientos asistiendo a los siguientes cursos formativos:

- Responsable de dirección y diseño de procedimientos experimentales categoría C. Homologado por la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación. CIPF. Septiembre de 2007.
- III International Course on Microarray Data Analysis. CIPF. Marzo de 2007.
- Cell and Developmental Biology of Xenopus. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Marzo de 2006.
- Licencia de Operador de Instalaciones Radiactivas en "Laboratorio con fuentes no encapsuladas". Consejo de Seguridad Nuclear. Julio de 2005.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	X
ABREVIATURAS.....	XV
RESUMEN.....	XIX
ABSTRACT.....	XXI
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Desarrollo embrionario: control de la proliferación y la diferenciación celular.....	2
2. Medaka (<i>Oryzias latipes</i>) como modelo animal para el estudio del desarrollo embrionario de vertebrados.....	4
2.1. Ventajas que presenta Medaka como modelo animal de vertebrados.....	5
2.2. Desarrollo embrionario en Medaka.....	9
2.3. Desarrollo temprano de las gónadas en Medaka.....	13
2.3.A. Ovogénesis en Medaka.....	15
2.3.B. Espermatogénesis en Medaka.....	17
3. Factores reguladores de la pluripotencialidad y diferenciación en el desarrollo embrionario temprano: Nanog y Oct4.....	17
3.1. Nanog y la regulación de la pluripotencialidad.....	20
3.2. Oct4 y la regulación de la pluripotencialidad.....	21
3.3. Nanog y Oct4 en Medaka.....	23
3.3.A. Identificación de Nanog en Medaka.....	24
3.3.B. Identificación de Oct4 en Medaka.....	27
4. Factores reguladores de la proliferación y diferenciación en el desarrollo embrionario tardío: La vía de señalización de Wnt.....	29
4.1. La vía canónica de Wnt.....	31
4.2. La vía de señalización de Wnt en el sistema nervioso central.....	32
4.3. La vía canónica de Wnt en la retina neural.....	35

4.3.A. Desarrollo temprano del ojo en Medaka.....	35
4.3.B. La retina neural como modelo para el estudio del desarrollo del sistema nervioso central.....	37
4.3.C. Expresión y función de Wnt en la retina de vertebrados.....	39
OBJETIVOS.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. Animales.....	46
1.1. Tratamientos farmacológicos.....	46
1.2. Tratamientos de choque térmico.....	47
1.3. Tratamiento para la eliminación de la pigmentación del epitelio pigmentario de la retina.....	47
2. Transgénesis.....	48
3. Inyección de mRNA y Morfolinos.....	54
4. Análisis de la expresión génica.....	51
4.1. Análisis mediante RT-PCR y qRT-PCR.....	53
4.1.A. RT-PCR.....	53
4.1.B. qRT-PCR.....	54
4.2. Análisis mediante hibridación <i>in situ</i>	55
4.2.A. Síntesis de la sonda de RNA para hibridación <i>in situ</i>	59
4.2.B. Protocolo de hibridación <i>in situ</i>	59
5. Análisis de la expresión proteica mediante inmunofluorescencia.....	63
5.1. Obtención de anticuerpos policlonales de Medaka.....	63
5.2. Anticuerpos utilizados.....	64
5.3. Protocolo de inmunofluorescencia en embrión entero.....	65
5.4. Protocolo de inmunofluorescencia en criosecciones.....	67
5.5. Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	69
6. Análisis de la apoptosis mediante TUNEL.....	69

7. Obtención de imágenes.....	70
8. Análisis de la interacción proteína-DNA mediante Inmunoprecipitación de cromatina.....	70
9. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.....	73
10. Análisis estadístico de los resultados.....	74
RESULTADOS.....	76
1. Control de genes de pluripotencialidad y diferenciación durante el desarrollo embrionario temprano.....	77
1.1. Expresión de Nanog y Oct4 durante el desarrollo embrionario temprano de Medaka.....	77
1.2. Análisis funcional de OI-Nanog durante el desarrollo embrionario temprano de Medaka.....	81
1.2.A. Nanog es necesario para que se produzca un correcto desarrollo embrionario.....	81
1.2.B. Nanog es necesario para la proliferación celular y para la correcta transición de la fase de síntesis del ciclo celular.....	86
1.2.C. Nanog no regula el proceso de determinación temprana de las capas embrionarias <i>in vivo</i>	91
2. Regulación de la pluripotencialidad y la diferenciación durante el desarrollo embrionario tardío y adulto: células del primordio germinal.....	95
2.1. Expresión de Nanog y Oct4 durante el desarrollo embrionario tardío de Medaka.....	95
2.1.A. Expresión del mRNA de Nanog y Oct4 en estadios embrionarios tardíos.....	95
2.1.B. Expresión de las proteínas de Nanog y Oct4 en estadios embrionarios tardíos.....	97
2.2. Función de Nanog en el desarrollo de las CPG de Medaka.....	99
2.2.A. OI-Nanog regula la expresión de <i>Cxcr4b</i> en las CPG....	99
2.2.B. OI-Nanog regula la migración de las CPG.....	103

2.2.C. La expresión de <i>Cxcr4b</i> en las CPG rescata el fenotipo de migración debido al <i>MO-Nanog</i>	105
2.2.D. OI-Nanog regula de manera directa la expresión de <i>Cxcr4b</i>	108
2.3. Expresión de OI-Nanog y OI-Oct4 en las gónadas adultas.....	110
3. Regulación de la proliferación y diferenciación durante el desarrollo embrionario tardío: la retina neural como modelo de desarrollo del sistema nervioso central.....	115
3.1. Modificación condicional de la vía de señalización de Wnt en el desarrollo embrionario de peces Medaka.....	115
3.1.A. Obtención y caracterización de líneas transgénicas de expresión génica condicional.....	116
3.1.B. Uso de fármacos para la manipulación de la expresión de la vía de señalización de Wnt de manera condicional.....	124
3.2. La vía de señalización de Wnt endógena está activa en la retina de Medaka.....	126
3.3. La vía de señalización de Wnt regula la diferenciación celular de los progenitores neurales de la retina durante el desarrollo temprano del ojo.....	128
3.4. La vía de señalización de Wnt regula la diferenciación celular tardía de los progenitores neurales de la retina durante el desarrollo del ojo.....	134
3.5. La vía de señalización de Wnt regula la apoptosis de los progenitores neurales de la retina durante el desarrollo temprano...	137
3.6. La vía de señalización de Wnt regula la proliferación de los progenitores neurales de la retina durante el desarrollo temprano...	141
3.7. La vía de señalización de Wnt regula el ciclo celular de los progenitores neurales de la retina durante el desarrollo temprano a través de <i>CcnD1</i>	145

DISCUSIÓN.....	150
1. Regulación de la proliferación y diferenciación durante el desarrollo embrionario de los peces Medaka.....	151
2. Control de genes de proliferación y diferenciación durante el desarrollo embrionario temprano.....	151
2.1. Expresión de Nanog y Oct4 durante el desarrollo embrionario temprano de Medaka.....	152
2.2. OI-Nanog regula la proliferación a través de la transición de la fase de síntesis durante el desarrollo embrionario temprano de Medaka.....	153
3. Regulación de la pluripotencialidad y la diferenciación durante el desarrollo embrionario tardío y adulto: células del primordio germinal.....	158
3.1. Expresión de Nanog y Oct4 durante el desarrollo embrionario tardío de Medaka.....	158
3.2. Función de Nanog en el desarrollo de las células del primordio germinal de Medaka.....	160
3.3. Expresión de OI-Nanog y OI-Oct4 en las gónadas adultas.....	163
4. Diferenciación durante el desarrollo embrionario tardío: el sistema nervioso central.....	166
4.1. La vía de señalización de Wnt tiene diferentes funciones temporales durante el desarrollo de la retina.....	167
 CONCLUSIONES.....	 174
 BIBLIOGRAFÍA.....	 177

ABREVIATURAS

A β : proteína β -amiloide.

Ac: *Anolis carolinensis*.

A-P: antero-posterior.

APC: del inglés *Adenomatous Polyposis Coli*.

β Cat: β -catenina.

BCIP: del inglés *Bromo-Chloro-Indol-Phosphate p-toluidine*.

BMP: Proteína morfogenética ósea, del inglés *Bone Morphogenetic Protein*.

Bra: *Brachyury*.

BSA: suero de albúmina bovina.

Bt: *Bus taurus*.

β TrCP: del inglés *β -Transducin repeat-Containing Protein*.

CcnA: *Ciclina A*.

CcnD1: *Ciclina D1*.

CGR: células ganglionares de la retina.

Ch: cromosoma.

ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina, del inglés *Chromatin immunoprecipitation*.

CPG: células del primordio germinal.

Ct: ciclo umbral en la qRT-PCR, del inglés *Threshold Cycle*.

DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindol.

Dig-UTP: Digoxigenina 11-UTP.

Dkk1: Dickkopf 1.

DNA: ácido desoxirribonucleico, del inglés *Deoxiribonucleic Acid*.

dph: días tras la eclosión, del inglés *days post-hatching*.

Dr: *Danio rerio*.

D-V: dorso-ventral.

Dvl: Dishevelled.

ESC: células madre embrionarias, del inglés *Embryonic Stem Cells*.

ENU: etilnitrosourea.

EPR: Epitelio pigmentario de la retina.

FBS: suero bovino fetal, del inglés *Fetal Bovine Serum*.

Fgf: Factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés *Fibroblast Growth Factor*.

Fig.: Figura.

Fr: *Fugu rubripes*.

FT: factor de transcripción.

Fz: Frizzled.

Ga: *Gasterosteus aculeatus*.

GDF: ganancia de función.

gDNA: DNA genómico.

GFP: proteína fluorescente verde, del inglés *Green Fluorescent Protein*.

Gg: *Gallus gallus*.

GSK3 β : quinasa de la glicógeno sintasa 3 β .

HD: Homeodominio.

H-E: hematoxilina-eosina.

Hs: *Homo sapiens*.

HS: choque térmico, del inglés *Heat Shock*.

ICM: masa celular interna, del inglés *Inner Cell Mass*.

ID2: Inhibidor de unión al DNA 2, del inglés *Inhibitor of DNA binding 2*.

IP: Inmunoprecipitación.

Lef1: Factor de unión al amplificador linfoide 1, del inglés *Lymphoid Enhancer-binding Factor 1*.

LIF: Factor inhibidor de leucemia, del inglés *Leukemia Inhibitory Factor*.

LRP: proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad, del inglés *Low density lipoprotein receptor-Related Protein*.

M: Miosis.

Md: *Monodelphis domestica*.

MHB: frontera entre el cerebro medio y el posterior, del inglés *Mid-Hind-Boundary*.

Mm: *Mus musculus*.

MO: Morfolino.

Mpb: millones de pares de bases.

mRNA: RNA mensajero, del inglés *Messenger Ribonucleic Acid*.

n: número de elementos de la muestra.

NBT: del inglés *Nitro Blue Tetrazolium*.

Oa: *Ornithorhynchus anatinus*.

OI: *Oryzias latipes*.

pb: pares de bases.

PBS: tampón fosfato salino.

PCP: polaridad celular planar, del inglés *Planar Cell Polarity*.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, *Polimerase Chain Reaction*.

PDF: pérdida de función.

PFA: paraformaldehído.

pH3: fosfohistona 3, del inglés *Phospho Histone 3*.

PI: yoduro de propicio, del inglés *Propidium Iodide*.

PMSF: fenil metano sulfanil fluorado.

PN: progenitor neural.

PNR: progenitor neural de la retina.

qRT-PCR: RT-PCR cuantitativa, del inglés *quantitative RT-PCR*.

Rhod: *Rodopsina*, del inglés *Rhodopsin*.

rpm: revoluciones por minuto.

RSC: célula madre de la retina, del inglés *Retinal Stem Cell*.

RT-PCR: PCR de transcripción reversa, del inglés *Reverse Transcriptase-PCR*.

S: síntesis.

Sc: *Sus scrofa*.

SC: célula madre, del inglés *Stem Cell*.

sd: desviación estándar, del inglés *Standar Deviation*.

Sfrp2: Proteína relacionada con Frizzled Secretado 2, del inglés *Secreted Frizzled-Related Protein 2*.

Shh: *Sonic Hedghog*.

SNC: Sistema nervioso central.

St.: estadio, del inglés *Stage*.

TCF: factor de transcripción específico de células T, del inglés *T Cell-specific transcription Factor*.

Tn: *Tetraodon nigroviridis*.

TUNEL: del inglés *TdT-mediated dUTP Nick End Labelling*.

U.A.: Unidades arbitrarias.

WMISH: hibridación in situ, del inglés *Whole Mount In Situ Hybridization*.

Wt1: gen del tumor de Wilms.

ZMC: Zona Marginal Ciliada de la retina.

#: Número.

La abreviatura se pone junto al nombre al que hace referencia la primera vez que aparece en el texto, después ya sólo se nombra como abreviatura a excepción de los títulos donde se han utilizado siempre los nombres completos sin abreviar.

En este trabajo, el nombre de los genes viene indicado en cursiva con la primera letra en mayúsculas, mientras que la proteína viene determinada en letra regular. Cuando el gen o la proteína se nombran en humanos, se han escrito con todas las letras en mayúsculas.

RESUMEN

A lo largo del desarrollo embrionario las células que forman el embrión deben dividirse numerosas veces hasta alcanzar la cantidad celular capaz de asegurar la diferenciación de todos los tejidos y órganos. Por tanto, la correcta regulación de la proliferación y diferenciación celular es fundamental para evitar defectos durante el desarrollo embrionario y la aparición de enfermedades en el individuo adulto. Aprovechando las numerosas ventajas que ofrece el pez Medaka (*Oryzias latipes*; *Ol*), hemos estudiado los mecanismos moleculares que regulan la proliferación y diferenciación en los embriones de Medaka en dos momentos distintos del desarrollo, uno temprano durante la segmentación y otro tardío durante la organogénesis.

El estudio en la etapa temprana de desarrollo se ha centrado, por una parte, en describir el patrón de expresión de Nanog y Oct4 a lo largo del desarrollo embrionario, y por otra parte, en estudiar la función endógena de Nanog. Tanto *Ol*-Nanog como *Ol*-Oct4 presentan patrones de expresión muy similares a los de mamífero, localizándose en el núcleo de los blastómeros durante la segmentación y más tardíamente, concentrándose principalmente en las células del primordio germinal. En el adulto, ambos se expresan en las células germinales de las gónadas de Medaka. El estudio funcional de *Ol*-Nanog reveló que es necesario para la transición de la fase de síntesis del ciclo celular al regular la expresión de *Ciclina A*, así como para la proliferación del embrión, sin embargo, no parece desempeñar un papel directo en la diferenciación de las capas germinales embrionarias. Además, *Ol*-Nanog media la migración de las células del primordio germinal mediante la regulación directa de la expresión de *Cxcr4b*.

Por otra parte, centramos el estudio de la etapa tardía del desarrollo en conocer la función de la vía de señalización canónica de Wnt sobre los progenitores neurales de la retina. Para realizar este estudio utilizamos una aproximación con animales transgénicos y otra farmacológica que nos

permitió manipular la señalización de Wnt en distintos momentos del desarrollo de la retina de Medaka. De este modo, determinamos que la vía de señalización de Wnt tiene dos funciones temporales distintas sobre los progenitores neurales de la retina, una temprana donde regula la progresión del ciclo celular a través de *Ciclina D1*, proliferación, apoptosis y diferenciación; y otra tardía, donde sólo regula la expresión del gen *Vsx1*, que es un marcador de células bipolares. Por tanto, la respuesta de los progenitores neurales de la retina a la vía de Wnt es dependiente del estadio de desarrollo.

ABSTRACT

During embryonic development, the cells that form the embryo must divide many times until reaching the number of cells required to ensure the correct differentiation of all tissues. Therefore, the proper regulation of cell proliferation and differentiation is essential to avoid defects during embryonic development and the emergence of diseases in the adult. Due to the favourable experimental characteristics of fish models, we have used the fish Medaka (*Oryzias latipes*; *OI*), to study the molecular mechanisms that regulate proliferation and differentiation in Medaka embryos at two different times of development, the first during segmentation and the second during organogenesis.

The study undertaken during the early stage of development has focused on characterising the spatio-temporal expression pattern of two key factors involved in maintaining pluripotency, Nanog and Oct4, and also investigating the function of the Medaka Nanog homologue (*OI-Nanog*) during development. Both *OI-Nanog* and *OI-Oct4* transcripts are expressed in a similar patterns to the mammalian *Nanog* and *Oct4* genes. Both proteins are located in the nucleus of the blastomeres during segmentation and later on in development are specifically expressed in primordial germ cells. In Medaka adults, both are expressed in the gonads and gonadal germ cells. The functional study revealed that *OI-Nanog* is required for the correct transition of cells within the synthesis phase of the cell cycle by regulating the expression of *Cyclin A*. Although having a very important role in cell proliferation in the embryo, *OI-Nanog* does not appear to play a direct role in the differentiation of embryonic germ layers. In addition, *OI-Nanog* mediates correct primordial germ cell migration by directly regulating the expression of *Cxcr4b*, the ligand for the Sdf1 receptor.

To study the mechanisms that regulate proliferation and differentiation in later stages of development, we focused on investigating the role of canonical Wnt signalling using retina neural progenitors as a

model system. To perform this study we used a transgenic and pharmacological approach to manipulate Wnt signalling at early and late stages of Medaka retina development. With the use of both approaches we determined that the canonical Wnt pathway has two different functions on the retina neural progenitors which depend on the stage of development. During early development we observed Wnt signalling to control the progression of the cell cycle by regulating the expression of *Cyclin D1*, and also to play a role in cellular proliferation, apoptosis and differentiation. During a later stage of development we observed Wnt signalling to only regulate the expression of *Vsx1*, a bipolar cell marker. Therefore, the retina neural progenitors' response to Wnt signalling is dependent on the developmental stage of the embryo.

INTRODUCCIÓN



*En algún sitio algo increíble
espera ser descubierto.
Carl Sagan*

1. Desarrollo embrionario: control de la proliferación y la diferenciación celular.

Tras la fecundación, el embrión, formado por una única célula, debe dividirse numerosas veces hasta estar constituido por la cantidad suficiente de células capaz de asegurar la diferenciación de todos los tejidos que necesitará en su vida adulta.

La proliferación celular, que tiene como objetivo adquirir la cantidad apropiada de células, y la diferenciación, que tiene como objetivo formar los distintos tipos celulares, no son procesos independientes. De hecho, en cada momento del desarrollo embrionario las células deben decidir entre continuar dividiéndose o salir del ciclo celular iniciando el proceso de diferenciación. Las células embrionarias seguirán uno u otro camino como respuesta a la comunicación extracelular y a las señales intrínsecas que regulan su desarrollo (Gibert, 2006). Por tanto, la regulación de esta señalización es crucial, pues niveles inapropiados de la misma producirían defectos en el desarrollo embrionario o más tardíamente en la vida adulta, la aparición de enfermedades.

Para conocer los mecanismos moleculares que regulan la proliferación y diferenciación en las células embrionarias es interesante estudiar estos procesos en distintos momentos del desarrollo embrionario. Por este motivo, en este trabajo, se han elegido dos momentos distintos del desarrollo, uno temprano durante la etapa de segmentación, y otro más tardío, en la etapa de organogénesis.

En primer lugar, se ha estudiado la regulación de las células madre (SC, del inglés *Stem Cell*) pluripotentes durante la segmentación embrionaria (Fig. 1). El desarrollo embrionario se inicia con el cigoto, que durante la segmentación se divide rápidamente para generar los blastómeros. Estos blastómeros son pluripotentes por lo que pueden diferenciarse a cualquier tipo celular de las tres hojas embrionarias. En estos estadios del desarrollo son necesarios mecanismos de regulación que

eviten la diferenciación prematura y aseguren una población de células en proliferación suficiente para generar todas las células del individuo adulto. En esta etapa hemos estudiado dos de los factores de transcripción (FT) claves en la regulación de la pluripotencialidad y diferenciación de los blastómeros que son Oct4 y Nanog (Nichols y cols., 1998; Chambers y cols., 2003; Mitsui y cols., 2003).

En segundo lugar, se ha estudiado la regulación de las células progenitoras multipotentes durante la formación del sistema nervioso central (SNC) en la etapa de organogénesis, concretamente, durante el desarrollo de la retina neural (Fig. 1). En esta etapa, hemos estudiado la vía de señalización de Wnt, que es una de las vías de señalización célula-célula que puede estar regulando la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales (PN).

Para realizar este estudio, se ha utilizado el pez Medaka, por las múltiples ventajas que presenta como animal modelo en biología del desarrollo embrionario.

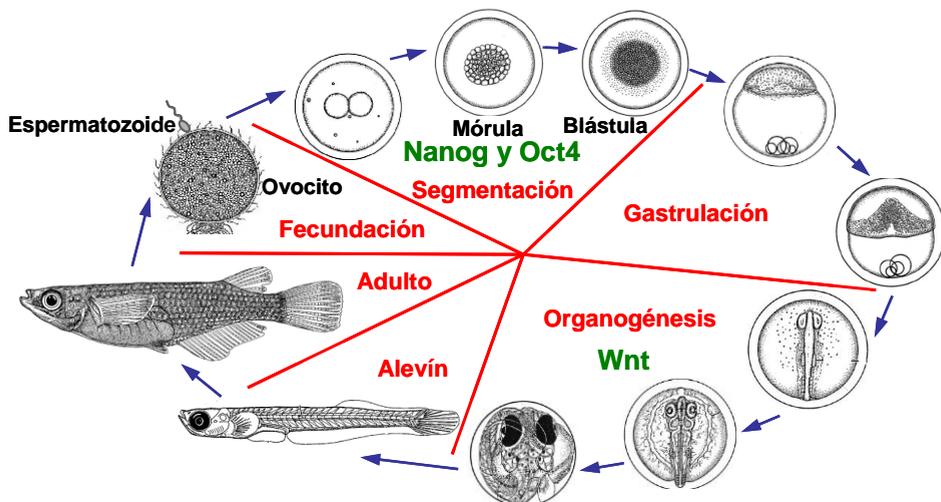


Fig. 1. Ciclo de vida de Medaka. Los FT Nanog y Oct4 se han estudiado durante la segmentación mientras que la vía de Wnt se ha estudiado durante la organogénesis de la retina neural.

2. Medaka (*Oryzias latipes*) como modelo animal para el estudio del desarrollo embrionario de vertebrados.

Oryzias latipes, conocido comúnmente como Medaka, es un pez teleosteo de agua dulce que habita en países del este de Asia. Los avances recientes en la genética de Medaka han convertido a este pez en un modelo de vertebrado idóneo para la investigación en genética del desarrollo, genómica y biología evolutiva (Ishikawa, 2000; Wittbrodt y cols., 2002).

Los peces Medaka son ovíparos y los huevos presentan una segmentación telolecítica discoidal. Los adultos miden entre 2.5 y 3 cm y es sencillo distinguir entre ambos sexos porque los machos suelen ser de menor tamaño que las hembras (Fig. 2) y la aleta dorsal en machos tiene una hendidura en el margen posterior.

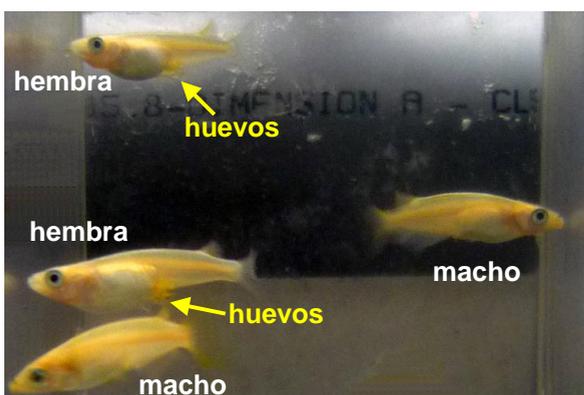


Fig. 2. Peces Medaka adultos criados en cautividad. Durante la fecundación, las hembras liberan los huevos y los machos liberan los espermatozoides. Tras la fecundación, los huevos quedan unidos al vientre materno algunas horas.

A continuación se van a especificar las ventajas del uso de Medaka como modelo en el estudio del desarrollo embrionario en vertebrados. Además, se describirán los estadios del desarrollo embrionario de Medaka así como el desarrollo de alguno de sus órganos, lo que permitirá una mejor comprensión de los resultados obtenidos. Por tanto, para comprender el patrón de expresión de Nanog y Oct4, además del desarrollo embrionario de Medaka, se va a introducir el desarrollo de las gónadas. Posteriormente,

para entender la función que desempeña la vía de señalización de Wnt en la retina se va a introducir el desarrollo y estructura de este órgano.

2.1. Ventajas que presenta Medaka como modelo animal de vertebrados.

Los peces de acuario de pequeño tamaño, como Medaka y Zebrafish (*Danio rerio*), ofrecen una excelente oportunidad de combinar la embriología, la genética y el análisis molecular en el estudio del desarrollo de los vertebrados.

Las ventajas que ofrece el pez Medaka como modelo animal de vertebrados frente a otros animales son muy numerosas (Shima y Mitani, 2004; Kinoshita y cols., 2009). Estas ventajas se enumeran a continuación:

- Al tratarse de un pez ovíparo, el desarrollo embrionario ocurre externamente. Esto representa una ventaja frente al uso de mamíferos como modelos animales, donde el desarrollo embrionario ocurre en el interior de la madre.
- Los peces Medaka se pueden criar y mantener fácilmente en el laboratorio. Son peces menos sensibles a los cambios ambientales que los peces Zebrafish. Por ejemplo, pueden habitar en aguas que oscilan anualmente entre los 4°C y los 40°C. Esto implica que son peces resistentes a los cambios de las condiciones del agua que pueden suceder en el laboratorio.
- Su ciclo de vida es rápido. Cuando estos peces se crían en condiciones apropiadas de temperatura, alimentación y densidad poblacional, la madurez sexual se alcanza dos meses después de la eclosión del huevo.
- Mediante los ciclos de luz se puede controlar el momento diario de apareamiento. Con el ciclo de luz apropiado se puede lograr que los peces Medaka se apareen durante todo el año.

- El número de embriones por hembra en cada puesta es muy elevado, de unos 20 a 30 embriones diarios, llegando incluso a alcanzar los 50 huevos por puesta en las condiciones más óptimas.

- Tanto el corion que rodea al embrión como el propio embrión son transparentes, y el tamaño del huevo es de 1 mm de diámetro, por lo que todo el desarrollo embrionario puede ser fácilmente visualizado mediante el uso de una lupa (Ver Fig. 5 en apartado 2.2). Este hecho convierte a Medaka en un sistema apropiado para realizar estudios *in vivo* de los procesos de desarrollo embrionario.

- Diversas publicaciones detallan los distintos estadios de desarrollo de Medaka, lo que es fundamental para poder ser utilizado como animal modelo (Iwamatsu, 2004; Kinoshita y cols., 2009).

- Los embriones de Medaka llegan al estadio de eclosión en 10 días cuando son incubados a la temperatura óptima (26°C). El ritmo del desarrollo embrionario puede ser controlado mediante la temperatura ambiental. Por ejemplo, hasta el estadio de blástula, se puede ralentizar e incluso detener el desarrollo embrionario durante horas poniendo a los embriones a una temperatura inferior a 10°C. Esta temperatura detiene el ciclo celular de los blastómeros que vuelve a reactivarse al incubar los embriones a 25 °C. Esto implica que en el laboratorio, los embriones pueden recogerse y mantenerse en hielo, deteniendo así el desarrollo para poder manipularlos y activar el desarrollo más adelante colocándolos a temperatura ambiente de nuevo.

- Las técnicas de obtención de transgénicos se aplican con éxito (Chou y cols., 2001; Grabher y Wittbrodt, 2007), de hecho, Medaka fue la primera especie de pez donde se estableció la transgénesis de manera estable (Ozato y cols., 1986). Una técnica eficiente para obtener líneas estables en Medaka consiste en la coinfección de la meganucleasa I-SceI junto con el vector que incluye el gen de interés flanqueado en ambos extremos con el sitio de restricción para la meganucleasa (Fig. 3; Thermes y cols., 2002). Esta técnica incrementa el número de embriones que expresan

el transgén y disminuye el nivel de mosaicismo. Además, los sitios de restricción para I-SceI no están presentes en el genoma de vertebrados por lo que no hay riesgo de fragmentación del genoma de Medaka (para más detalles ver Materiales y Métodos, apartado 2).

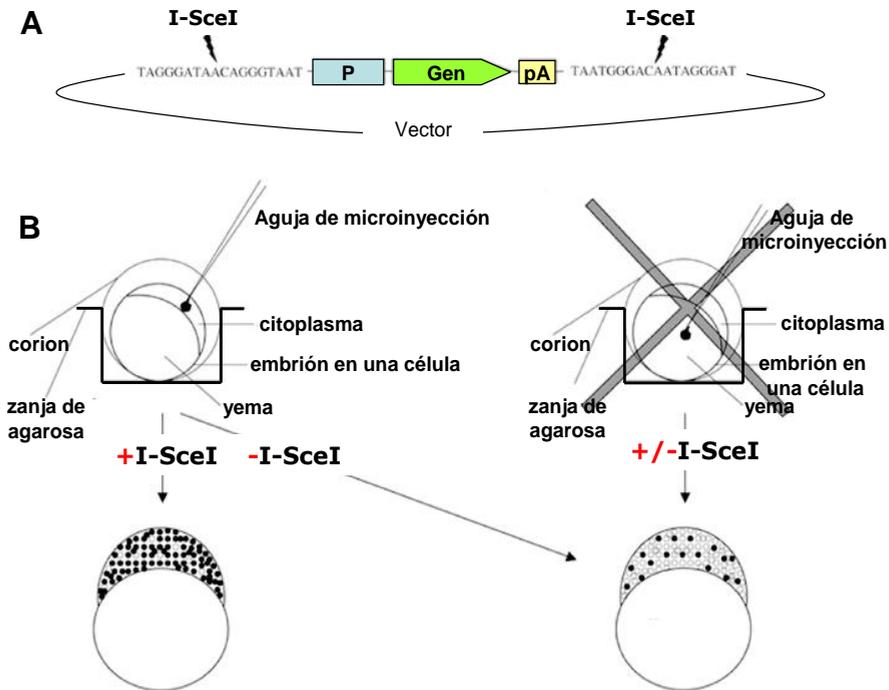


Fig. 3. Proceso de transgénesis en embriones de Medaka utilizando la técnica de meganucleasa. (A) Esquema de un vector I-SceI. Este vector incluye las secuencias de restricción para I-SceI flanqueando el conjunto de inserción con el promotor (P), el gen y la secuencia polyA (pA). (B) La inyección del vector junto con la meganucleasa I-SceI en el citoplasma de un embrión de Medaka en estadio de una célula produce mayor número de animales transgénicos y menor nivel de mosaicismo que los embriones inyectados en el citoplasma sin meganucleasa o inyectados en la yema, como se hace en los embriones de Zebrafish. (Modificado de Grabher y Wittbrodt, 2007).

- Actualmente se dispone de la secuencia completa del genoma de Medaka (<http://biol1.bio.nagoya-u.ac.jp:8000>), que tiene aproximadamente 800 millones de pares de bases (Mpb; Naruse y cols., 2004) y 24 pares de cromosomas. Este tamaño supone la mitad que el

genoma de Zebrafish (1700 Mpb) y es tres veces más pequeño que el genoma humano, por lo que lo convierte en un buen modelo de vertebrados para estudios genómicos.

- Hay una gran diversidad disponible de líneas mutantes estables de Medaka (<http://www.shigen.nig.ac.jp/Medaka>). Estos mutantes han surgido de manera espontánea o son generados por mutagénesis a gran escala utilizando el mutágeno etilnitrosourea (ENU; Loosli y cols., 2000). Esta mutagénesis a gran escala permite conocer la función de genes y vías de señalización en vertebrados gracias a la asociación del fenotipo mutante a la función del gen específico que lo origina. Una combinación de líneas mutantes se han utilizado para generar el pez *See-Through*, cuyos animales adultos tienen el cuerpo transparente, lo que permite utilizar técnicas no invasivas para el estudio morfológico y molecular en los órganos internos (Wakamatsu y cols., 2001). Por otra parte, la mutagénesis a gran escala ha permitido estudiar mutaciones que afectan al desarrollo de las células del primordio germinal (CPG; Sasado y cols., 2004), las gónadas (Morinaga y cols., 2004) o la retina (Loosli y cols., 2004), entre otras.

- En Medaka hay disponibles células madre embrionarias (ESC del inglés *Embryonic Stem Cells*; Hong y cols., 1996). Las ESC son un buen sistema para el análisis experimental del desarrollo en vertebrados. En cultivo, las ESC son muy útiles para el estudio de la diferenciación celular (Hong y cols., 2004). Las ESC de Medaka comparten las propiedades *in vitro* de las ESC murinas (Hong y cols., 1996), como por ejemplo tener cariotipo normal o potencial de diferenciación a muchos tipos celulares bajo condiciones definidas. Además, recientemente, se han obtenido ESC haploides de Medaka que presentan crecimiento normal, capacidad pluripotente e integridad genómica (Yi y cols., 2009). Las ESC haploides permiten realizar estudios genéticos de fenotipos recesivos en vertebrados *in vitro*.

- Existe un atlas del cerebro adulto de Medaka (http://www.shigen.nig.ac.jp/Medaka/Medaka_atlas/brainAtlas01.html), así como numerosas publicaciones que describen la morfogénesis del cerebro (Fig. 4; Ishikawa, 1997; Kage y cols., 2004) y el ojo en Medaka (Wittbrodt y cols., 2002). Recientemente se han descrito las zonas proliferativas del cerebro adulto de Medaka (Kuroyanagi y cols., 2010).

- Medaka presenta el sistema genético XX-XY para la determinación del sexo. Además, la determinación sexual en machos se establece con la expresión del gen *Dmrt1bY*. Esto lo convierte en un buen modelo experimental para estudiar los mecanismos de diferenciación sexual en vertebrados no mamíferos (Matsuda y cols., 2002; Matsuda, 2005).

- Recientemente se ha establecido Medaka como modelo animal para el estudio del cáncer, basado en el trasplante de células tumorales y seguimiento *in vivo* de las mismas en tiempo real, aprovechando las técnicas de fluorescencia (Hasegawa y cols., 2009).

- El mantenimiento en el laboratorio de los peces Medaka es económico en comparación con el mantenimiento de mamíferos.

2.2. Desarrollo embrionario en Medaka.

Como se ha dicho previamente, en Medaka es sencillo realizar el seguimiento *in vivo* del desarrollo embrionario gracias a la transparencia del embrión y el corion que lo rodea. Además, el tamaño del huevo es de aproximadamente 1 mm, lo que permite su visualización mediante el uso de una lupa.

El desarrollo del embrión de Medaka desde la fecundación hasta la eclosión se divide en 39 estadios (Tabla 1 y Fig. 5; Iwamatsu, 2004) que se agrupan en las tres etapas del desarrollo embrionario. La etapa de segmentación comprende desde el estadio (st.) 1 al 11, a partir del cual se inician los estadios de gastrulación, que incluyen los st. 12 al 18, y finalmente se da la organogénesis que se inicia en el st. 19 (Tabla 1).

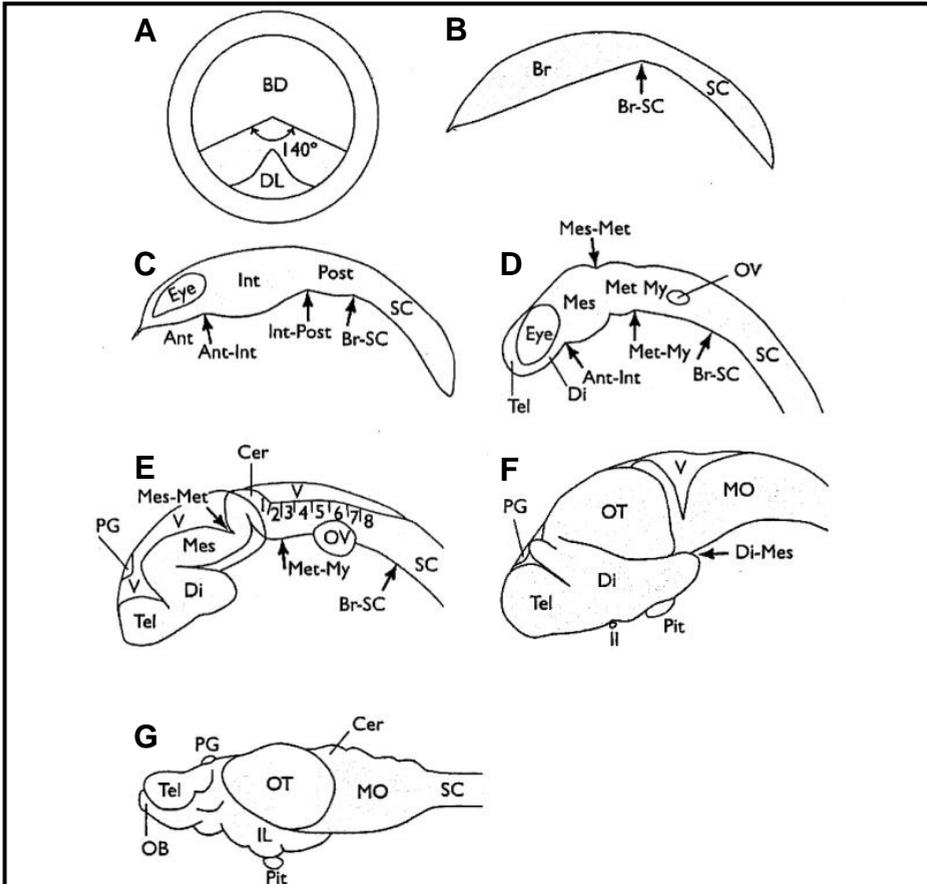


Fig. 4. Representación del desarrollo del cerebro de Medaka. (A) Embrión en estadio de gástrula temprana visto desde el polo animal. Las futuras células neurales se localizan en un sector dorsal del blastodermo que engloba unos 140°; BD: blastodermo; DL: campo embrionario. (B) Estadio de gástrula tardía, vista lateral del cuerpo embrionario; Br: cerebro; SC: médula espinal. (C) St. 18 (néurula), visión lateral del cuerpo embrionario, el cerebro rudimentario muestra tres subdivisiones: anterior (Ant), intermedia (Int) y posterior (Post). (D) St. 21, visión lateral. La vesícula del cerebro anterior se divide en telencéfalo (Tel) y diencéfalo rostral (Di). La vesícula intermedia se divide en diencéfalo, mesencéfalo (Mes) y metencéfalo (Met). La vesícula cerebral posterior forma el mielencéfalo (My). OV: vesícula ótica. (E) St. 25 (tubo neural), visión lateral. El octavo rombómero se hace visible. PG: glándula pineal; V: ventrículo; Cer: cerebelo. (F) Visión lateral del embrión en el estadio de cerebro tardío. El mesencéfalo dorsal se expande para formar el techo óptico (OT). MO: médula oblongata; Pit: pituitaria; Il: nervio óptico. (G) Visión lateral del cerebro en el estadio de alevín. Las flechas indican las fronteras de las subdivisiones. (Modificado de Kinoshita y cols., 2009).

Tabla 1. Estadios del desarrollo de Medaka desde la fecundación a la eclosión. Los estadios de desarrollo determinados por Iwamatsu (2004) se han agrupado según las etapas del desarrollo. En cada estadio se determina la característica principal que lo identifica y las horas que transcurren desde la fecundación hasta que el embrión llega a ese estadio cuando es incubado a 26°C.

Etapas	Estadio	Característica principal	horas (26°C)
Zigoto	1 y 2	1 célula.	0.6
Segmentación	3 al 7	2 a 32 células.	1.5 a 3.5
Blástula	8	Mórula temprana.	4
	9	Mórula tardía.	5.2
	10	Blástula temprana.	6.5
	11	Blástula tardía.	8
Gástrula	12	Pregástrula, 20% epibolia.	10.2
	13 y 14	Gástrula temprana.	13 a 15
	15	Gástrula media, crece el campo embrionario.	17,5
	16	Gástrula tardía, 75% epibolia, la placa neural se hace visible.	21
	17 y 18	0 somitas. 90% epibolia, cerebro rudimentario, vesícula óptica.	25 a 26
Organogénesis	19 al 21	1 a 8 somitas. 100% epibolia, regionalización cerebral, copas ópticas.	27.5 a 34
	22, 23	9 a 12 somitas. Corazón tubular, notocorda, vesícula del cerebro posterior.	38 a 41
	24 y 25	14 a 19 somitas. El corazón palpita, intestino, rombómeros del cerebro posterior.	44 a 50
	26 al 28	22 a 30 somitas, pigmentación del ojo.	54 a 64
	29 al 38	34 a 35 somitas.	74 a 180
	39	Eclosión	240

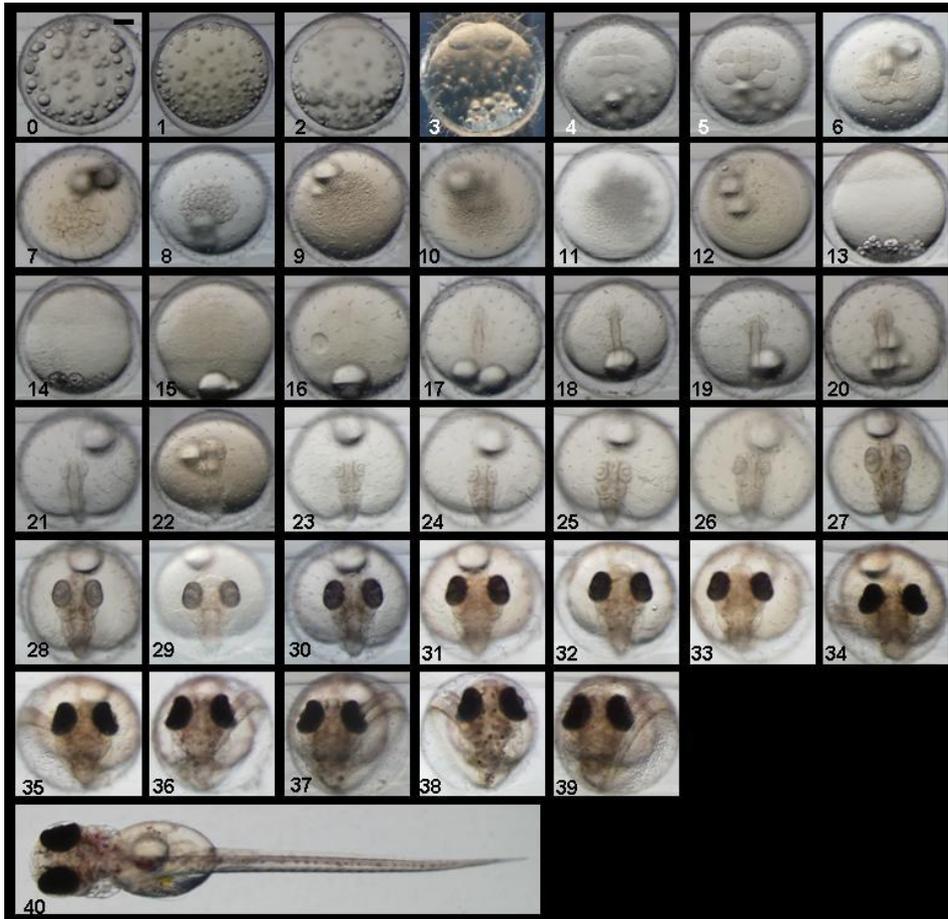


Fig. 5. Estadios de desarrollo embrionario en Medaka desde el momento de la fecundación hasta la eclosión del alevín. Imágenes de embriones de Medaka vivos en los distintos estadios del desarrollo embrionario visualizados con una lupa. El número que aparece en cada imagen corresponde al estadio de desarrollo según fueron descritos por Iwamatsu (2004). La transparencia del corion y el embrión permite visualizar el desarrollo del embrión y sus estructuras, como por ejemplo los ojos o las gónadas. En los st. 0 al 3 y 13 a 16, la imagen muestra el polo animal (superior) y el vegetal (inferior) y el embrión se encuentra en el polo animal. Las imágenes de st. 4 al 12 se han tomado en el polo animal del huevo por lo que el embrión se localiza centrado en la imagen. En el resto de estadios se aprecia claramente la disposición del embrión. Barra de escala: 200 μ m. Cada vez que en el texto se nombre un nuevo estadio del desarrollo de medaka se remitirá a esta figura.

Los estadios del desarrollo de Medaka se determinaron en función de distintos parámetros embriológicos tales como el número de blastómeros y su tamaño, la extensión de la epibolia, el número de somitas, el desarrollo de distintos órganos como el SNC, el ojo, la notocorda, el corazón y el sistema circulatorio.

Tras el estadio de eclosión (st. 39), los peces Medaka pasan por los estadios de alevín y juvenil, donde todavía continúa la organogénesis y siguen desarrollando algunos órganos y tejidos, antes de llegar a la edad adulta de reproducción.

2.3. Desarrollo temprano de las gónadas en Medaka.

Las gónadas de Medaka se desarrollan a partir de las células germinales que dan lugar a los gametos y de células somáticas que dan lugar al resto de tejidos de la gónada. Las CPG se detectan a partir del estadio de blástula temprana (st. 10) distribuidas aleatoriamente cerca del polo animal, donde permanecen hasta que comienzan su migración en el inicio de la gastrulación (Fig. 6; Herpin y cols., 2007 y 2008).

En Medaka se han descrito tres etapas secuenciales de migración de las CPG (Fig. 6; Herpin y cols., 2008). La primera etapa comienza en st. 14 (gástrula temprana) y termina en st. 17 (néurula temprana). En esta etapa las CPG migran hacia la base del campo embrionario y está dirigida por la quimioquina Sdf1a, que se expresa en el mesodermo lateral, y su receptor Cxcr4, que se expresa en las CPG. En la segunda etapa, que se da entre los st. 18 a 24 y es independiente de quimioquinas, las CPG migran pasivamente junto con las células somáticas hacia la línea media embrionaria. La última etapa se inicia en el st. 26 y en ella, las CPG migran hacia el mesodermo de la placa lateral, que es la zona donde se formarán las gónadas. En esta última etapa es la quimioquina Sdf1b quien participa en el posicionamiento de las CPG.

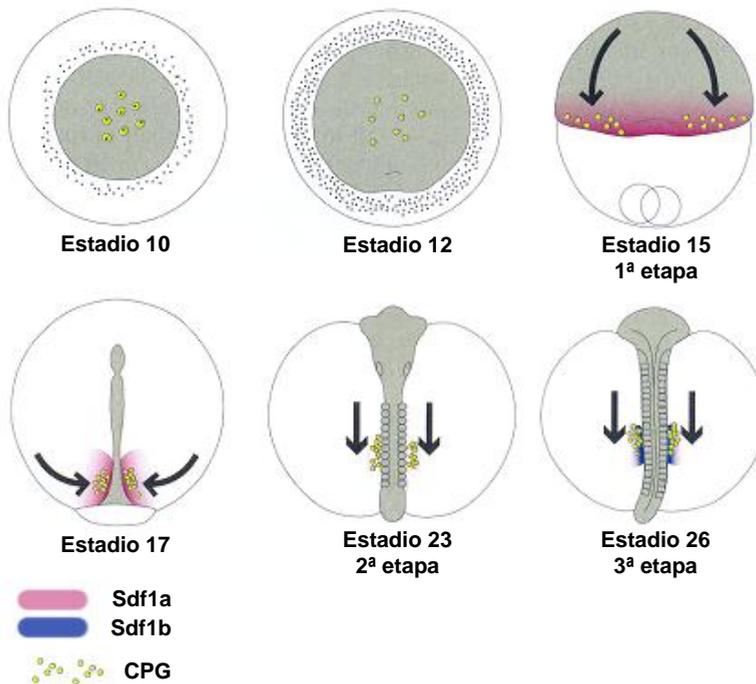


Fig. 6. Etapas de migración de las CPG. Las CPG se detectan inicialmente en st. 10 (vista del polo animal) e inician su migración en st. 14 hacia la zona marginal del campo embrionario atraídas por Sdf1a mientras que en la tercera fase las CPG migran atraídas por Sdf1b. (Modificado de Kinoshita y cols., 2009).

Una vez las CPG han migrado desde su lugar de nacimiento hasta el emplazamiento donde se formarán las gónadas, el primordio gonadal comienza el dimorfismo sexual para diferenciarse a ovario o testículo (Fig. 7). En Medaka, el sexo se determina genéticamente mediante el gen *Dmrt1bY*, localizado en el cromosoma (ch.) Y (Matsuda y cols., 2002; Matsuda, 2005).

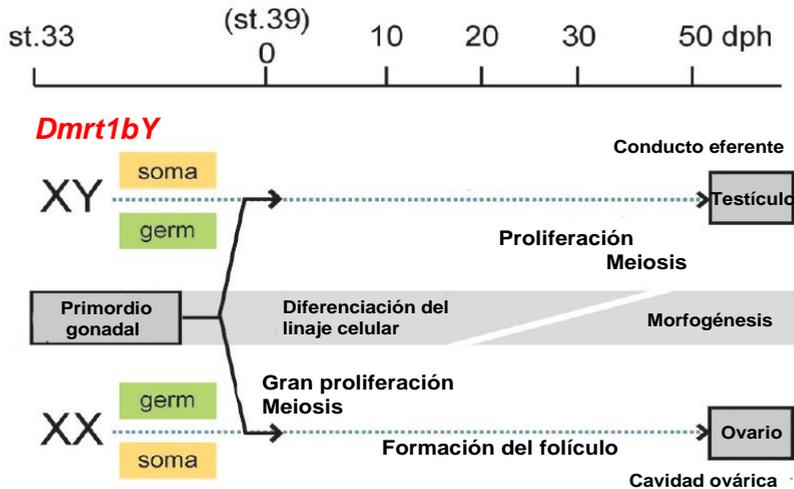


Fig. 7. Desarrollo de las gónadas de Medaka desde st. 33 hasta el adulto. En st. 33 se forma el primordio gonadal, coincidiendo con el inicio de la expresión del gen *Dmrt1bY* en las células somáticas. En el momento de la eclosión, las células germinales en las hembras se incrementan rápidamente, lo que no sucede en el macho. El folículo ovárico se hace evidente 20 dph. Soma: células somáticas; Germ: células germinales; dph: días tras eclosión. (Modificado de Kurokawa y cols., 2007).

2.3.A. Ovogénesis en Medaka.

La maduración de los ovocitos en el ovario adulto de Medaka es asincrónica, por lo que en una disección de ovario se pueden visualizar ovocitos en todos los estadios de maduración.

El desarrollo del ovocito se clasifica en diez estadios en base a su morfología externa y sus microestructuras internas. Estos diez estadios están agrupados en cuatro fases (Iwamatsu y cols., 1988):

- Fase previtelogénica: Los ovocitos se localizan junto al epitelio del ovario. Los ovocitos no tienen envoltorio y comienzan a sintetizarlo. Su tamaño pasa de 20 a 150 μm .

El plasma germinal es visible. Esta fase está subdividida en 4 estadios (Fig. 8; St. I a St. IV).

- Fase vitelogénica: El ovocito pasa de 151 a 800 μm . El plasma germinal desaparece. Aparecen vesícula de yema en el citoplasma del ovocito. Esta fase está subdividida en 4 estadios (Fig. 8; St. V a St VIII).
- Fase postvitelogénica (Fig. 8; St. IX): El tamaño del ovocito pasa de 801 a 1200 μm . La masa de la yema cubre prácticamente todo el citoplasma del ovocito y las vesículas de la yema se localizan en la parte exterior del citoplasma. El corion está bien formado cubierto de la capa folicular.
- Fase de ovulación (Fig. 8; St. X): El ovocito mide 1200 μm . La superficie del ovocito está cubierta de filamentos. Los ovocitos migran a la cavidad ovárica.

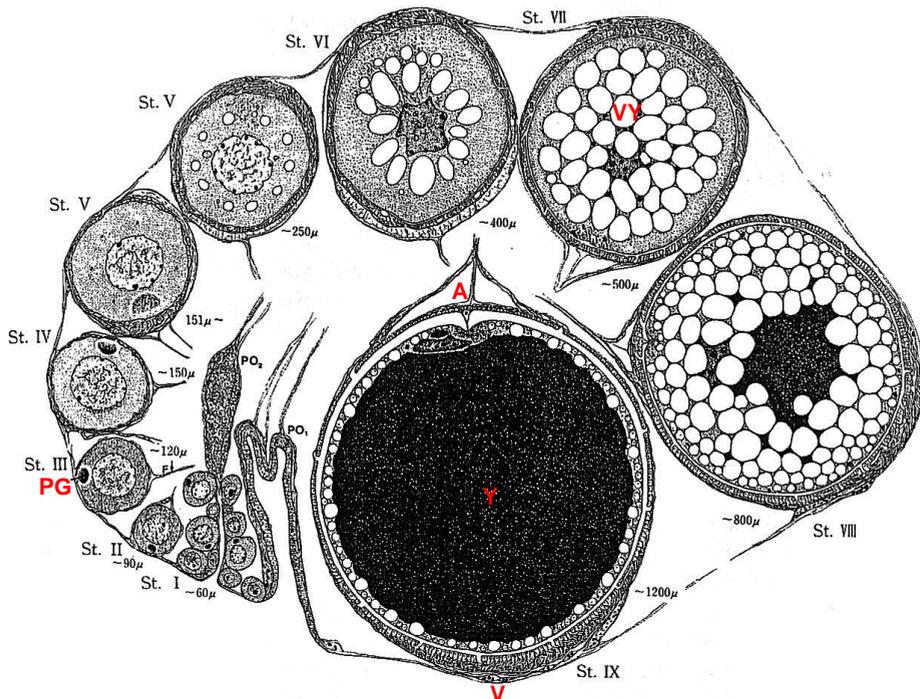


Fig. 8. Las fases del desarrollo del ovocito de Medaka. A: polo animal; V: polo vegetal; Y: yema; VY: vesícula de la yema; PG: plasma germinal. (Modificado de Kinoshita y cols., 2009).

2.3.B. Espermatogénesis en Medaka.

A los 20 ó 30 días tras la eclosión se inicia la proliferación de las espermatogonias tipo A, coincidiendo con la expresión del gen *Dmrt1*, implicado en esta proliferación (Kobayashi y cols., 2004). Las espermatogonias tipo A, que son las células germinales más indiferenciadas, se localizan en la periferia de la región seminífera del testículo (Satoh, 1974).

Las espermatogonias tipo A se diferencian a espermatogonias tipo B, pero también mantienen el nicho de células progenitoras. Estas espermatogonias tipo B son células en diferenciación que se dividen unas diez veces antes de diferenciarse a espermatocitos. Los espermatocitos maduran a espermátidas y finalmente se forman los espermatozoides.

3. Factores reguladores de la pluripotencialidad y diferenciación en el desarrollo embrionario temprano: Nanog y Oct4.

Diversos FT controlan el mantenimiento o la pérdida de la pluripotencialidad en los blastómeros del embrión temprano *in vivo* y en las ESC *in vitro*. Este control sobre la pluripotencialidad regula la diferenciación de las distintas células y tejidos durante el desarrollo. Su estudio es importante no sólo para entender la biología de los blastómeros, sino también para entender como funcionan las ESC y manipularlas adecuadamente con una finalidad terapéutica.

Los tres FT claves en el control de la pluripotencialidad de las ESC son Nanog, Oct4 y Sox2 (Fig. 9; Nichols y cols., 1998; Avilion y cols., 2003; Chambers y cols., 2003; Mitsui y cols., 2003; Torres y Watt, 2008). Junto a estos tres FT claves, en los últimos años se han descrito otras proteínas también implicadas en regular la pluripotencialidad y la autorrenovación de las ESC, como son LIF/gp130/Stat3 (Burdon y cols., 2002), FoxD3 (Hanna y

cols., 2002), Sall4 (Sakaki-Yumoto y cols., 2006; Zhang y cols., 2006) y Dax1 (Niakan y cols., 2006).

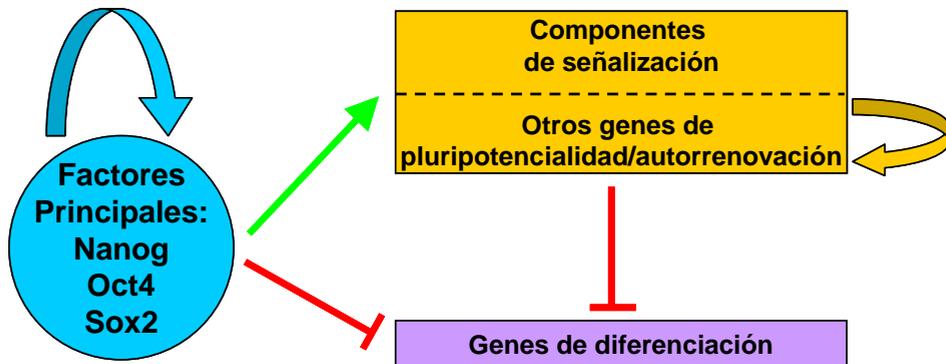
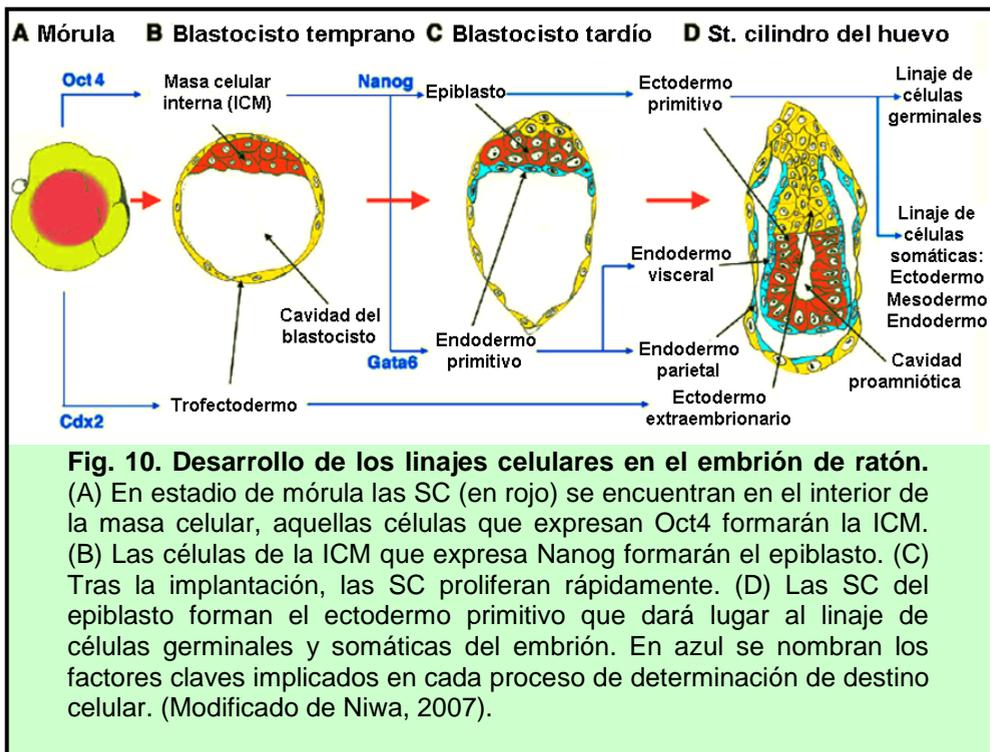


Fig. 9. Regulación de la pluripotencialidad en ESC. Los factores principales, Nanog, Oct4 y Sox2, activan sus genes diana en las ESC que codifican para genes de rutas de señalización y otros factores implicados en pluripotencialidad y autorrenovación. A su vez, inhiben genes que promueven la diferenciación de las ESC. Estos genes de diferenciación son inhibidos también por los genes de pluripotencialidad y autorrenovación regulados por los genes principales. Los genes principales y los genes de pluripotencialidad/autorrenovación presentan procesos de autorregulación y regulación cruzada entre ellos. (Modificado de Orkin, 2005).

Conocer el funcionamiento de estos FT es fundamental para entender como se regula la pluripotencialidad y diferenciación de las ESC. Este conocimiento de la regulación de las ESC permitirá aprovechar su potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades (Johnson y cols., 2008).

La regulación de la pluripotencialidad por Nanog y Oct4 se ha descrito principalmente en mamíferos, y el análisis funcional *in vivo* de estos FT se ha centrado en el modelo murino (Nichols y cols., 1998; Chambers y cols., 2003; Mitsui y cols., 2003). En el embrión preimplantacional de ratón (*Mus musculus*), la primera determinación de destino celular se da en el estadio de mórula. En este estadio, las células que mantienen la expresión

de *Oct4* formarán la masa celular interna (ICM, del inglés *Inner Cell Mass*), mientras que las células que pierden la expresión de *Oct4* se diferencian hacia trofoectodermo (Fig. 10A). En el estadio de blastocisto sucede la segunda determinación de destino celular, esta vez mediada por *Nanog*. En este estadio, sólo las células que expresan *Nanog* en la ICM continúan siendo pluripotentes, mientras que las células que no expresan *Nanog* se diferencian a endodermo primitivo (Fig. 10B).



Para poder entender el papel que desempeñan *in vivo* estos FT en el control de la pluripotencialidad, así como la regulación de los mismos, es interesante introducir nuevos animales modelo que complementen al modelo murino. Un animal modelo apropiado para este estudio sería el pez Medaka, por las múltiples ventajas que presenta (ver apartado 2.1. de Introducción).

3.1. Nanog y la regulación de la pluripotencialidad.

Nanog es un FT de tipo homeodominio (HD) que actúa junto a Oct4 y Sox2 regulando la pluripotencialidad. Sin embargo, Nanog es el único de los tres cuya sobreexpresión puede sustituir la necesidad del factor inhibidor de leucemia (LIF, del inglés *Leukemia Inhibitory Factor*) en ESC de ratón (Chambers y cols., 2003; Mitsui y cols., 2003).

En los embriones de ratón nulos para *Nanog*, la falta de este FT produce letalidad (Mitsui y cols., 2003). Además, como se ha dicho en el párrafo anterior, la expresión constitutiva de Nanog en las ESC hace posible la autorrenovación independiente de LIF sin producirse la pérdida del estado pluripotente (Chambers y cols., 2003). Sin embargo, en cultivos de ESC, Nanog presenta un patrón de expresión en mosaico y las células que no expresan Nanog en estos cultivos mantienen la morfología de célula indiferenciada con capacidad para generar células Nanog positivas (Chambers y cols. 2007). Asimismo, estas células nulas para Nanog pueden autorrenovarse y son pluripotentes, lo que sugiere que Nanog no es necesario para mantener la pluripotencialidad (Chambers y cols. 2007). Por otra parte, tras la fusión celular entre una ESC y una SC neural, esta última adopta un estado pluripotente debido a la acción de Nanog (Silva y cols., 2006).

Nanog se expresa en las gónadas en desarrollo de ratones y pollos (*Gallus gallus*) pero la función que desempeña en su desarrollo no se ha descrito (Fig. 11; Chambers y cols., 2003; Yamaguchi S. y cols., 2005; Cañón y cols., 2006; Laval y cols., 2007). Además, en las quimeras de ratón formadas por células *Nanog*^{-/-} y mórulas de células salvajes, las células *Nanog*^{-/-} contribuyen a todos los tejidos, pero en el borde genital sólo son detectables en las células somáticas, no en las CPG (Chambers y cols., 2007).

En conjunto, estos resultados obtenidos con el estudio de ESC y el estudio embrionario en ratón, no resuelven de manera definitiva cuál es la

función endógena de Nanog, por lo que es interesante introducir nuevos modelos animales para complementar al modelo murino.

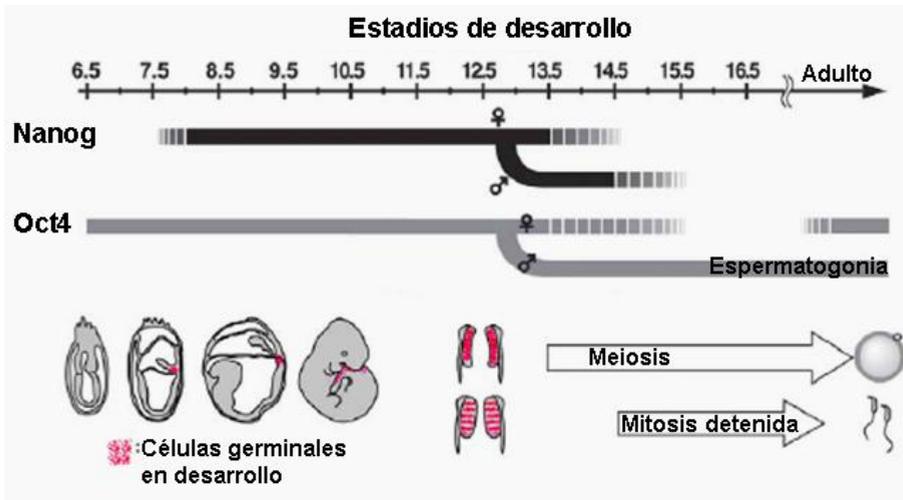


Fig. 11. Patrón de expresión temporal de *Nanog* y *Oct4* durante el desarrollo de las gónadas de ratón. La expresión de *Nanog* en las CPG proliferativas y migradoras aparece en estadio E7.75 y continúa a lo largo del desarrollo de las CPG, pero tras llegar a las gónadas en desarrollo, *Nanog* se inhibe en las CPG masculinas detenidas en mitosis y en las CPG femeninas en meiosis (Yamaguchi S. y cols., 2005). La expresión de *Oct4* se detecta exclusivamente en las CPG a partir de E7.5 y mantiene la expresión durante su proliferación y migración hasta el borde genital. En las hembras, *Oct4* se inhibe en las CPG cuando entran en meiosis y vuelve a expresarse tras el nacimiento. En machos, la expresión de *Oct4* se mantiene en las células germinales durante todo el desarrollo fetal y tras el nacimiento en los monocitos proliferativos y en las espermatogonias indiferenciadas (Kehler y cols., 2004). La localización de las células germinales (marcadas en rosa) se detalla en los dibujos inferiores. (Modificado de Yamaguchi S. y cols., 2005).

3.2. *Oct4* y la regulación de la pluripotencialidad.

Oct4, también conocido como *Pou5f1*, es un FT con dominio POU de la clase V que se expresa en células embrionarias pluripotentes y en células de la línea germinal. *Oct4* actúa en conjunto con *Nanog* y *Sox2* para

regular la pluripotencialidad y proliferación de las ESC (Boyer et al., 2005; Loh et cols., 2006; Wang et cols., 2006).

En el embrión de mamíferos, *Oct4* es necesario para el mantenimiento de la pluripotencialidad de la ICM y para la supervivencia de las células germinales (Rosner et cols., 1990; Schöler et cols., 1990; Nichols et cols., 1998; Pesce et cols., 1998). Los embriones nulos para *Oct4* son letales en los estadios de preimplantación, lo que sugiere que *Oct4* es necesario para el establecimiento de la pluripotencialidad de la ICM (Nichols et cols., 1998).

Los estudios en cultivos de SC confirman el papel de *Oct4* en la regulación de la pluripotencialidad y la diferenciación en función de sus niveles de expresión (Niwa et cols., 2000).

Oct4 se expresa en las CPG y en las gónadas de ratón (Fig. 11; Rosner et cols., 1990; Schöler et cols., 1990; Pesce et cols., 1998). También se ha detectado la expresión de *Oct4* en las CPG humanas (Anderson et cols., 2007). La inactivación condicional de *Oct4* en las CPG de ratón induce la apoptosis de las CPG, pero no su diferenciación, lo que sugiere que *Oct4* es necesario para la supervivencia de las CPG (Kehler et cols., 2004).

En Zebrafish, el gen *spg/pou2*, que es el ortólogo de *Oct4*, es necesario para la morfogénesis durante la pregástrula, para la formación de la frontera entre el cerebro medio y el posterior (MHB del inglés *Mid-Hind-Boundary*; Belting et cols., 2001; Burgess et cols., 2002), la especificación del endodermo (Lunde et cols., 2004; Reim et cols., 2004) y participa en la formación del eje dorso-ventral (D-V; Reim y Brand, 2006). Aunque algunas de estas funciones se han conservado en el ratón, otras no han sido descritas en mamíferos, por lo que pueden constituir nuevas funciones de *Oct4* adquiridas durante la evolución de los peces o funciones perdidas durante la evolución de los mamíferos. Por ejemplo, *Oct4* no se expresa en el MHB de ratones, por lo que no parece estar implicado en la especificación del MHB. Además, los ratones donde *Oct4* se ha inactivado de manera condicional en los PN presentan cerebros de morfología normal

(Lengner y cols., 2007). Otra diferencia entre *Oct4* en ratón y *spg/pou2* en Zebrafish es que no se ha detectado la expresión de *spg/pou2* en las CPG en desarrollo ni en las gónadas adultas de Zebrafish. Por tanto, la expresión de *spg/pou2* en el ovocito maduro puede deberse a la acumulación de su RNA mensajero (mRNA, del inglés *Messenger Ribonucleic Acid*) para su utilización en las etapas tempranas del desarrollo antes de la transición de blástula media (Marlow y Mullins, 2008).

En vista de los datos descritos sobre *Oct4* en mamíferos y en Zebrafish, puede ser interesante el estudio en otros modelos animales para complementar a los modelos ya estudiados y poder determinar claramente la función endógena de *Oct4*.

3.3. Nanog y Oct4 en Medaka.

Las redes de genes reguladores de la pluripotencialidad se han centrado principalmente en modelos animales mamíferos porque, hasta hace algunos años, no existía la evidencia de que estas redes de genes estuviesen actuando en animales no mamíferos. Sin embargo, recientemente, se han publicado las secuencias de *Nanog* y *Oct4* en especies de vertebrados no mamíferos, demostrando que no son exclusivos de mamíferos.

En el pollo, la secuencia de *Nanog* y la de *Oct4* han sido descritas (Cañón y cols., 2006; Laval y cols., 2007). La función de *Nanog* en pollo ha sido caracterizada *in vitro* en cultivos de ESC de pollo y de ratón, mostrando que tanto *Nanog* de pollo como *Nanog* de ratón comparten una homología funcional en las ESC (Laval y cols., 2007). Estos resultados se han confirmado también en *Xenopus*, donde se han descrito tres genes homólogos de *Oct4* y uno de ellos, llamado *XIPou91*, presenta la misma función que *Oct4* de mamíferos en las ESC, al mantener la condición de troncalidad celular durante el desarrollo temprano (Morrison y Brickman,

2006). Sin embargo, en ninguno de los dos casos, pollo y *Xenopus*, se han descrito las funciones *in vivo* de *Nanog* y *Oct4*.

En peces se han caracterizado ESC con capacidad de autorrenovación tanto en Zebrafish como en Medaka (Sun y cols., 1995; Hong y cols., 1996). Además, la activación de *Oct4* murino es capaz de eliminar la diferenciación espontánea de ESC de Medaka (Hong y cols., 2004) al igual que hace en las ESC de ratón (McWhir y cols., 1996). Por otra parte, se ha identificado una secuencia homóloga de *Oct4* de mamíferos en Medaka, *O1-pou5f1* (Thermes y cols., 2006), y en Zebrafish, *pou2/spg* (Burgess y cols., 2002). Sin embargo, el estudio de la red de pluripotencialidad en peces se ha visto limitada por dos motivos. En primer lugar, hasta el presente trabajo (Camp y cols., 2009) no se había descrito un ortólogo de *Nanog* en peces. En segundo lugar, *spg/pou2* de Zebrafish presenta funciones diferentes en comparación con el papel que desempeña *Oct4* en mamíferos (ver apartado 3.2. de Introducción), y *spg/pou2* no puede mantener las ESC murinas, mientras que *XIPou91* de *Xenopus* sí puede mantenerlas (Morrison y Brickman, 2006). Además, en el caso de *O1-pou5f1* de Medaka, no se han hecho estudios funcionales ni se disponía de un estudio detallado de expresión hasta el presente trabajo (ªSánchez-Sánchez y cols., 2010).

3.3.A. Identificación de Nanog en Medaka.

Previo al estudio de la expresión y función de *Nanog* en Medaka que se presenta en este trabajo, se identificó la secuencia de la proteína *Nanog* en Medaka y en otras especies de peces como Zebrafish (Camp y cols., 2009). La identificación se realizó con la colaboración del Dr. García-España (IIS Pere Virgili, Tarragona, España) y el Dr. DeSalle (Sackler Institute for comparative genomics, NY, EEUU).

Para la identificación de las secuencias de *Nanog* en peces, se utilizaron como base las secuencias conocidas de *Nanog* en mamíferos

(Camp y cols., 2009). El alineamiento de las secuencias de Nanog en peces y tetrápodos incluyendo mamíferos mostró una conservación de secuencia baja. Sin embargo, la conservación de la secuencia de Nanog en el HD era más elevada. Por otra parte, los aminoácidos implicados en la preservación de la integridad estructural del HD (Asn51, Arg53, Leu16, Phe20, Val45, Trp48 y Phe49) estaban conservados en todos los HD de Nanog. Además, la comparación de la región del HD mostró que el HD de Nanog de tetrápodos era más parecido al HD de Nanog de peces que a los HD de otras proteínas relacionadas (Fig. 12). Conjuntamente con este dato, se detectaron cuatro residuos del HD de Nanog (Met31, Tyr42, Lys43, Thr47) que difieren de otros HD de proteínas relacionadas y que confieren al HD de Nanog la especificidad de unión (Jauch y cols., 2008). Estos residuos están también conservados en las secuencias de Nanog de peces (Fig. 12).

	10	20	30	40	50	60			
PECES	Ol. Nanog	KAKVRAAFSE	SQMSTLVQRF	SVQRYLAP	PAEMKNLADVT	GLTYKQVKTWF	QNRMMKLRRHQ	100%	
	Ga. Nanog	KGKMRAAFSE	SQMSTLVQRF	SIQRYLTP	PAEMKNLAEMT	GLTYKQVKTWF	QNRMMKLRRHQ	88%	
	Tn. Nanog	KAKARTAFSE	SQMNVLVHKF	SVQRYLTP	PAEMKNLAETV	GLTYKQVKTWF	QNRMMKLRRHQ	85%	
	Fr. Nanog	KAKARTAFSE	SQMNILVHKF	SIQRYLTP	PAEMKNLAETV	GLTYKQVKTWF	QNRMMKLRRHQ	83%	
	Dr. Nanog	PRKTRAAFSE	EQMNALVNR	RFNQRYLTP	PAEMKTLGAT	GLTYKQVKTWF	QNRMMKLRRHQ	76%	
TETRÁPODOS	Ac. Nanog	KVETRAAFSQKQLQI	LHHRFQNK	QKYLSPQ	QIRELAAALD	LTYKQIKTWF	QNRQRMKFKFTQ	48%	
	Gg. Nanog	KAKSRTAFSQEQQLQI	LHDFRFSQ	KYLSPHQ	QIRELAAALD	LTYKQIKTWF	QNRQRMKFKRQ	54%	
	Oa. Nanog	KSKIRTAFTQ	TQLNINRFR	QTKYLSPQ	QIRDLAMSLN	LTYKQIKTWF	QNRQRMKSKRDR	51%	
	Md. Nanog	KPKMRTVFSQAQLN	VNSRFVEQ	KYLSPQ	QIRNVAENLN	LTYKQIKTWF	QNRQRMKSKFWQ	48%	
	Mm. Nanog	KQKMRRTVFSQAQLC	ALKDRFQK	KYLSQL	QMQELSSILN	LSYKQIKTWF	QNRQRMKCKRWQ	42%	
	Hs. Nanog	KQKTRRTVFSSTQL	CVLNDRFQ	RQKYLSQL	QMQELSNILN	LSYKQIKTWF	QNRQRMKSKFWQ	41%	
PROTEÍNAS RELACIONADAS	Ol. Nkx25	RRKPRVLF	SQAQVYELER	RFKQORYLSA	PERDHLASV	LKLTPTQV	KINFQNRRYKCKRQR	32%	
	Hs. NKx25	RRKPRVLF	SQAQVYELER	RFKQORYLSA	PERDQLASV	LKLTSTQV	KINFQNRRYKCKRQR	32%	
	Gg. NKx25	RRKPRVLF	SQAQVYELER	RFKQORYLSA	PERDHLANV	LKLTSTQV	KINFQNRRYKCKRQR	32%	
	Hs/Gg/Dr. NKX32	KKRSRAAF	SHAQVFELE	RFNHQRYLSG	PERADLAASL	KLKLETQV	KINFQNRRYKTKRRQ	35%	
	Hs. VENTX	APRVRTAF	TMEQVRFLE	GVFQHQYLS	FLERKRLAREM	QLSEVQIKTWF	QNRMMKHKRQ	33%	
	Hs/Gg/Dr. BARX1	GRRSRTV	FTEQLMGL	EKRFKQYLS	TDPRI DLAE	SLGLS	QLQVKTWF	QNRMMKWKKIV	32%
	Hs/Gg. Msx1	NRKPRTP	FTTQALLAL	ERKFRQKQYLS	IPAE	RAEFSSLSL	LETQV	KINFQNRRAKAKFL	26%
	Ol. Msx4	NRKPRTP	FTTQALLAL	ERKFRQKQYLS	IPAE	RAEFSSLSL	LETQV	KINFQNRRAKAKFL	26%
	Hs. DLX4	LRKPRTTY	SSIQQLQH	INDFRFQHTQY	LALP	RAQLAAQL	GLTQ	QVKNFQNRKRSYKKLL	27%
	Dr. DLX4	IRKPRTTY	SSIQQLQAIN	DFRFQHTQY	LALP	RAQLAAQL	GLTQ	QVKNFQNRKRSYKKIM	28%

Fig. 12. Alineamiento de las secuencias de HD de Nanog en peces, tetrápodos y proteínas relacionadas. El alineamiento se ha realizado en función de la secuencia de Nanog en Medaka. El porcentaje de similitud a la secuencia de Medaka se indica en el lado derecho. Naranja: igual en todas las secuencias; verde: igual a Medaka; amarillo: parecido a Medaka. Asteriscos rojos: marcan los residuos específicos de Nanog. Las especies se nombran con las dos primeras letras de su nombre científico Ac: *Anolis carolinensis*; Dr: *Danio rerio*; Fr: *Fugu rubripes*; Ga: *Gasterosteus aculeatus*; Gg: *Gallus gallus*; Hs: *Homo sapiens*; Md: *Monodelphis domestica*; Mm: *Mus musculus*; Oa: *Ornithorhynchus anatinus*; Ol: *Oryzias latipes*; Tn: *Tetraodon nigroviridis*. (Modificado de Camp y cols., 2009).

El análisis filogenético del HD de las proteínas Nanog y otros HD de proteínas relacionadas demostró que los ortólogos de Nanog en peces estaban mucho más relacionados evolutivamente con los ortólogos de Nanog en mamíferos que a los HD de otras proteínas relacionadas (Fig. 13; Camp y cols., 2009).

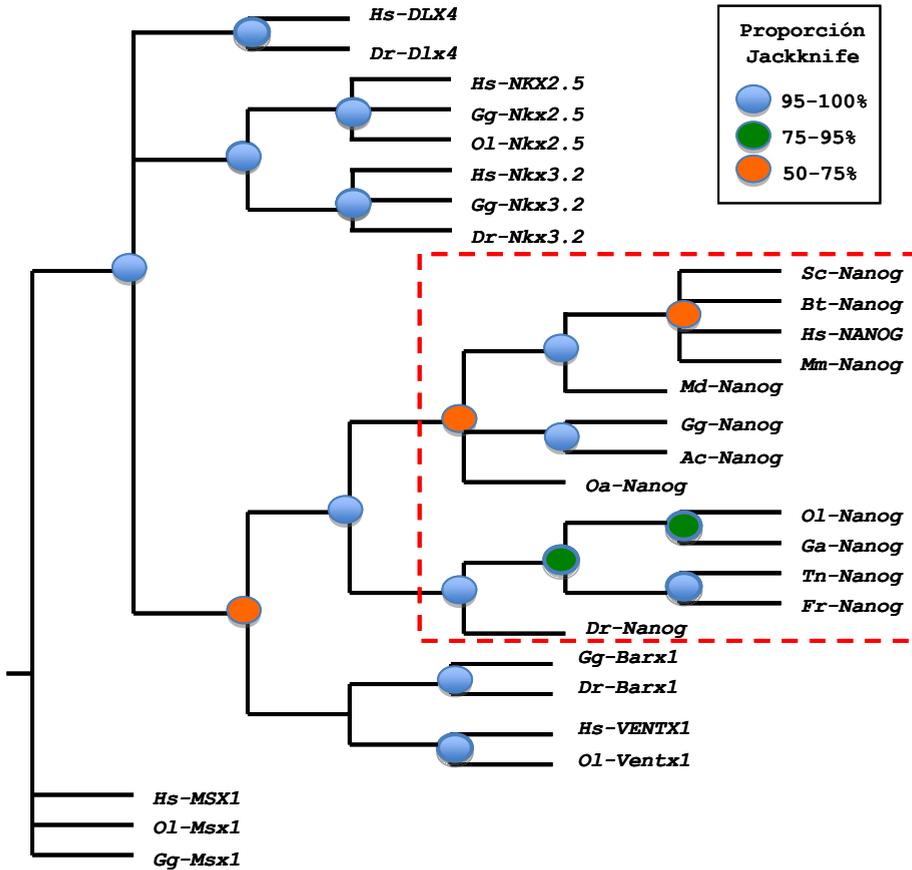


Fig. 13. Árbol filogenético de la secuencia de aminoácidos del HD de Nanog y proteínas relacionadas. Dentro del punteado rojo se localizan los HD de Nanog de las distintas especies estudiadas. El procedimiento de Jackknife se utilizó para calcular los porcentajes de los nodos del árbol (Camp y cols., 2009). Ac: *Anolis caronilensis*; Bt: *Bus taurus*; Dr: *Danio rerio*; Fr: *Fugu rubripes*; Ga: *Gasterosteus aculeatus*; Gg: *Gallus gallus*; Hs: *Homo sapiens*; Md: *Monodelphis domestica*; Mm: *Mus musculus*; Oa: *Ornithorhynchus anatinus*; Ol: *Oryzias latipes*; Sc: *Sus scrofa*; Tn: *Tetraodon nigroviridis*. (Modificado de Camp y cols., 2009).

Los resultados de estos y otros análisis *in silico* de las secuencias de Nanog demostraron que la secuencia potencial de Nanog en Medaka era el ortólogo de Nanog en mamíferos. Además, el análisis determinó que hay una única copia de Nanog en el genoma de Medaka, y se localiza en el ch. 20 (Camp y cols., 2009). La secuencia de Nanog de Medaka se depositó en GenBank y se puede consultar con referencia FJ436046.

3.3.B. Identificación de Oct4 en Medaka.

La secuencia de Oct4 en Medaka ya está identificada (Thermes y cols., 2006) y se puede consultar en la base de datos GenBank con referencia AY639946.

Mediante la colaboración con el Dr. García-España (IIS Pere Virgili, Tarragona, España) se investigó si existía una duplicación de *Oct4* en el genoma de Medaka, pero no se encontraron copias adicionales del gen. Además, el alineamiento entre la secuencia predicha de la proteína de Oct4 en Medaka con otras proteínas Oct4 de humano, ratón, *Xenopus* y Zebrafish mostró que la conservación era mucho más elevada en el dominio POU que cuando se tiene en cuenta toda la secuencia de la proteína (Tabla 2; ^aSánchez-Sánchez y cols., 2010).

Tabla. 2. Porcentaje de similitud de las secuencias de Oct4 en distintas especies. El primer número indica la similitud en la secuencia entera de las proteínas de Oct4 y el número entre paréntesis indica el porcentaje de similitud en la secuencia del dominio POU de las proteínas Oct4. (Modificado de ^aSánchez-Sánchez y cols., 2010).

Especies	<i>Mm</i>	<i>Xl</i>	<i>Ol</i>	<i>Dr</i>
<i>Humano (Hs)</i>	72 (92)	34 (64)	34 (69)	32 (68)
<i>Ratón (Mm)</i>		31 (64)	32 (69)	31 (68)
<i>Xenopus (Xl)</i>			34 (70)	31 (68)
<i>Medaka (Ol)</i>				63 (94)

El análisis de la sintenia de *Oct4* en Medaka mostró que este gen estaba localizado cerca de los genes *Clic1* y *Fu7/Q5FP2_ORYLA* al igual que el gen *pou2/spg* en Zebrafish (Fig. 14; ^aSánchez-Sánchez y cols., 2010). La relación de sintenia entre *pou2/spg* de Zebrafish y los genes *Oct4* de *Xenopus*, pollo y ratón ya se habían descrito previamente (Burgess y cols., 2002; Morrison y Brickman, 2006; Laval y cols., 2007).

Por tanto, los análisis realizados confirmaron que la secuencia descrita para *Oct4* en Medaka era la ortóloga del gen *Oct4* en mamíferos.

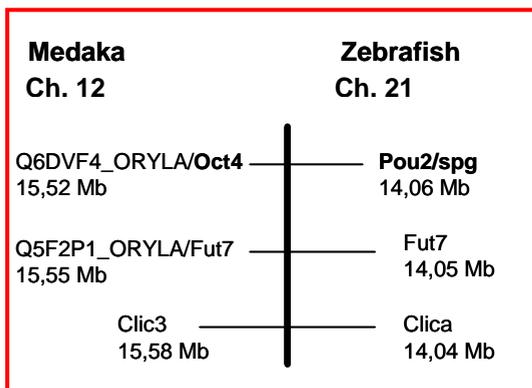


Fig. 14. Relación de sintenia de *Oct4*. Relación de sintenia entre el ch. 12 de Medaka y el ch. 21 de Zebrafish (Modificado de ^aSánchez-Sánchez y cols., 2010).

4. Factores reguladores de la proliferación y diferenciación en el desarrollo embrionario tardío: La vía de señalización de Wnt.

La vía de señalización extracelular de Wnt, conocida en *Drosophila* como Wingless, regula múltiples procesos del desarrollo embrionario tanto en vertebrados como en invertebrados (Cadigan y Nusse, 1997; Wodarz y Nusse, 1998; Hobmayer y cols., 2000; Peifer y Polakis, 2000). Esta vía de señalización controla aspectos del desarrollo tales como proliferación, diferenciación, polaridad celular, migración celular o el crecimiento axonal. Por otra parte, la pérdida o la activación inapropiada de esta vía altera los procesos de morfogénesis, destino celular y mitogénesis, por lo que esta vía está implicada en la aparición de cáncer en humanos, como por ejemplo el cáncer de colon (Polakis, 2000). Además, la desregulación de esta vía también está asociada a enfermedades degenerativas (Nusse, 2005; Luo y cols., 2007).

Los genes *Wnt* codifican para una amplia familia de glicoproteínas secretadas ricas en cisteínas con actividad morfogenética. Estos genes están altamente conservados en la evolución. Se han identificado 19 genes *Wnt* en vertebrados y 7 genes *wg* en *Drosophila*. La pertenencia a la familia Wnt se ha definido por la similitud en la secuencia de aminoácidos de la proteína en lugar de por las propiedades funcionales. Por ello, las distintas proteínas Wnt están asociadas a diferentes funciones y a diferentes vías de señalización reguladas por ellas (Huelsenken y Behrens, 2002; Nusse, 2005; Gordon y Nusse, 2006).

La investigación en *Drosophila* y vertebrados ha mostrado que la señalización de Wnt se transduce de dos formas distintas, una de ellas es la vía canónica o vía de Wnt/ β -catenina (β Cat) y la otra es la vía no canónica o vía independiente de β Cat (Montcouquiol y cols., 2006). En la vía canónica, la activación por Wnt lleva a la estabilización del factor β Cat, que entra en el núcleo para regular la transcripción de los genes diana de la vía de Wnt

(Fig. 15A). Por otra parte, se han descrito dos vías no canónicas de señalización de Wnt independientes de β Cat, que son la vía del calcio (Fig. 15B) y la vía de polaridad celular planar (PCP; Fig. 15C). Las vías no canónicas de Wnt están relacionadas con la función de movimiento celular y polaridad celular (Montcouquiol y cols., 2006).

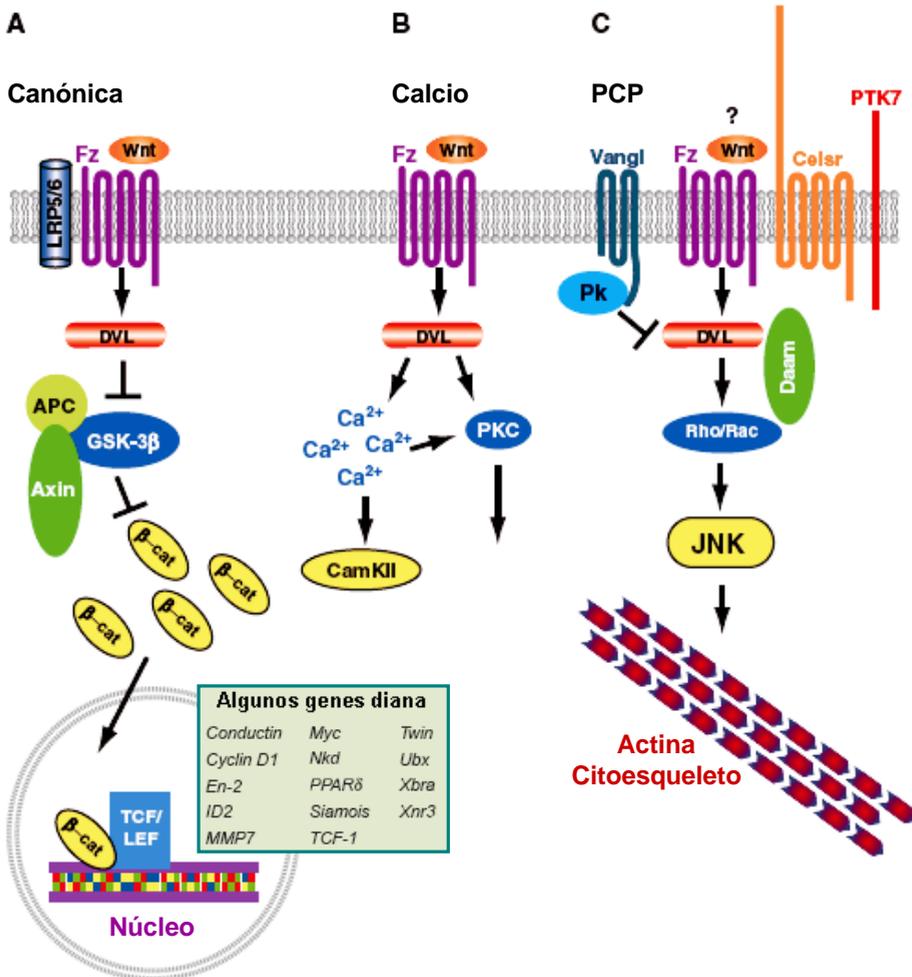


Fig. 15. Las vías de señalización de Wnt. (A) Vía canónica de Wnt a través de la β Cat. (B) Vía del Calcio (no canónica) de Wnt. (C) Vía PCP (no canónica) de Wnt. En las tres vías, Wnt se une al receptor de membrana Frizzled (Fz), lo que activa intracelularmente a la proteína Disheveled (Dvl). En esta imagen se ha utilizado la nomenclatura de vertebrados. (Modificado de Huelsken y Behrens, 2002; Montcouquiol y cols., 2006).

4.1. La vía canónica de Wnt.

El proceso que caracteriza a la vía canónica de Wnt es la estabilización en el citoplasma de β Cat y su subsecuente translocación al núcleo, donde actúa como FT (Fig. 15A; Gordon y Nusse, 2006).

Si la vía de Wnt está inactiva, debido a la ausencia de la proteína Wnt extracelular, se produce la fosforilación de β Cat por la quinasa de la glicógeno sintasa 3 β (GSK3 β) en sus residuos serina/treonina 33, 37 y 41. La GSK3 β forma un complejo destructor de la β Cat junto con Axina y APC (del inglés *Adenomatous Polyposis Coli*), este complejo mantiene niveles bajos de β Cat citoplasmática. La fosforilación de β Cat en los residuos serina/treonina 33 y 37 produce la ubiquitinación de la β Cat por β TrCP (del inglés *β -Transducin repeat-Containing Protein*) y su marcaje para ser degradada por el proteosoma (Zeng y cols., 1997; Huelsken y Behrens, 2002).

La vía de Wnt se activa cuando la proteína Wnt extracelular se une a un complejo receptor de membrana formado por siete receptores transmembrana Frizzled (Fz) y la proteína LRP (del inglés *Low density lipoprotein receptor-Related Protein*). Al activarse la vía, Dishevelled (Dvl) inhibe el complejo formado por Axina-APC-GSK3 β al desplazar la GSK3 β de la Axina. De este modo, se bloquea la degradación de β Cat, la cual se estabiliza acumulándose en el citoplasma, y finalmente es traslocada al núcleo. En el núcleo, la β Cat se asocia a los FT TCF/LEF1 (del inglés *T Cell-specific transcription Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor 1*) formando un complejo que regula la expresión de sus genes diana (Fig. 15A; Huelsken y Behrens, 2002).

La gran mayoría de genes diana regulados por la vía canónica de Wnt están implicados en la regulación de la proliferación, el ciclo celular, la apoptosis o la determinación del destino celular. Algunos de estos genes son por ejemplo *Ciclina D1 (CcnD1)*, que regula el ciclo celular (Shtutman y cols., 1999; Tetsu y McCormick, 1999); *ID2* (del inglés *Inhibitor of DNA*

binding 2), que regula el ciclo celular y diferenciación celular (Lasorella y cols., 1996; Memezawa y cols., 2007); *Myc*, que regula procesos de proliferación y apoptosis (Amati y cols., 1998; Prendergast, 1999; You y cols., 2002; Singh y Dalton, 2009), *Siamois* y *Twin*, que regulan procesos tempranos de determinación celular (Laurent y cols., 1997; Fan y cols., 1998; Kodjabachian y Lemaire, 2001; Ishibashi y cols., 2008). Al ser genes implicados en los procesos generales del desarrollo, la desregulación de la vía canónica de Wnt desencadena la aparición de enfermedades humanas tales como cáncer (Polakis, 2000), lo que convierte a esta vía de señalización en una diana potencial para el descubrimiento de fármacos oncológicos (Janssens y cols., 2006).

Otros genes diana de β Cat son aquellos que codifican para proteínas que participan en la propia vía de señalización de Wnt, y que además del papel que desempeñan en la vía canónica, actúan también como reguladores de la misma. Son por ejemplo los genes *Conductina/Axina2*, cuya expresión inhibe a la propia vía de Wnt mediante el aumento del complejo de degradación de la β Cat (Lustig y cols., 2002) y *Lef1* que activa la vía al actuar como cofactor de la β Cat (Filali y cols., 2001).

4.2. La vía de señalización de Wnt en el sistema nervioso central.

En el SNC, la vía de señalización canónica de Wnt está implicada en el desarrollo del cerebro, la médula espinal y la ampliación de numerosas subpoblaciones de neuronas motoras y sensoriales.

Una de las funciones morfogénicas mejor estudiadas de la vía de Wnt en vertebrados es su implicación en la especificación neuronal del tubo neural dorsal. Durante la neurogénesis, los PN adquieren su identidad neuronal en función de su posición D-V en el tubo neural en desarrollo. En este proceso, están implicados dos centros organizadores del tubo neural. Por un lado, en la parte ventral del tubo neural se encuentra la placa del

suelo, que segrega Shh (Sonic Hedghog). El otro centro organizador es la placa del techo, que está en la zona dorsal y segrega BMP (del inglés *Bone Morphogenetic Protein*) y Wnt, los cuales generan un gradiente opuesto al de Shh. Se ha visto que *Wnt1* y *Wnt3a* son necesarios para la expansión de los PN dorsales y además, también son necesarios para la diferenciación de los PN a interneuronas D1 (Fig. 16; Ikeya y cols., 1997; Muroyama y cols., 2002; Chizhikov y Millen, 2005; Ciani y Salinas, 2005).

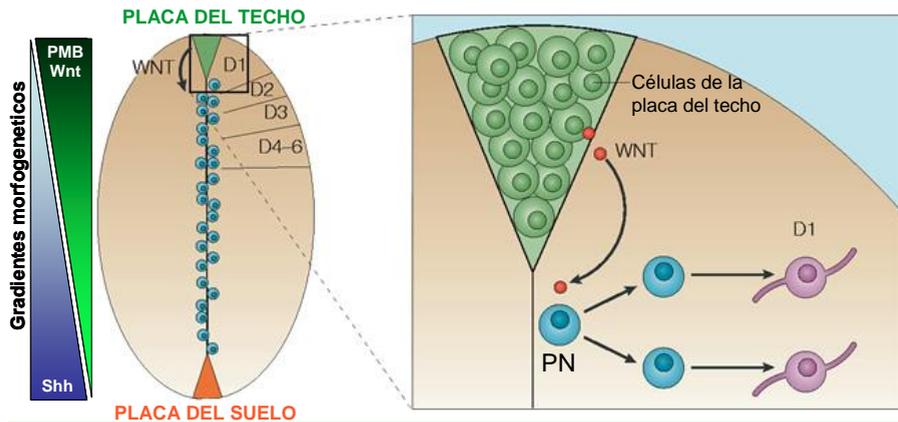


Fig. 16. La vía de Wnt en el eje D-V del tubo neural. El gradiente morfogenético D-V de Wnt en el tubo neural regula la proliferación de los PN dorsales y además induce la diferenciación a interneuronas D1 mediante la interacción con los morfógenos Shh y BMP. (Modificada de Ciani y Salinas, 2005).

Además de la función de Wnt en la especificación neuronal D-V, esta vía también participa en el establecimiento del patrón neural antero-posterior (A-P) del tubo neural (Kiecker y Niehrs, 2001). En este caso, la fuente emisora de Wnt se localiza en el eje posterior especificando los destinos celulares posteriores. Los antagonistas de Wnt como Dickkopf 1 (*Dkk1*) y Cerberus restringen la señalización de Wnt en las estructuras anteriores (Fig. 17A). En *X. laevis*, el gen *Xldax*, que es un inhibidor de la vía canónica de Wnt, reduce la expresión de los marcadores neurales anteriores (Michiue y cols., 2004). Además, en el eje A-P, Wnt también genera gradientes locales para regionalizar el tubo neural. Es el caso de la

MHB, donde Tlc, que es un antagonista de Wnt al ser un homólogo de la proteína secretada Fz, se expresa anteriormente regulando la formación de las células telencefálicas (Fig. 17B; Houart y cols., 2002).

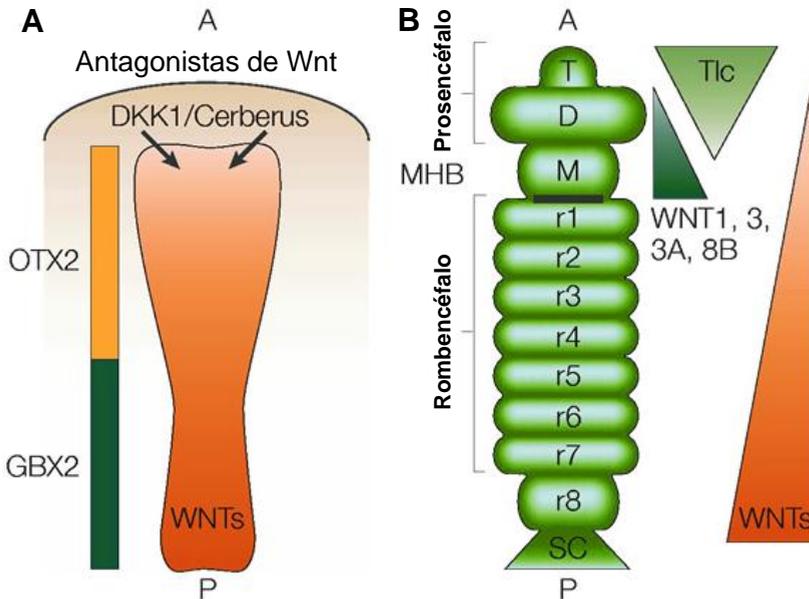


Fig. 17. La vía de Wnt en el eje A-P del tubo neural. (A) Vista dorsal del tubo neural mostrando el gradiente de señalización de Wnt desde la zona posterior (P) a la anterior (A) para especificar los destinos celulares posteriores. Los marcadores Otx2 y Gbx2 se utilizan para determinar los destinos anteriores y posteriores respectivamente. (B) El gradiente local de Wnt en el MHB que especifica las células telencefálicas. D-diencefalo, R-rombocéfalo, SC-médula espinal, T-telencefalo. (Modificado de Ciani y Salinas, 2005).

Muchas de las proteínas de la vía de señalización canónica de Wnt implicadas en la especificación del tubo neural también están implicadas en la especificación del destino celular de la cresta neural (Lee y cols., 2004) y el palium dorsal en el cerebro anterior (Backman y cols., 2005).

Además de su función en la especificación celular, la vía de señalización de Wnt también regula la proliferación de células precursoras específicas en el cerebro en desarrollo (Panhuysen y cols., 2004). Las

proteínas Lef1/Tcf regulan la generación de las células granulosas del giro dentado y el desarrollo del hipocampo (Galceran y cols., 2000).

Por otra parte, la desregulación de la vía de señalización de Wnt se asocia a enfermedades neurodegenerativas o neuropsiquiátricas. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer, la neurotoxicidad de la proteína β -amilioide ($A\beta$) en las neuronas de hipocampo se ha asociado al incremento de los niveles de GSK3 β y la pérdida de β Cat (Garrido y cols., 2002). Otro ejemplo consiste en que muchas de las personas afectadas por esquizofrenia presentan niveles anormales de Wnt1 en el cerebro (Miyaoaka y cols., 1999). Finalmente, en la retinitis pigmentosa, que consiste en la degeneración de la retina por la pérdida progresiva de fotorreceptores, se ha detectado un aumento en la secreción de Sfrp2 (del inglés *Secreted Frizzled-Related Protein 2*), que es un inhibidor de Wnt, lo que indica que la pérdida de la vía de señalización de Wnt puede inducir la neurodegeneración de la retina (Jones y cols., 2000).

4.3. La vía canónica de Wnt en la retina neural.

4.3.A. Desarrollo temprano del ojo en Medaka.

El desarrollo del ojo en Medaka comienza durante la gastrulación al especificarse la placa neural anterior (Fig. 18A). En este estadio es necesario que las vías de señalización de BMP y Wnt, que promueven la caudalización del embrión, estén inhibidas (Wilson y Houart, 2004).

Al finalizar la gastrulación se especifica el campo del ojo. El campo del ojo está constituido por neuroectodermo, que formará la retina, y ectodermo superficial, que originará la lente y la córnea (Fig. 18B). En esta etapa del desarrollo del ojo están implicados los genes *Six3* y *Pax6* (Loosli y cols., 1999; Carl y cols., 2002).

La aparición de los dos primordios del ojo a partir de un único campo del ojo se debe a diversas vías de señalización que proceden del

tejido axial (Fig. 18C). Algunas de las vías implicadas son la vía de Nodal, la vía de Fgf (del inglés *Fibroblast Growth Factor*) y la vía de Shh (Take-Uchi y cols., 2003).

La morfogénesis del ojo se inicia durante la neurulación, donde se invaginan las vesículas ópticas a partir del cerebro anterior. En esta etapa es necesaria la función del gen *Rx3*. El mutante *eyeless* de Medaka, deficiente en *Rx3* funcional, no forma los ojos (Loosli y cols., 2001). Tras la formación de las vesículas ópticas, se da una invaginación que forma las copas ópticas, originando una estructura en dos capas compuestas por la retina neural y el epitelio pigmentario de la retina (EPR; Fig. 18D). Finalmente, la retina neural, que al evaginarse estaba formada por una única capa, comienza la diferenciación de los distintos tipos celulares de manera secuencial (Fig. 18E).

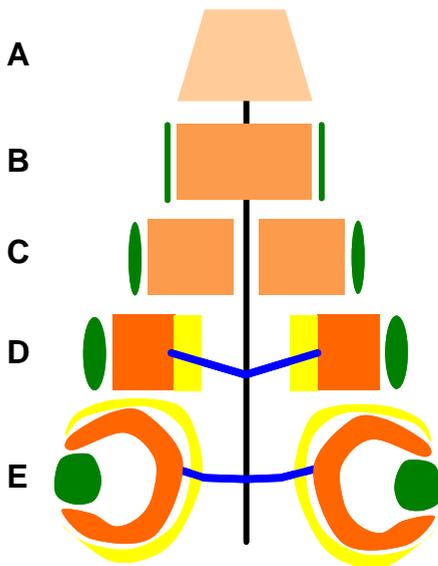


Fig. 18. Representación del desarrollo de la retina en Medaka.

La línea central es la línea media que divide el embrión en el eje izquierda-derecha, y además representa el eje temporal desde el desarrollo más temprano (arriba) al desarrollo más tardío (abajo). (A) Especificación de la placa neural anterior. (B) Determinación del campo del ojo (naranja), en verde se indica el tejido que dará las lentes. (C) Formación de los dos primordios de la retina. (D) Evaginación de la vesícula óptica y posterior formación de la copa óptica. En azul se indica el nervio óptico, en amarillo el EPR y la retina neural en naranja oscuro. (E) Diferenciación de la retina neural. (Modificado de Wittbrodt y cols., 2002).

4.3.B. La retina neural como modelo para el estudio del desarrollo del sistema nervioso central.

La retina es un modelo idóneo para el estudio de la proliferación y diferenciación durante el desarrollo del SNC en vertebrados por las múltiples ventajas que ofrece. Estas ventajas se basan en que la retina neural es una de las regiones del SNC más accesible y los siete principales tipos celulares que la forman están bien caracterizados, disponiéndose en una organización laminar característica conservada evolutivamente (Fig. 19; Ramón y Cajal, 1892).

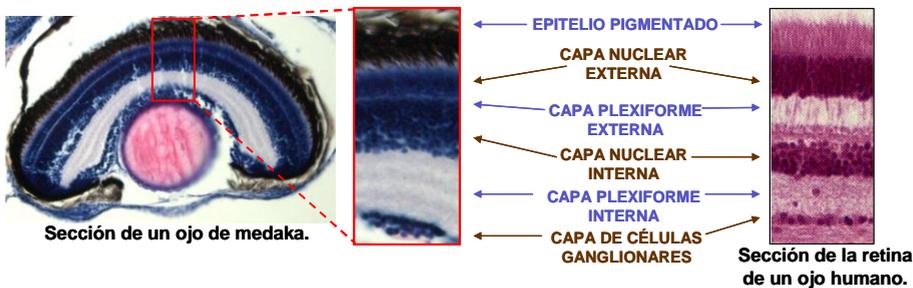


Fig. 19. Estructura de la retina de vertebrados. En vertebrados, la estructura de la retina neural está muy conservada evolutivamente, por lo que se puede observar la misma disposición celular en láminas tanto en el ojo de Medaka (izquierda en la imagen), como en el ojo humano (derecha en la imagen). Las secciones han sido teñidas con hematoxilina-eosina. La sección de la retina humana se ha tomado de Gilbert, 2006.

Los siete tipos celulares de la retina neural se componen de seis tipos de neuronas y uno de glía. Los tipos celulares son las células ganglionares de la retina (CGR), las células horizontales, las células amacrinas, las células bipolares, los conos, los bastones y la glía de Müller. Todos estos tipos celulares se forman a partir de un único tipo de progenitor neural de la retina (PNR) proveniente del ectodermo neural, mientras que las células que formarán la lente y la córnea provienen del ectodermo superficial.

El desarrollo de la retina neural se inicia con un periodo de divisiones mitóticas rápidas para expandir el número de PNR. Al igual que sucede en otros tejidos del SNC, los núcleos de los PNR migran arriba y abajo a través del tejido neural en desarrollo dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentren. La fase de síntesis (S) del ciclo celular se produce en la zona basal de la retina neural, mientras que en la zona apical, junto al EPR, sucede la fase de mitosis (M; Fig. 20; Martins y Pearson, 2007). Posteriormente, estos PNR se diferencian a uno de los siete tipos celulares de la retina.

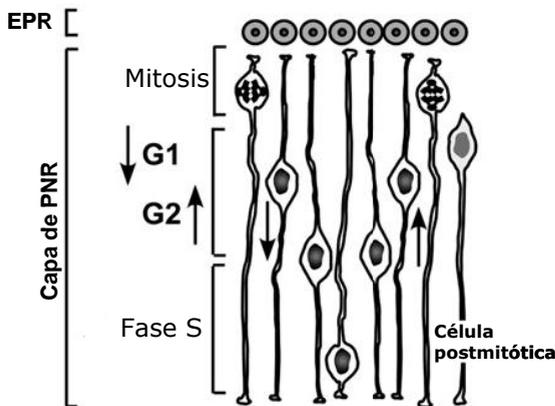


Fig. 20. Migración nuclear de los PNR según las distintas fases del ciclo celular. La fase M sucede en la zona apical de la capa de PNR, mientras que la fase S se da en la zona basal. La fase G1 sucede mientras el núcleo descende hacia la zona basal y la G2 cuando el núcleo asciende a la zona apical. (Modificado de Martins y Pearson, 2007).

La diferenciación de los distintos tipos celulares de la retina neural sigue una secuencia temporal muy conservada en las especies de vertebrados (Livesey y Cepko, 2001). En primer lugar se diferencian las CGR, seguidas de los conos, células horizontales y gran parte de las células amacrinas, posteriormente se forman las células bipolares, la glía de Müller y el resto de amacrinas, mientras que los bastones se forman durante todo el proceso de diferenciación (Fig. 21).

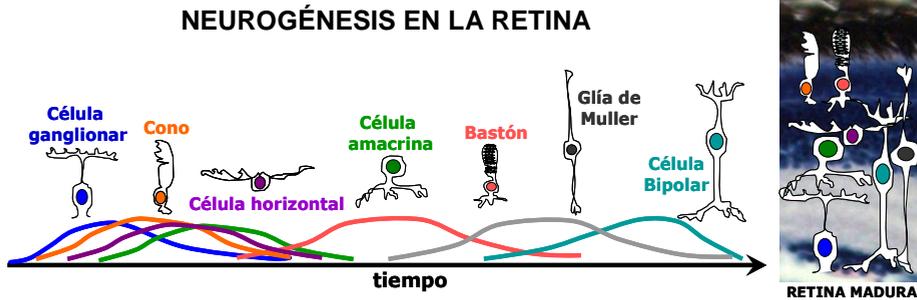


Fig. 21. Secuencia neurogénica en la retina neural de vertebrados. Durante el desarrollo embrionario, los PNR salen del ciclo celular diferenciándose en los distintos tipos celulares, siguiendo una secuencia temporal de diferenciación muy conservada en los vertebrados, donde las CGR son las primeras en formarse y las bipolares las últimas. (Modificado de Martins y Pearson, 2007).

En este proceso de desarrollo de la retina, los PNR se ven expuestos a una serie de factores tanto intrínsecos como extrínsecos que regulan la proliferación y posterior determinación del destino celular. En la retina de *Xenopus*, la salida temprana del ciclo celular promueve la diferenciación de los PNR lo que implica un programa intrínseco de diferenciación (Ohnuma y cols., 2002). Por otra parte, en pollo y otros vertebrados, la diferenciación de los PNR está controlada por señales extrínsecas tales como Fgf y Shh. En este modelo de diferenciación, Fgf promueve la expresión del gen proneural *Ath5* (Martínez-Morales y cols., 2005) en el nervio óptico y se propaga por Shh a lo largo de toda la retina (Masai y cols., 2000; Neumann y Nusslein-Volhard, 2000).

Una de las vías de señalización que ejerce su función extrínseca sobre la retina es la vía canónica de Wnt.

4.3.C. Expresión y función de Wnt en la retina de vertebrados.

Muchos componentes de la vía de señalización de Wnt se expresan en la retina durante el desarrollo del ojo, y la actividad de Wnt se ha detectado en la retina utilizando diversos reporteros, lo que sugiere que la

vía de señalización de Wnt participa en la regulación del desarrollo de esta estructura (Jasoni y cols., 1999; Esteve y cols., 2000; Jin y cols., 2002; Fuhrmann y cols., 2003; Kubo y cols., 2003; Liu y cols., 2003, 2006; Yokoi y cols., 2003; Van Raay y Vetter, 2004; Van Raay y cols., 2005; Veien y cols., 2005).

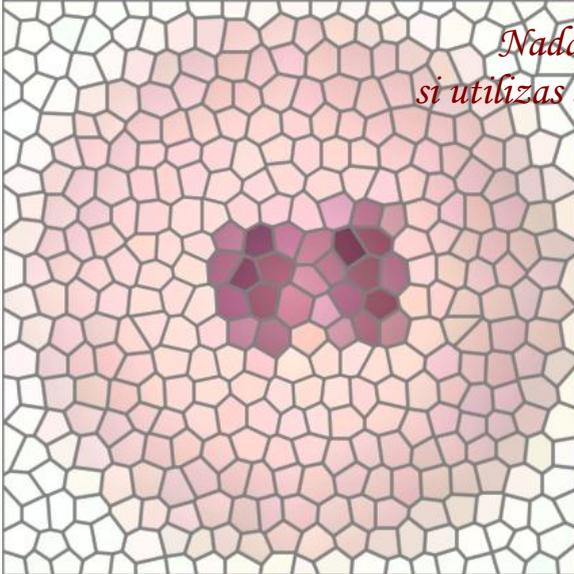
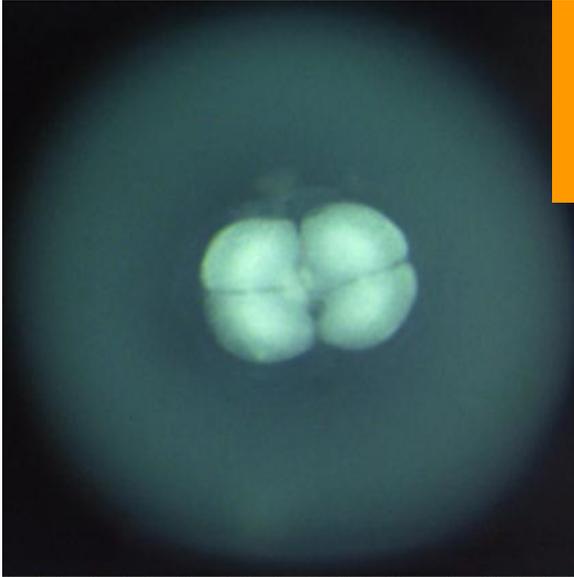
Si bien no se han hecho estudios de expresión para todos los genes Wnt, en Medaka, el gen *Wnt8b* se expresa en la retina en la zona central de la vesícula óptica en st. 22 y en la zona marginal ciliada (ZMC) dorsal en st. 24 (Yokoi y cols., 2003). En Zebrafish *Wnt2b* y *Wnt8* se expresan en el EPR y además hay muchos miembros de la familia de FT *Tcf*, mediadores de la señal de Wnt, que se expresan de manera dinámica en el ojo en desarrollo (Veien y cols., 2008). Por otra parte, *Dkk3* se expresa en la glía de Müller y en las CGR, donde actúa como un regulador positivo de la señalización de Wnt en la retina de ratón (Nakamura y cols., 2007). *Fz5* es otro de los miembros de la vía de Wnt que regula la diferenciación neural en la retina de *Xenopus*. La inhibición de *Fz5* en los estadios iniciales del desarrollo embrionario reduce la proliferación celular en la copa óptica e incrementa la diferenciación de lo PNR hacia glía de Müller (Van Raay y cols., 2005). Esto sugiere que *Fz5*, y por tanto, la vía de señalización de Wnt, tiene una función específica en la diferenciación celular durante la formación del ojo. Sin embargo, la inhibición de *Fz5* puede alterar procesos iniciales del desarrollo del ojo que afectarían al desarrollo de la retina. En Zebrafish, *Fz5* y *Wnt11* actúan suprimiendo la señalización de Wnt y facilitan la formación del campo óptico (Cavodeassi y cols., 2005).

Aunque las diferentes funciones de la vía de Wnt en la retina pueden ser atribuidas a distintos miembros de la familia Wnt, también puede suceder que múltiples funciones estén reguladas por un único componente de la familia, como es el caso de *Wnt2b*. En la ZMC, *Wnt2b* regula la proliferación de las células de la lente (Jasoni y cols., 1999) y de las células madre de la retina adulta (RSC, del inglés *Retinal Stem Cell*; Kubo y cols., 2003). *Wnt2b* también induce proliferación de los PNR tempranamente,

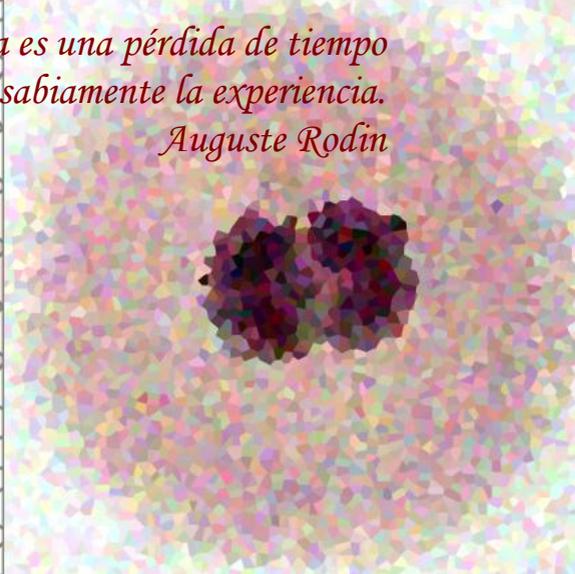
inhibiendo su diferenciación (Kubo y cols., 2005). Sin embargo, en otros experimentos, *Wnt2b* induce diferenciación hacia destinos periféricos del ojo, el cuerpo ciliado y el iris (Cho y Cepko, 2006). También se ha descrito que la señalización canónica de Wnt promueve la proliferación de los PNR y la regeneración de explantes dañados de retina en mamíferos (Osakada y cols., 2007). Más recientemente, se ha demostrado que la vía de señalización de Wnt regula la proliferación en las RSC de los ojos de renacuajos de *Xenopus* (Denayer y cols., 2008).

Por tanto, las publicaciones asignan diferentes funciones a la vía de señalización de Wnt durante el desarrollo del SNC y más concretamente de la retina neural. Sin embargo, hay discrepancias en los resultados tales como los descritos para la función del gen *Wnt2b*. Muchas de estas contradicciones pueden ser el resultado de comparar la función de la vía de Wnt en diferentes momentos del desarrollo o a las distintas técnicas experimentales utilizadas, particularmente, en el caso del uso de técnicas *in vitro*. Por tanto, es importante conocer el papel principal que desempeña la vía de señalización de Wnt durante el desarrollo de la retina *in vivo* y determinar si la función de esta vía de señalización varía a lo largo de los distintos estadios de desarrollo embrionario. Además, como se ha mencionado, la vía canónica de Wnt está implicada en la regulación de las RSC en retinas adultas, por lo que el conocimiento del funcionamiento de esta vía en la retina también permitirá diseñar terapias utilizando las RSC para la curación de enfermedades tales como la retinitis pigmentosa.

OBJETIVOS



*Nada es una pérdida de tiempo
si utilizas sabiamente la experiencia.
Auguste Rodin*



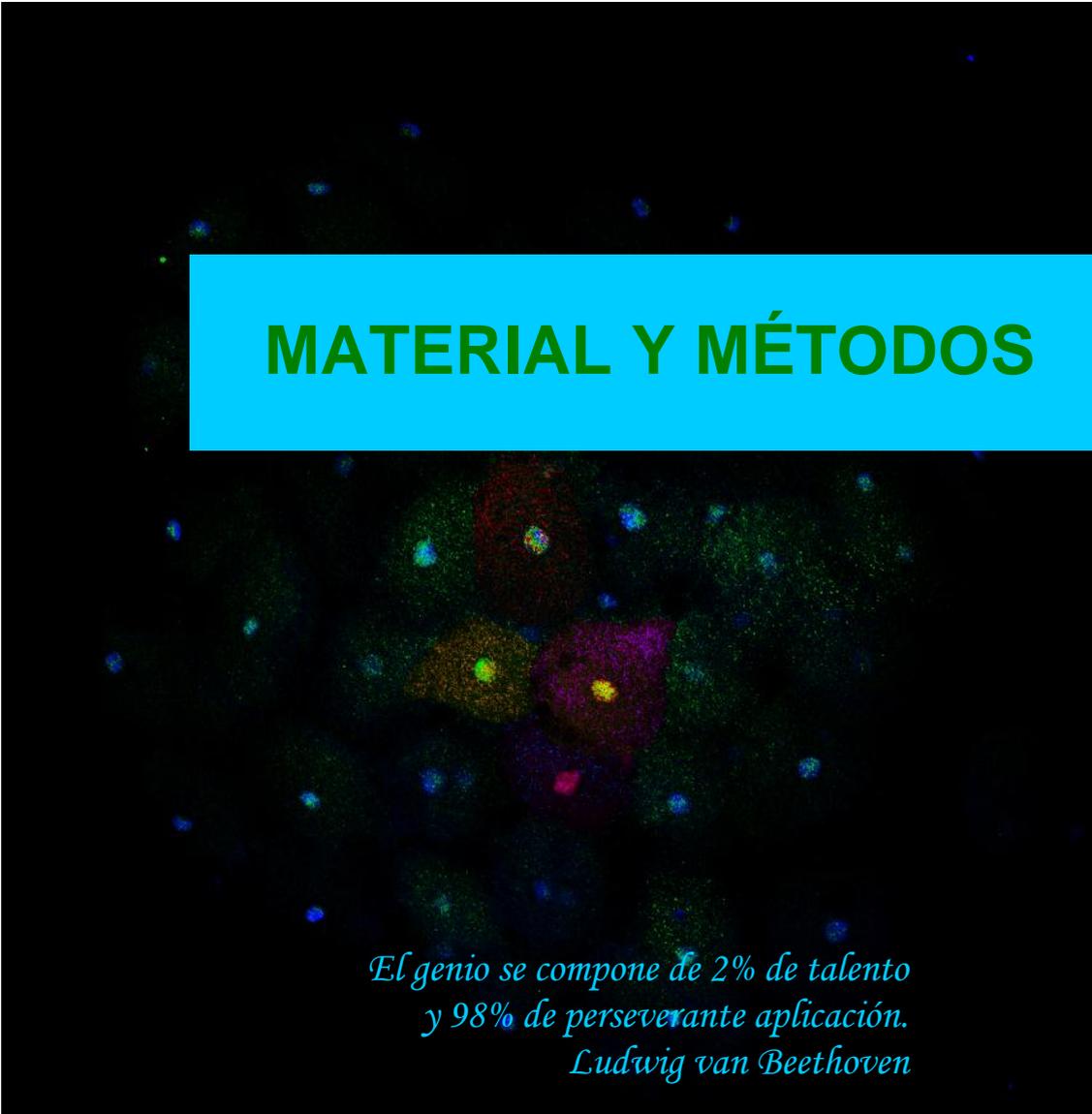
El objetivo general de esta tesis consiste en estudiar los **mecanismos de control de la proliferación y diferenciación a lo largo del desarrollo embrionario de vertebrados**. En primer lugar, se ha hecho un estudio en estadios tempranos del desarrollo, para conocer como **Nanog** y **Oct4** regulan estos procesos en las células pluripotentes durante la etapa de segmentación embrionaria y en el desarrollo del linaje de células germinales. Más tardíamente, se ha hecho un estudio temporal de la regulación de la vía de **Wnt** durante la organogénesis de la retina neural.

Los objetivos específicos son:

- **Estudio del patrón de expresión de Nanog y Oct4 *in vivo* durante el desarrollo de los embriones Medaka como modelo de vertebrados.** Esto nos permitirá comparar la expresión de estos FT en Medaka con la descrita para otros vertebrados.
- **Estudio de la función de Nanog *in vivo* durante el desarrollo temprano de los embriones Medaka como modelo de vertebrados.** Esto nos permitirá conocer con más detalle la función endógena de este FT complementando así los estudios *in vivo* en el modelo murino e *in vitro* en las ESC.
- **Validación de Medaka como modelo animal para el estudio de los genes de pluripotencialidad *in vivo*.**
- **Estudio de la función de Nanog *in vivo* durante el desarrollo de las gónadas de los embriones Medaka como modelo de vertebrados.** Esto nos permitirá conocer

la función de Nanog en estadios más tardíos, probablemente relacionada con el desarrollo del linaje de células germinales.

- **Estudio temporal *in vivo* de la función de la vía de señalización de Wnt durante los distintos estadios de organogénesis de la retina neural en los embriones Medaka como modelo de desarrollo del SNC en vertebrados.** Mediante aproximación genética y farmacológica, podremos manipular la vía de manera condicional *in vivo*, lo que nos permitirá estudiar de manera detallada la función endógena de la vía de Wnt en la retina neural y conocer si esta vía desempeña varias funciones en la retina de vertebrados dependiendo del estadio de desarrollo de la misma.



MATERIAL Y MÉTODOS

*El genio se compone de 2% de talento
y 98% de perseverante aplicación.
Ludwig van Beethoven*

1. Animales.

Para este estudio se han utilizado peces Medaka (*Oryzias latipes*) de la cepa Cab (generosamente proporcionada por la Dr. P. Bovolenta, Instituto Cajal, Madrid). Cab es una cepa comercial disponible en Carolina Biological Supply (<http://www.carolina.com>; Loosli y cols., 2001).

Los animales adultos se mantuvieron en acuarios con agua en constante circulación, a una temperatura de 28°C y un ciclo diario de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Se alimentaron diariamente con artemia recién eclosionada dos veces al día y comida seca una vez al día.

Los embriones se recogieron por desove natural y se incubaron a 25°C en solución de yamamoto (Yamamoto, 1975). La edad de los embriones de Medaka se nombra en estadios. Para determinar el estadio de desarrollo embrionario se utilizó la descripción de Iwamatsu (2004), que va desde st. 0 en el que se inicia la activación del huevo hasta st. 39 previo a la eclosión (ver Fig. 5 de Introducción).

Las líneas transgénicas que se han utilizado en este trabajo son:

- *HS-Wnt8*: generada en el laboratorio (ver apartado 2 en esta sección).
- *HS-DNWnt8*: generada en el laboratorio (ver apartado 2 en esta sección).
- *Ath5-GFP*: generosamente proporcionada por el Dr. J. Wittbrodt (EMBL, Alemania; Del Bene y cols., 2007).

1.1. Tratamientos farmacológicos.

El tratamiento farmacológico se ha realizado en embriones Cab o en embriones de la línea transgénica *Ath5-GFP*. Entre los estadios de desarrollo embrionario deseados, se cambió la solución de incubación de yamamoto por una solución del fármaco disuelto en yamamoto. En el caso del LiCl (Sigma-Aldrich, Cambridge, UK) las concentraciones usadas fueron

0,15 M y 0,3 M (Hedgepeth y cols., 1997), mientras que para la indirubina (Indirubin 3-monoxime; Sigma-Aldrich) las concentraciones utilizadas fueron 5 μ M y 10 μ M (Castelo-Branco y cols., 2004). Debido a las propiedades de solubilidad de la indirubina, este fármaco se diluyó en yamamoto con 4 % de DMSO (Sigma-Aldrich). Por tanto, en el caso de la indirubina, los embriones utilizados para los experimentos control también se incubaron en yamamoto con 4 % de DMSO pero sin el fármaco. El estadio de desarrollo de los embriones tratados se determinó según el número de somitas y las características morfológicas descritas (Iwamatsu, 2004). Todos los experimentos farmacológicos se realizaron por triplicado.

1.2. Tratamientos de choque térmico.

El tratamiento de choque térmico (HS, del inglés *Heat Shock*) se aplicó en embriones transgénicos *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* y en embriones Cab (control) cuando se encontraban en el estadio de desarrollo deseado. Cada tratamiento de HS consistió en aplicar tres veces consecutivas un HS a 37°C durante 30 minutos seguido de 30 minutos a 25°C (Grabher y Wittbrodt, 2004). Cuando el tratamiento de HS se realizó en tres estadios distintos de desarrollo, el proceso previamente descrito de HS se repitió en cada uno de los tres estadios. El estadio de desarrollo de los embriones tratados se determinó según el número de somitas y las características morfológicas descritas (Iwamatsu, 2004). Todos los experimentos de HS se realizaron por triplicado.

1.3. Tratamiento para la eliminación de la pigmentación del epitelio pigmentario de la retina.

En el estudio del desarrollo del ojo, muchos de los análisis realizados en el ojo entero se realizaron en estadios avanzados de desarrollo, donde la pigmentación del EPR interfiere con la visualización de

los resultados de las distintas tinciones. Para evitar esta interferencia, cuando el análisis de resultados se realizó en ojos enteros de embriones de st. 25 o superior, para inhibir la aparición de la pigmentación del EPR, previamente se añadió al medio de incubación 0,003 % de N-feniltiourea (PTU; Sigma-Aldrich) desde el st. 17 hasta el momento de la fijación.

2. Transgénesis.

Las dos líneas transgénicas *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* fueron generadas usando dos vectores plasmídicos distintos, *pHS-Wnt8-CSKA-GFP* (abreviado como *pHS-Wnt8*) y *pHS-DNWnt8-CSKA-GFP* (abreviado como *pHS-DNWnt8*). Ambos vectores contienen dos sitios de restricción para la meganucleasa I-SceI que favorecen las transgénesis (Thermes y cols., 2002). Entre estos sitios está el gen de *GFP* (proteína fluorescente verde, del inglés *Green Fluorescent Protein*) bajo el control del promotor constitutivo *CSKA*, así como un promotor inducible de HS que controla la expresión del gen de *Xenopus laevis Wnt8* o una forma truncada en el extremo carboxi-terminal de la proteína de ese gen *Wnt8 (DNWnt8)*. Se han utilizado los transgenes de *Xenopus laevis* para poder distinguir entre la expresión endógena de Wnt de los peces Medaka y la expresión exógena de los transgenes. Las proteínas de Wnt están bien conservadas evolutivamente y se utilizan habitualmente de forma cruzada entre especies, de hecho, el primer ensayo funcional de un gen *Wnt (Int-1)* se realizó utilizando el gen de ratón *Int-1* en *Xenopus laevis* (McMahon y Moon, 1989). Desde entonces, la capacidad de inducir una duplicación de eje en *Xenopus* se ha utilizado ampliamente para caracterizar las proteínas canónicas de Wnt de diferentes especies. Más recientemente, la proteína Wnt3a de ratón se ha utilizado para inducir la vía canónica de Wnt en las SC humanas (Reya y cols., 2003; Willert y cols., 2003).

Para construir el plásmido *pHS-Wnt8-CSKA-GFP*, la secuencia del gen *Wnt8* bajo el control del promotor HS fue extraída del plásmido

pHSXwnt-8HSG (generosamente proporcionada por el Dr. T. Czerny; Universität Wien, Austria) mediante la digestión con la enzima de restricción Apal (Takara Bio Inc., Shiga, Japón). Tras la digestión enzimática, se aisló la banda del inserto de tamaño esperado en una electroforesis con gel de agarosa (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 0,8 %, preparado en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM), con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) 1 µg/mL utilizando el sistema de extracción *High Pure PCR Prod. Purification Kit* (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). Posteriormente, el inserto se clonó dentro del sitio Apal en el plásmido *pCSKA-GFP* (generosamente proporcionada por el Dr. J. Wittbrodt; EMBL, Alemania) utilizando el sistema de ligación *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche Diagnostics). Este paso sirvió para introducir el inserto *HS-Wnt8* entre los sitios I-SceI del plásmido *pCSKA-GFP* que contiene a su vez *CSKA-GFP*. El producto de ligación se utilizó en el proceso de transformación de células competentes DH5α (*Max Efficiency DH5α Competent Cells*; Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante basado en HS. Los 200 µL resultantes de la mezcla de transformación se sembraron en placas de LB-agar (LB: triptona 1 %, extracto de levadura 0,8 % y NaCl 1 %, pH 7. LB-agar: LB y agar 1,5 %; todos los reactivos adquiridos a Conda Laboratorios) con ampicilina (50 µg/mL; Sigma-Aldrich), pues el plásmido *pCSKA-GFP* incluye resistencia a ese antibiótico. Tras incubar las placas toda la noche a 37°C, las colonias obtenidas se cultivaron en medio LB líquido con ampicilina. Los cultivos obtenidos sirvieron para aislar el ácido desoxirribonucleico (DNA, del inglés *Deoxiribonucleic Acid*) plasmídico mediante la utilización del sistema de extracción *Genelute HP plasmid MIDIprep kit* (Sigma-Aldrich).

La construcción del plásmido *pHS-DNWnt8-CSKA-GFP* se realizó en dos pasos de clonación. En el primer paso de clonación, la secuencia del gen *DNWnt8* fue extraída del plásmido *pdnXwnt8-CS2+* (generosamente proporcionada por el Dr. S. Sokol; Mount Sinai School of Medicine, NY, EEUU) utilizando las enzimas de restricción EcoRI (Takara Bio Inc.) y Stul

(Takara Bio Inc.). El inserto se aisló mediante electroforesis y se clonó en el plásmido *pHS1* (generosamente proporcionada por el Dr. T. Czerny; Universität Wien, Austria) entre los sitios de restricción EcoRI y StuI, utilizando el sistema de ligación *Rapid DNA Ligation Kit*. El producto de ligación se transformó y se purificó el DNA plasmídico, en el cual el gen *DNWnt8* quedó controlado bajo el promotor HS. En el segundo paso de clonación, la secuencia *HS-DNWnt8* fue extraída con la enzima Apal y fue clonada en el sitio Apal del vector *pCSKA-GFP* utilizando el mismo sistema de ligación y obtención del DNA plasmídico, para insertar *HS-DNWnt8* entre los sitios I-SceI junto con *CSKA-GFP*. En los dos pasos de clonación, los protocolos de transformación y aislamiento del DNA plasmídico fueron similares a los descritos en el párrafo anterior.

Los plásmidos resultantes *pHS-Wnt8-CSKA-GFP* y *pHS-DNWnt8-CSKA-GFP* fueron verificados mediante secuenciación, realizada por el servicio de Secuenciación del Centro de Investigación Príncipe Felipe (SCIPF, Valencia, España, <http://secuenciacion.cipf.es>). Para la microinyección del DNA, los plásmidos fueron digeridos con la enzima I-SceI (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA linearizado fue inyectado en el citoplasma de embriones Cab en st. 2, utilizando un microinyector de presión Narishige IM300 (Narishige, Londres, Reino Unido) y capilares de vidrio de borosilicato (WPI Inc., Sarasota, FL). Los embriones GFP positivos fueron seleccionados y mantenidos hasta la madurez sexual formando la generación F0. Una vez alcanzada la madurez sexual fueron cruzados en parejas con un Medaka adulto no transgénico para obtener los embriones de la generación F1. Los embriones de la F1 fueron seleccionados por la fluorescencia de GFP, estos embriones procedían de los animales F0 que habían incorporado la construcción transgénica en la línea germinal. Los animales GFP positivos de la generación F1 fueron mantenidos hasta la madurez sexual y cruzados con animales no transgénicos para confirmar que los embriones GFP positivos de la generación F2 presentaban una proporción de segregación del 50 %.

Esta segregación se debe a que los peces transgénicos obtenidos mediante el uso de meganucleasa I-SceI presentan una segregación mendeliana de la expresión del transgén en la generación F2 (Grabher y Wittbrodt, 2007).

3. Inyección de mRNA y Morfolinos.

Los **mRNA de microinyección** se sintetizaron a partir de los plásmidos indicados en la Tabla 3. El paso previo a la síntesis del mRNA consistió en la linearización de 1 µg de plásmido con la enzima de restricción localizada al final de la secuencia del gen que se va a transcribir, incluyéndose una secuencia poliA (Tabla 3). Tras la linearización del plásmido se precipitó el DNA con un protocolo estándar de precipitación con etanol y acetato de amonio. Posteriormente se verificó la presencia del DNA de tamaño apropiado mediante una electroforesis en gel de agarosa del 1 % con 1 µg/mL de bromuro de etidio. Por último, el sistema *mMessage mMachine* (Ambion, Austin, TX) se utilizó en todos los casos para la síntesis del mRNA a partir del DNA linearizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 3. Elementos utilizados en la síntesis de los mRNA de inyección. Las enzimas de restricción incluidas en esta tabla fueron adquiridas en Takara Bio Inc.

mRNA	Plásmido	Enzima restricción	RNA-Polimerasa
GFP	<i>pHSGFP3</i>	NotI	SP6
Nanog	<i>pCS2+OI-Nanog</i>	NotI	SP6
Nanog-Myc	<i>pCS2+MT-OI-Nanog</i>	NotI	SP6
Myc	<i>pCS2+MT</i>	NotI	SP6
3'UTR-Nanos-GFP	<i>pEGFP-nanos 3'UTR</i>	Apal	SP6
3'UTR-Olvas-Cxcr4b	<i>pCxcr4b-Olvas 3'UTR</i>	Nsil	SP6
Sdf1a	<i>pCRII-Sdf1a-fl4</i>	PstI	SP6
Wnt8	<i>pHS-Wnt8-CSKA-GFP</i>	NotI	SP6
DNWnt8	<i>pHS-DNWnt8-CSKA-GFP</i>	NotI	SP6

Los siguientes plásmidos fueron generosamente proporcionados por los laboratorios indicados:

- *pHSGFP3*: Dr. T. Czerny; Universität Wien, Austria.
- *pCS2+MT*: Dr. K. Naruse, NIBB, Japón.
- *pEGFP-nanos 3'UTR* y *pCxcr4b-Olvas 3'UTR*: Dr. M. Tanaka, Okazaki, Japón.
- *pCRII-Sdf1a-fl4*: Dr. M. Scharf, Wuerzburg University, Alemania.

Los plásmidos *pCS2+OI-Nanog* y *pCS2+MT-OI-Nanog* habían sido sintetizados previamente en el laboratorio.

En el apartado 2 de esta sección se ha descrito como se obtuvieron los plásmidos *pHS-Wnt8-CSKA-GFP* y *pHS-DNWnt8-CSKA-GFP*.

Los **Morfolinos (MO)** son oligonucleótidos modificados que se utilizan como reactivos “*knockdown*” de genes (Stirchak y cols., 1989). Su función se basa en el bloqueo de sitios del mRNA para impedir la funcionalidad del mismo. Los MO se componen de subunidades formadas por una base ácido nucleica, un anillo morfolino y una subunidad de unión de fosfordiamidato no iónico. Esta estructura le confiere propiedades ventajosas como son una alta estabilidad, resistencia a las nucleasas, alta eficiencia, actividad a largo plazo, solubilidad acuosa y baja toxicidad. La secuencia del MO se diseña en función del sitio del RNA que se bloquea:

- Bloqueo de la traducción: al impedir de manera estérica la unión del complejo de iniciación de la traducción por lo que el mRNA es degradado de manera natural.
- Bloqueo del procesamiento: al bloquear sitios relacionados con el procesamiento del pre-mRNA.

Las secuencias de los MO utilizados (Gene Tools, Philomath, OR, <http://www.gene-tools.com>) son:

- *MO-Nanog-ATG*: 5'-TGACCTGAGTTTTCCACTCCGCCAT-3'.
Este MO impide que se inicie el proceso de traducción al

bloquear de manera estérica el complejo de iniciación de la traducción.

- *MO-Nanog-i1e2*: 5'-TCCAAGAATCTGTTGAGGGAATGAA-3'. Este MO interfiere en la maduración del mRNA impidiendo el correcto procesamiento del exón 2.
- *MO-Control (MO-C)*: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'.

Los mRNA y los MO fueron coinyectados junto al mRNA *GFP*, que se usó como trazador para poder seleccionar los embriones que habían incorporado el material inyectado. La excepción fue el mRNA *3'UTR-Nanos-GFP* que ya incluye la *GFP*, por lo que no se coinyectó con el mRNA *GFP*.

Los mRNAs sintetizados y los MO fueron inyectados en los embriones Cab en st. 2 utilizando un microinyector Narishige IM300 y capilares de vidrio de borosilicato. Sin embargo, en los experimentos de migración de las CPG, donde se coinyectó el *MO-Nanog* o *MO-C* junto con el mRNA *3'UTR-Nanos-GFP*, las inyecciones se practicaron en embriones de st. 4 y 5 para evitar la mortalidad temprana originada por el *MO-Nanog*.

Cuando no se indica otra concentración diferente en el apartado de resultados, la concentración de inyección utilizada para los mRNA fue de 200 ng/μL y la concentración de los MO fue de 1 mM, excepto el mRNA de *GFP* que se inyectó como trazador a una concentración de 20 ng/μL.

4. Análisis de la expresión génica.

4.1. Análisis mediante RT-PCR y qRT-PCR.

El primer paso para la realización de los análisis de RT-PCR (del inglés *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) y qRT-PCR (del inglés *quantitative RT-PCR*) fue la extracción del RNA total de las muestras de interés en el momento del desarrollo apropiado. En el estudio de la expresión de *O1-Nanog* se extrajo el RNA de grupos de 20 embriones. En el

estudio de la expresión de *OI-Oct4* se extrajo el RNA de grupos de 40 embriones o de muestras de tejido diseccionadas a partir de individuos adultos compuestas por ovario, testículo interno, testículo externo o bazo. En el estudio de la vía de señalización de Wnt en el ojo se extrajo el RNA de ojos diseccionados procedentes de grupos de 40 embriones. Cada experimento se realizó por duplicado, por lo que se obtuvieron dos muestras de RNA total por cada experimento. Para la extracción del RNA total se utilizó el reactivo trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el RNA, las posibles contaminaciones con DNA genómico (gDNA) se eliminaron con el sistema *DNA-free Kit* (Ambion). La concentración del RNA extraído se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

La síntesis de los cDNA se realizó a partir de 1 µg del correspondiente RNA obtenido, utilizando *Random primers hexamers* (Roche Diagnostics) y la transcriptasa reversa *Superscript III* (Invitrogen).

4.1.A. RT-PCR.

Una vez sintetizados los cDNA de cadena sencilla, la amplificación de los genes de estudio se realizó utilizando las mismas cantidades de cDNA. En la Tabla 4 se indican las secuencias de las parejas de oligonucleótidos usadas en las amplificaciones, así como la temperatura de la fase de anillamiento y el número de ciclos para cada oligonucleótido. Para que las reacciones de RT-PCR fuesen semicuantitativas, el número de ciclos fue optimizado mediante la determinación del rango exponencial de amplificación de cada pareja de oligonucleótidos. Las condiciones de la reacción de PCR en cada ciclo fueron 35 segundos a 94°C en el paso de desnaturalización, 50 segundos a la temperatura indicada en la Tabla 4 en el paso de anillamiento y 30 segundos a 72°C en el paso de extensión. Para determinar la ausencia de contaminación de gDNA se usaron los oligonucleótidos de *Actina* y la mezcla de reacción de síntesis de cDNA para

cada RNA, pero sin la transcriptasa reversa. Tras la amplificación, los productos de RT-PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio. Las imágenes de las bandas de DNA amplificado fueron tomadas en el transiluminador *Versadoc Image Analyser* (Bio-Rad, Hercules, CA). Cada experimento de PCR se realizó por triplicado para cada muestra de cDNA.

4.1.B. qRT-PCR.

La mezcla de reacción para las qRT-PCR contenía la cantidad del cDNA sintetizado indicada en la Tabla 5, *SYBR Green Master Mix* (Bio-Rad) a la concentración indicada por el fabricante y 0,25 mM de cada pareja de oligonucleótidos (Tabla 4 y 5). Las reacciones de PCR y la detección de fluorescencia se realizaron en el termociclador *Real-Time PCR thermal cycler* (MiniOpticon, Bio-Rad). Las condiciones de las PCR fueron las siguientes: 35 ciclos que incluían 15 segundos a 95°C en el paso de desnaturalización, 45 segundos a la temperatura indicada en la Tabla 5 para la fase de anillamiento y 30 segundos a 72°C en la fase de extensión. La curva de *melting* se construyó trazando un gráfico con los datos de fluorescencia obtenidos entre las temperaturas de 55 a 95°C. En cada experimento se incluyeron muestras control sin cDNA para confirmar la ausencia de productos amplificados de manera inespecífica. Para cada muestra, el ciclo umbral (Ct, del inglés *Threshold Cycle*) del control de amplificación interno (*Actina*) fue sustraído del Ct del correspondiente gen de estudio para determinar el ΔCt . Para calcular la proporción de la expresión relativa del gen de estudio relacionada con la *Actina* (control interno) se utilizó el método Pfaffl (Pfaffl, 2001). Esta proporción relativa es la que se ha representado en las gráficas de barras en la sección de resultados. Las eficiencias de amplificación de cada par de oligonucleótidos fueron calculadas usando curvas de dilución (Tabla 5). Las reacciones de qRT-PCR se realizaron por triplicado para cada muestra de cDNA.

Tabla 4. Lista de parejas de oligonucleótidos utilizadas en los procesos de RT-PCR y qRT-PCR. El tamaño del fragmento amplificado viene determinado por los pares de bases (pb). El número de ciclos y la temperatura de anillamiento (Tm) fueron los parámetros utilizados para la RT-PCR semicuantitativa, en aquellos genes donde dichas casillas están en blanco sólo se realizó qRT-PCR. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com>). El número de identificación corresponde al número de GenBank para cada secuencia genética (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) o al número de Ensembl (<http://www.ensembl.org>) para las no descritas en la base de datos GenBank.

Gen	nº Identificación	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso	pb	ciclos	Tm °C
Actina	D89627	ACTGGAACAATGA AGGAG	ATACAAGCAATAC TACAACC	241	30/32/ 35/40	54/56/ 57/58
Ath5	ENSORLG000 00013722	CCAAGTACGAAAC CCTG	GCAGGAGAAGGTT TGG	143	32	56
Axin1Ch1	ENSORLG000 00009838	AAGAGGAGAAAGA TGAAGATTG	TTTCATGCATCTCT TTCC	315	32	54
Axin1Ch8	ENSORLG000 00004794	CAAAGTGCTTCAT CAAAG	TTTTCAGACTCAG ACCTGTG	199	32	54
Axin2Ch1	ENSORLG000 00001945	CAAAGTCTCTGCA TTTCC	GCTTGAAGATAAC TTTGGC	174	32	58
Axin2Ch8	ENSORLG000 00008893	CTTGCATACTCT CCTTGG	GCTTGTAGATGGC TTTGG	168	32	58
Bra	NM001104657	CTCTCCAACAAGC TGAAC	GTTCTGGTAGGCA GTGAC	159	30	57
cdc25a	ENSORLG000 00018198	TCCTCCCTCACCT CGTCA	AAACTCCGCCATT CCCTTC	107	35	58
CcnA	ENSORLG000 00020079	TACATTGATCGCT TCCTCT	TGACAGGACTTTG AGCAC	198	35	58
CcnD1	ENSORLG000 00000317	TCTGTGAGGAACA GAAATG	AGCAGTTCTCCAG GTTGG	214	35	58
Cdk2	ENSORLG000 00014972	GCGATTTCGAGAAA TTTCACT	CCTGATGGAGGAA CTCAA	115	35	58
Cdk4	ENSORLG000 00015209	CTCTCCTTCCTCC ACTCA	TAAGCCAAAGTCT GCTAGTT	102	35	58
Cdk6	ENSORLG000 00004090	AACATCCTGGTCA CTAGC	TCGGTACCAGAGA GTCAC	111	35	58
Cxcr4b	DQ313523	CGAGCAGGGTGA TATACG	ACACCACTCGACT CTCCA	183		
Cxcr7	ENSORLT000 00022368	TAGCCTCCTTGCC AGACA	TTCTGTGTGGTTC TCCTCT	95		
Dmrt1Y	AY129241	GGAGCTACTCTGC TTCAT	GTAGAAGTTGTAG TAGGAGGT	101		
DNWnt8	NM001088168	AAGTGCAACCAGA GAAACC	TCCTGCTTCATTG TTATGC	259	30	56

MATERIAL Y MÉTODOS

Gen	nº Identificación	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso	pb	ciclos	Tm °C
FoxA2	ENSORL00000017407	TTCTCTCATCACC ATGGC	GAGGAAACAGTCG TTGAAT	160	35	57
Gata 3	NM001104718	ATCTTCTAGTTATG GTTCC	GTTTCATCTTGTGA TACAGG	158	35	57
Lef1	ENSORL00000006924	ATGAAAAACACAG AGACC	TTTGTGGACGTT CTGG	164	35	54
Nanog	FJ436046	GTGGTATACATCA GAGAAGG	CATAGTTGCTGCA TGAAC	166	35	57
Oct4	AY639946	ACACGGATGAGGA GTATTC	GTTTACGCCAAAG AAAGC	245	35	54
Pax2	Z97020	CAGCGTCTCGTCT ATTAAC	CTGGTTACAGGTG GAGAAG	132	30	57
Pax6	AJ000938	GTAGCCTCAATGA TGCAG	GTATTCTGGAGAT GTCGC	148	30	57
Prox1	ENSORL00000014947	CTTAAGCAGGAGC TCAAT	GAATCTTTCAGGC GGTAT	126	32	54
p53	AF212997	TGCAGTCGCCGAT TCAAAATATTTT	CCACGTGCTCCGT CTTCTTG TAG	500	35	58
Rhod	AB001606	CCTCTAAACTACA TCCTGC	CAGAGACCAATTT CACC	176	32	56
Sdf1a	DQ859774	GGAGCATCTCTAA GGCCTTTCAG	GCAATTTATGCGC CTCAAACACAC	231		
Sdf1b	NM001104727	CAGTTACATGTTT TGCCATTGC	ACGCACACCCCAA CCTCCAAA	267		
Shh	AB007129	ACTTCATCATGTT CATAGAC	GTGTAAATCCGTT TCACG	236	35	27
Smp	ENSORL00000009669	AAACTTCACAGCT TCCAC	AAATCCTTTAAGTT GTGC	143	40	57
Sox2	FJ895588	GCACAACCTCGGAG ATAAGC	GTCCTTCTTCATG AGGGTC	172	30	57
Sox3	NM001104764	GCTGACTGGAAAC TTCTC	CAGGGAATACTTG TCTTTC	153	30	57
Sox17	ENSORL00000011542	CACAACGCAGAGC TGAG	GTCCAGCCTCTTA ATCCTC	179	35	57
Tcf3	ENSORL00000011813	ACTCCCAACTTTA TCCTGG	AGCAGAAGGAGT GGCAGG	164	35	57
Tert	DQ248968	GTGTTCTGATGAG GAGCTG	GACAGATCTCCCT GGAAG	192	35	57
Vsx1	AJ250403	GATGTGTACGCTC GAGAAATGC	TGAATCACTTGA GGATGGATTCTG	196	35	56
Wnt8	NM001088168	AAGTGCAACCAGA GAAACC	TCCTGCTTCATTG TTATGC	259	30	56
Wt1a	NM001104701	CACTCCTTCAAAC ATGAAGAC	AGGTGTGTGGCAT CCATA	96		

Tabla 5. Condiciones utilizadas en la qRT-PCR para cada pareja de oligonucleótidos.

Gen	Estadio embrionario	T _m (°C)	Eficiencia de los oligonucleótidos	cDNA (ng)
<i>Actina</i>	16	57	1,99	1,67
<i>CcnD1</i>	16	57	1,92	1,67
<i>CcnA</i>	16	57	1,95	1,67
<i>Actina</i>	16	58	1,91	1,67
<i>Cxcr4</i>	16	58	1,90	1,67
<i>Cxcr7</i>	16	58	1,99	1,67
<i>Dmrt1Y</i>	16	58	1,97	1,67
<i>Sdf1a</i>	16	58	1,95	1,67
<i>Sdf1b</i>	16	58	1,95	1,67
<i>Wt1a</i>	16	58	1,94	1,67
<i>Actina</i>	22	54	1,94	1,67
<i>Axina1Ch1</i>	22	54	1,97	1,67
<i>Axina1Ch8</i>	22	54	1,95	1,67
<i>Axina2Ch1</i>	22	54	1,98	1,67
<i>Axina2Ch8</i>	22	54	2,00	1,67
<i>Lef1</i>	22	54	2,00	1,67
<i>Actina</i>	22	58	1,99	0,84
<i>CcnD1</i>	22	58	1,92	0,84
<i>CcnA</i>	22	58	1,95	0,84
<i>Actina</i>	30	58	1,99	0,84
<i>CcnD1</i>	30	58	2,00	0,84
<i>CcnA</i>	30	58	2,00	0,84
<i>Actina</i>	30	54	1,96	1,67
<i>Axina1Ch1</i>	30	54	2,00	1,67
<i>Axina1Ch8</i>	30	54	2,00	1,67
<i>Axina2Ch1</i>	30	54	1,93	1,67
<i>Axina2Ch8</i>	30	54	1,96	1,67
<i>Lef1</i>	30	54	2,00	1,67
<i>Ath5</i>	30	54	1,95	1,67
<i>Prox1</i>	30	54	1,96	1,67
<i>Actina</i>	35	54	1,94	1,67
<i>Ath5</i>	35	54	1,94	1,67
<i>Prox1</i>	35	54	2,00	1,67
<i>Vsx1</i>	35	54	1,91	1,67
<i>Rhod</i>	35	54	1,93	1,67

4.2. Análisis mediante hibridación *in situ*.

4.2.A. Síntesis de la sonda de RNA para hibridación *in situ*.

El primer paso en la técnica de hibridación *in situ* (WMISH, del inglés *Whole Mount In Situ Hybridization*) consistió en la síntesis de las sondas antisentido de RNA.

Los plásmidos indicados en la Tabla 6 fueron usados como molde para la síntesis de la sonda de RNA. En primer lugar se linearizó el plásmido en el extremo 5' de la secuencia a amplificar, utilizando las enzimas de restricción indicadas en la Tabla 6. Posteriormente se precipitó el DNA con un protocolo estándar de extracción con etanol y acetato de amonio. Una vez resuspendido el DNA linearizado, se verificó la presencia del DNA de tamaño apropiado con una electroforesis en gel de agarosa del 1 % y bromuro de etidio 1 µg/mL.

Para la reacción de transcripción se partió de 1 µg de DNA y se siguieron las instrucciones del fabricante de la RNA-polimerasa indicada en la Tabla 6. Las RNA-polimerasas se seleccionaron en función de su localización en el extremo 3' de la secuencia a amplificar. Todas las sondas sintetizadas fueron del tipo *DIG-labeled RNA* (RNA unido a Digoxigenina) por lo que a la reacción de síntesis se añadió 1 mM de los nucleótidos ATP, CTP y GTP, así como 0,65 mM de UTP y 0,35 mM de Dig-UTP (Digoxigenina 11-UTP, Roche Diagnostics). Una vez sintetizada la sonda se trató con DNAsal (Takara Bio Inc.) para eliminar el DNA remanente y se realizó una precipitación estándar con acetato de amonio y etanol. Las sondas se analizaron con una electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se cuantificaron con un espectrofotómetro NanoDrop ND1000. Finalmente se diluyeron hasta una concentración de 1 µg/mL en tampón de hibridación (composición en el apartado 4.2.B. de esta sección) y se preservaron a -20°C hasta su uso.

Tabla 6. Elementos utilizados en la síntesis de las sondas de RNA antisentido para WMISH. Las enzimas incluidas en esta tabla fueron adquiridas en Takara Bio Inc. excepto la enzima RNA polimerasa T3 (Roche Diagnostics). El plásmido *pHS-DNWnt8-CSKA-GFP* ha sido abreviado como *pHS-DNWnt8*.

Sonda	Plásmido	Enzima restricción	RNA-Polimerasa
Nanog	<i>pCS2+Nanog</i>	XhoI	T7
Oct4	<i>pCS2+Oct4</i>	XhoI	T7
Bra	<i>Me-T</i>	Sall	T3
Pax6	<i>OIPax6</i>	SmaI	T7
Cxcr4	<i>Cxcr4b-pCS2+</i>	BamHI	T3
Sdf1a	<i>pCRII-sdf1a-fl4</i>	HindIII	T7
Wnt8	<i>pHS-DNWnt8</i>	EcoRI	T7
Ath5	<i>OI.Ath5Full</i>	NotI	SP6
Prox1	<i>pBS-Prox1</i>	NotI	T7
Vsx1	<i>pBS-Vsx1</i>	NotI	T7
Rhod	<i>OIRhodopsin</i>	EcoRI	T3

Los siguientes plásmidos fueron generosamente proporcionados por los laboratorios indicados:

- *Me-T*, *OIPax6*, *OI.Ath5Full* y *OIRhodopsin*: Dr. P. Bovolenta, CSIC, Instituto Cajal, España.
- *Cxcr4b-pCS2+*: Dr. K. Naruse, NIBB, Japón.
- *pCRII-sdf1a-fl4*: Dr. M. Schartl, Wuerzburg University, Alemania.

Los plásmidos *pCS2+Nanog* y *pCS2+Oct4* habían sido sintetizados previamente en el laboratorio.

En el apartado 2 de esta sección se ha descrito como se obtuvo el plásmido *pHS-DNWnt8-CSKA-GFP*.

Los plásmidos *pBS-Prox1* y *pBS-VSx1* fueron sintetizados utilizando los siguientes pares de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de

alrededor de 400 pb de los genes *Prox1* y *Vsx1*. Las secuencias de los oligonucleótidos (Sigma-Aldrich) fueron las siguientes:

- *Prox1*-Directo: GATAACATTGCTCGAGCCAAAG.
- *Prox1*-Reverso: TTATTCTTGAGAAGCTGG.
- *Vsx1*-Directo: AGTCCATCCTCAACTCAG.
- *Vsx1*-Reverso: GTCCTAAATTTTCTCAGC.

Las condiciones de PCR fueron 35 ciclos y una temperatura de anillamiento de 40,5°C en el caso del gen *Prox1* y de 54°C para el gen *Vsx1*. Los fragmentos amplificados por PCR fueron clonados en el vector *pBS* entre los sitios *EcoRI* y *XhoI*, siguiendo los mismos protocolos de ligación, transformación y extracción del DNA plasmídico que en el apartado 2 de esta sección. Posteriormente, los plásmidos fueron verificados mediante secuenciación (SCIPF).

Además de las sondas antisentido, en todos los casos se sintetizaron sondas sentido de RNA que fueron utilizadas como control negativo del proceso de WMISH.

4.2.B. Protocolo de hibridación *in situ*.

Se utilizó un protocolo de WMISH estándar en el que los embriones en el estadio apropiado o las gónadas adultas diseccionadas fueron fijadas con paraformaldehído (PFA, Merck) al 4 % en tampón fosfato salino a doble concentración de trabajo (PBS a concentración de trabajo: 100 mM NaCl, 2 mM de KCl, 6 mM de Na₂HPO₄, 1,1 mM de KH₂PO₄, pH 7,4, todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich) más 0,1 % de Tween20 (2xPBSTw; USB, Cleveland, OH). La fijación se realizó a 4°C durante toda la noche. A continuación se eliminó el corion de los embriones utilizando pinzas de disección (WPI Inc.). Los embriones y las gónadas fueron deshidratados usando concentraciones cada vez más elevadas de etanol hasta llegar a etanol absoluto y guardados toda la noche a -20°C. El

siguiente pasó consistió en la rehidratación de los embriones y las gónadas con concentraciones decrecientes de etanol seguidas de varios lavados con PBSTw a la concentración de trabajo. Tras los lavados, las muestras se trataron con proteinasa K (Sigma-Aldrich) 10 µg/mL para incrementar la permeabilidad de la membrana, la accesibilidad de la sonda y la digestión de proteínas asociadas al mRNA. El tiempo de incubación con la solución de proteinasa K dependió del estadio de desarrollo del embrión, siendo los tiempos más largos cuanto más desarrollado se encontraban los embriones y para las gónadas adultas. Tras inactivar la solución de proteinasa K con una solución de glicina (Sigma-Aldrich) 2 mg/mL en PBSTw se volvió a fijar con la solución de PFA durante 20 minutos. A continuación las muestras se incubaron con tampón de hibridación (Formamida al 50 %, heparina 50 µg/mL, 0,1 % Tween20, tórula RNA 5 mg/mL y SSC a concentración de trabajo que contiene: 150 mM de NaCl, 15 mM de citrato sódico, pH 7. Todos los reactivos adquiridos en Sigma-Aldrich) durante 2 horas a 65°C. Antes de añadir la sonda, ésta se desnaturalizó a 80°C durante 10 minutos, posteriormente, se incubó con los embriones o las gónadas durante toda la noche a 65°C. Tras la hibridación, se realizaron los lavados secuenciales a 65°C con dos lavados de SSC a doble concentración de trabajo más 0,1 % de Tween20 (2SSCTw) y formamida al 50 %, seguido de un lavado con 2xSSCTw y dos lavados con SSCTw a una concentración 5 veces menor que la de trabajo (0,2xSSCTw).

Tras el proceso de hibridación, se llevó a cabo el proceso de revelado de WMISH. Para ello, en primer lugar se bloquearon las muestras con suero bovino fetal (FBS; del inglés *Fetal Bovine Serum*; Invitrogen) al 5 % en PBSTw a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras el bloqueo, los embriones y las gónadas fueron incubados con el anticuerpo anti-Digoxigenina (Anti-digoxigenina-AP Fab fragments, Roche Diagnostics) diluido en PBSTw a una relación 1:2000 durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, se realizaron seis lavados de 10 minutos con PBSTw y luego se equilibró en tampón de tinción (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM,

MgCl₂ 50 mM, 0,1% Tween20, todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich). A continuación se realizó el revelado en oscuridad con la mezcla de sustratos de la fosfatasa alcalina formada por NBT (del inglés *Nitro Blue Tetrazolium*; Sigma-Aldrich) y BCIP (del inglés *Bromo-Chloro-Indol-Phosphate p-toluidine*; Sigma-Aldrich). El tiempo de incubación dependió del momento de aparición de la coloración violeta. Finalmente, se lavó el exceso de tinción con tres lavados de PBSTw. Los embriones se montaron sobre portaobjetos usando medio glicerol (USB) diluido al 87 %. Por otra parte, una vez realizada la WMISH en las gónadas adultas, se incluyeron en OCT (Sakura Finetek, Tokio, Japón) siguiendo el protocolo estándar de pretratamiento con sacarosa (USC), para posteriormente hacer criosecciones de 15 µm en un criostato Leica CM1900UV (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Una vez obtenidas las criosecciones, se lavó el OCT con PBS y se montaron las muestras con medio glicerol diluido al 87 %.

5. Análisis de la expresión proteica mediante inmunofluorescencia.

5.1. Obtención de anticuerpos policlonales de Medaka.

Se diseñaron tres anticuerpos policlonales para detectar las proteínas de OI-Nanog, OI-Oct4 y OI-Ptc1. Los anticuerpos fueron sintetizados por Abnova Corporation (Taipei, Taiwán) mediante la inmunización de conejos con los péptidos inmunógenos siguientes:

- OI-Nanog: posición de la secuencia dentro de la proteína entre 106-125; secuencia GGENCTRRTGSDSASDSEAH (20 mer).
- OI-Oct4: posición de la secuencia dentro de la proteína entre 121-140; secuencia QTREQIKMPEIKIEKDTDEE (20 mer).
- OI-Ptc1: posición de la secuencia dentro de la proteína entre 293-313; secuencia TAPNRNSTKPFNVARALSGG (20 mer).

5.2. Anticuerpos utilizados.

Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo para los experimentos de inmunofluorescencia fueron los indicados en la Tabla 7.

Tabla 7. Listado de anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo primario	Dilución	Referencia	Marca	Especie
Anti-OI-Nanog	1:200		Abnova	conejo
Anti-OI-Oct4	1:200		Abnova	conejo
Anti-Myc	1:500	OP10L	Calbiochem	ratón
Anti-pH3	1:200	9706	Cell Signaling	ratón
Anti-PCNA	1:200	sc-56	Santa Cruz	ratón
Anti-Actina	1:200	Ab6276	Abcam	ratón
Anti-βCat	1:200	9562	Cell Signaling	conejo
Anti-Zpr1	1:400	zpr1	Zirc	conejo

Los anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo para los experimentos de inmunofluorescencia fueron los indicados en la Tabla 8.

Tabla 8. Listado de anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo secundario	Dilución	Referencia	Marca
Anti-ratón conjugado a Cy3	1:500	115-166-062	Jackson ImmunoResearch
Anti-conejo conjugado a Cy3	1:500	111-166-045	Jackson ImmunoResearch
Anti-ratón conjugado a Alexa488	1:500	A11001	Invitrogen
Anti-conejo conjugado a Alexa488	1:500	A11008	Invitrogen

5.3. Protocolo de inmunofluorescencia en embrión entero.

Los embriones en el estadio apropiado y los ovarios de Medaka fueron fijados con PFA 4 % diluido en PBSTw. La fijación fue de una hora a temperatura ambiente para embriones de st. 10 o inferior, y de dos horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C para embriones de estadio superior a 10 y para los ovarios. Tras la fijación, los embriones fueron decorionados con pinzas de disección y lavados con PBS más TritonX-100 (PBSTx; USB). Antes de bloquear las uniones inespecíficas, algunos protocolos de anticuerpos requirieron de los siguientes pretratamientos:

- Anti-Myc: no requirió pretratamiento.
- Anti-OI-Nanog y anti-pH3 (Fosfo Histona 3): previo al bloqueo las muestras se llevaron a ebullición en tampón citrato 10 mM (pH 6; Sigma Gemosys) durante 5 minutos.
- Anti-Oct4: previo al bloqueo, los embriones fueron incubados con proteinasa K 10 µg/mL durante 1 minuto cuando eran de st. 10 o inferior y durante 20 minutos si eran de st. 25.

Tras los pretratamientos, las muestras fueron bloqueadas durante una hora a temperatura ambiente con tampón bloqueo (5 % FBS inactivado por calor en PBSTx). Este mismo tampón de bloqueo se utilizó para preparar las diluciones de anticuerpo primario a las concentraciones indicadas en la Tabla 7. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las muestras con PBSTx y se incubaron con la dilución del anticuerpo secundario en ese mismo tampón, a las concentraciones indicadas en la Tabla 8, durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron de nuevo las muestras con PBSTx y se incubaron con 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI; Sigma-Aldrich) al 0,2 µg/mL. Tras lavar el exceso de DAPI, los embriones se montaron en portaobjetos utilizando el medio *Fluoromount G* (SouthernBiotech, Birmingham, AL).

Los controles negativos de las reacciones de inmunofluorescencia consistieron en la incubación de las muestras únicamente con el anticuerpo secundario, de manera que los protocolos fueron los mismos pero en el

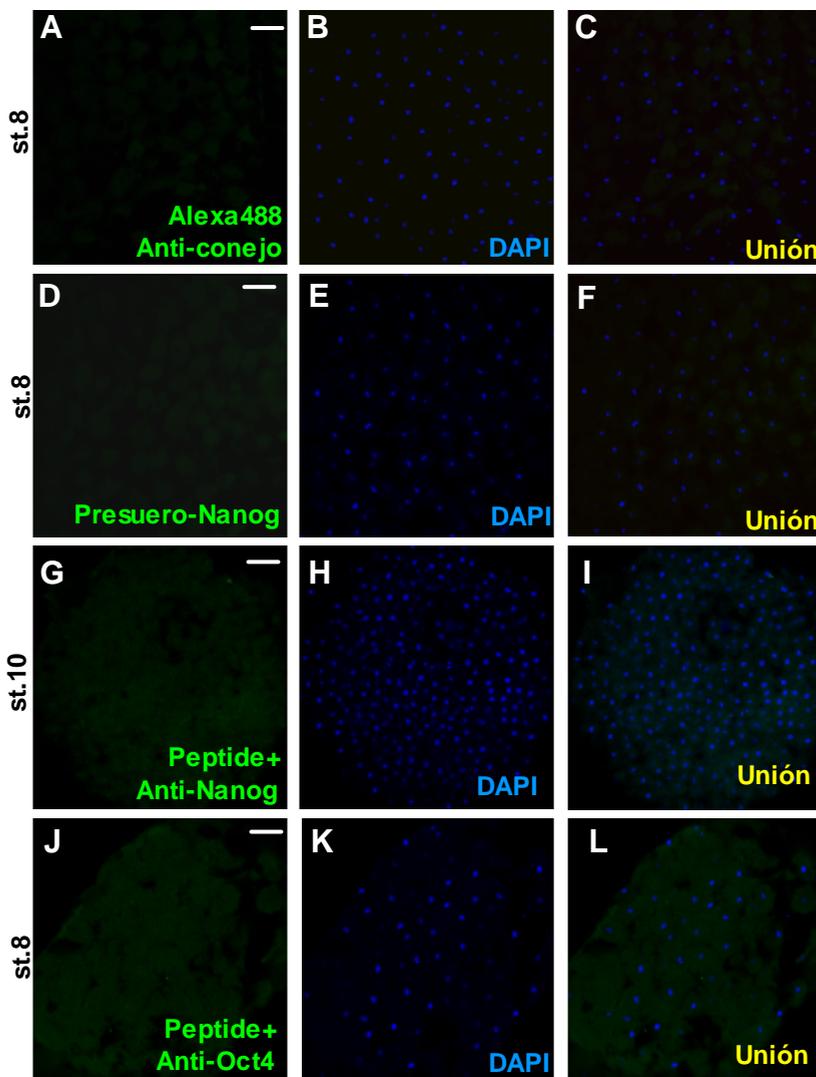


Fig. 22. Controles negativos de la inmunofluorescencia para los anticuerpos OI-Nanog y OI-Oct4. Los controles negativos utilizando el anticuerpo secundario únicamente (A-C), el presuero en lugar del anticuerpo primario (D-F) o el anticuerpo primario preadsorbido por el péptido inmunógeno (G-L) no mostraron señal. Barras de escala: 50 μ m.

paso de incubación con el anticuerpo primario sólo se incubaron con la solución de bloqueo.

Los controles de inmunofluorescencia para los anticuerpos OI-Nanog y OI-Oct4 se completaron con otros dos controles negativos, además del control basado en el uso del anticuerpo secundario sin primario (Fig. 22A-C). Un control negativo consistió en la incubación con el suero extraído de los conejos previo a su inmunización con el péptido antigénico (presuero) en lugar de incubar con el anticuerpo primario (Fig. 22D-F). El otro control negativo consistió en incubar con anticuerpos primarios preadsorbidos. La preadsorción del anticuerpo de OI-Nanog o OI-Oct4 se realizó con el péptido inmunogénico respectivo guardando una relación 1mol:20moles en suero de albúmina bovina (BSA; Sigma-Aldrich) al 1 % diluida en PBS. Esta mezcla de anticuerpo y péptido inmunogénico se incubó en rotación a 4°C durante toda la noche. La solución resultante se utilizó en lugar de la solución de anticuerpo primario (Fig. 22G-L). Este último control negativo muestra la especificidad del anticuerpo al antígeno que lo generó.

5.4. Protocolo de inmunofluorescencia en criosecciones.

El primer paso para obtener las criosecciones de embriones o tejidos consistió en la fijación de las muestras. Los embriones en estadio apropiado y las gónadas adultas diseccionadas fueron fijados con PFA 4 % diluido en PBSTw durante toda la noche a 4°C. Tras la fijación, los embriones fueron decorionados con pinzas de disección y lavados con PBSTw. Las muestras se incluyeron en OCT siguiendo el protocolo estándar de pretratamiento con sacarosa, para posteriormente hacer criosecciones de 10 µm en un criostato Leica CM1900UV. Las criosecciones obtenidas se utilizaron para el proceso de inmunofluorescencia. El primer paso consistió en eliminar el OCT con tampón TBSTw (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y Tween20 0,1 %).

Los anticuerpos primarios que se utilizaron en las criosecciones del ojo de medaka fueron anti- β Cat y anti-Zpr1. El anticuerpo de β Cat requirió un pretratamiento de ebullición con tampón citrato 10 mM (pH 6) durante 5 minutos.

Las criosecciones de gónadas adultas fueron utilizadas para la inmunofluorescencia con anti-OI-Nanog y anti-OI-Oct4. Cuando se utilizó anti-OI-Oct4 se realizó una doble inmunotinción con anti-PCNA en las muestras de ovario y testículo, o con anti-Actina en las muestras de ovario. La inmunofluorescencia en criosecciones de OI-Nanog requirió un pretratamiento de ebullición con tampón citrato 10 mM (pH 6) durante 5 minutos. La inmunofluorescencia de OI-Oct4 requirió un pretratamiento con proteinasa K 10 μ g/mL durante 5 minutos para las secciones de testículo y 7 minutos para las secciones de ovario.

Posteriormente, se bloquearon las muestras con tampón bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. El tampón de bloqueo se utilizó también para preparar las diluciones de anticuerpo primario a las concentraciones indicadas en la Tabla 7. Tras el bloqueo, se incubaron las secciones con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación con los anticuerpos primarios, se lavaron las muestras con TBSTw y se incubaron con la dilución del anticuerpo secundario en ese mismo tampón, a las concentraciones indicadas en la Tabla 8, durante una hora en oscuridad a temperatura ambiente. Para la doble inmunotinción con anti-Oct4 y Anti-PCNA, se preparó la dilución de los anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado a Cy3 (PCNA) y anti-conejo conjugado a Alexa488 (OI-Oct4). Para la doble inmunotinción con anti-Oct4 y Anti-Actina, se preparó la dilución de los anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado a Cy3 (OI-Oct4) y anti-ratón conjugado a Alexa488 (Actina). Posteriormente, se lavaron de nuevo las muestras con TBSTw y se incubaron con 0,2 μ g/mL de DAPI. Finalmente, las muestras se montaron con medio *Fluoromount G*.

5.5. Tinción de Hematoxilina-Eosina.

Para observar la morfología del testículo de Medaka y complementar así los resultados de inmunofluorescencia en testículo, se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) en criosecciones de testículo adulto de Medaka de 10 μm . Se seleccionaron portaobjetos con criosecciones de testículo en serie paralela, de manera que la tinción de H-E y la tinción de inmunofluorescencia para el anticuerpo Ol-Nanog se realizaron sobre secciones de testículo sólo separadas por 10 μm . Se siguió un protocolo de tinción estándar por lo que en primer lugar se tiñeron las secciones con hematoxilina (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos, tras lavar se trató con alcohol ácido (0,4 % de HCl en etanol al 70 %; Sigma-Aldrich) durante 2 segundos y luego se tiñó con eosina (Sigma-Aldrich) durante 2 minutos. Tras lavar el exceso de colorante, se montaron las muestras usando medio glicerol diluido al 87 %.

6. Análisis de la apoptosis mediante TUNEL.

Para el estudio de la apoptosis en la retina de Medaka, los embriones Cab control o los transgénicos *HS-Wnt8* y *HS-DNwnt8* sometidos a tratamiento de HS fueron fijados en el estadio apropiado con PFA al 4 % en PBS a doble concentración de trabajo durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los embriones fueron decorionados. Las células apoptóticas fueron detectadas mediante TUNEL (del inglés *TdT-mediated dUTP Nick End Labelling*; Yamamoto y Henderson, 1999) utilizando el sistema *ApoptTag Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit* (Chemicon International Inc., Billerica, MA) siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez finalizado el proceso de TUNEL, los embriones fueron montados en portaobjetos con glicerol al 87 %.

7. Obtención de imágenes.

Las imágenes de los fenotipos embrionarios, inmunofluorescencia, WMISH y TUNEL fueron captadas mediante una cámara Olympus modelo DP70 (Olympus, Tokyo, Japón) conectada a una lupa de Leica modelo MZ16FA (Leica Microsystems), o a un microscopio de fluorescencia de Leica modelo DM5000B (Leica Microsystems). Las imágenes de confocal se tomaron en el microscopio confocal de Leica modelo DM IRE2 (Leica Microsystems), en el servicio de Microscopia Confocal del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

Las imágenes presentadas fueron procesadas utilizando el programa Adobe Photoshop 7.0 (San Jose, CA, <http://www.adobe.com/products/photoshop>). Todos los experimentos de fenotipos embrionarios, inmunofluorescencia, tinciones de H-E, WMISH y TUNEL se realizaron por triplicado, mostrándose en el apartado de resultados una imagen representativa de los tres experimentos.

8. Análisis de la interacción proteína-DNA mediante Inmunoprecipitación de cromatina.

Para realizar la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se seleccionaron 500 embriones Cab en st. 16. Estos embriones se homogeneizaron por acción mecánica utilizando un mortero y se fijaron 8 minutos con formaldehído al 1 % (Sigma-Aldrich) en PBS frío. Posteriormente se lavaron las células fijadas con PBS frío que contenía un mix inhibitor de proteasas (Sigma-Aldrich) y PMSF (1 mM; fenil metano sulfanil fluorado, Sigma-Aldrich). Para eliminar los trozos de corion, la suspensión se filtró con filtros de 0,2 mm de diámetro de poro. Tras la filtración, se centrifugó la suspensión a 470 g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular

resultante se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C hasta el momento de su utilización.

La técnica de ChIP se realizó siguiendo el método Q2ChIP descrito por Dahl y Collas (^{a/b}2007). Para ello, las células fueron lisadas mediante resuspensión del precipitado celular en 100 μL de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, SDS 1 %) durante 5 minutos a 0°C . Tras la lisis se añadió 100 μL del tampón RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, EGTA 0,5 mM, TritonX-100 1 %, SDS 0,1 %, Na-deoxicolato 0,1 %, NaCl 140 mM) y el lisado fue sonicado para obtener fragmentos de cromatina de aproximadamente 100 pb a 500 pb de longitud. Las muestras fueron posteriormente centrifugadas a 13000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C para precipitar los desechos celulares. El sobrenadante fue incubado con el presuero conjugado a las esferas paramagnéticas recubiertas de Proteína-A (Dynabeads Protein A, Invitrogen) y tras la captura magnética la solución limpia de cromatina se llevó a un nuevo tubo. Posteriormente, la solución de cromatina fue incubada con el anticuerpo específico de OI-Nanog o el anticuerpo específico de OI-Ptc1 conjugados a las esferas paramagnéticas recubiertas de Proteína-A. Para realizar el control positivo del ChIP, una tercera parte de la solución de sobrenadante no fue incubada con ningún anticuerpo conjugado, a esta fracción se le ha llamado pre-inmunoprecipitación (pre-IP). Mediante captura magnética, las soluciones fueron lavadas en tampón RIPA y posteriormente en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 10 mM). Para separar los fragmentos de DNA de las esferas paramagnéticas conjugadas a los anticuerpos, se utilizó un tampón de elución (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, SDS 1 %, Proteinasa K 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los fragmentos de DNA fueron posteriormente precipitados con un protocolo estándar de precipitación con etanol y resuspendido en 50 μL de agua libre de nucleadas.

Para cada reacción de PCR, se utilizó 1 μ L de la solución con los fragmentos de DNA y cada pareja de oligonucleótidos incluidos en la tabla 9. Las condiciones de la reacción de PCR en cada ciclo fueron 1 minuto a 94°C en el paso de desnaturalización, 45 segundos a 58°C en el paso de anillamiento y 1 minuto a 72°C en el paso de extensión. Tras la amplificación, los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % con 1 μ g/mL de bromuro de etidio. Las imágenes de las bandas de DNA amplificado fueron tomadas en el transiluminador *Versadoc Image Analyser* (Bio-Rad, Hercules, CA). Cada experimento de PCR se realizó por triplicado para cada muestra de DNA y pareja de oligonucleótidos, mostrándose en el apartado de resultados una imagen representativa de los tres experimentos.

Tabla 9. Lista de las parejas de oligonucleótidos utilizadas en las PCR realizadas tras el ChIP. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich.

Gen	Región promotora-Oligo	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
Cxcr4b	1-A	CAGCTCCACTGCATTCATA	ACGCTGATTAAGTCGAAC
Cxcr4b	2-B	GGAATTGCTCATTCTTGCTTA	CAGATCGCTATCAGTCCA
Cxcr4b	3-C	TTTGCTCACAGGCAGGTA	CACCGCTGCTTCTAAATC
Cxcr4b	4-D	ATATATCAAAGGCATTGAGGG	ACCTTCTGTCACTTCTCAACTA
Cxcr4b	5-E	CACGCGCCTTTTATACTG	TCAGGATGAGTGCAGAATG
Cxcr4b	5-F	TTCTGCACTCATCCTGAC	CATGAAAGGAGTTCTCCAG
Shh	6-G	CTCCTCCATGGGAAAACA	CACACTCGGCCATAAATG
Shh	7-H	CATCAAACAAAGCAGCCC	GTGCGTGATATTCCGTAG

9. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

Para analizar el ciclo celular mediante citometría de flujo, en primer lugar se disgregaron las células de las muestras de interés. Por un lado, en el estudio de la acción de OI-Nanog en el ciclo celular, las células se extrajeron de embriones inyectados con *MO-C* o *MO-Nanog* en st. 16. Por otro lado, en el estudio del efecto de la vía de Wnt en el ciclo celular de los PNR, se diseccionaron ojos en el estadio apropiado a partir de grupos de 40 embriones. Las células de ambos tipos de muestras se disgregaron mediante tripsinización (Tripsina/EDTA, Invitrogen) a 37°C. La suspensión celular de cada muestra se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 5 minutos y el precipitado de células se lavó con PBS frío. Posteriormente, las células fueron fijadas con etanol frío al 70 % durante toda la noche a -20°C. Tras la fijación, se eliminó el etanol y se lavó el precipitado celular con PBS frío. Para determinar el contenido de DNA de cada célula individual, el precipitado de células se resuspendió en 300 µL de solución de yoduro de propidio (PI, del inglés *Propidium Iodide*) que contenía PI (50 µg/mL, Sigma-Aldrich) y RNAsa A (10 µg/mL, Sigma-Aldrich) y se incubó durante toda la noche a 4°C. La suspensión de células fue analizada en un citómetro de flujo Cytomics modelo FC500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). El cálculo del tamaño celular y el análisis del porcentaje de cada fase del ciclo celular se realizaron a partir de los datos obtenidos, utilizando los programas públicos WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>) y Cylcherd (<http://www.facsclab.toxikologie.uni-mainz.de/engl.%20Websites/Downloads-engl.jsp>). Cada experimento se realizó por triplicado. En el apartado de resultados se ha representado un histograma representativo de los tres experimentos mientras que las gráficas de barras muestran la media \pm desviación estándar (sd) de los tres experimentos independientes.

10. Análisis estadístico de los resultados.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, <http://www.graphpad.com>) para el cálculo de las medias y las sd, así como para la construcción de las gráficas presentadas. El programa GraphPad Prism también se utilizó en el análisis de la significación estadística de los resultados mediante el test de la T de Student o mediante el test de ANOVA más el test postHoc de Tukey. Para todos los datos obtenidos, un nivel igual o menor del 5% ($p < 0,05\%$) fue considerado como estadísticamente significativo. Los resultados se han expresado como la media \pm la sd en los diferentes grupos descritos.

Todos los experimentos de fenotipos embrionarios, WMISH, inmunofluorescencia y TUNEL se realizaron por triplicado, siendo el valor de n que aparece en el apartado de resultados el número total de elementos de la muestra.

En el estudio de la función de OI-Nanog sobre la proliferación, que se realizó mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo pH3 y DAPI, en cada embrión se seleccionaron al azar cuatro sectores de igual área. En cada sector se contó el número de núcleos teñidos con DAPI y el número de células pH3 positivas.

En el estudio de la función de OI-Nanog sobre la distribución de PGC en el embrión se han utilizado los paneles esquemáticos de distribución de PGC desarrollados por Herpin y colaboradores (2008) con el permiso del Dr. M. Schartl (Universidad de Wuerzburg, Germany).

En el estudio de proliferación de la retina mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo pH3, se contó el número de células pH3 positivas en cada retina completa para poder comparar los cambios debidos a la alteración de la vía de Wnt. En el estudio de apoptosis de la retina mediante TUNEL, se contó el número de células TUNEL positivas en

cada retina completa para poder comparar los cambios debidos a la alteración de la vía de Wnt. Los datos obtenidos en estos estudios de proliferación y apoptosis se transformaron en valores relativos al control, al cual se le dio valor 1. En las representaciones gráficas de estos estudios de proliferación y apoptosis, el eje X representa el valor 1 del control, por lo que las barras muestran los valores de la media \pm sd relativos de los experimentos así como el aumento (barra sobre el eje X) o la disminución (barra bajo el eje X) de los mismos respecto al control (eje X). Los experimentos de proliferación y apoptosis se realizaron por triplicado, por lo que las gráficas representan los resultados de tres experimentos independientes.



*Para el investigador no existe alegría comparable
a la de un descubrimiento, por pequeño que sea.
Alexander Fleming*

RESULTADOS



1. Control de genes de pluripotencialidad y diferenciación durante el desarrollo embrionario temprano.

Como se ha visto en la introducción, la regulación que Nanog y Oct4 ejercen sobre la pluripotencialidad se ha descrito principalmente en mamíferos, y el análisis funcional *in vivo* de estos FT se ha limitado al modelo murino. Para poder determinar la función endógena de estos FT durante el desarrollo embrionario de vertebrados es interesante introducir nuevos modelos animales que presenten ventajas frente al modelo murino y que complementen los resultados obtenidos.

El modelo animal elegido en este trabajo para estudiar la función *in vivo* de estos FT es el pez Medaka. El pez Medaka presenta muchas ventajas como modelo para la investigación embrionaria tal y como se ha descrito en el apartado de introducción. Previamente, en el laboratorio se había identificado la secuencia de *Nanog* ortóloga al gen Nanog de mamíferos y que no había sido localizada en el genoma de ningún pez hasta la fecha. Además, en el caso de *O1-pou5f1* de Medaka, no se disponía de un estudio detallado de expresión.

1.1. Expresión de Nanog y Oct4 durante el desarrollo embrionario temprano de Medaka.

En primer lugar, se estudió el patrón de expresión génica de *O1-Nanog* (Número de acceso en GenBank FJ436046) y *O1-Oct4* (Número de acceso en GenBank AY639946) durante el desarrollo embrionario de Medaka, utilizando las técnicas de RT-PCR para determinar los estadios en los que se expresan (expresión temporal) y de WMISH para determinar las células y tejidos en los que se expresan (expresión espacial).

Mediante RT-PCR se detectó la expresión de los dos genes a lo largo del desarrollo embrionario desde los estadios más tempranos, incluyendo los huevos sin fertilizar y los embriones de una célula, cuando el

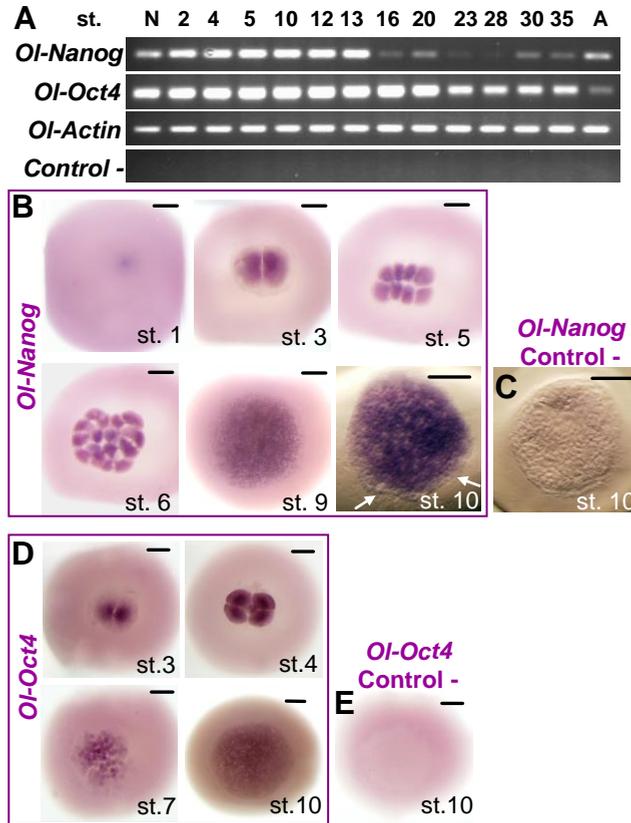


Fig. 23. Expresión de *OI-Nanog* y *OI-Oct4* en Medaka. (A) Análisis por RT-PCR del mRNA de *OI-Nanog* y *OI-Oct4* en distintos estadios del desarrollo embrionario. N: no fertilizado, A: alevín, st.: estadio. La amplificación del gen *OI-Actin* se ha usado como control interno. El control negativo (-) se ha realizado utilizando los oligos de *OI-Actin* con la mezcla de reacción del mRNA sin la transcriptasa reversa. (B) WMISH de *OI-Nanog* en distintos estadios. Hasta st. 9 se detecta la expresión de *OI-Nanog* en todos los blastómeros. Las flechas en el st. 10 marcan las células marginales donde no se detecta la expresión de *OI-Nanog*. (C) Control negativo de la reacción de WMISH utilizando la sonda sentido de *OI-Nanog*. (D) WMISH de *OI-Oct4* en distintos estadios. (E) Control negativo de la reacción de WMISH utilizando la sonda sentido de *OI-Oct4*. Barras de escala en B-E: 200 μ m.

genoma zigótico todavía no está activo. Por tanto, el mRNA de estos genes se hereda maternalmente. Este resultado contrasta con el patrón de expresión de *Nanog* en ratón, donde no se detecta el mRNA hasta el estadio de mórula (Chambers y cols., 2003). Por otra parte, la expresión de *OI-Nanog* disminuye a partir de st. 16 (estadio de gástrula tardía; Fig. 23 A y Fig. 5 en Introducción), siendo prácticamente indetectable entre los st. 20 y 28 (Fig. 5 en Introducción). Tras la eclosión del embrión, en estadio de alevín, la expresión de *Nanog* vuelve a ser elevada.

Mediante WMISH se observó que tanto *OI-Nanog* como *OI-Oct4* se expresaban en todas las células del embrión durante el desarrollo temprano hasta el estadio de blástula (st. 10; Fig. 23B y D; Fig. 5 en Introducción). En este estadio, *OI-Oct4* se detectó en todos los blastómeros mientras que la expresión de *OI-Nanog* se detectó en la mayoría de los blastómeros, salvo en los blastómeros localizados en las zonas de la periferia del embrión (Fig. 23B). El patrón de expresión génica temprana de *OI-Oct4* en Medaka es similar al patrón de expresión que presentan los genes homólogos del gen *Oct4* en Zebrafish (*spg/pou2*; Belting y cols., 2001) y ratón (*Mm-Oct4*; Yeom y cols., 1991). Cuando se utilizaron las sondas “sentido” de estos genes como controles negativos no se detectó tinción alguna (Fig. 23C y E), confirmando que las sondas de *OI-Nanog* y *OI-Oct4* eran específicas.

En segundo lugar, se estudió el patrón de expresión de las proteínas de *OI-Nanog* y *OI-Oct4* así como su localización subcelular. Para ello, se generaron anticuerpos policlonales para péptidos específicos de *OI-Nanog* y *OI-Oct4* (ver Materiales y Métodos para más información).

En embriones de estadio temprano la proteína *OI-Nanog* se detectó localizada en el núcleo celular y una tinción más débil en el citoplasma (Fig. 24A-C). Además, durante la división celular, caracterizada por la presencia de cromosomas mitóticos teñidos con DAPI, la proteína *OI-Nanog* dejaba de localizarse en el núcleo pasando a quedar dispersa en el citoplasma (Fig. 24D-F).

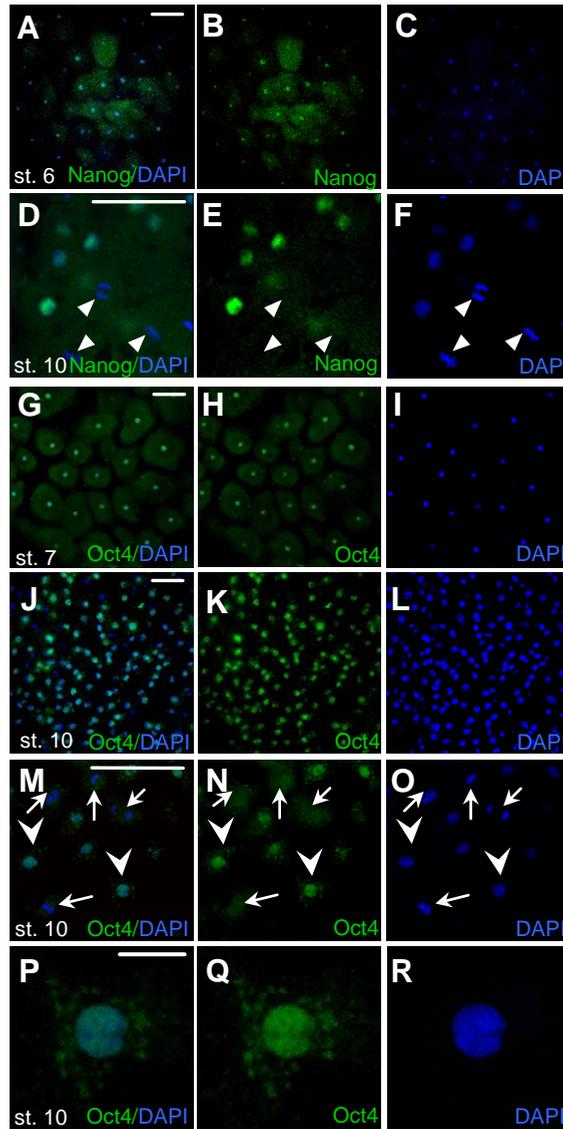


Fig. 24. Expresión de la proteína OI-Nanog y OI-Oct4. Ambas proteínas se localizan principalmente en los núcleos de los blastómeros (A-C y G-L) y aparecen dispersas uniformemente por el citoplasma durante la división celular (puntas de flecha en D-F y flechas en M-O). Además, OI-Oct4 presenta una tinción punteada en el citoplasma (P-R y puntas de flecha en M-O). Barras de escala en A, D, G, J y M: 50 μ m y en P: 10 μ m

El patrón de expresión de la proteína *OI-Oct4* en estadios tempranos de desarrollo es similar al de *OI-Nanog*. *OI-Oct4* se detectó en el núcleo celular (Fig. 24J-L). En st. 10, también se detectó una tinción citoplásmica punteada (Fig. 24M-R), lo que sugiere una localización compartimentada en el citoplasma. Además, al igual que sucedía en el caso de la proteína de *OI-Nanog*, durante la división celular, caracterizada por la presencia de cromosomas mitóticos teñidos con DAPI, la proteína *OI-Oct4* no se localizaba en el núcleo, quedando dispersa en el citoplasma (Fig. 24M-O).

1.2. Análisis funcional de *OI-Nanog* durante el desarrollo embrionario temprano de Medaka.

1.2.A. *Nanog* es necesario para que se produzca un correcto desarrollo embrionario.

Para estudiar la función de *OI-Nanog* durante el desarrollo embrionario de Medaka se utilizaron experimentos de pérdida de función (PDF) mediante la inyección de MO específicos para el bloqueo de la traducción de la proteína *OI-Nanog* (ver apartado de Materiales y Métodos), así como experimentos de ganancia de función (GDF) basados en la inyección de mRNA de *OI-Nanog* unido a la secuencia de varios epítomos de *myc*.

Para disminuir los niveles de la proteína de *OI-Nanog* se usaron dos MO distintos. Uno de ellos fue diseñado para unirse a la secuencia ATG de *OI-Nanog* (*MO-ATG*) por lo que bloquea la traducción al impedir estéricamente la entrada del ribosoma. El otro se une a la secuencia de unión entre el intrón1-exón2 de *OI-Nanog* (*MO-i1e2*). Este último tipo de MO interfiere con el procesado correcto del intrón del pre-mRNA, que no se elimina del mRNA y provoca la síntesis de una proteína truncada. Los embriones que se inyectaron con el *MO-Control* (*MO-C*) se desarrollaron de

manera normal (Fig. 25A, E). En el st. 16, la blástula de estos embriones control cubre las tres cuartas partes de la yema y el cuerpo embrionario forma una estrecha línea, mientras que en st. 23 (Fig. 5 en Introducción) se pueden detectar claramente las estructuras de la cabeza (ojos, lentes, vesículas cerebrales) y los 12 pares de somitas.

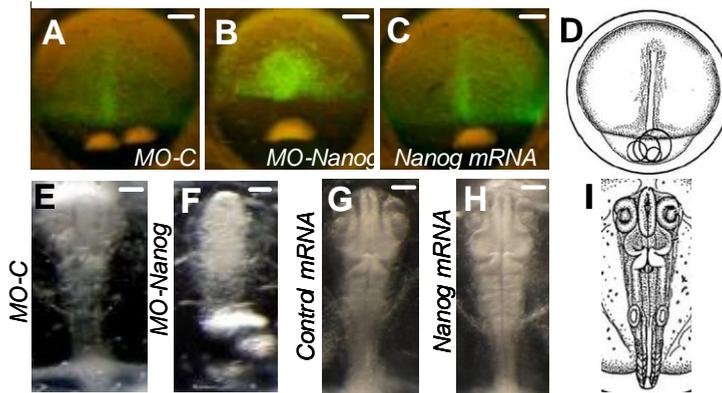


Fig. 25. La disminución de OI-Nanog mediada por la inyección de MO específicos altera el desarrollo temprano de los embriones de Medaka, mientras que la GDF no induce ningún fenotipo. (A-C) Fenotipos de embriones 24 horas tras la inyección de *MO-C*, *MO-Nanog* o el mRNA de *OI-Nanog* (st. 16). El mRNA de la *GFP* fue inyectado como trazador. (D) Dibujo de un embrión de Medaka en st. 16 adaptado de Iwamatsu (2004). (E-H) Fenotipos en embriones de st. 23 inducidos tras la eliminación o sobreexpresión de *OI-Nanog*. (I) Dibujo de un embrión de Medaka en st. 23 adaptado de Iwamatsu (2004). Barras de escala: 200 μ m.

Sin embargo, la inyección del *MO-ATG* o el *MO-i1e2* causa un fenotipo anormal en la mayoría de los embriones de st. 16 (Fig. 25B y Tabla 10). La blástula de estos embriones cubre únicamente la mitad de la yema y el cuerpo embrionario en desarrollo está formado por una masa de células compacta y densa. En st. 23, el embrión es de reducido tamaño y está formado por una masa celular sin diferenciar, donde no se pueden apreciar estructuras de cabeza o cola (Fig. 25F). Este fenotipo produce la parada del desarrollo embrionario y consecuentemente la muerte del embrión.

Ambos MO diseñados contra *OI-Nanog* generan el mismo fenotipo, sin embargo, el *MO-ATG* presentó mayor penetrancia, ya que generó un mayor porcentaje de embriones afectados que los embriones inyectados con *MO-i1e2* (Tabla10). Por tanto, en el resto de experimentos, se utilizó únicamente el *MO-ATG*, el cual se nombrará en adelante como *MO-Nanog*.

Tabla 10. Análisis fenotípico de los experimentos de GDF y PDF de *OI-Nanog*. Los fenotipos no específicos, i.e. fenotipos de inyección, no están representados en la tabla, pero representan la diferencia entre los datos indicados y el 100 %. Cada experimento se realizó por triplicado y n es el número total de embriones de esos tres experimentos.

	Concentración	Fenotipo específico Nanog (%)	Normal (%)	n
<i>MO-C</i>	1 mM	0	75	166
	0,5 mM	0	81	111
<i>ATG MO (MO-Nanog)</i>	1 mM	88	2	161
	0,5 mM	77	14	138
<i>i1e2 MO</i>	0,5 mM	39	41	88
Control mRNA	100 ng/μl	0	71	126
	200 ng/μl	0	78	176
Nanog mRNA	100 ng/μl	0	79	126
	200 ng/μl	0	76	137
	400 ng/μl	0	78	81

Para comprobar que el fenotipo de *MO-Nanog* es específico en la reducción de los niveles de la proteína de *OI-Nanog* se realizaron dos experimentos. En primer lugar se analizaron los niveles de proteína Nanog *in vivo* después de la inyección de *MO-Nanog*. La tinción de inmunofluorescencia con el anticuerpo de Nanog en los embriones inyectados con *MO-C* o *MO-Nanog* mostró la pérdida de la proteína *OI-Nanog* en el núcleo de las células de los embriones inyectados con *MO-Nanog* (Fig. 26D-F), lo que no sucedía en los embriones inyectados con *MO-C* (Fig. 26A-C).

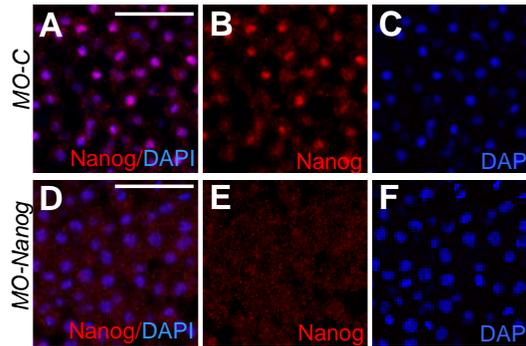


Fig. 26. La localización nuclear de OI-Nanog no aparece en los embriones inyectados con *MO-Nanog*. (A-C) En los embriones inyectados con *MO-C* existe colocalización entre DAPI y la proteína de OI-Nanog. (D-F) En los embriones inyectados con *MO-Nanog* no hay colocalización entre DAPI y la proteína de OI-Nanog. Barras de escala: 50 μ m.

En segundo lugar se realizó un estudio de rescate del fenotipo mediante la coinyección de *MO-Nanog* junto a distintas concentraciones del mRNA *OI-Nanog* unido a *myc*. Mediante la coinyección se obtuvo un rescate dependiente de la concentración del fenotipo de *MO-Nanog* llegando a recuperarse la viabilidad embrionaria (Fig. 27).

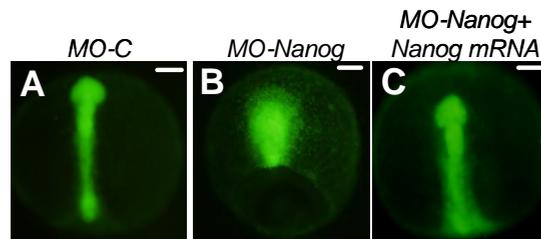


Fig. 27. El mRNA de *OI-Nanog* rescata el fenotipo inducido por el *MO-Nanog*. El fenotipo en st. 19 de los embriones coinyectados con *MO-Nanog* y mRNA de *OI-Nanog* (C) es muy similar al fenotipo que produce la inyección del *MO-C* (A), pudiendo apreciarse en ambos casos la estructura de la cabeza y la cola. Los embriones inyectados únicamente con *MO-Nanog* no presentan estructuras evidentes de cabeza o cola a ese estadio (B). Barras de escala: 200 μ m.

Los niveles de rescate fueron desde moderados a completos dependiendo de la concentración del mRNA coinyectado, de manera que a mayor concentración, más elevado fue el nivel de rescate del fenotipo de *MO-Nanog* (Tabla 11). Los resultados de estos dos experimentos confirman que el fenotipo originado por la inyección de *MO-Nanog* es específico de la reducción de la proteína de *OI-Nanog* endógena.

Tabla 11. Rescate del fenotipo causado por la falta de función de Nanog. Las dos concentraciones de mRNA *myc-Nanog* coinyectadas con *MO-Nanog* son capaces de rescatar el fenotipo específico de *MO-Nanog*, demostrando la especificidad del *MO-Nanog* y la funcionalidad del mRNA de *OI-Nanog*. La concentración más elevada del mRNA de *OI-Nanog* generó mayor porcentaje de rescate completo por lo que el rescate era dependiente de la concentración de mRNA inyectado. Los experimentos control realizados mediante la coinyección de *MO-Nanog* y mRNA *myc* presentaban únicamente fenotipos de *MO-Nanog*. Cada experimento se realizó por triplicado y n es el número total de embriones de esos tres experimentos.

mRNA	<i>MO-Nanog</i>	Fenotipo de <i>MO-Nanog</i> (%)	Rescate (%)		n
			Moderado	Completo	
<i>Myc-Nanog</i> 100 ng/μl	0,5 mM	8	40	52	108
<i>Myc-Nanog</i> 200 ng/μl	0,5 mM	0	15	85	116
<i>Myc-Control</i> 100 ng/μl	0,5 mM	100	0	0	96
<i>Myc-Control</i> 200 ng/μl	0,5 mM	100	0	0	108

El resultado del experimento de rescate también indicó que el mRNA sintetizado de *OI-Nanog* era funcional y capaz de rescatar la falta de función del *OI-Nanog* endógeno.

Además, se realizó la inmunohistoquímica para detectar el epitopo de *myc* unido al mRNA de *OI-Nanog*. Mediante este experimento se comprobó que la localización subcelular de la proteína exógena *OI-Nanog* era nuclear (Fig. 28). Sin embargo, los experimentos de sobreexpresión que se realizaron inyectando dos concentraciones distintas de mRNA *OI-Nanog*

no generaron ningún fenotipo visible (Fig. 25C, H y Tabla 10). Por tanto, el mRNA inyectado induce la sobreexpresión de la proteína funcional de *OI-Nanog* que se localiza en el núcleo al igual que la proteína endógena (Fig. 28) y es capaz de rescatar la falta de proteína endógena producida por el *MO-Nanog*. Sin embargo, la sobreexpresión de proteína funcional en un embrión normal no alteró el desarrollo del mismo.

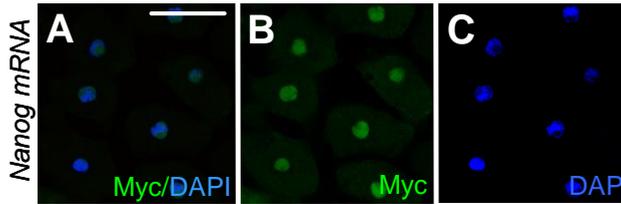


Fig. 28. El mRNA inyectado de *OI-Nanog* unido a *Myc* produce una proteína que se localiza en el núcleo al igual que la proteína endógena de *Nanog*. (A) La colocalización entre DAPI y la señalización de inmunofluorescencia para *Myc* muestran la localización nuclear de la proteína exógena de *Nanog*. Barra de escala: 25 μ m.

1.2.B. *Nanog* es necesario para la proliferación celular y para la correcta transición de la fase de síntesis del ciclo celular.

Para caracterizar el fenotipo de los embriones inyectados con el *MO-Nanog*, el estudio se centró en primer lugar en el efecto sobre la proliferación, ya que visualmente los embriones inyectados con el *MO-Nanog* presentaban menor número de células que el control y además, las células parecían tener un tamaño mayor (Fig. 25A y B). En los peces teleósteos, el embrión va reduciendo el tamaño celular con cada división hasta los estadios de activación del genoma zigótico, por ello, un tamaño celular mayor es indicativo de una menor división celular. Esta observación fue cuantificada mediante el recuento del número de núcleos, teñidos con DAPI, en 4 sectores de cada embrión. Los sectores eran de área fija y

fueron establecidos al azar dentro del embrión. Los embriones inyectados con *MO-Nanog* tenían menor número de núcleos por sector ($19,69 \pm 1,31$) que los embriones inyectados con el *MO-C* ($34,58 \pm 2,62$; Fig. 29E). Por tanto, la proliferación en estos embriones podría estar comprometida tras la reducción de los niveles de la proteína de Nanog.

Para estudiar la posible relación entre *OI-Nanog* y la proliferación celular, se realizó un estudio de inmunohistoquímica con pH3, que marca las células en fase M del ciclo celular. En el st. 16, la sobreexpresión de *OI-Nanog* en los embriones inyectados con el mRNA no tuvo efecto en el número de células o el porcentaje de células pH3 positivas cuando se compararon con el control (Fig. 29C, D, G y H). Por otro lado, los embriones inyectados con *MO-Nanog* tenían un menor número de células pH3 positivas por sector ($6,3 \pm 0,5 \%$) que los embriones inyectados con *MO-C* ($14,0 \pm 1,1 \%$; Fig. 29A, B y F).

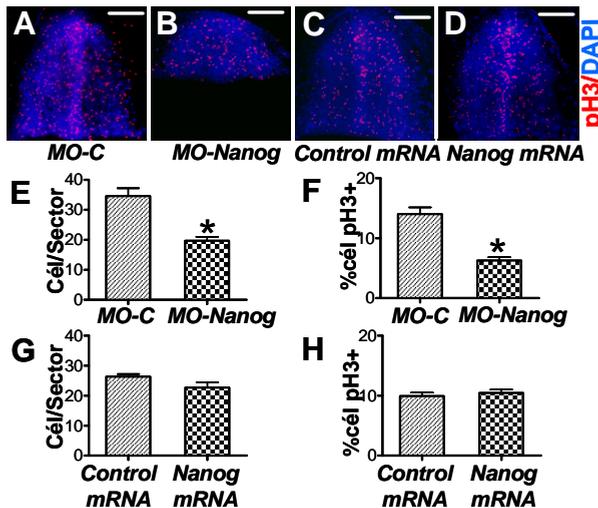


Fig. 29. La reducción de *OI-Nanog* debido a la inyección de *MO-Nanog* disminuye la proliferación celular. (A, B, E, F) Ensayo de proliferación celular en embriones de st. 16 previamente inyectados con *MO-C* o *MO-Nanog*. (C, D, G, H) Ensayo de proliferación celular en embriones de st. 16 previamente inyectados con mRNA de *myc-Control* o mRNA de *myc-Nanog*. Los datos representan la media \pm sd de tres experimentos independientes, * $p < 0,0005$. Cél: Células. Barras de escala en A-D: 200 μ m.

Además, se estudió si el efecto del *MO-Nanog* sobre la proliferación podía ser rescatado coinyectando el mRNA de *Oi-Nanog*. La coinyección de *MO-Nanog* (0,5 mM) con el mRNA de *Oi-Nanog* (200 ng/μL) provocó un incremento en el porcentaje de células pH3 positivas ($12,7 \pm 0,6$ %) con respecto al porcentaje de células pH3 positivas que presentaban los embriones coinyectados con *MO-Nanog* y el mRNA control ($6,7 \pm 0,4$ %; Fig. 30). Además, este rescate por el mRNA de *Nanog* generaba un porcentaje de células pH3 positivas similar a los embriones inyectados únicamente con *MO-C* (Fig. 30C). Estos datos indican que *Nanog* es necesario para la proliferación de las células en desarrollo en estadios tempranos.

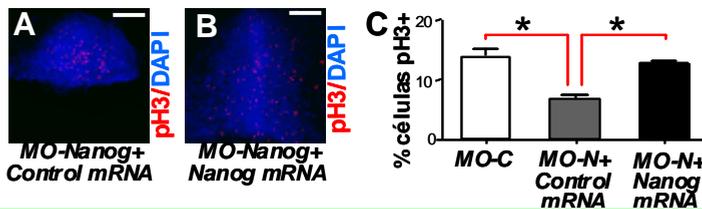


Fig. 30. La coinyección del mRNA de *Oi-Nanog* junto al *MO-Nanog* es capaz de rescatar la disminución de proliferación causada por el *MO-Nanog*. (A-C) Los embriones coinyectados con el mRNA de *Oi-Nanog* y el *MO-Nanog* presentan un tamaño de embrión y un porcentaje de células pH3 positivas similar a los embriones inyectados con *MO-C* y mayor a los embriones coinyectados con *MO-Nanog* y el mRNA Control. En (C) *MO-Nanog* ha sido abreviado como *MO-N*. Los datos representan la media \pm sd de tres experimentos independientes, * $p < 0,0005$. Barras de escala en A y B: 200 μ m.

Tras los resultados obtenidos, se analizó el efecto de *Oi-Nanog* en las propiedades del ciclo celular. Para ello, se hizo un estudio de citometría de flujo en el que las células provenientes de embriones inyectados con *MO-C* o *MO-Nanog* de st. 16 fueron teñidas con PI. Usando esta técnica, además de conocer la relación de células que hay en cada fase del ciclo celular, se puede analizar el tamaño celular. Esto permitió cuantificar la observación inicial en la que las células de los embriones inyectados con

MO-Nanog parecían ser más grandes que las células de los embriones inyectados con el *MO-C* (Fig. 25A, B). Para evitar la interferencia que produciría en la cuantificación del tamaño celular los cambios debidos a la síntesis de DNA y división celular, únicamente se cuantificó el tamaño de las células que se encontraban en fase G0/G1 (Fig. 31A, C). El análisis mostró que la distribución celular de los embriones inyectados con *MO-Nanog* se había desplazado hacía tamaños celulares mayores en comparación con la distribución celular de los embriones control (Fig. 31B, D).

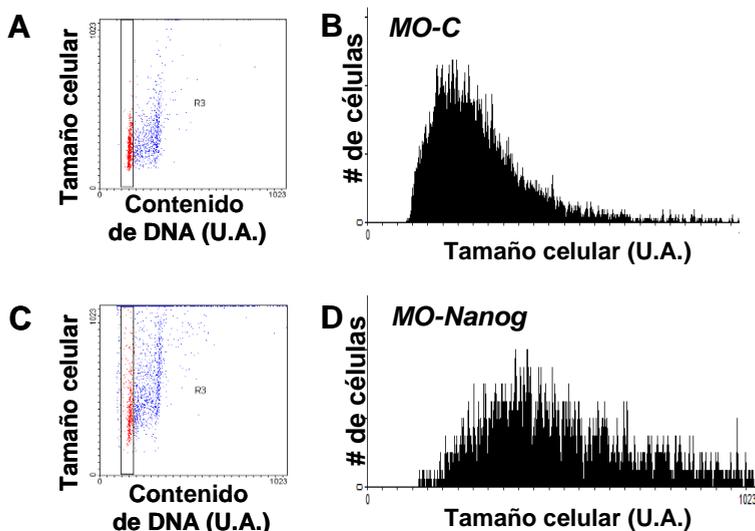


Fig. 31. El tamaño celular de los embriones inyectados con *MO-Nanog* es mayor que el de los embriones inyectados con *MO-C*. (B-D) Histogramas que muestran el tamaño celular de los embriones inyectados con *MO-C* (B) o *MO-Nanog* (D) de las células que se encuentran en la fase G0/G1 (seleccionadas en el histograma A o C respectivamente, marcadas con el punteado rojo). U.A.: unidades arbitrarias; #: número.

Mediante este experimento con PI y citometría de flujo se pudo estudiar también el porcentaje de células que se encontraba en cada fase del ciclo celular. Se observó que el porcentaje de células en fase S estaba incrementado en los embriones inyectados con *MO-Nanog* ($63,37 \pm 2,40 \%$)

en comparación con el porcentaje en fase S de los embriones inyectados con *MO-C* ($53,39 \pm 0,65$ %; Fig. 32). Este incremento en fase S iba acompañado de un descenso en el porcentaje de células en fase G0/G1 en los embriones inyectados con *MO-Nanog* ($18,43 \pm 1,12$ %) al compararse con los inyectados con *MO-C* ($33,18 \pm 2,28$ %, Fig. 32).

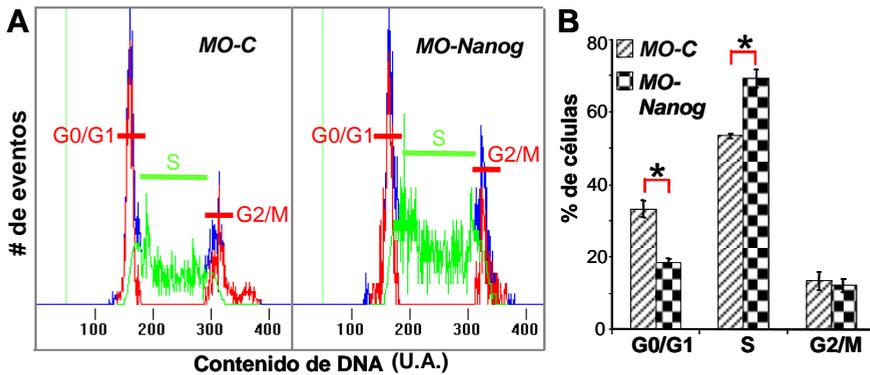


Fig. 32. La disminución de *OI-Nanog* aumenta el porcentaje de células en fase S y disminuye el porcentaje de células en fase G0/G1. (A) Histograma representando la distribución celular en las distintas fases del ciclo celular según el contenido de DNA de las células provenientes de embriones inyectados con *MO-C* o con *MO-Nanog*. U.A.: unidades arbitrarias; #: número. (B) Gráfica que representa el porcentaje de células en G0/G1, S y G2/M de embriones inyectados con *MO-C* o *MO-Nanog*. Los datos representan la media \pm sd, * $p < 0,005$.

Teniendo en cuenta estos resultados, se analizaron por qRT-PCR los posibles cambios en la expresión de *Ciclina D1* (*CcnD1*) y *Ciclina A* (*CcnA*), dos genes que codifican para proteínas reguladoras del ciclo en la fase G1 y S. *CcnD1* es un importante regulador de la progresión del ciclo de fase G1 a fase S, mientras que *CcnA* es necesario para la progresión del ciclo a través de la fase S. Tras analizar los resultados de la qRT-PCR se observó una disminución en la expresión de *CcnA* en los embriones inyectados con *MO-Nanog* respecto a los embriones inyectados con *MO-C* (Fig. 33B). Sin embargo, no hubo cambios en la expresión de *CcnD1* (Fig.

33A). En conjunto, estos resultados indicarían que *Oi-Nanog* es necesario para la progresión de la fase S y/o salida de esa fase.

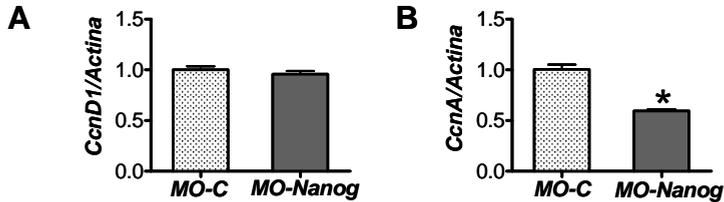


Fig. 33. La disminución de *Oi-Nanog* disminuye la expresión de *CcnA*, proteína reguladora de la progresión del ciclo celular a través de la fase S, pero no afecta a la expresión de *CcnD1*. (A, B) Detección de la expresión de *CcnD1* (A) y *CcnA* (B) en relación a la actina mediante qRT-PCR en embriones inyectados con *MO-C* o con *MO-Nanog*. Los datos representan la media \pm sd de tres experimentos independientes, * $p < 0,0005$.

1.2.C. Nanog no regula el proceso de determinación temprana de las capas embrionarias *in vivo*.

Los experimentos realizados *in vitro* en ESC de ratón para determinar la función de Nanog muestran que es necesario para evitar la diferenciación celular (Chambers y cols., 2003; Mitsui y cols., 2003). Para estudiar si Nanog conserva esta función *in vivo*, se analizó por WMISH y qRT-PCR la posible variación de la expresión de genes marcadores de diferenciación en embriones inyectados con mRNA de *Oi-Nanog* o con *MO-Nanog* en relación a sus respectivos controles. Mediante WMISH se analizó la expresión de *Brachyury* (*Bra*) como marcador de mesodermo (Smith y cols., 1991), *Pax6* como marcador de ectodermo (Stoykova y cols., 1994) y *Oct4* como marcador de pluripotencialidad (Nichols y cols., 1998). Mediante qRT-PCR analizamos *Sox17* como marcador de endodermo (Sinner y cols., 2004). En los embriones inyectados con *MO-Nanog*, el patrón de expresión del gen *Bra* se mantuvo proporcional al tamaño del embrión, lo que indica que la inducción de mesodermo ocurre de manera normal. Los niveles de

Pax6 disminuyeron, pero seguía expresándose el gen, y el patrón de expresión de *Oct4* era desorganizado. Por tanto, los tres genes marcadores se expresaban en los embriones deficientes de Nanog, indicando que la diferenciación celular estaba ocurriendo de manera normal, si bien algunos patrones de expresión se veían afectados, posiblemente como consecuencia de la diferencia de tamaño entre los embriones deficientes de OI-Nanog en comparación con los controles (Fig. 34A-D).

Por otra parte, la sobreexpresión de *OI-Nanog* no tenía efecto en el patrón de expresión de los tres genes marcadores o en sus niveles de expresión (Fig. 34A-D). La falta de efecto debida a la inyección del mRNA de *OI-Nanog* podría deberse a que en st. 16, el mRNA exógeno se hubiese degradado. Sin embargo, en st. 16 todavía se detectaban por RT-PCR niveles más elevados de mRNA de *OI-Nanog* en los embriones inyectados con el mRNA de *OI-Nanog* en comparación con los embriones control (Fig. 34F). Tampoco hubo un cambio significativo en la expresión de *Sox17* analizado por qRT-PCR en los embriones inyectados con *MO-Nanog* o el mRNA de *OI-Nanog* en relación a sus controles (Fig. 34E).

Si *OI-Nanog* fuese necesario para mantener la pluripotencialidad, su eliminación debería inducir la activación temprana de los marcadores de diferenciación y la inhibición de los marcadores de pluripotencialidad. Sin embargo, la activación de los genes específicos de diferenciación en los embriones deficientes de OI-Nanog ocurría en el mismo estadio que en los embriones control. Esto indica que la eliminación de Nanog no induce una diferenciación precoz en el embrión. Además, la expresión del mRNA de *Oct4* estaba presente en los embriones inyectados con *MO-Nanog* (Fig. 34D), indicando que siguen presentes células pluripotentes.

Para realizar un análisis más completo y confirmar los resultados de WMISH y qRT-PCR, realizamos un análisis de RT-PCR semicuantitativa de *Bra*, *Pax6*, *Oct4*, *Sox17* y otros genes marcadores (Fig. 34F). Los resultados de RT-PCR semicuantitativa confirmaron que los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación asociados con la determinación de las

capas embrionarias tempranas no presentaban cambios significativos. Por tanto, no habían alteraciones en la expresión de genes marcadores asociados con mesodermo (*Bra*), endodermo (*Sox17* y *FoxA2*; Sinner y cols., 2004), ectodermo no neural (*Gata3*; Sheng y cols., 1999) o ectodermo neural temprano (*Sox2* y *Sox3*; Uwanogho y cols., 1995). Sin embargo, sí se observó una reducción en los marcadores de ectodermo neural *Pax6*, *Shh* y *Pax2* (Stoykova y cols., 1994) en los embriones inyectados con *MO-Nanog*

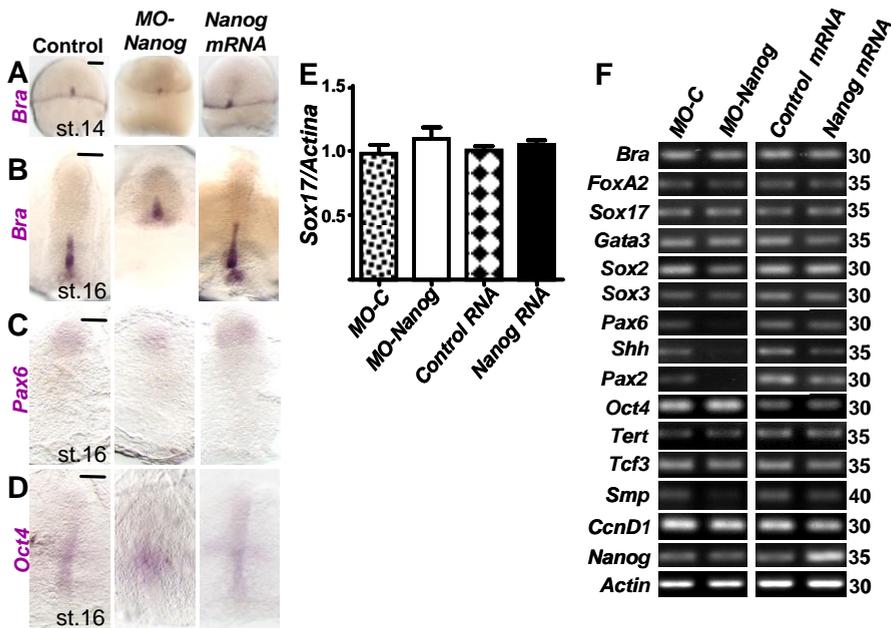


Fig. 34. La GDF o PDF de *Oi-Nanog* no regula la expresión de genes asociados con pluripotencialidad o la determinación temprana de las capas embrionarias. (A-D) Análisis de la expresión de genes marcadores utilizando WISH tras la eliminación de *Oi-Nanog* o la sobreexpresión de *Oi-Nanog*. No se observan cambios significativos en el patrón de expresión de los genes marcadores *Bra* (mesodermo, A y B) y *Pax6* (ectodermo neural, C). (D) El patrón de expresión de *Oct4* (pluripotencialidad) está desorganizado, pero no inhibido. (E) Análisis de expresión por qRT-PCR del marcador de endodermo *Sox17* en st. 16. Los datos representan la media \pm sd. (F) Análisis de expresión por RT-PCR de varios mRNA de genes marcadores en embriones de st. 16. El número de ciclos de cada amplificación se muestra a la derecha de la imagen. Barras de escala en A-D: 200 μ m.

en comparación con los embriones inyectados con *MO-C*. Estos marcadores son inducidos en el ectodermo neural durante el proceso de regionalización y depende de la interacción entre las capas embrionarias (Lupo y cols., 2006). La alteración en la expresión de estos genes puede deberse a un defecto en los procesos de regionalización provocada por la falta de proliferación celular.

Además, los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencialidad tales como *Oct4*, *Tert* y *Tcf3* (Nichols y cols., 1998; Pereira y cols., 2006; Laval y cols., 2007) no cambiaron en los embriones inyectados con *MO-Nanog* o con el mRNA de *OI-Nanog* (Fig. 34F). Por otra parte, la disminución de *OI-Nanog* en los embriones coincidió con una disminución en la expresión de *Simplet (Smp)*, que es un gen homólogo al gen *FAM53B* en humanos y que participa en la regulación de la proliferación en el embrión de Medaka tras la transición de media-blástula. (Fig. 34F; Thermes y cols., 2006). Por tanto, los resultados muestran que *OI-Nanog* no parece necesario para la diferenciación temprana de las capas embrionarias y el mantenimiento de la pluripotencialidad celular.

2. Regulación de la pluripotencialidad y la diferenciación durante el desarrollo embrionario tardío y adulto: células del primordio germinal.

2.1. Expresión de Nanog y Oct4 durante el desarrollo embrionario tardío de Medaka.

En ratones, tanto *Mm-Nanog* como *Mm-Oct4* se expresan en las CPG, en el borde genital y en las gónadas en desarrollo (Rosner y cols., 1990; Scholer y cols., 1990; Pesce y cols., 1998; Chambers y cols., 2003; Yamaguchi S. y cols., 2005). El gen *Mm-Oct4* es necesario para la supervivencia de las CPG (Kehler y cols. 2004) pues la pérdida de la función de Oct4 en las CPG conduce a la apoptosis de estas células en los embriones de ratón. En pollo, *c-Nanog* y *c-PouV*, homólogo de *Oct4*, también se expresan en las CPG y las gónadas en desarrollo (Cañón y cols., 2006; Laval y cols., 2007). Estos datos sugieren que tanto OI-Nanog como OI-Oct4 podrían expresarse también en las CPG de Medaka, por tanto, se evaluó la expresión de los dos genes en las CPG.

2.1.A. Expresión del mRNA de Nanog y Oct4 en estadios embrionarios tardíos.

Previamente, mediante el uso de RT-PCR, se detectó la expresión de ambos genes a lo largo de todo el desarrollo embrionario de Medaka (Ver Fig. 23A en el apartado 1.1). Además, se estudió el patrón de expresión de ambos genes mediante la utilización de WMISH.

Por un lado, no se detectó la expresión de *OI-Nanog* en los estadios tardíos. Este resultado coincide con los bajos niveles de expresión de este gen detectados por RT-PCR (Fig. 23A en el apartado 1.1), por lo que estos estadios tardíos presentan niveles de expresión de *OI-Nanog* que pueden no alcanzar el umbral de detección por WMISH.

Por otro lado, en st. 15 (estadio de media-gástrula; Fig. 5 de Introducción), la expresión de *OI-Oct4* se localizó en un grupo central de células alrededor de la línea embrionaria (Fig. 35A). En st. 17 (estadio de néurula temprana; Fig. 5 de Introducción), la expresión se detectó en la zona media del cuerpo embrionario (Fig. 35B). En st. 18 (estadio de néurula tardía; Fig. 5 de Introducción), apareció un segundo dominio de expresión de *OI-Oct4* en la zona posterior del embrión (Fig. 35C), que es similar a la expresión de *spg/pou2* en la parte posterior del embrión de Zebrafish (Thisse y cols., 2001). En st. 19 (estadio de 2 somitas; Fig. 5 de Introducción), la expresión en la zona central del embrión desapareció mientras que el dominio posterior de expresión se hizo más fuerte y permaneció expresado a ese nivel hasta como mínimo el st. 23 (estadio de 12 somitas; Fig. 35D-F).

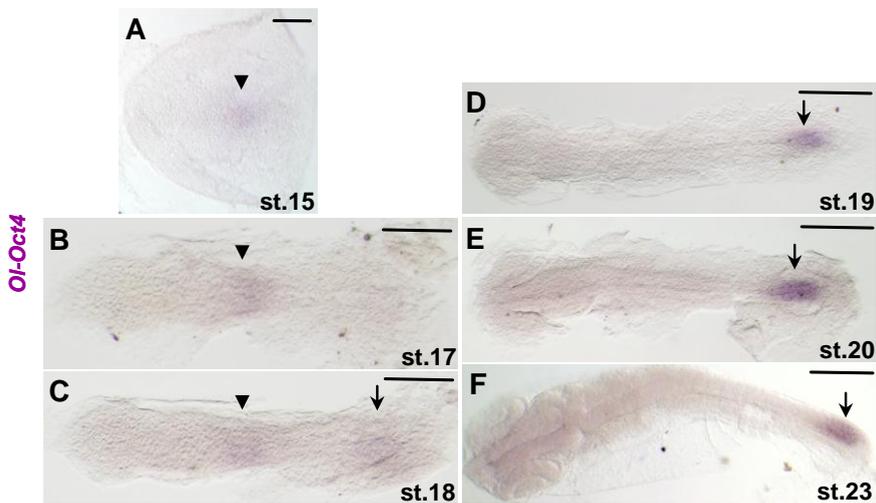


Fig. 35. Patrón de expresión de *OI-Oct4* en distintos estadios tardíos del desarrollo embrionario. (A-B) Dominio de expresión en la mitad del cuerpo embrionario (puntas de flecha). (C-F) Dominio de expresión de *OI-Oct4* en la punta posterior del cuerpo embrionario (flechas). La parte anterior de los embriones se encuentra a la izquierda. Barras de escala: 200 μ m.

2.1.B. Expresión de las proteínas de Nanog y Oct4 en estadios embrionarios tardíos.

Para caracterizar mejor el patrón de expresión de OI-Nanog y OI-Oct4 se realizó el análisis inmunohistoquímico con los anticuerpos específicos. Los primeros resultados en embriones de st. 20 (estadio de 4 somitas; Fig. 5 Introducción) o más tardíos mostraron expresión de ambas proteínas en algunas células localizadas junto al cuerpo embrionario en la zona posterior. Puesto que ambas proteínas se expresan en las CPG de ratones y pollos, se comprobó si estas células se correspondían con las CPG de Medaka. Para ello, en primer lugar se inyectaron embriones de Medaka en st. 1 a 3 con la construcción *3'UTR-Nanos-GFP*. Esta construcción se caracteriza por expresar *GFP* únicamente en las CPG (Saito y cols. 2006). Posteriormente se realizó la inmunohistoquímica con OI-Nanog u OI-Oct4 cuando los embriones estuvieron en el estadio apropiado.

En el estudio de OI-Nanog, en st. 23 (estadio de 12 somitas) se detectó que la tinción de OI-Nanog colocalizaba con las CPG (células GFP positivas; Fig. 36). Por tanto, en estadios tardíos de desarrollo, la expresión de OI-Nanog queda restringida a las CPG.

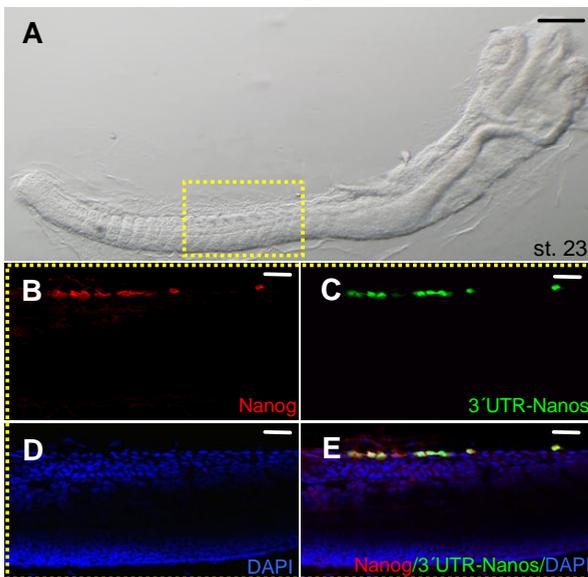


Fig. 36. OI-Nanog se expresa en las CPG. (A) Imagen en campo claro de un embrión de st. 23. El área dentro del recuadro amarillo está aumentada en (B-E). (B-E) Imágenes de inmunofluorescencia que muestran la colocalización de OI-Nanog y las CPG, marcadas con *3'UTR-Nanos-GFP*. Barras de escala en A: 100 μ m y en B-E: 20 μ m.

Por otra parte, el estudio inmunohistoquímico de OI-Oct4 reveló un patrón dinámico en la presencia de esta proteína en las CPG de Medaka, ya que no todas las células GFP positivas lo eran también para OI-Oct4. En st. 25 (estadio de 18 somitas; Fig. 5 Introducción), las células GFP que colocalizaban con OI-Oct4 tenían una morfología similar a una ameba y no se encontraban localizadas en la posición final de las gónadas, lo que sugería que estas células eran las CPG en migración (Fig. 37A-E, J-M). Cuando las CPG alcanzaban su localización final, donde las gónadas se

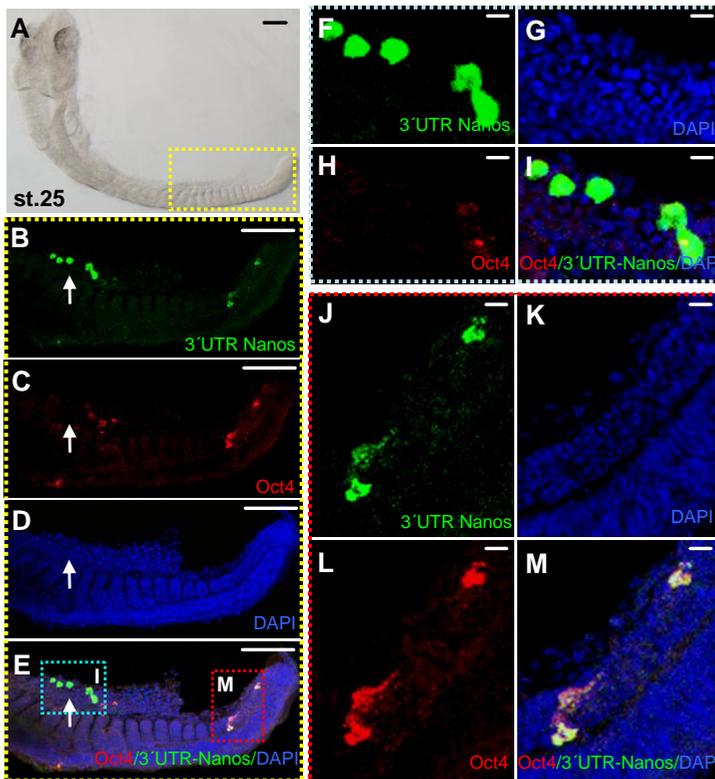


Fig. 37. OI-Oct4 se expresa en las CPG en migración. (A) Imagen en campo claro de un embrión de st. 25. El área dentro del recuadro amarillo está aumentada en (B-E). (B-M) Imágenes de inmunofluorescencia que muestran dos tipos distintos de CPG. (J-M) Un tipo de CPG tienen una morfología de ameba, está migrando hacia la posición final de la gónada y expresa OI-Oct4. (F-I) El otro tipo de CPG tiene una morfología circular, está localizada en la posición final de la gónada (flecha en B-E), pero no expresa OI-Oct4. Barras de escala en A-E: 100 μ m y en F-M: 10 μ m.

diferenciarán, y adoptaban una morfología redonda, la expresión de *OI-Oct4* se perdía (Fig. 37A-I). Este resultado en la expresión de *OI-Oct4* sugiere que la expresión se mantiene sólo durante la migración de las CPG.

2.2. Función de Nanog en el desarrollo de las células del primordio germinal de Medaka.

2.2.A. *OI-Nanog* regula la expresión de *Cxcr4b* en las células del primordio germinal.

Como se ha indicado en el apartado anterior, *OI-Nanog* se expresa en las CPG en migración así como en las CPG que ya han alcanzado su posición final, donde se formarán las gónadas (Fig. 36). En ratón, las ESC delecionadas para el gen *Nanog* e inyectadas en mórulas de ratones salvajes contribuyen a la diferenciación de todos los tejidos somáticos excepto las gónadas (Chambers y cols., 2007). Esto indica que *Nanog* parece ser necesario para la formación de las gónadas. Para investigar el mecanismo molecular que utiliza *Nanog* en el desarrollo de la línea germinal, se analizaron los efectos de la desregulación de *OI-Nanog* sobre la expresión de varios genes implicados en el desarrollo de las CPG y la determinación del sexo.

En Zebrafish y ratones, la quimioquina *Sdf1* y su receptor *Cxcr4* son necesarios para la migración de las CPG (Doitsidou y cols., 2002; Ara y cols., 2003; Molyneaux y cols., 2003). *Sdf1* se expresa en las células somáticas y *Cxcr4* se expresa en las CPG (Knaut y cols., 2003). En Medaka, hay dos ortólogos de *Sdf1*, *Sdf1a* y *Sdf1b*, que actúan de manera secuencial sobre *Cxcr4b* para dirigir la migración de las CPG. Esta secuencia de eventos delimita dos de las tres fases de migración de las CPG en Medaka (Kurokawa y cols., 2006). Durante la fase inicial de migración, que comienza a mediados del estadio de pre-gástrula (st. 14; Fig. 5 Introducción) y terminan a principios de la neurulación (st. 17), *Cxcr4b* se

expresa en las CPG, las cuales migran a la zona marginal del embrión en respuesta a *Sdf1a*. En la segunda fase, que se produce entre finales de la etapa de néurula (st. 18) y el estadio de 15 somitas (st. 24; Fig. 5 Introducción), las CPG migran de forma pasiva junto con las células somáticas hacia la línea media del embrión, independientemente de *Sdf1a* o *Sdf1b*. La tercera fase de migración comienza alrededor del estadio de 22 somitas (st. 26; Fig. 5 Introducción), en esta fase el sistema *Sdf1b/Cxcr4b* participa en el posicionamiento de las CPG (Herpin y cols., 2008). Además, en la tercera fase de migración, se ha descrito la implicación de otro sistema receptor-quimioquina, *Cxcr7/rdc1*, aunque en este caso el receptor *Cxcr7* se expresa en las células somáticas mesodermales (Sasado y cols., 2008). Otro gen implicado en la biología de las CPG es el gen del tumor de Wilms (*Wt1*), que afecta al desarrollo de las gónadas de mamíferos (Gessler, y cols., 1990; Barboux y cols. 1997; Klamt y cols., 1998) y es necesario para el mantenimiento de las CPG en Medaka (Klüver y cols., 2009). Por último, Medaka es el único vertebrado no mamífero con un gen de determinación del sexo masculino, *Dmrt1bY/Dmy* (Matsuda y cols., 2002; Nanda y cols., 2002). *Dmrt1bY* se expresa antes de la eclosión (st. 36; Fig. 5 Introducción) en las gónadas masculinas e inhibe la proliferación de las CPG, que siguen proliferando en la gónadas femeninas (Herpin y cols., 2007).

A continuación, se estudió el efecto de la PDF de *OI-Nanog* sobre los niveles de expresión de estos genes por qRT-PCR en embriones inyectados con *MO-Nanog* y con *MO-C*. El efecto de GDF de *OI-Nanog* se realizó de igual manera utilizando embriones inyectados con mRNA de *OI-Nanog* o mRNA control. Los resultados mostraron que la disminución de *OI-Nanog* originaba una disminución en los niveles de expresión del gen *Cxcr4b* pero no en el resto de genes estudiados (Fig. 38A). Por otra parte, la sobreexpresión de *OI-Nanog* no alteró los niveles de expresión de ninguno de los genes de estudio (Fig. 38A).

Para confirmar los resultados obtenidos por qRT-PCR, se utilizó la técnica de WMISH en embriones inyectados con *MO-C* o *MO-Nanog*.

Cxcr4b presenta dos dominios de expresión, uno anterior, dentro de las vesículas ópticas en desarrollo, y otro en la parte posterior del embrión donde se localizan las CPG (Fig. 38B). Al comparar estos dominios de expresión en los embriones inyectados con *MO-Nanog* respecto a los embriones control, se observó que sólo el dominio posterior desaparecía en los embriones deficientes en *OI-Nanog* (Fig. 38D). Por otra parte, tanto en los embriones control como en los deficientes de *OI-Nanog*, el dominio de expresión en los tejidos somáticos de *Sdf1a*, que es el ligando de *Cxcr4b*, se localizaba en el mismo lugar y con un nivel de expresión muy similar, al igual que se observó mediante qRT-PCR (Fig. 38C, E, G).

Para analizar con mayor detalle la especificidad de este efecto en el dominio de expresión de *Cxcr4b* en las CPG, se coinyectó *MO-Nanog* con el mRNA de *Cxcr4b* unido al fragmento *3'UTR-Olvas*, por lo que dirige la expresión de este gen a las CPG (Sasado y cols., 2008). El análisis por WMISH mostró que tras la coinyección, se recuperó la expresión de *Cxcr4b* en el dominio posterior, sin verse afectada la expresión de *Sdf1a* (Fig. 38F, G). Esto indica que el dominio posterior de expresión de *Cxcr4b* es el que corresponde a las CPG.

Por último, mediante el uso de qRT-PCR se confirmó el resultado obtenido en el experimento de rescate. La coinyección de *3'UTR-Olvas-Cxcr4b* con *MO-Nanog* aumentaba los niveles de expresión de *Cxcr4b* en comparación con los niveles de *Cxcr4b* en los embriones inyectados solamente con *MO-Nanog*, pero el nivel de expresión rescatado era menor al obtenido por la coinyección de *3'UTR-Olvas-Cxcr4b* con *MO-C* (Fig. 38H). Esto indicaba que *MO-Nanog* estaba inhibiendo la expresión endógena de *Cxcr4b*. Además, la sobreexpresión del ligando de *Cxcr4b*, *Sdf1a*, no rescataba la disminución de su receptor *Cxcr4b* ocasionada por el *MO-Nanog*. Así mismo, no se observaron cambios en la expresión de *Sdf1a* cuando se sobreexpresaba *Cxcr4b* (Fig. 38H). Estos resultados indican que *OI-Nanog* regula de manera específica la expresión de *Cxcr4b* en las CPG.

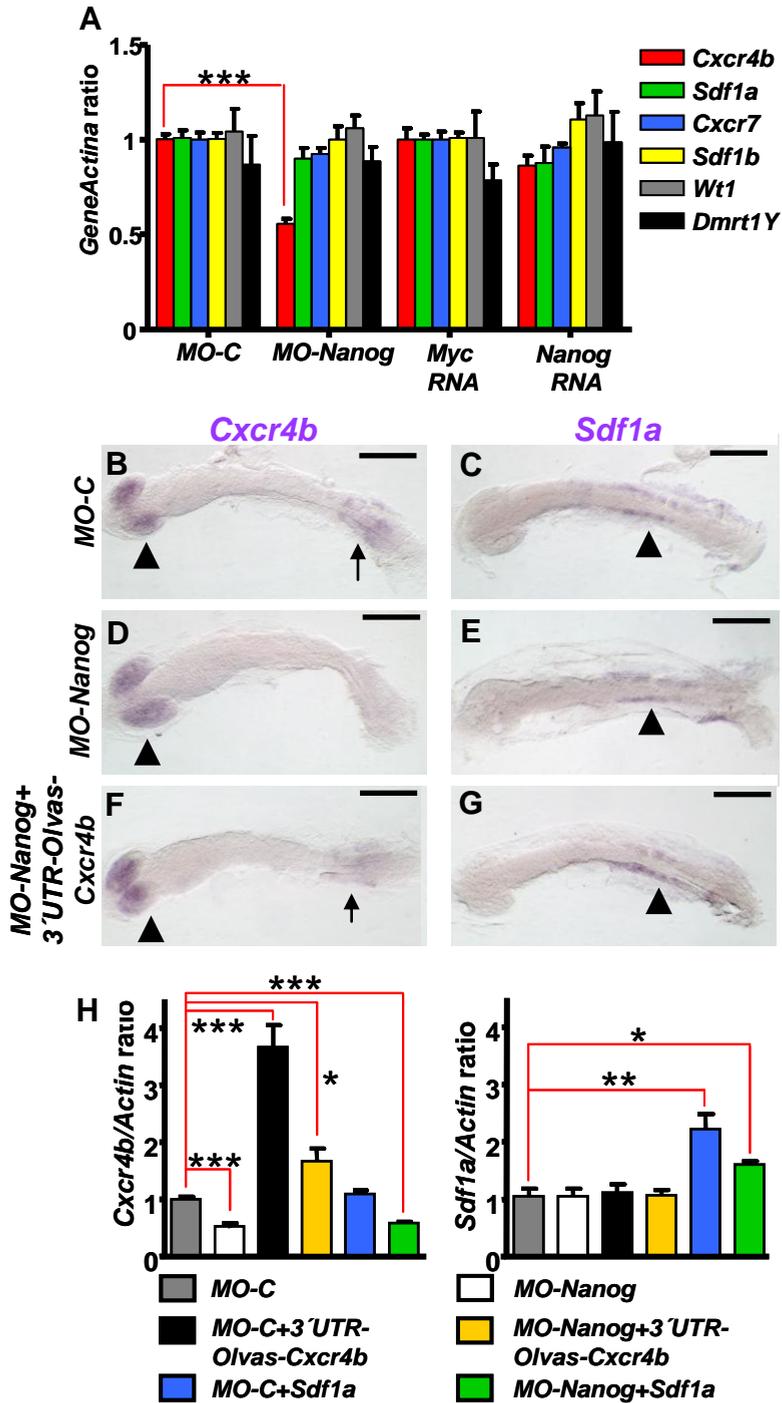


Figura 38. OI-Nanog regula la expresión de *Cxcr4b* en las CPG. (A) Análisis de expresión de los genes *Cxcr4b*, *Sdf1a*, *Cxcr7*, *Sdf1b*, *Wt1* y *Dmrt1Y* mediante qRT-PCR en st. 16, en embriones inyectados con *MO-C*, *MO-Nanog*, *Myc-RNA* o *Nanog-RNA*. Los datos representan la media \pm sd (barras de error). (B-G) Detección de los dominios de expresión de *Cxcr4b* y *Sdf1a* mediante WMISH en embriones de st. 18 tras la inyección con *MO-C*, *MO-Nanog* o la coinyección de *MO-Nanog* más *3'UTR-Olvas-Cxcr4b*. Puntas de flecha: dominios de expresión que no son afectados por la disminución de OI-Nanog; flechas: dominios de expresión presentes en todos los embriones excepto los inyectados con *MO-Nanog*. La parte anterior de los embriones se localiza a la izquierda. Las imágenes representan a tres experimentos independientes (n=35). Barras de escala: 200 μ m. (H) Análisis de expresión de *Cxcr4b* y *Sdf1a* por qRT-PCR en embriones de st. 16 en los experimentos de rescate de fenotipo. Los datos representan la media \pm sd (barras de error). *p<0.05; **p<0.005;*** p< 0,0005.

← Fig. 16. Página anterior.

2.2.B. OI-Nanog regula la migración de las células del primordio germinal.

Para analizar el papel que desempeña Nanog en la biología de las CPG, se utilizó *MO-Nanog* para inhibir su función. Cuando el *MO-Nanog* se inyecta en embriones de st. 1-3 (estadio de 1 a 2 células; Fig. 5 Introducción), se produce un defecto en la proliferación que compromete el desarrollo embrionario y causa la muerte del embrión (ver apartado 1.2.A de esta sección). Para evitar este efecto, se inyectaron los MO en una célula de embriones en st. 4 (4 células; Fig. 5 Introducción). Tanto el *MO-C* como el *MO-Nanog* se coinyectaron con la construcción *3'UTR-Nanos-GFP*, la cual, dirige la expresión de la *GFP* a las CPG. Además, bajo estas condiciones, la fluorescencia queda restringida al blastómero inyectado y su progenie, lo que permite el seguimiento del desarrollo de las CPG afectadas por el MO en un ambiente embrionario normal. Por tanto, estos embriones no tienen comprometida su capacidad de supervivencia y se desarrollan al mismo tiempo que los embriones control.

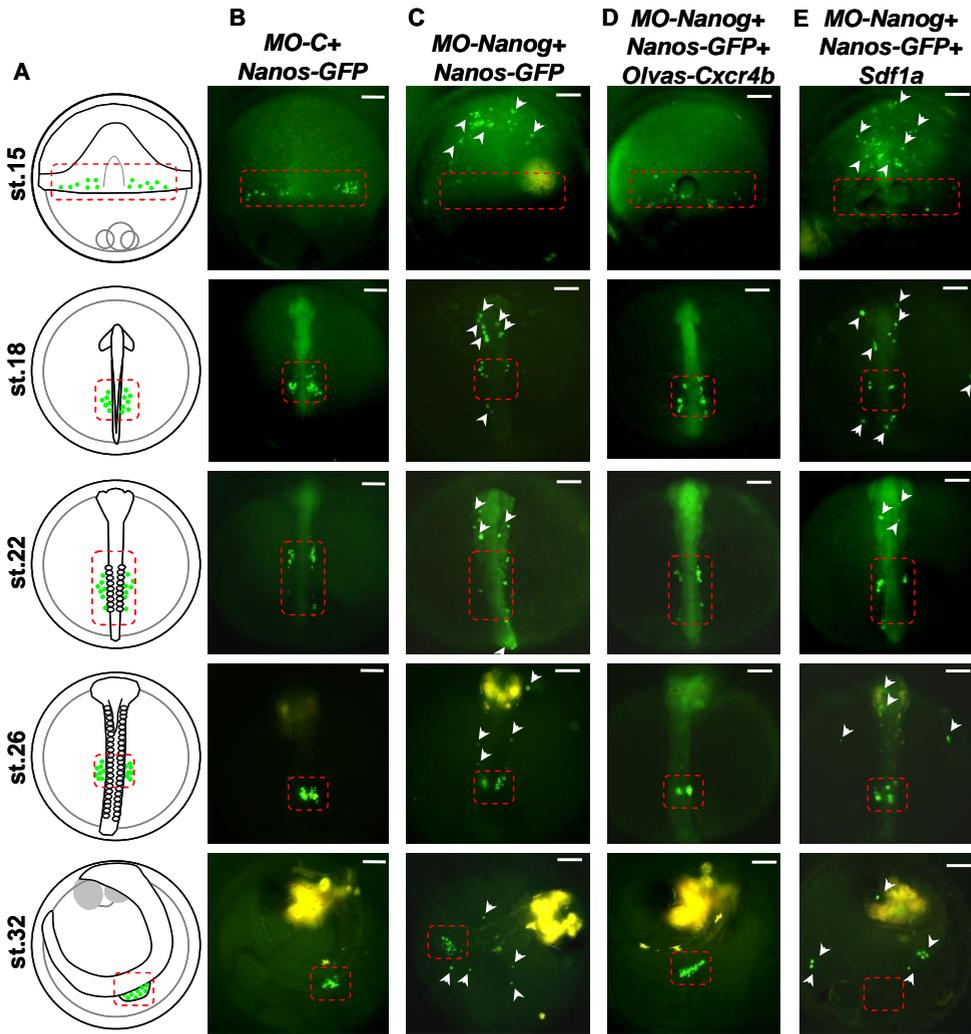


Figura 39. OI-Nanog regula la migración de las CPG a través de *Cxcr4b*. (A) Dibujo esquemático que muestra la localización de las CPG (puntos verdes) en embriones control en los distintos estadios de desarrollo estudiados. (B-E) Imágenes de fluorescencia mostrando las CPG marcadas con GFP, en embriones coinyectados con la construcción 3'UTR-Nanos-GFP (abreviada como *Nanos-GFP*) y MO-C (B), o MO-Nanog (C), o MO-Nanog + 3'UTR-Oivas-Cxcr4b (abreviada como *Oivas-Cxcr4b*; D), o MO-Nanog + *Sdf1a* (E). Puntas de flecha: CPG localizadas en un lugar incorrecto; cuadro punteado rojo: Posición normal donde se localizan las CPG. Barras de escala: 200 μ m.

En los embriones inyectados con el *MO-C* las CPG se desarrollaban de manera normal y migraban hasta el lugar donde las gónadas se formarán (Fig. 39A, B). Se cuantificó la migración de las CPG en tres estadios de desarrollo representativos de cada una de las fases de migración (st. 15, fase I; st. 18, fase II; st. 26, fase III) según describieron Herpin y colaboradores (2008; Fig. 40). Esta cuantificación permitió establecer los mapas de distribución de las CPG en las condiciones normales de desarrollo en esos tres estadios.

En los embriones inyectados con *MO-Nanog*, las CPG estaban dispersas por toda la superficie del embrión y muy pocas células migraban a su localización correcta (Fig. 39C). La cuantificación de la distribución de CPG en los tres estadios de desarrollo (st. 15, 18 y 26) mostró que un alto porcentaje de CPG no migraba hacia la parte posterior del embrión durante la fase I. En esta fase, los embriones inyectados con *MO-C* tenían entre 36 a 41 % de las CPG en la zona posterior del embrión mientras que los embriones inyectados con *MO-Nanog* sólo tenían entre un 11 al 16 % de CPG en la parte posterior del embrión. Además, a lo largo de su desarrollo, las CPG no alcanzaban su posición final (Fig. 40). Los resultados muestran que *OI-Nanog* es necesario al menos durante la primera fase de migración. Además, la eliminación de *OI-Nanog* no inhibe la expresión de *3'UTR-Nanos-GFP*, lo que indica que las CPG mantienen su identidad, siendo capaces de regular la expresión de *3'UTR-Nanos-GFP* normalmente.

2.2.C. La expresión de *Cxcr4b* en las células del primordio germinal rescata el fenotipo de migración debido al *MO-Nanog*.

Cxcr4b se expresa en las CPG y es necesario para su correcta migración durante la fase más temprana (fase I), donde actúa como receptor de la quimioquina *Sdf1a* (Kurokawa y cols., 2006). Como se ha descrito previamente (ver 2.2.A), *OI-Nanog* regula la expresión de *Cxcr4b* en las CPG, por lo que se analizó si el efecto de *OI-Nanog* en la migración

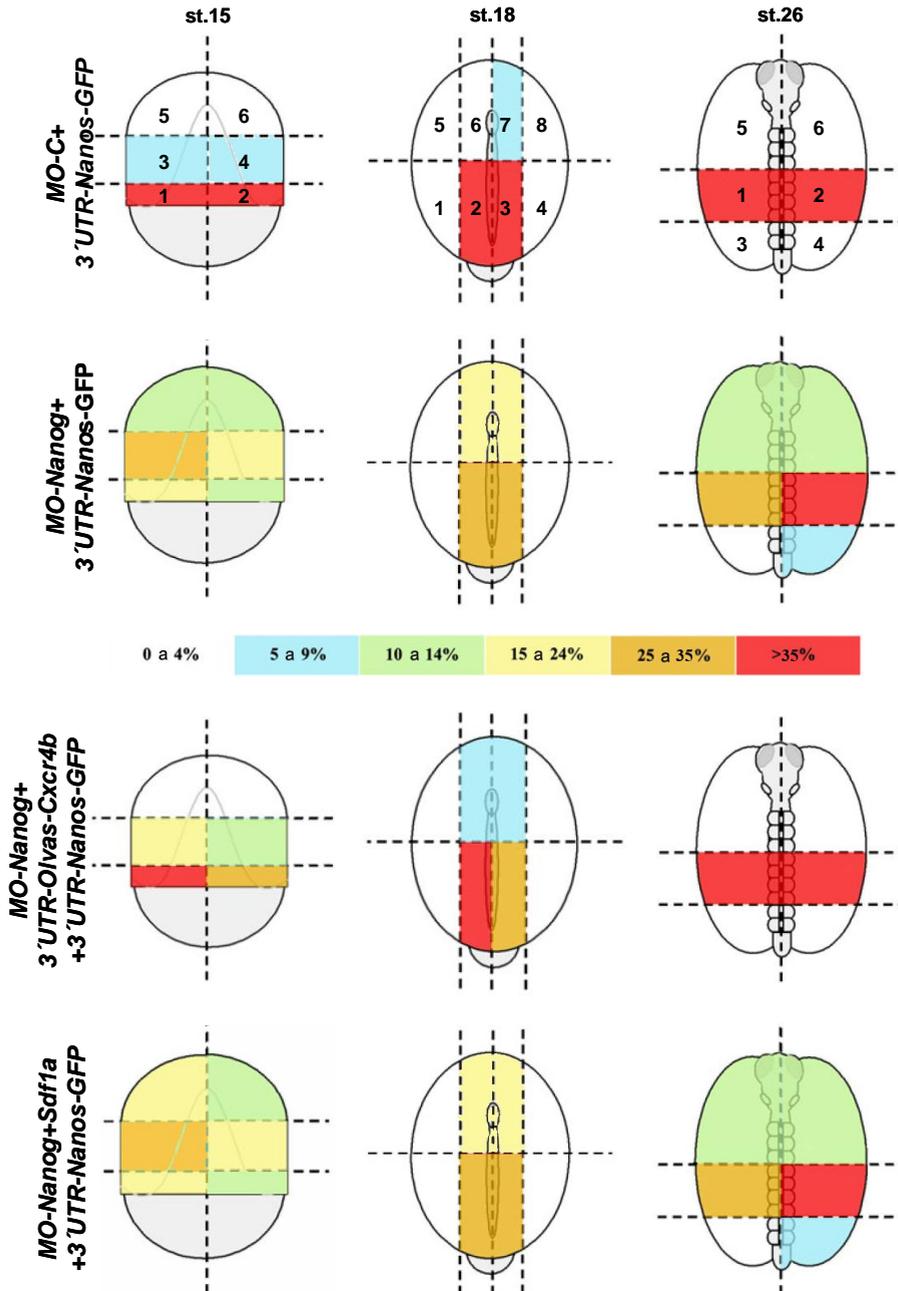


Figura 40. Representación esquemática de la distribución de CPG en porcentaje tras la inyección de *MO-Nanog* y los experimentos de rescate. Los resultados representados se obtuvieron a partir de los embriones coinyectados con *3'UTR-Nanos-GFP* y *MO-C*, o *MO-Nanog*, o *MO-Nanog+3'UTR-Olvas-Cxcr4b*, o *MO-Nanog+Sdf1a*. Las CPG se contaron en tres estadios de desarrollo (st. 15, 18 y 26).

de las CPG estaba mediado por *Cxcr4b*. Para ello, se utilizó la construcción *3'UTR-Olvas-Cxcr4b*, que como se ha indicado previamente, contiene la región 3' no codificante del gen *Olvas* encargada de dirigir la expresión de *Olvas* a las CPG. Esta región fusionada al gen *Cxcr4b* activa su expresión de manera específica en las CPG. El mRNA *3'UTR-Olvas-Cxcr4b* se coinyectó junto con el *MO-Nanog* y el mRNA de *3'UTR-Nanos-GFP* en una célula de embriones en st. 4. Este diseño experimental permitía que *3'UTR-Nanos-GFP* marcara con GFP las CPG derivadas del blastómero inyectado. Por tanto, estas CPG-GFP positivas habían heredado tanto el *MO-Nanog* como el mRNA *3'UTR-Olvas-Cxcr4b* por lo que eran deficientes en la proteína Ol-Nanog y a su vez sobreexpresaban de forma específica *Cxcr4b*. Según las observaciones previamente publicadas, la sobreexpresión del mRNA de *3'UTR-Olvas-Cxcr4b* no produce ningún efecto sobre la migración de las CPG (Sasado y cols., 2008).

Los resultados obtenidos mostraron que la sobreexpresión de *Cxcr4b* en las CPG delecionadas para Ol-Nanog era capaz de rescatar el fenotipo de migración anormal de las CPG, por lo que la mayoría de las CPG alcanzaban la posición final de formación de las gónadas (Fig.39D). La cuantificación de este efecto confirmó un rescate prácticamente total durante las fases de migración, puesto que en la fase I, el porcentaje de CPG que llegaba a la base del embrión era del 25 al 41%. Además, se observó el rescate completo de la posición final de las CPG (Fig. 40).

Para validar estos resultados con un control negativo que mostrase la especificidad del efecto de *Ol-Nanog* sobre la regulación de *Cxcr4b*, se coinyectó el mRNA de *Sdf1a* con *MO-Nanog* y *3'UTR-Nanos-GFP*. *Sdf1a* es el ligando de *Cxcr4b* y se expresa en la zona donde las CPG deben dirigirse. La sobreexpresión de *Sdf1a* no rescataba el defecto producido por el *MO-Nanog* en la migración de las CPG (Fig. 39E y Fig. 40). En conjunto, estas observaciones indican que *Cxcr4b* media los efectos de Ol-Nanog sobre la migración de las CPG.

Por tanto, OI-Nanog regula la migración de las CPG a través de la regulación de la expresión del gen *Cxcr4b*, sin afectar la diferenciación de las CPG.

2.2.D. OI-Nanog regula de manera directa la expresión de *Cxcr4b*.

En los apartados anteriores se ha descrito como OI-Nanog regula la migración de las CPG a través del control de la expresión del gen *Cxcr4b*. Para saber si la regulación de OI-Nanog sobre *Cxcr4b* es directa, se realizó un experimento de ChIP (Inmunoprecipitación de cromatina) con el anticuerpo específico de OI-Nanog. Este experimento permitió comprobar si OI-Nanog se unía a alguna de las secuencias potencialmente reguladoras de *Cxcr4b*.

Se seleccionaron cinco secuencias potencialmente reguladoras de *Cxcr4b* por ser aquellas secuencias con mayor nivel de conservación entre distintas especies de vertebrados y que además estaban más próximas al inicio de la secuencia codificante del gen *Cxcr4b*. Para hacer la reacción de ChIP se extrajeron las células de embriones en st. 16, pues en este estadio está activa la fase I de migración de las CPG donde interviene la acción del receptor *Cxcr4b*. Tras la reacción del ChIP, se realizaron reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para cada una de las cinco secuencias potencialmente reguladoras de *Cxcr4b* y como molde los fragmentos de gDNA obtenidos tras la inmunoprecipitación (IP) con el anticuerpo de OI-Nanog. El resultado de las reacciones de PCR mostró amplificación en las cuatro secuencias más próximas al inicio del gen *Cxcr4b* (secuencias nombradas del 2 al 4), mientras que la secuencia 1, más alejada del gen, no mostró amplificación (Fig. 41). Este resultado indicó que OI-Nanog regula de manera directa la expresión de *Cxcr4b* en los embriones de st. 16 puesto que el experimento de ChIP reveló que la proteína OI-Nanog se une a una zona del gDNA potencialmente reguladora

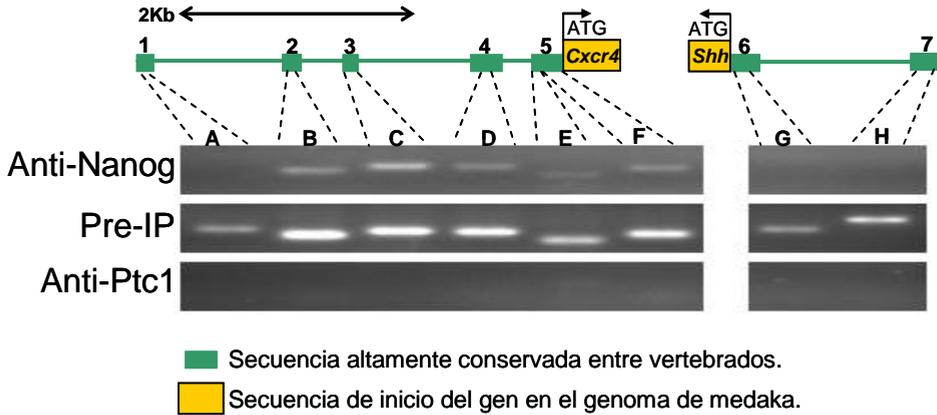


Figura 41. OI-Nanog regula la expresión de *Cxcr4b* de manera directa. Resultados de las PCR realizadas tras las reacciones de ChIP utilizando los fragmentos de gDNA obtenidos con Anti-Nanog, pre-IP(control) o Anti-Ptc1(control). En las PCR se utilizaron 6 pares de oligonucleótidos específicos para abarcar las 5 secuencias altamente conservadas previas al gen *Cxcr4b*, que amplificaban fragmentos de unas 200 pb, y 2 pares de oligonucleótidos específicos para abarcar las 2 secuencias altamente conservadas previas al gen *Shh* usado como control.

de la expresión de *Cxcr4b*. Para validar este resultado, se realizaron varios controles sobre la técnica de ChIP. El control positivo, que consistió en realizar las mismas reacciones de PCR pero utilizando como molde los fragmentos de gDNA obtenidos previamente a la IP, mostró amplificación en todas las secuencias amplificadas (de la secuencia 1 a la 5). Además, se realizaron dos controles negativos, el primero consistió en utilizar la técnica de ChIP con el anticuerpo específico de la proteína Ptc1, que es un receptor de membrana no relacionado con *Cxcr4b*. Este control negativo no mostró amplificación en ninguna de las secuencias potencialmente reguladoras de *Cxcr4b*. El segundo control negativo se basó en utilizar como molde los fragmentos de gDNA obtenidos en cada una de las tres reacciones de ChIP (ChIP con anti-OI-Nanog, ChIP pre-IP y ChIP con anti-Ptc1) y utilizar parejas de oligonucleótidos específicos para dos secuencias potencialmente reguladoras del gen *Shh* (secuencias 6 y 7). Los resultados observados para estas reacciones de PCR mostraron sólo amplificación cuando se

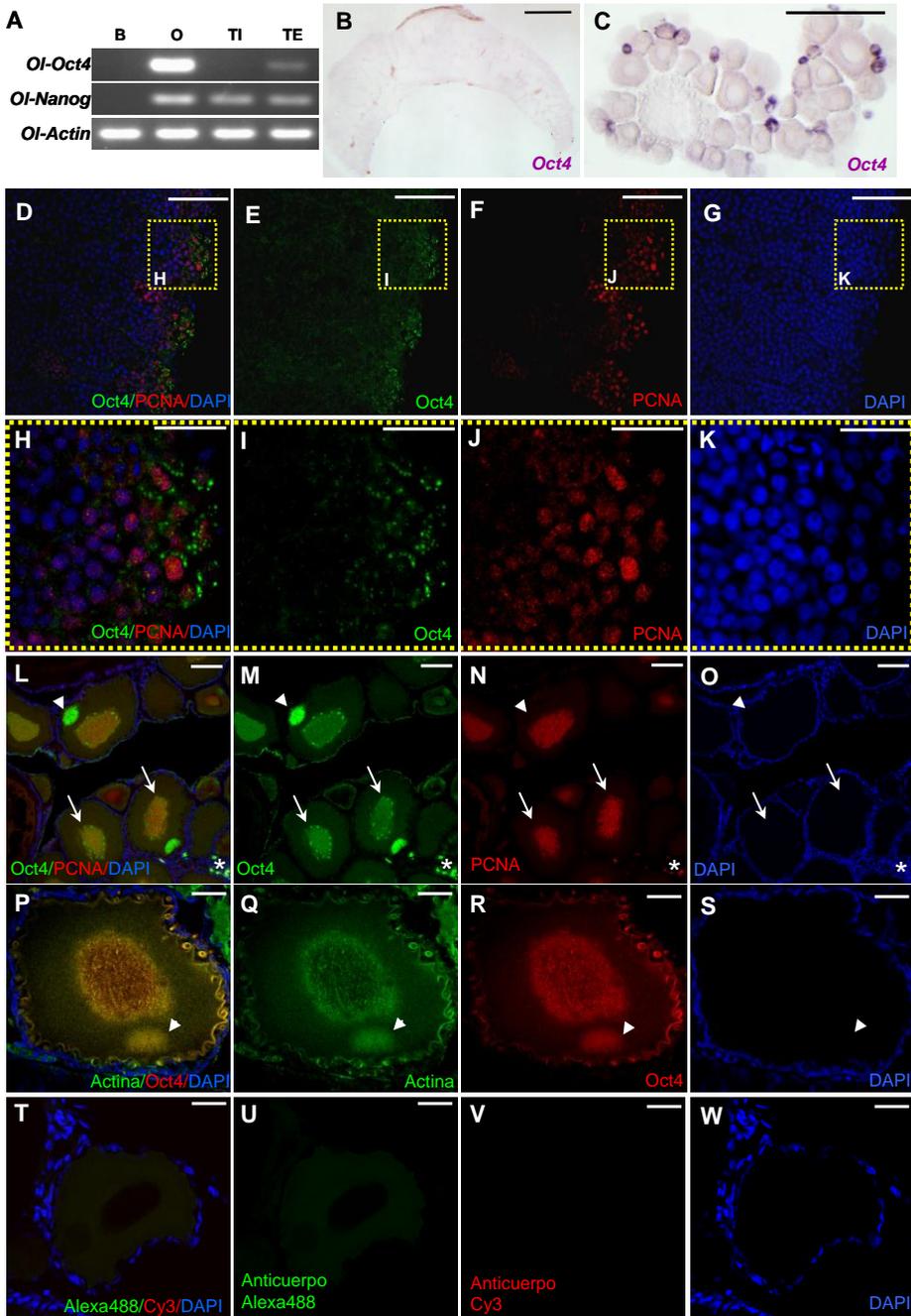
utilizó como molde los fragmentos de gDNA obtenidos en la pre-IP (control positivo), pero no hubo amplificación cuando se usó el gDNA obtenido tras el ChIP con Anti-OI-Nanog o el ChIP con Anti-Ptc1 (Fig. 41).

2.3. Expresión de OI-Nanog y OI-Oct4 en las gónadas adultas.

En mamíferos, tanto Oct4 como Nanog se expresan en las gónadas en desarrollo (Yeom y cols., 1996; Pesce y cols., 1998; Chambers y cols., 2003; Mitsui y cols., 2005). Además, la expresión del gen *Oct4* se ha detectado en las gónadas adultas de ratón y humano (Pesce y cols., 1998; Anderson y cols., 2007). Por otro lado, *Nanog* se expresa en las gónadas en desarrollo en ratón y pollo (Yamaguchi S. y cols., 2005; Laval y cols., 2007), pero no se ha descrito su expresión en las gónadas de ratones adultos. Para conocer si estos genes se expresan en las gónadas adultas de Medaka, se evaluó la presencia de los mRNA y las proteínas de OI-Nanog y OI-Oct4 en el ovario y el testículo.

Fig. 42. OI-Oct4 se expresa en gónadas adultas. (A) Análisis de la expresión de *OI-Oct4* y *OI-Nanog* por RT-PCR en distintos órganos adultos. B: bazo; O: ovario; TI: testículo interior; TE: testículo exterior. *OI-Actin* se ha usado como control. (B) WMISH para detectar la expresión de *OI-Oct4* en una sección de testículo adulto. La expresión se detecta en la periferia del testículo. (C) WMISH para detectar la expresión de *OI-Oct4* en una sección de ovario adulto. La expresión se detecta en los ovocitos tempranos. (D-K) Presencia de la proteína de OI-Oct4 en el testículo. La expresión se detecta en la periferia, donde se localizan las espermatogonias indiferenciadas. (H-K) Detalle aumentado de (D-G) mostrando un patrón de expresión punteado de OI-Oct4 en la periferia de las espermatogonias. (L-W) Presencia de la proteína de OI-Oct4 en el ovario. La expresión se detecta en el material cromosómico y en un patrón punteado alrededor de esa tinción nuclear (flechas en L-O). También se detecta expresión de OI-Oct4 en el plasma germinal (puntas de flecha en L-S) y en las células de la periferia (* en L-O). (T-W) El control del experimento de inmunofluorescencia usando solamente los anticuerpos secundarios no mostró señal. Barra de escala en B: 100 μ m; en C-G, L-O: 50 μ m y H-K, P-W: 20 μ m.

Fig. 42. Página siguiente. 



El análisis de expresión por RT-PCR de estos dos genes mostró que ambos están expresados en el ovario adulto de Medaka y también en el testículo, aunque más débilmente (Fig. 42A). En el caso de *OI-Oct4*, sólo se detectó mRNA en el testículo exterior, pero no en el interior. El análisis por WMISH reveló un patrón de expresión muy similar en ambos genes, pues en los testículos, la expresión se detectó principalmente en la periferia, en el lugar donde se localizan las espermatogonias, que son las células que se autorrenuevan dando los espermatozoides (Fig. 42B y Fig. 43D). En el ovario, tanto el mRNA de *OI-Oct4* como el de *OI-Nanog* se detectaron únicamente en los ovocitos previtelogénicos de pequeño tamaño, mientras que la señal se detectaba muy débil o incluso desaparecía en los ovocitos previtelogénicos de mediano y gran tamaño (Fig. 42C y Fig. 43A, B).

Para detectar la expresión de las proteínas de *OI-Oct4* y *OI-Nanog* en las gónadas se realizó la inmunotinción con los anticuerpos específicos. En el testículo, al igual que el mRNA, la proteína de *OI-Oct4* estaba confinada en la periferia donde se localizan las espermatogonias inmaduras (Fig. 42D-K), las cuales constituyen la población de SC germinales del testículo. En los ovarios, la proteína de *OI-Oct4* se detectó en el núcleo de las células periféricas y los ovocitos pequeños. Además, durante la maduración de los ovocitos, la expresión de *OI-Oct4* se detectó en el material cromosómico y con un patrón punteado alrededor de esa tinción nuclear. Finalmente, *OI-Oct4* también se detectó en el plasma germinal de los ovocitos (Fig. 42L-S), donde colocalizaba con la expresión de Actina, que se utilizó como marcador de esta estructura (Marlow y Mullins, 2008). Como control negativo se usó la tinción de inmunofluorescencia únicamente con los anticuerpos secundarios, sin previa incubación con los anticuerpos primarios, este control no mostró ninguna tinción.

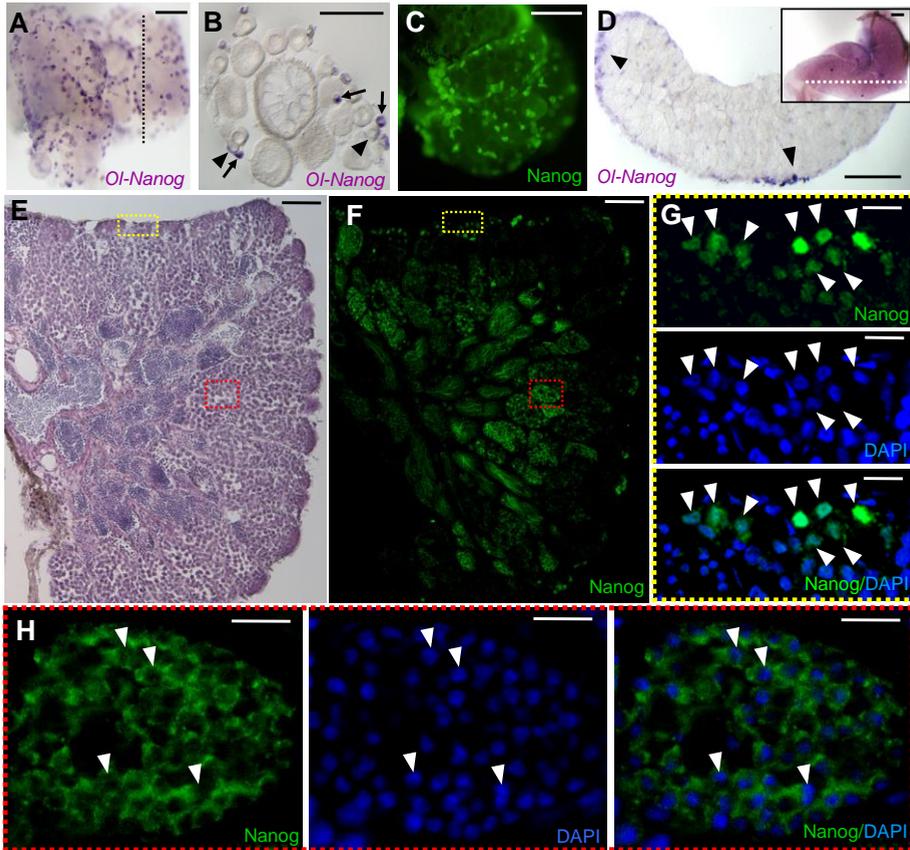


Fig. 43. Expresión de OI-Nanog en las gónadas de Medaka. (A-C) Detección de *OI-Nanog* en ovarios completos o secciones mediante WMISH e inmunohistoquímica. (B) Sección tomada en la línea punteada de (A) mostrando los altos niveles de expresión de *OI-Nanog* en los ovocitos previtelogénicos más pequeños (flechas), cuando estos ovocitos crecen la expresión de *OI-Nanog* disminuye (puntas de flecha). (C) El patrón de expresión de la proteína OI-Nanog es similar al descrito para el mRNA. (D-H) Detección de *OI-Nanog* en testículos completos o secciones mediante WMISH e inmunohistoquímica. (D) Detección de la expresión de *OI-Nanog* mediante WMISH en el testículo entero (ventana interna) o en una sección correspondiente a la línea punteada del testículo entero. La expresión se detecta mayoritariamente en la periferia del testículo, donde se localizan las espermatogonias (cabeza de flecha). Tinción con H-E de una sección de testículo. (F-H) Expresión de OI-Nanog en sección de testículo. (G) Imagen aumentada de una sección periférica de (F) donde se aprecia que OI-Nanog se detecta en los núcleos celulares (puntas de flecha). (H) Imagen aumentada de una sección interior de (F) donde se aprecia que OI-Nanog se detecta únicamente en el citoplasma de las células que se disponen en cistos. Barras de escala en A-D: 100µm, en E y F: 50µm, en G y H: 10µm.

El estudio de la expresión de proteína de OI-Nanog reveló que en el ovario, la presencia de la proteína coincidía con el patrón de expresión del mRNA, por lo que sólo los ovocitos de pequeño tamaño eran OI-Nanog positivos (Fig. 43C). Por otra parte, en testículos, para analizar con más detalle el patrón de expresión de OI-Nanog, se realizó la inmunohistoquímica en criosecciones de testículo y la tinción de H-E para visualizar las estructuras del testículo (Fig. 43E, F). Al igual que la expresión del mRNA, la proteína se detectó en los núcleos de las células que se encontraban en la periferia del testículo, donde se localizan las espermatogonias (Fig. 43G). Pero además, también se localizó proteína en el citoplasma de las células agrupadas en cistos, donde sucede la espermatogénesis (Fig. 43H), y donde el mRNA ya no se detectaba (Fig. 43D).

La expresión de OI-Oct4 y OI-Nanog en las espermatogonias y los ovocitos inmaduros indica que pueden tener una función en la gametogénesis o mantenimiento de las SC adultas, ya que se expresa específicamente y no se detecta su expresión en los gametos maduros.

3. Regulación de la proliferación y diferenciación durante el desarrollo embrionario tardío: la retina neural como modelo de desarrollo del sistema nervioso central.

Para estudiar la regulación de la proliferación y diferenciación durante el desarrollo embrionario del SNC, se optó por estudiar la función de la vía de señalización de Wnt en el desarrollo de la retina neural.

La retina neural constituye un buen modelo para el estudio del desarrollo del SNC por las múltiples ventajas que aporta, como por ejemplo, su fácil accesibilidad y su detallado conocimiento sobre su estructura laminar y las células que la forman.

La vía de señalización de Wnt está implicada en la formación del SNC, por ejemplo, participa en la especificación neuronal del tubo neural dorsal (Ikeya y cols., 1997; Muroyama y cols., 2002; Chizhikov y Millen, 2005; Ciani y Salinas, 2005) y en el establecimiento del patrón neural A-P del tubo neural (Kiecker y Niehrs, 2001). En el caso concreto de la retina neural, las publicaciones asignan diferentes funciones a la vía de señalización de Wnt que llegan incluso a ser contradictorias (ver Introducción, apartado 4.3.B). Por ello, es importante aclarar el papel principal que desempeña la vía de señalización de Wnt durante el desarrollo de la retina neural *in vivo*.

3.1. Modificación condicional de la vía de señalización de Wnt en el desarrollo embrionario de peces Medaka.

La formación del ojo comienza en las primeras etapas de la organogénesis, por lo que es un proceso tardío en el desarrollo embrionario. Estamos interesados en conocer la función biológica de la vía de señalización de Wnt durante el desarrollo de la retina neural en los vertebrados. Sin embargo, además de la función que la vía de señalización de Wnt podría tener en la formación de la retina neural, también desempeña

otras funciones durante el desarrollo temprano de los vertebrados. Es por esto que el estudio del desarrollo de la retina neural podría verse afectado por las funciones tempranas de la vía de Wnt, ya que los papeles que la vía desempeña tempranamente podrían enmascarar los efectos que tiene sobre otros procesos más tardíos en el desarrollo, como es el caso de la formación del ojo. Para evitar este efecto enmascarador, se ha optado por realizar experimentos de GDF y PDF génica mediante la utilización de dos líneas transgénicas de Medaka de expresión condicional (*HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8*) y, complementariamente, utilizando dos fármacos activadores de la vía de Wnt (LiCl e indirubina).

3.1.A. Obtención y caracterización de líneas transgénicas de expresión génica condicional.

Uno de los papeles que desempeña la vía de Wnt durante el desarrollo temprano de los peces Zebrafish es el establecimiento del eje A-P (Erter y cols., 2001). Esta función también podría darse en los peces Medaka por lo que la modificación temprana de la vía de Wnt impediría el correcto estudio de las funciones tardías en la formación del ojo. Para comprobar si en Medaka la vía de Wnt también participa en el establecimiento del eje A-P se inyectó en embriones de Medaka en estadio de una célula el mRNA de *Wnt8* sintetizado a partir del plásmido *pHS-Wnt8* y el mRNA de *DNWnt8* sintetizado a partir del plásmido *pHS-DNWnt8* (ver apartado 2 de Materiales y Métodos para los detalles de la obtención de estos vectores). Además, estos mRNA se inyectaron junto con el mRNA de *GFP*, que sirvió como trazador. Al igual que lo descrito previamente para Zebrafish (Erter y cols., 2001), la activación de Wnt mediante la inyección del mRNA de *Wnt8* provocó un fenotipo de posteriorización del embrión. En este caso, el $88,4 \pm 3,6$ % de los embriones inyectados carecían de cabeza (Fig. 44B), en comparación con los embriones controles inyectados únicamente con mRNA de *GFP*, donde el 100 % de los embriones

presentaban un fenotipo normal (Fig. 44A). Por otra parte, cuando se inhibió la vía de Wnt mediante la inyección del mRNA de *DNWnt8* el $92,3 \pm 4,1$ % de los embriones presentaban un fenotipo de anteriorización, en el que sólo se apreciaban estructuras de la cabeza (Fig. 44C). Por tanto, en Medaka, la vía de señalización de Wnt también participa en el establecimiento del eje A-P, lo que implica que una manipulación temprana de la vía de Wnt altera el correcto desarrollo embrionario e impide el estudio de esta vía en estadios tardíos de desarrollo.

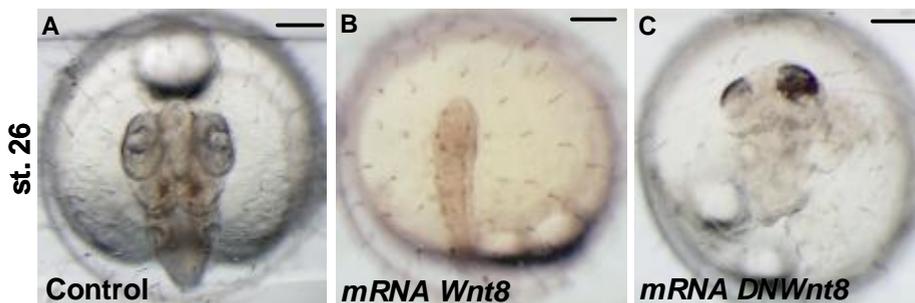


Fig. 44. Fenotipo de posteriorización y anteriorización debidos a la sobreexpresión de *Wnt8* o de *DNWnt8* respectivamente. Embriones de st. 26 inyectados en st. 2 con el mRNA de *GFP* (A), el mRNA de *Wnt8* (B) o el mRNA de *DNWnt8* (C). (B) Los embriones que sobreexpresan *Wnt8* presentan una posteriorización del eje A-P sin llegar a formar la cabeza. (C) Los embriones que tienen inhibida la vía de Wnt presentan una anteriorización del eje A-P en la que sólo se aprecia la formación de la cabeza. Barras de escala: 200 μ m.

El primer paso para la generación de las líneas transgénicas consistió en el diseño y obtención de los vectores plasmídicos que posteriormente se usaron para obtener las líneas transgénicas. Para ello, se diseñaron dos vectores de expresión condicional. Uno de los vectores expresaba de manera condicional el transgén *Wnt8* y se diseñó para realizar los experimentos de GDF génica. El otro vector expresa el transgén *DNWnt8* y se diseñó para los experimentos de PDF génica. El gen *DNWnt8* presenta una delección del dominio carboxi-terminal de la proteína *Wnt8*, por lo que bloquea la activación del receptor impidiendo la transmisión de la

señal, actuando de este modo como un dominante negativo de la vía canónica de Wnt (Hoppler y cols., 1996).

Además de incluir uno de los dos transgenes, para el diseño de los vectores se incluyeron tres características (Fig. 45):

- El vector incluyó el transgén implicado en la vía de señalización de Wnt bajo la regulación de un promotor de expresión condicional. En este caso, se eligió el promotor de HS, que induce la expresión del gen en respuesta a un estrés celular, en este caso debido a un brusco cambio de temperatura. Mediante el uso de este promotor HS, se pudo manipular condicionalmente la vía de señalización de Wnt en distintas etapas del desarrollo de la retina, evitando la interferencia con funciones génicas tempranas, como por ejemplo el establecimiento del eje A-P (Erter y cols., 2001; Lekven y cols., 2001; Houart y cols., 2002; Kudoh y cols., 2002). A partir de este momento, los transgenes se nombrarán *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* para diferenciarlos del gen endógeno *Wnt8*.
- Para poder seleccionar los embriones que, tras la inyección del vector linealizado, han incorporado la construcción en su genoma, se utilizó la GFP bajo la regulación del promotor constitutivo CSKA.
- Para favorecer el proceso de transgénesis, el fragmento de interés estaba flanqueado por las secuencias de restricción de la Meganucleasa *I-SceI* (Thermes y cols., 2002).

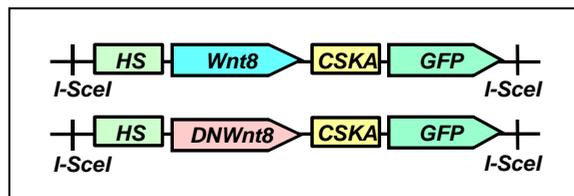


Fig. 45. Mapas de los vectores plasmídicos. Vectores generados para la obtención de las dos líneas transgénicas de manipulación condicional de la vía de señalización de Wnt.

Una vez obtenidas las dos construcciones plasmídicas, se inyectaron en embriones CAB normales en estadio de una célula con el fin

de obtener animales transgénicos. De esta manera, se obtuvieron las líneas transgénicas *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8*. Los animales transgénicos eran seleccionados en función de la fluorescencia para GFP (Fig. 46).

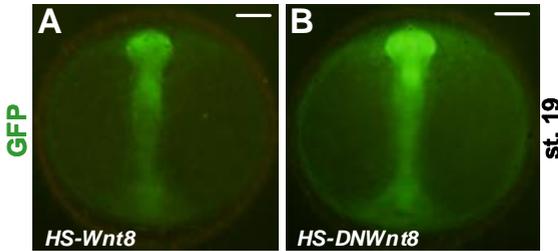


Fig. 46. Selección de embriones transgénicos por la fluorescencia de GFP. (A) Embrión transgénico *HS-Wnt8* en st. 19. (B) Embrión transgénico *HS-DNWnt8* en st. 19.

La validación de las líneas transgénicas se basó en tres puntos:

- **Validación de la funcionalidad del sistema de expresión condicional.** Para ello, se estudió la expresión de los transgenes *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* mediante el uso de RT-PCR (Fig. 47A) y mediante el uso de WMISH, utilizando sondas específicas para los transgenes de *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* (Fig. 47B-E; para más detalles sobre las sondas ver Materiales y Métodos). En primer lugar, los animales transgénicos en st. 17 fueron sometidos a tratamientos de HS (ver Materiales y Métodos para los detalles del tratamiento de HS). Mediante el uso de RT-PCR y WMISH se comprobó que los transgenes *Wnt8* y *DNWnt8* se expresaban sólo después de someter a tratamiento de HS a los animales transgénicos. Además, la técnica de WMISH demostró que el tratamiento de HS inducía la expresión de los transgenes en todo el embrión, incluyendo las vesículas ópticas (Fig. 47B-E), en el 100 % de los embriones transgénicos tratados con HS.

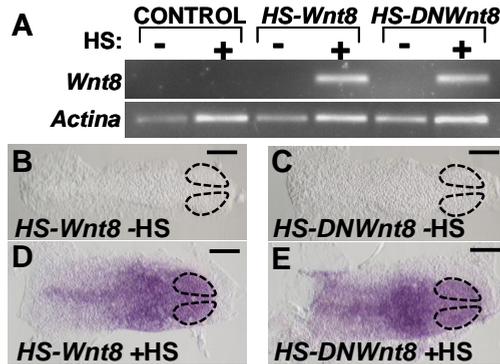


Fig. 47. Detección de la activación de la expresión de los transgenes *Wnt8* y *DNWnt8* tras el tratamiento de HS. (A) Detección de la expresión de los transgenes por RT-PCR tras el tratamiento de HS en embriones de st. 17 usando oligonucleótidos específicos para los transgenes. La expresión de los transgenes no se detectó en los embriones control ni en los embriones transgénicos sin tratamiento de HS. La expresión de *Actina* se usó como control. (B-E) Detección de la activación de los transgenes mediante WMISH en embriones de st. 17 tras el tratamiento de HS utilizando sondas específicas para los transgenes (en morado). La parte anterior de los embriones está a la derecha y las vesículas del ojo se localizan en el interior de las áreas punteadas. Barras de escala: 100 μ m. (B, C) Embriones transgénicos sin tratamiento de HS. Ningún embrión presentaba marcaje morado. (D, E) Embriones transgénicos con tratamiento de HS, el 100 % de los embriones aparecían con el marcaje morado específico. Al ser ambos transgenes de *X.laevis*, los oligonucleótidos y las sondas usadas no detectaron la expresión endógena de Wnt en Medaka.

- **Validación de los transgenes como moduladores de la expresión de genes diana de Wnt.** Para ello se estudió cómo afectaban estos transgenes a la expresión de genes diana de Wnt como *Axina2* y *Lef1* (*Lymphoid enhancer binding factor 1*). *Axina2* se asocia a las proteínas β cat, GSK3 β y APC, y está implicada en la inhibición de la vía de señalización de Wnt (Ikeda y cols., 1998), mientras que *Lef1* actúa como mediador de la señalización nuclear de la vía de Wnt (Filali y cols., 2002). Ambos genes se activan por la señalización de Wnt. Los embriones transgénicos en st. 17 ó 26 fueron tratados con HS y posteriormente analizamos los cambios en la expresión de *Axina2* y *Lef1* por RT-PCR en los st. 22 ó 30 respectivamente (Fig. 5 Introducción),

pues estos son los estadios que analizaremos en nuestro estudio. En Medaka, *Axina1* y *Axina2* están duplicados con una copia en el ch. 1 y otra en el ch. 8. Para determinar de manera cuantitativa qué gen o genes de *Axina* están activados por la señalización de Wnt, se analizó la expresión de los cuatro genes mediante qRT-PCR. La activación del transgén *HS-Wnt8* en st. 17 y análisis de expresión génica en st. 22 reveló un aumento de la expresión de *Axina2* (*ch.1*) y *Lef1*, mientras que no se observaron cambios en *Axina1* (*ch. 1 y 8*) o *Axina2* (*ch. 8*; Fig. 48). Por otra parte, la activación del transgén *HS-DNWnt8* en st. 17 mostró la inhibición de la expresión de *Axina2* (*ch.1*) y *Lef1* en st. 22, mientras que no se observaron cambios en *Axina1* (*ch. 1 y 8*) o *Axina2* (*ch. 8*; Fig. 48).

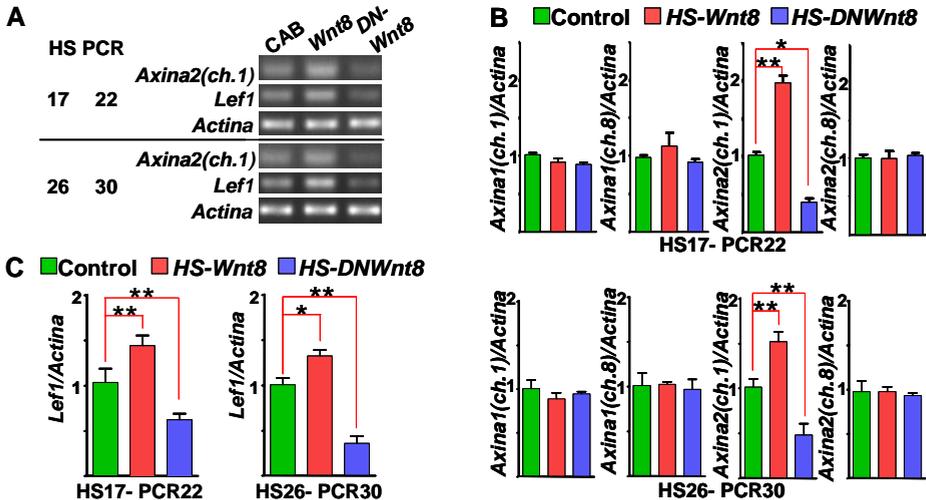


Fig. 48. Efecto de la activación de los transgenes sobre la expresión de *Axina2* y *Lef1*. (A) RT-PCR de la expresión de *Lef1* y *Axina2* a st. 22 ó 30 tras un tratamiento de HS a st. 17 ó 22 respectivamente. La expresión de *Actina* se utilizó como control. (B) qRT-PCR para cuantificar cambios en los niveles relativos de expresión de *Axina1* (*ch. 1 u 8*) y *Axina2* (*ch. 1 u 8*) respecto a la *Actina*, en embriones de st. 22 ó 30 tras un tratamiento de HS a st. 17 ó 26 respectivamente. (C) qRT-PCR para cuantificar cambios en los niveles relativos de expresión de *Lef1* respecto a la *Actina* en embriones de st. 22 ó 30 tras un tratamiento de HS a st. 17 ó 26 respectivamente. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$. Los datos representan la media \pm sd (barra de error).

Este efecto sobre la expresión génica de *Axina2* y *Lef1* también se observó cuando los transgenes fueron activados en st. 26 y la expresión génica fue evaluada en st. 30 (Fig. 48). Por tanto, la activación de los transgenes *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* afecta a la expresión endógena de *Axina2* (ch. 1) y *Lef1*, demostrando que ambos transgenes están modulando la vía de Wnt de la manera esperada.

▪ **Capacidad de los transgenes para modular funcionalmente la vía de Wnt.** Para probar si los transgenes podrían inducir fenotipos asociados a la vía de Wnt en el embrión entero, se analizó si actuaban sobre el establecimiento del eje A-P como se ha descrito previamente en otros vertebrados. La activación de *HS-Wnt8* en embriones en st. 10 (previo al establecimiento del eje A-P) generó un fenotipo de embriones sin cabeza que carecían de estructuras anteriores (64,2 ± 2,8 % de los embriones presentaban el fenotipo mientras que el resto de embriones parecían normales; Fig. 49B). Este fenotipo es similar a los fenotipos causados por experimentos de GDF de la vía de señalización de Wnt en otros vertebrados (Erter y cols., 2001; Lekven y cols., 2001; Houart y

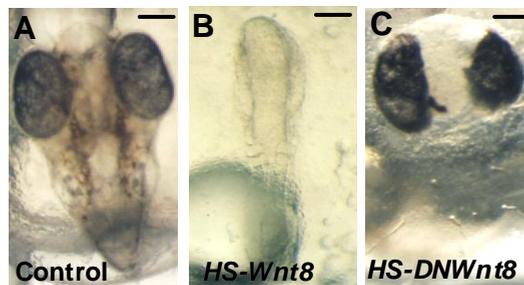


Fig. 49. La activación de los transgenes en estadios tempranos afecta al eje A-P. Embriones de st. 30 tratados con HS en st. 10. (A) Los embriones CAB control presentaban en su totalidad un eje A-P normal incluso tras ser tratados con HS. (B) Los embriones que sobreexpresan *Wnt8* presentan una posteriorización del eje A-P sin llegar a formar la cabeza. (C) Los embriones que tienen inhibida la vía de Wnt presentan una anteriorización del eje A-P en la que sólo se aprecia la formación de la cabeza. Barras de escala: 100 µm.

cols., 2002; Kudoh y cols., 2002). Por otra parte, la activación de *DNWnt8* en embriones de st. 10 causaba un fenotipo de carencia de estructuras posteriores en el embrión, formándose sólo la cabeza ($76,2 \pm 5,1$ % de los embriones presentaban el fenotipo mientras que el resto de embriones parecían normales Fig. 49C). Este fenotipo es similar al producido por la inhibición de la vía de señalización de Wnt (Erter y cols., 2001; Lekven y cols., 2001; Houart y cols., 2002). Sin embargo, cuando los embriones transgénicos eran tratados con HS después del st. 10, en ningún caso aparecían fenotipos apreciables de manera visual, siendo estos embriones similares a los embriones CAB control (Fig. 50). Esto indica que los transgenes están modificando funcionalmente la vía de Wnt. Además, demuestra que la determinación del eje A-P por Wnt se realiza antes del st. 10 (antes de la neurulación).

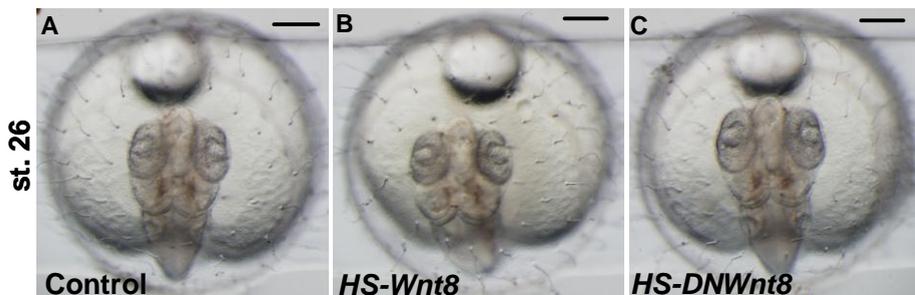


Fig. 50. Cuando la activación de los transgenes es posterior a st. 10 no afectan al establecimiento del eje A-P. Embriones de st. 26 tratados con HS en st. 17. (A) Tanto los embriones CAB control como los transgénicos *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* presentaban en su totalidad un eje A-P normal tras el tratamiento de HS. Barras de escala: 200 μ m.

En conjunto, los resultados de las tres validaciones realizadas confirman que la vía de señalización de Wnt puede ser manipulada usando las dos líneas transgénicas generadas, las cuales, tras el tratamiento de HS, expresan proteínas funcionales de Wnt8 y DNWnt8.

3.1.B. Uso de fármacos para la manipulación de la expresión de la vía de señalización de Wnt de manera condicional.

Para confirmar los resultados obtenidos por las dos líneas transgénicas, también se utilizó una aproximación farmacológica de activación condicional de la vía. Los fármacos usados fueron LiCl e indirubina, que activan la vía de Wnt mediante la inhibición de la enzima GSK3 β , la cual es una mediadora de la señalización de Wnt que actúa inhibiendo a la misma (Fig. 51; Osakada y cols., 2007).

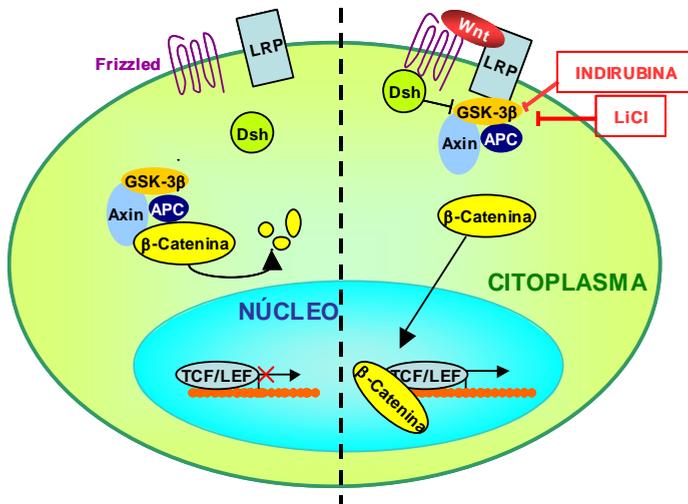


Fig. 51. Vía de señalización de Wnt en vertebrados. Los fármacos utilizados aparecen enmarcados en rojo, se indica el componente de la vía de señalización sobre el que actúa el fármaco y la relación de inhibición sobre ese componente.

La adición del LiCl o indirubina en el medio de incubación de los embriones permite una activación condicional de la vía de señalización de Wnt en el estadio de estudio. Para determinar la concentración de trabajo de los fármacos que permitía de manera eficiente la activación de la vía de señalización, se incubaron embriones de Medaka desde el st. 17 al st. 22

con dos concentraciones distintas de cada uno. En los experimentos de LiCl se utilizaron las concentraciones de 0,15 M y 0,3 M, mientras que en los experimentos con indirubina se usaron las concentraciones 5 μ M y 10 μ M. Posteriormente se analizó el contenido de mRNA de *Axina2* (*ch. 1*) por RT-PCR y qRT-PCR y de *Lef1* mediante el uso de qRT-PCR.

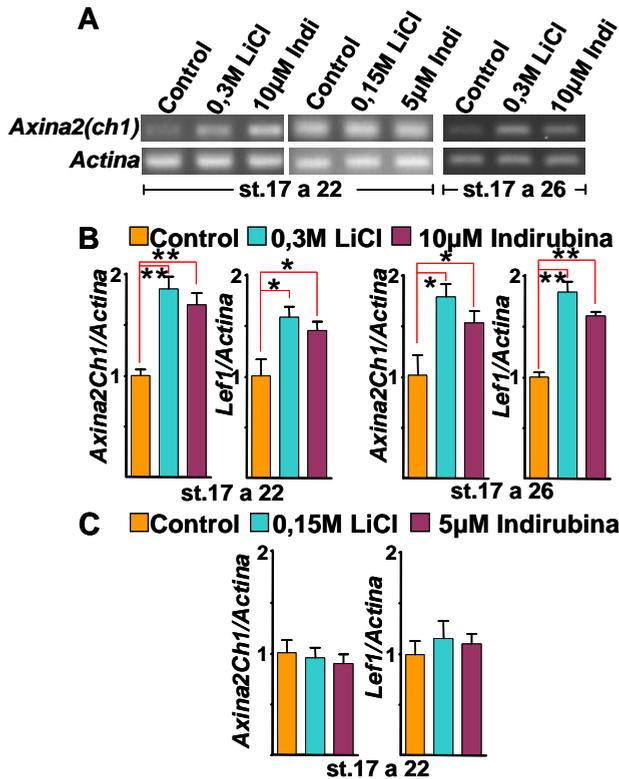


Fig. 52. Determinación de la concentración de trabajo para LiCl e indirubina. (A) Nivel de expresión de *Axina2* (*ch. 1*) mediante el uso de RT-PCR en st. 22 ó 26 tras la incubación de los embriones de Medaka con LiCl o indirubina desde el st. 17, usando dos concentraciones distintas para cada fármaco. (B) Estudio por qRT-PCR de los niveles de expresión de *Axina2* (*ch. 1*) y *Lef1* relativos a los niveles de expresión de *Actina* en st. 22 ó 26 tras la incubación con LiCl al 0,3 M o indirubina a 10 μ M desde el st. 17. (C) Estudio por qRT-PCR de los niveles de expresión de *Axina2* (*Ch. 1*) y *Lef1* relativos a los niveles de expresión de *Actina* en st. 22 tras la incubación con LiCl al 0,15 M o indirubina a 5 μ M desde el st. 17. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$. Los datos representan la media \pm sd (barra de error).

Los resultados de RT-PCR y qRT-PCR mostraron que las concentraciones apropiadas para activar de manera eficiente la vía de Wnt eran para el LiCl 0,3 M y en el caso de la indirubina 10 μ M (Fig. 52). La incubación de embriones CAB con estas concentraciones de fármacos desde el st. 17 hasta st. 22 ó 26 activaban la expresión endógena de los genes *Lef1* y *Axin2* (*ch. 1*). Sin embargo, las concentraciones más bajas no afectaban a la expresión endógena de estos genes. Por tanto, para los experimentos subsecuentes, se utilizaron las concentraciones de 0,3 M en el caso del LiCl o 10 μ M para la indirubina.

3.2. La vía de señalización de Wnt endógena está activa en la retina de Medaka.

Como se ha visto en el apartado de introducción, durante el desarrollo del ojo de los vertebrados se expresan muchos de los componentes de vía de señalización de Wnt (Jasoni y cols., 1999; Esteve y cols., 2000; Jin y cols., 2002; Fuhrmann y cols., 2003; Kubo y cols., 2003; Liu y cols., 2003, 2006; Yokoi y cols., 2003; Van Raay y Vetter, 2004; Van Raay y cols., 2005; Veien y cols., 2005). Además, como mínimo el gen *Wnt8b* se expresa en la retina neural de Medaka durante su desarrollo embrionario (Yokoi y cols., 2003).

Para confirmar que la vía de Wnt endógena está activa en la retina de Medaka, se estudió la presencia de β cat nuclear. Cuando la vía de señalización de Wnt está activa, se acumula β Cat en el citoplasma y posteriormente es translocada al núcleo donde actúa como FT de la vía de señalización de Wnt. En el desarrollo de la retina neural de Medaka, la presencia de β cat nuclear se detectó en el $17,8 \pm 1,2$ % de las células, con una distribución dispersa, mientras que en la lente no se detecta la presencia de β cat nuclear (Fig. 53). Este resultado indica que la señalización de Wnt está activa en la retina neural y puede actuar de

manera transitoria, como ya se ha descrito previamente en ratones (Fuhrmann y cols., 2009).

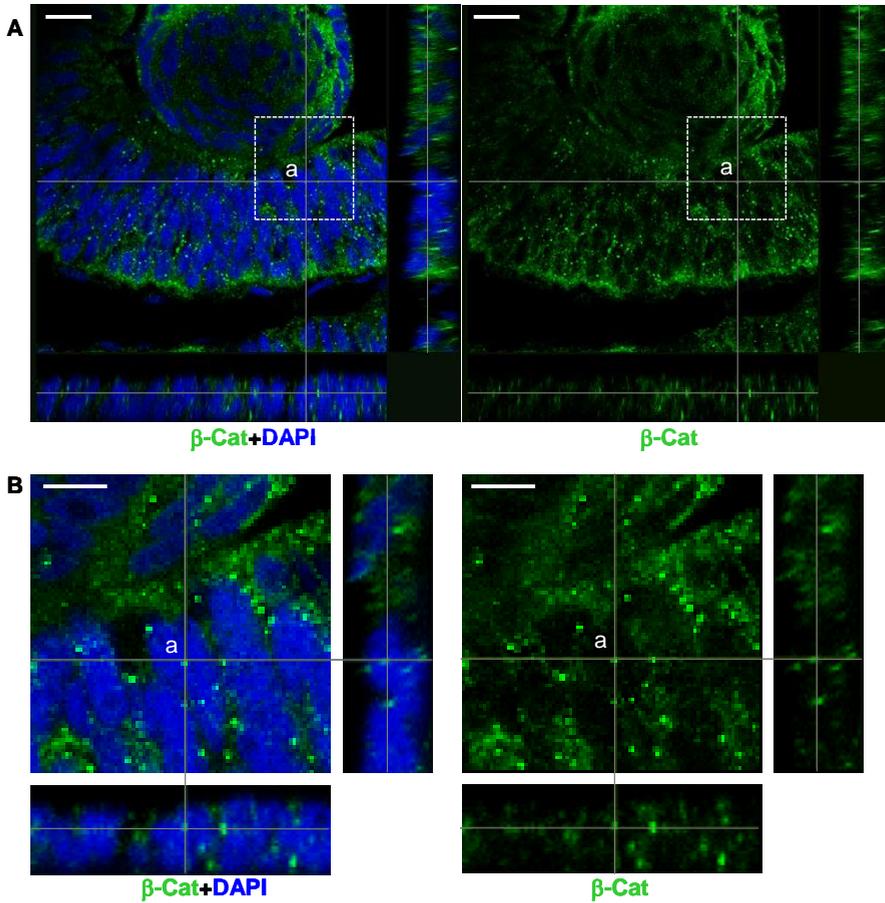


Fig. 53. Señalización canónica endógena de Wnt en la retina de Medaka. (A) Inmunohistoquímica de β cat y tinción de DAPI en criosección de ojo de Medaka. Las secciones en Z cruzan en un punto de elevada tinción de β cat (a). La proyección del eje Z se muestran en el lado derecho (eje Y) y en el lado inferior (eje X). (B) Imagen aumentada del área alrededor del punto (a), y las secciones en Z correspondientes, que muestran como la tinción de β cat está rodeada por DAPI en los tres ejes. Barras de escala en (A): 10 μ m y en (B): 5 μ m.

3.3. La vía de señalización de Wnt regula la diferenciación celular de los progenitores neurales de la retina durante el desarrollo temprano del ojo.

Una vez establecidas las dos metodologías de modulación de la vía de señalización de Wnt de manera condicional, por un lado la metodología genética mediante el uso de las líneas transgénicas y por otro lado la metodología farmacológica, se utilizaron estas dos aproximaciones para estudiar la posible función de la vía de señalización de Wnt en la diferenciación de los PNR.

Para investigar la función de la vía de señalización de Wnt durante la diferenciación de los PNR de Medaka, se analizó la expresión de marcadores de diferenciación neuronal en la retina tras la manipulación de la vía de señalización de Wnt.

Tal y como se describe en otros vertebrados (Prada y cols., 1991; Cayouette y cols., 2006; Wallace, 2008), los PNR de Medaka siguen un patrón temporal de diferenciación. Las células CGR se diferencian en primer lugar. Por tanto, *Ath5*, que es un marcador de diferenciación de PNR temprano aparece inicialmente marcando las CGR, pudiendo detectarse en st. 25 en la retina de Medaka (Fig. 54A). Posteriormente, *Ath5* marcará también algunas células horizontales, amacrinas y fotorreceptores (Brown y cols., 1998; Kanekar y cols., 1998; Poggi y cols., 2005). Otro marcador que se ha estudiado es *Prox1*, que se expresa en células amacrinas y horizontales, apareciendo en st. 27 (Fig. 54B; Dyer y cols., 2003). Tras *Ath5* y *Prox1*, se detecta el marcaje de *Vsx1*, que aparece en st. 30 y marca células bipolares (Fig. 54C; Passini y cols., 1998). Finalmente, el último marcador que hemos utilizado es *Rodopsina* (*Rhod*, del inglés *Rhodopsin*), que aparece en st. 34 y marca los fotorreceptores de tipo bastón (Fig. 54D; Vihelic y cols., 1999; Kitambi y Malicki, 2008).

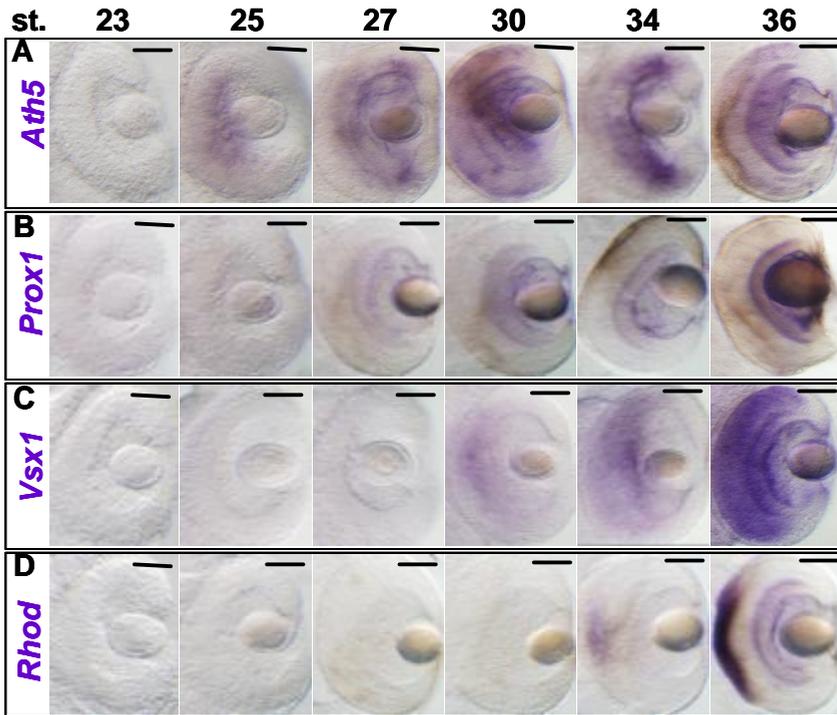


Fig. 54. Patrón de expresión de los genes marcadores de diferenciación en el ojo en desarrollo de Medaka. Patrón de expresión de los genes (A) *Ath5*, (B) *Prox1*, (C) *Vsx1* y (D) *Rhod* en distintos estadios del desarrollo del ojo de Medaka (st. 23, 25, 27, 30, 34 y 36). Barra de escala: 50 μ m.

Para analizar la expresión de *Ath5*, se utilizaron embriones transgénicos *Ath5-GFP* (del Bene y cols., 2007) y WMISH con una sonda para *Ath5*.

Tras incubar los embriones *Ath5-GFP* con LiCl o con indirubina desde st. 17 a st. 26, se observó un incremento en el dominio de expresión de GFP a st. 30, (Fig. 55B-D). LiCl incrementó la expresión de GFP en el $83 \pm 4,9$ % de los embriones tratados (n=36) y la indirubina en el $68 \pm 2,7$ % de los embriones tratados (n=21). Sin embargo, en st. 35 la distribución de las células GFP en los animales transgénicos *Ath5-GFP* era similar a la distribución de los embriones control no tratados.

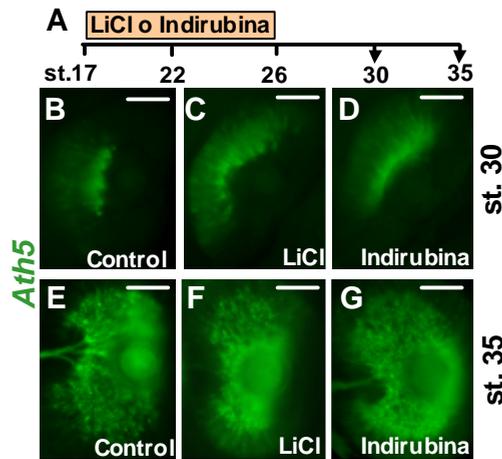


Fig. 55. La activación farmacológica de la vía de Wnt aumenta inicialmente el dominio GFP en los embriones transgénicos *Ath5-GFP*. (A) Esquema que muestra los estadios de incubación de los fármacos y los estadios donde los embriones fueron fijados y el dominio de expresión de GFP analizado (flechas). (B-G) Imágenes de fluorescencia de GFP en ojos de embriones tratados con LiCl o indirubina. Ojos control sin ningún tratamiento farmacológico (B, E), ojos de embriones incubados con LiCl (C, F) y ojos de embriones tratados con indirubina (D, G). Mientras que en st. 30 se observa un aumento en el dominio de *Ath5* mediado por la fluorescencia de GFP (B-D), no se observan cambios en la expresión de GFP en st. 35 (E-G). Barra de escala: 50 μ m.

Para confirmar este efecto de la vía de Wnt sobre la expresión del gen *Ath5* se utilizaron los animales transgénicos *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8*. En primer lugar, los animales transgénicos fueron expuestos a tres tratamientos de HS a lo largo de su desarrollo, en los st. 17, 22 y 26 para activar la expresión de *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* durante el desarrollo de la retina. Tras los tratamientos de HS se detectó la expresión del gen marcador *Ath5* mediante WMISH en st. 30. La activación de *HS-Wnt8* incrementó el dominio de expresión de *Ath5*, que en st. 30 sólo marca las CGR (Fig. 56A, B; $72,5 \pm 1,3$ %, n=62). Sin embargo, la activación de *HS-DNWnt8* disminuyó la expresión del dominio de *Ath5* (Fig. 56A, B; $85,1 \pm 2,8$ %, n=68). Cuando el análisis se realizó en st. 35, no se apreciaron

alteraciones en el dominio de expresión de *Ath5* debidas a la activación de los transgenes (Fig. 56E-G).

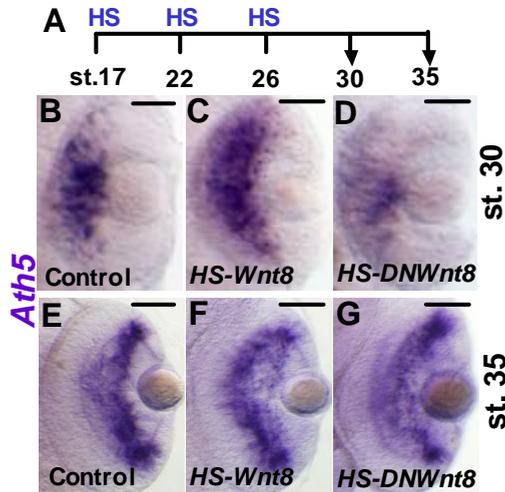


Fig. 56. La activación de los transgenes modula el dominio de expresión de *Ath5* en st. 30 pero no en 35. (A) Esquema que muestra los estadios donde se realizaron procesos de HS y los estadios donde los embriones fueron fijados y el dominio de expresión de *Ath5* analizado. (B-G) Imágenes de WMISH para el marcador de CGR *Ath5* en ojos de embriones tratados con HS en st. 17, 22 y 26. Ojos control CAB (B, E), ojos de embriones *HS-Wnt8* (C, F) y ojos de embriones *HS-DNWnt8* (D, G). La regulación de la vía de Wnt sobre la expresión de *Ath5* se puede apreciar en st. 30 (B-D), pero no en st. 35 (E-G). Barra de escala: 50 μ m.

Para ampliar el análisis y describir con mayor precisión en qué estadios la vía de Wnt regula la expresión de *Ath5*, se realizaron tratamientos únicos de HS en lugar de tres tratamientos a lo largo del desarrollo del ojo. Además, para cuantificar los cambios en la expresión de *Ath5*, se realizó RT-PCR y qRT-PCR a partir de ojos diseccionados. Así, tras activar la vía de Wnt con *HS-Wnt8* o inhibirla con *HS-DNWnt8* en st. 17, se detectó un cambio en la expresión de *Ath5* en st. 30, pero no en st. 35 (Fig. 57A, B; Fig. 5 Introducción). Sin embargo, cuando la activación de los transgenes se realizó en st. 26, no se detectaron cambios significativos en

la expresión de *Ath5* en st. 30 o en st. 35 (Fig. 57A, B). Por tanto, la vía de Wnt regula la diferenciación de las CGR antes de st. 26.

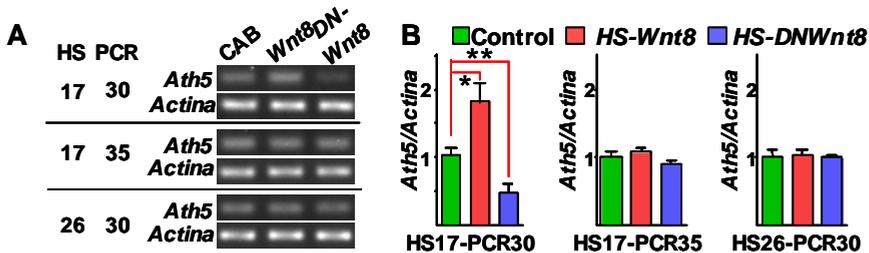


Fig. 57. La vía de Wnt regula la diferenciación de las CGR antes de st. 26. (A) Análisis de la expresión de *Ath5* por RT-PCR. Los estadios señalados indican el estadio en el que se produjo el tratamiento de HS y el estadio en que se extrajo el mRNA para realizar el análisis de RT-PCR. (B) Análisis por qRT-PCR de la expresión de *Ath5* relativa a la expresión del control *Actina* en ojos de embrión tras el tratamiento de HS en st. 17 y análisis en st. 30 ó 35, o HS en st. 26 para posterior análisis en st. 30. * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$. Los datos representan la media \pm sd (barra de error).

Para determinar si estos resultados en la regulación de la expresión de *Ath5* son específicos sobre este marcador, o si se trata de un efecto general en la diferenciación de los PNR, se estudió el efecto de la vía de Wnt en otros tipos neuronales de la retina. *Prox1* es una proteína homeobox que se expresa en las células amacrinas durante la diferenciación (Dyer y cols., 2003). Tras la activación de *HS-Wnt8* en st. 17, se detectó un incremento en la expresión de *Prox1* en el $73,1 \pm 2,5$ % de los embriones ($n=41$) en st. 32. Por el contrario, en st. 35 los niveles de mRNA de *Prox1* fueron equivalentes a los del control ($n= 37$; Fig. 58A-G). Cuando se activó la expresión de *HS-DNWnt8* en st. 17, se observó un descenso de la expresión de *Prox1* en st. 32 en el $84,8 \pm 5,2$ % de los embriones ($n=46$), pero en st. 35, los niveles de *Prox1* fueron iguales a los del control ($n=37$; Fig. 58A-G). Finalmente, la activación de los transgenes en st. 26 no producía ningún cambio en la expresión de *Prox1* en st. 32 ($n=45$; Fig. 58H-K). Estos resultados obtenidos mediante análisis de WMISH fueron

confirmados mediante la cuantificación de los niveles de expresión de *Prox1* utilizando qRT-PCR (Fig. 58L).

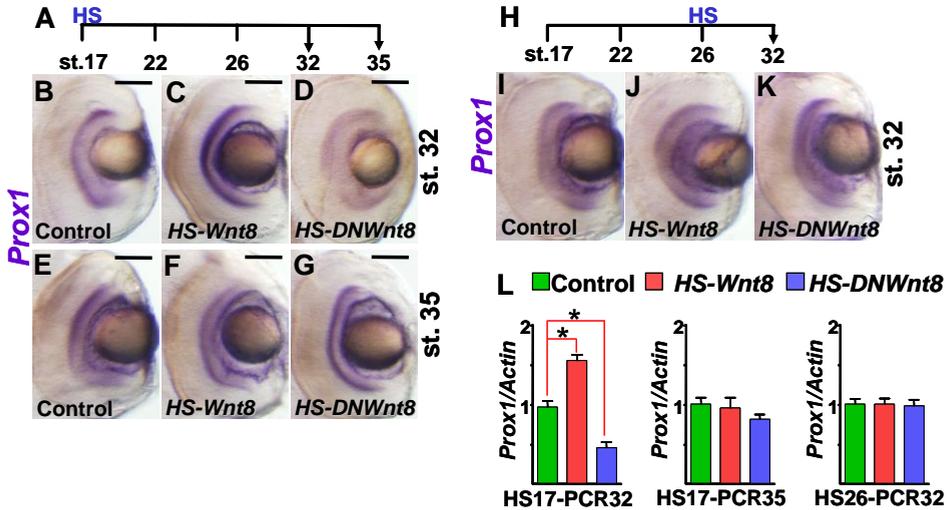


Fig. 58. La activación de los transgenes *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* modula el dominio de expresión de *Prox1* en st. 32 pero no en 35. (A, H) Esquema que muestra los estadios donde se realizaron procesos de HS y los estadios donde los embriones fueron fijados y el dominio de expresión de *Prox1* analizado (flechas). (B-G, I-K) Imágenes de WISH para el marcador *Prox1* en ojos de embriones tratados con HS en st. 17 (B-G) o en st. 26 (I-K). Ojos control (B, E, I), ojos de embriones *HS-Wnt8* (C, F, J) y ojos de embriones *HS-DNWnt8* (D, G, K). Barra de escala: 50 μ m. (L) Análisis por qRT-PCR de la expresión de *Prox1* relativa a la expresión del control *Actina* en ojos de embriones tras el tratamiento de HS en st. 17 y análisis en st. 32 ó 35, o HS en st. 26 para posterior análisis en st. 32. * $p < 0.0001$. Los datos representan la media \pm sd (barra de error).

Los resultados obtenidos con la modulación de la vía de Wnt sobre la regulación de la expresión de *Ath5* y *Prox1* sugieren que hay una fase temprana durante el desarrollo de la retina en la cual la vía de Wnt regula la expresión de estos dos marcadores.

3.4. La vía de señalización de Wnt regula la diferenciación celular tardía de los progenitores neurales de la retina durante el desarrollo del ojo.

Como se ha visto anteriormente, los PNR siguen una secuencia de diferenciación temporal, siendo las células bipolares y los fotorreceptores de tipo bastón dos de los tipos celulares que se diferencian más tardíamente. Para estudiar si la vía de señalización de Wnt podría estar también regulando la diferenciación más tardía de los PNR, se estudió el efecto de la modulación de la vía sobre el marcador *Vsx1* de células bipolares y el marcador *Rhod* de fotorreceptores tipo bastón.

Mediante el uso de las dos líneas transgénicas, *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8*, se realizaron tres tratamientos de HS a lo largo del desarrollo de

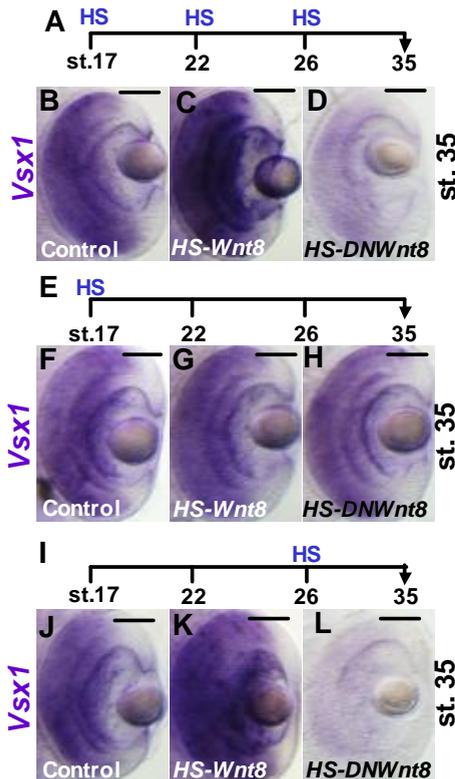


Fig. 59. La activación de los transgenes *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* en st. 26 modula el dominio de expresión de *Vsx1* en st. 35. (A, E, I) Esquema que muestra los estadios donde se realizaron procesos de HS y los estadios donde los embriones fueron fijados y el dominio de expresión de *Vsx1* analizado (flecha). (B-D, F-H, J-L) Imágenes de WMISH para el marcador *Vsx1* en ojos de embriones tratados con HS en st. 17, 22 y 26 (B-D), en st. 17 (F-H), o en st. 26 (J-L). Ojos control de embriones CAB (B, F, J), ojos de embriones *HS-Wnt8* (C, G, K) y ojos de embriones *HS-DNWnt8* (D, H, L). Barra de escala: 50 μ m.

los embriones (st. 17, 22 y 26) y se analizó por WMISH el efecto sobre *Vsx1*. La activación de *HS-Wnt8* incrementó la expresión de *Vsx1* en st. 35 en el $80,4 \pm 3,7$ % de los embriones (n=41), mientras que la inhibición de la vía de Wnt por *HS-DNWnt8* disminuyó la expresión de *Vsx1* en ese estadio en el $85 \pm 0,9$ % de los embriones (n=47; Fig. 59A-D).

Por otra parte, al activar los transgenes en distintos estadios de desarrollo se observó una especificidad temporal del efecto de Wnt sobre *Vsx1*. De este modo, la activación de los transgenes en st. 17 no producía cambios en la expresión del marcador *Vsx1* en st. 35 (n=45; Fig. 59E-H). Por otra parte, la activación de *HS-Wnt8* en st. 26 producía un aumento en la expresión de *Vsx1* en st. 35 en el $74,3 \pm 2,3$ % de los embriones tratados (n=39), mientras que la expresión de *Vsx1* disminuía en el $74,3 \pm 2,6$ % de los embriones al activarse *HS-DNWnt8* (n=43; Fig. 59I-L). Estos datos sugieren que la vía de señalización de Wnt regula la expresión de *Vsx1* después de st. 26.

Para comprobar si el efecto de Wnt sobre *Vsx1* era específico o general sobre la expresión de todos los marcadores tardíos, se analizó la expresión del marcador *Rhod*. Para ello, se utilizaron los mismos tratamientos de HS que se habían empleado en el estudio del marcador

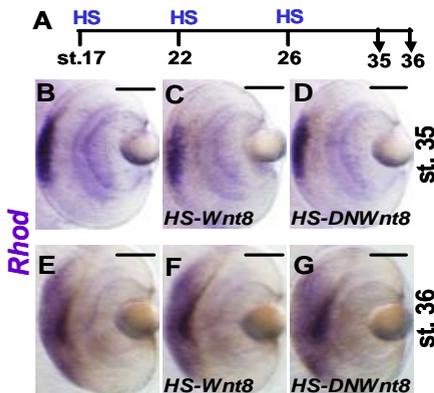


Fig. 60. La activación de los transgenes *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* no modula el dominio de expresión de *Rhod* en st. 35 ni 36. (A) Esquema que muestra los estadios donde se realizaron procesos de HS y los estadios donde los embriones fueron fijados y el dominio de expresión de *Rhod* analizado (flecha). (B-G) Imágenes de WMISH para el marcador *Rhod* en ojos de embriones tratados con HS en st. 17, 22 y 26. Ojos control de embriones CAB (B, E), ojos de embriones *HS-Wnt8* (C, F) y ojos de embriones *HS-DNWnt8* (D, G). Barra de escala: 50 μ m.

Vsx1. Tras el tratamiento de HS a lo largo de tres estadios (17, 22 y 26) o tras el tratamiento puntual de HS en st. 17 o en st. 26 no se observó ningún efecto sobre la expresión de *Rhod* (Fig. 60). Estos resultados sugieren que Wnt no regula la expresión de *Rhod* tras el st. 26 y, por tanto, el efecto de Wnt sobre *Vsx1* es específico.

Los efectos de la vía de señalización de Wnt sobre los marcadores *Vsx1* y *Rhod* fueron cuantificados mediante RT-PCR y qRT-PCR. Los resultados obtenidos mediante ambas técnicas confirmaron que Wnt regula la expresión de *Vsx1* tras el st. 26, pero no en estadios anteriores, y que además, no afecta a la expresión de *Rhod* (Fig. 61A, B).

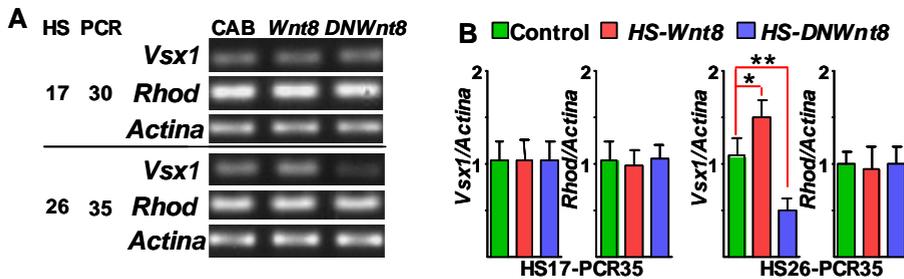


Fig. 61. La vía de Wnt regula la expresión de *Vsx1* pero no la de *Rhod*. (A) Análisis de la expresión de *Vsx1* y *Rhod* por RT-PCR. Los estadios señalados indican el estadio en el que se produjo el tratamiento de HS y el estadio en que se extrajo el mRNA para realizar el análisis de RT-PCR. (B) Análisis por qRT-PCR de la expresión de *Vsx1* o *Rhod* relativa a la expresión del control *Actina* en ojos de embrión tras el tratamiento de HS en st. 17 y análisis en st. 35, o HS en st. 26 para posterior análisis en st. 35. * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$. Los datos representan la media \pm sd (barra de error).

Para confirmar que la vía de Wnt no tenía ningún efecto sobre los fotorreceptores, se utilizó el anticuerpo anti-Zpr1, que reconoce un antígeno específico de los fotorreceptores. Tras el proceso de HS consecutivo en los st. 17, 22 y 26, tampoco se apreció ningún cambio en la distribución o grosor de la capa de fotorreceptores marcada por la proteína Zpr1 en st. 35 (Fig. 62).

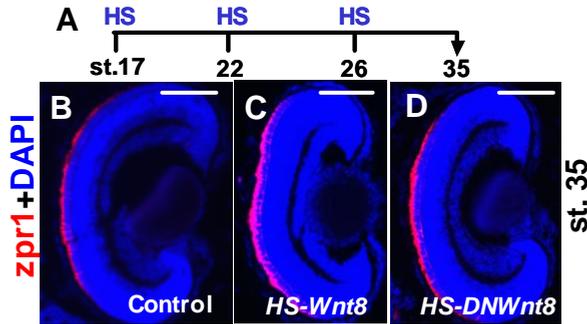


Fig. 62. La activación de los transgenes *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* no afecta a la capa de fotorreceptores en st. 35. (A) Esquema que muestra los estadios donde se realizaron procesos de HS y el estadio donde los embriones fueron fijados y se realizó la inmunohistoquímica para anti-zpr1 (flecha). (B-D) Inmuntinción de Zpr1 en ojos de embriones tratados con HS en st. 17, 22 y 26. Ojo control de embrión CAB, n=10 (B); ojo de embrión *HS-Wnt8*, n=7 (C); ojo de embrión *HS-DNWnt8*, n=9 (D). Barras de escala: 50 μ m.

Por tanto, los resultados obtenidos indican que la vía de Wnt regula la expresión del marcador de células bipolares, *Vsx1*, a partir del st. 26, pero no afecta a la expresión del marcador *Rhod* ni a la capa de fotorreceptores.

3.5. La vía de señalización de Wnt regula la apoptosis de los progenitores neurales de la retina durante el desarrollo temprano.

Durante el desarrollo neural temprano en Medaka, se detecta una gran cantidad de células apoptóticas en el tubo neural desde st. 20 a st. 27, pero el número de células apoptóticas decrece a partir de st. 29 (Ishikawa y cols., 2007). Esto indica que la apoptosis es un proceso regulado durante el desarrollo del SNC. Por tanto, decidimos analizar si la vía de señalización de Wnt regula la apoptosis durante el desarrollo del ojo. Para analizar el

efecto de la vía de Wnt en la apoptosis de los PNR se utilizó la tinción de TUNEL.

En primer lugar, se sometió a los embriones transgénicos o al grupo control a tres procesos de HS a lo largo de su desarrollo, en st. 17, 22 y 26. Tras un HS a los embriones *HS-Wnt8* en st. 17 se contaron las células apoptóticas en el ojo en st. 22 y se detectó un incremento de la apoptosis respecto al control. Sin embargo, cuando el análisis se realizó en st. 26, tras HS a st. 17 y 22, el número relativo de células apoptóticas se vio reducido. También había una reducción en la apoptosis en st. 30, tras los tres procesos de HS, en st. 17, 22 y 26 (Tabla 12 y Fig. 63A-C).

Por otra parte, al repetir el experimento con los animales transgénicos *HS-DNWnt8*, el resultado fue complementario al obtenido para los transgénicos *HS-Wnt8*. En primer lugar, tras HS en st. 17, el análisis de TUNEL en st. 22 reveló una disminución en el número relativo de células apoptóticas. Sin embargo, cuando el análisis se realizó en st. 26, tras HS en st. 17 y 22, o se realizó en st. 30, tras HS en st. 17, 22 y 26, la inhibición de la vía de Wnt provocó un aumento en el número relativo de células apoptóticas (Tabla 12 y Fig. 63A-C).

La vía de señalización de Wnt podría tener distintos efectos a lo largo del desarrollo de la retina neural, por ello se activó la expresión de los transgenes en momentos puntuales. De este modo, la activación de la expresión de *HS-Wnt8* en st. 17 provocó un aumento de apoptosis relativo al control en st. 22, pero en st. 30 se detectó una disminución en la apoptosis (Fig. 63D). Cuando la activación del transgén *HS-Wnt8* se realizó en st. 22, también se detectó un aumento en la apoptosis en st. 26 y una disminución de la misma en st. 30 (Fig. 63E). Finalmente, la activación del transgén *HS-Wnt8* en st. 26 no provocó ningún cambio en el número de células apoptóticas en st. 30 (Fig. 63F). Por otra parte, en el caso de la activación del transgén *HS-DNWnt8*, que inhibe la vía de Wnt, los efectos en la apoptosis fueron complementarios a los obtenidos con la activación de *HS-Wnt8* antes de st. 26. Así, la activación de *HS-DNWnt8* en st. 17

provocó una disminución de la apoptosis en st. 22, pero en st. 30 se detectó un aumento (Fig. 63D). Cuando el transgén que inhibe la vía de Wnt se activó en st. 22, se produjo una disminución inicial de la apoptosis relativa al control en st. 26, seguida de un aumento relativo en st. 30 (Fig. 63E). Por otra parte, la activación de uno u otro transgén en st. 26 no provocó cambios en la apoptosis en st. 30 (Fig. 63F).

Tabla 12. Resultados obtenidos mediante TUNEL en el estudio de la vía de señalización de Wnt sobre la apoptosis. Los datos representan el número de células positivas para TUNEL en la retina en desarrollo. Los experimentos se realizaron por triplicado y n es el número total de retinas contadas en cada condición. Estos datos fueron usados para calcular los valores relativos de la Fig. 64, dándole al control el valor 1.

	HS st.	TUNEL st.	Media	sd	n
Control	17	22	22,2	1,03	30
<i>Wnt8</i>	17	22	27,6	1,17	30
<i>DNWnt8</i>	17	22	17,1	1,10	30
Control	17, 22	26	17,4	0,96	30
<i>Wnt8</i>	17, 22	26	13,5	0,84	30
<i>DNWnt8</i>	17, 22	26	21,2	0,91	30
Control	17, 22, 26	30	5,5	1,17	30
<i>Wnt8</i>	17, 22, 26	30	0,57	1,13	30
<i>DNWnt8</i>	17, 22, 26	30	11,44	1,04	30
	HS st.	TUNEL st.	Media	sd	n
Control	17	22	22,2	1,00	30
<i>Wnt8</i>	17	22	27,6	1,51	30
<i>DNWnt8</i>	17	22	17,1	1,17	30
Control	17	30	5,5	0,72	30
<i>Wnt8</i>	17	30	0,44	1,10	30
<i>DNWnt8</i>	17	30	9,6	1,11	30
	HS st.	TUNEL st.	Media	sd	n
Control	22	26	17,1	0,99	30
<i>Wnt8</i>	22	26	23,0	1,22	30
<i>DNWnt8</i>	22	26	11,4	1,94	30
Control	22	30	5,2	1,15	30
<i>Wnt8</i>	22	30	4,7	1,42	30
<i>DNWnt8</i>	22	30	6,2	1,00	30
	HS st.	TUNEL st.	Media	sd	n
Control	26	30	5,6	1,34	30
<i>Wnt8</i>	26	30	5,44	1,14	30
<i>DNWnt8</i>	26	30	5,6	0,39	30

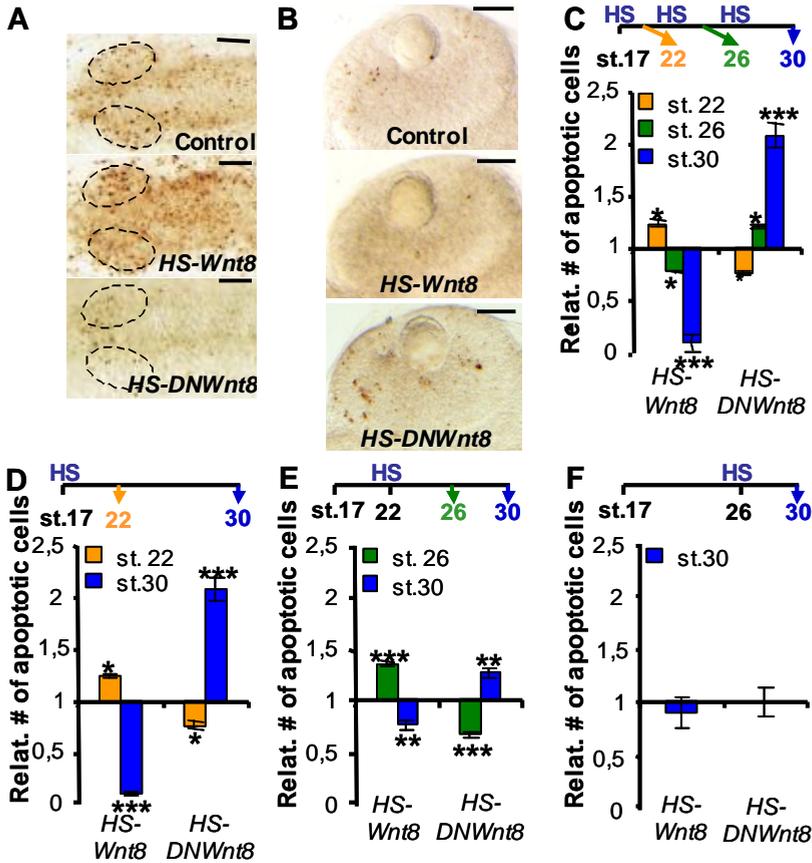


Fig. 63. La vía de señalización de Wnt regula la apoptosis de los PNR. (A, B) Imagen de WMISH que muestra las células TUNEL positivas en embriones control, *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* tras HS en st. 17 y tinción de TUNEL en st. 22 (A) o en ojos de st. 30 (B). En (A) la parte anterior está en el lado derecho y las copas ópticas se localizan dentro de las áreas marcadas. Barras de escala: 50 μ m. (C-F) Representación gráfica relativa del número de células apoptóticas en la retina de los embriones transgénicos tratados con HS en relación a los embriones control. Se han representado los valores numéricos relativos al control (línea base). (C) Los embriones fueron tratados con HS en st. 17 y analizados en st. 22 (naranja), tratados con HS en st. 17 y 22 y analizados en st. 26 (verde) o tratados con HS en st. 17, 22 y 26 y analizados en st. 30 (azul). (D) Los embriones fueron tratados con HS en st. 17 y analizados en st. 22 (naranja) ó 30 (azul). (E) Los embriones fueron tratados con HS en st. 22 y analizados en st. 26 (verde) y 30 (azul). (F) Los embriones fueron tratados con HS en st. 26 y analizados en st. 30 (azul). La apoptosis no se vio afectada cuando la activación de los transgenes se dio a este estadio. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Los datos representan la media \pm sd (barra de error).

Estos resultados demuestran que la vía de señalización de Wnt regula la apoptosis de los PNR durante el desarrollo temprano del ojo. Además, al igual que sucede con la diferenciación celular, existen mecanismos independientes de la vía de Wnt que compensan los efectos introducidos por Wnt.

3.6. La vía de señalización de Wnt regula la proliferación de los progenitores neurales de la retina durante el desarrollo temprano.

Para estudiar la proliferación de los PNR se utilizó la inmunohistoquímica con pH3 como marcador de las células en proliferación en fase M del ciclo celular. En primer lugar se incubaron embriones CAB con LiCl o indirubina desde st. 17 hasta st. 22 ó 26, momento en que se realizó la tinción con anti-pH3. Tras la incubación con los fármacos, en st. 22 se observó un incremento en el número de células pH3 positivas en la retina (LiCl, $35.18 \pm 0,98$, $n=60$; indirubina $30,07 \pm 0,90$, $n=60$) en comparación con las retinas de los embriones control ($19,94 \pm 0,99$). Sin embargo, este incremento en la proliferación no se observó cuando la proliferación se midió a st. 26, donde el número de células pH3 positivas no variaba respecto al control ($43,2 \pm 0,75$) en el caso del LiCl ($44,3 \pm 1,12$) o incluso se veía disminuido en el caso de la indirubina ($36,8 \pm 1,20$; Fig. 64).

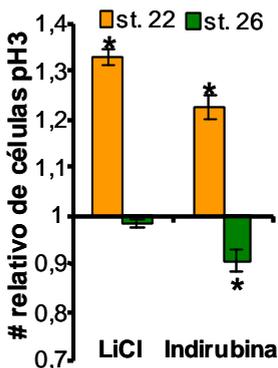


Fig. 64. Efecto de los fármacos activadores de la vía de Wnt sobre la proliferación. Los embriones fueron incubados con LiCl o indirubina desde st. 17 a 22 (naranja) o desde st. 17 a 26 (verde). El incremento en el número relativo de células pH3 positivas sólo se aprecia en st. 22, pero en 26 ese aumento desaparece (LiCl) o incluso se invierte con una disminución respecto al control (indirubina). * $p < 0,001$. Los datos representan la media \pm sd (barra de error).

Estos resultados se confirmaron utilizando los animales transgénicos que permiten la sobreexpresión o inhibición de la vía de Wnt. Tras activar la vía de Wnt con *HS-Wnt8* en st. 17 se producía un aumento en la proliferación en st. 22 (Tabla 13 y Fig. 65A). Sin embargo, cuando la proliferación se midió en st. 26 (HS en st. 17 y 22), el incremento en la proliferación no se detectó (Tabla 13 y Fig. 65A). Además, si la proliferación se medía en st. 30 (tres tratamientos de HS en st. 17, 22 y 26), se observaba una disminución en el número relativo de células pH3 positivas (Tabla 13 y Fig. 65A). Por otra parte, la inhibición de la vía de Wnt con *DNWnt8* provocaba un efecto complementario en la proliferación. En este caso, en st. 22 (HS en st. 17), el número relativo de células pH3 positivas se veía disminuido respecto al control (Tabla 13 y Fig. 65A). En st. 26, (HS en st. 17 y 22) no se detectaban variaciones en la proliferación respecto al control, y en st. 30 (HS en st. 17, 22 y 26) los niveles de proliferación estaban aumentados respecto al control (Tabla 13 y Fig. 65A).

A la vista de estos resultados, podría suceder que Wnt tuviese efectos opuestos sobre la proliferación en distintos momentos del desarrollo. Para comprobar esta posibilidad, se administraron tratamientos de HS en un único estadio y se analizaron los valores de proliferación en varios estadios posteriores. La activación de *HS-Wnt8* en st. 17 generó un aumento en el número de células pH3 positivas en st. 22, sin embargo, en st. 30 había una disminución de la proliferación (Fig. 65B). Por otra parte, la activación de *HS-DNWnt8* en st. 17 produjo una disminución de la proliferación en st. 22, pero en st. 30, la proliferación se veía incrementada (Fig. 65B). El mismo tipo de análisis se realizó suministrando el tratamiento de HS en st. 22. En este caso, la activación de *HS-Wnt8* provocó un aumento en la proliferación en st. 26, pero si se medía más tarde en el desarrollo, en st. 32, la proliferación aparecía disminuida (Fig. 65C, D). Por otra parte, la inhibición de la vía de Wnt mediante la activación de *HS-DNWnt8* provocó una disminución de la proliferación en st. 26 mientras que en st. 32 la proliferación aumentó (Fig. 65C, D).

Tabla 13. Resultados obtenidos mediante la inmunohistoquímica de pH3 en el estudio de la vía de señalización de Wnt sobre la proliferación. Los datos representan el número de células teñidas con pH3 en la retina en desarrollo. Los experimentos se realizaron por triplicado y n es el número total de retinas contadas en cada condición. Estos datos fueron usados para calcular los valores relativos de la Fig. 66, dándole al control el valor 1.

	HS st.	pH3 st.	Media	sd	n
Control	17	22	21,6	1,22	60
<i>Wnt8</i>	17	22	23,8	1,39	60
<i>DNWnt8</i>	17	22	16,8	1,09	60
Control	17, 22	26	32,9	1,51	60
<i>Wnt8</i>	17, 22	26	33,0	1,11	60
<i>DNWnt8</i>	17, 22	26	32,7	0,62	60
Control	17, 22, 26	30	41,1	1,44	60
<i>Wnt8</i>	17, 22, 26	30	37,1	1,37	60
<i>DNWnt8</i>	17, 22, 26	30	44,7	1,33	60
	HS st.	pH3 st.	Media	sd	n
Control	17	22	27,33	1,73	60
<i>Wnt8</i>	17	22	30,5	1,33	60
<i>DNWnt8</i>	17	22	22,9	1,32	60
Control	17	30	40,6	1,07	60
<i>Wnt8</i>	17	30	35,44	0,96	60
<i>DNWnt8</i>	17	30	45,1	1,41	60
	HS st.	pH3 st.	Media	sd	n
Control	22	26	34,88	0,89	60
<i>Wnt8</i>	22	26	38,8	1,55	60
<i>DNWnt8</i>	22	26	31,57	1,98	60
Control	22	30	40,8	1,22	60
<i>Wnt8</i>	22	30	40,6	1,26	60
<i>DNWnt8</i>	22	30	40,5	1,58	60
Control	22	32	56,90	1,69	60
<i>Wnt8</i>	22	32	51,75	1,49	60
<i>DNWnt8</i>	22	32	62,20	1,53	60
	HS st.	pH3 st.	Media	sd	n
Control	26	30	40,5	1,18	60
<i>Wnt8</i>	26	30	40,13	1,16	60
<i>DNWnt8</i>	26	30	40,8	1,99	60

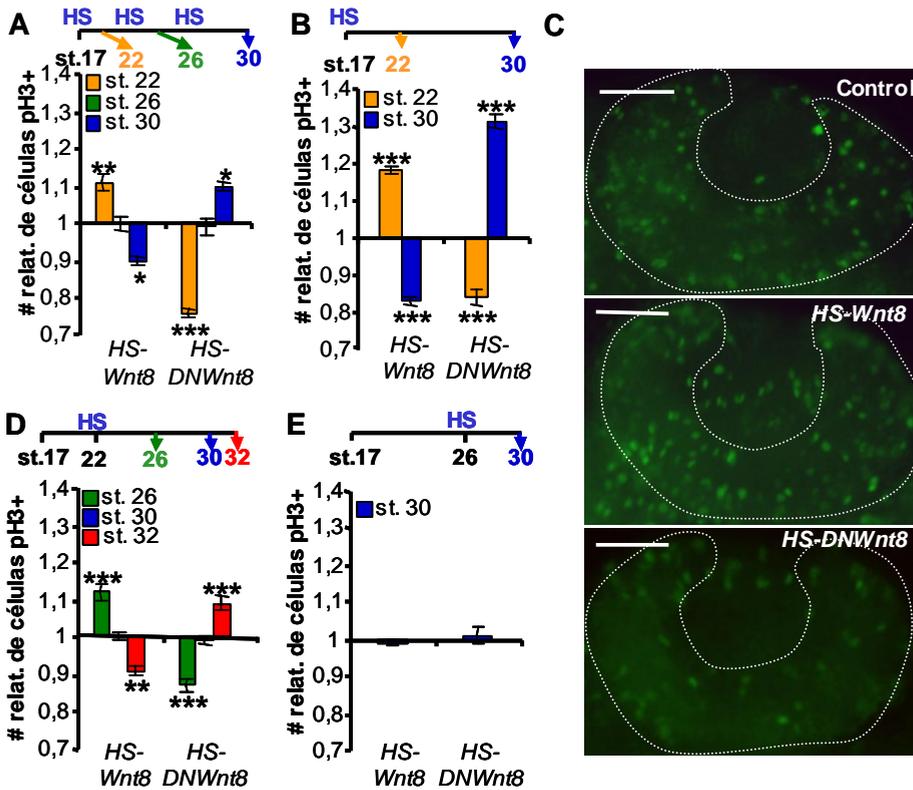


Fig. 65. La vía de señalización de Wnt regula la proliferación de los PNR. (A, B, D, E) Representación gráfica relativa del número de células pH3 positivas en la retina neural de los embriones transgénicos tratados con HS en relación a los embriones control. Se han representado los valores numéricos relativos al control (línea base). (A) Los embriones fueron tratados con HS en st. 17 y analizados en st. 22 (naranja), tratados con HS en st. 17 y 22 y analizados a st. 26 (verde), tratados con HS en st. 17, 22 y 26 y analizados a st. 30 (azul). (B) Los embriones fueron tratados con HS a st. 17 y analizados a st. 22 (naranja) ó 30 (azul). (C) Inmunohistoquímica de pH3 en un ojo control, un ojo *HS-Wnt8* y un ojo *HS-DNWnt8* tras un tratamiento de HS en st. 22 y análisis en st. 26. Las retinas se encuentran dentro de las áreas marcadas. Barras de escala: 50 μ m. (D) Los embriones fueron tratados con HS en st. 22 y analizados en st. 26 (verde), 30 (azul) ó 32 (rojo). (E) Los embriones fueron tratados con HS en st. 26 y analizados en st. 30 (azul). La proliferación no se vio afectada cuando la activación de los transgenes se dio en este estadio. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Los datos representan la media \pm sd (barra de error).

Por tanto, el efecto provocado por Wnt inicialmente se compensaba posteriormente de manera independiente de la señalización de Wnt.

Para finalizar este análisis, se activaron los transgenes en st. 26 y se cuantificó el efecto en la proliferación en st. 30, sin embargo, ninguno de los dos transgenes produjo cambios en el número de células pH3 positivas (Tabla 13 y Fig. 65E). Por tanto, la regulación de la vía de Wnt sobre la proliferación de los PNR se produce durante el desarrollo temprano del ojo, antes del st. 26.

3.7. La vía de señalización de Wnt regula el ciclo celular de los progenitores neurales de la retina durante el desarrollo temprano a través de *CcnD1*.

Tras el estudio de los procesos de diferenciación, apoptosis y proliferación de los PNR, se ha visto que la vía de señalización de Wnt está participando en la regulación de los tres procesos, lo que podría parecer una contradicción. Sin embargo, una explicación podría ser que Wnt estuviese regulando un proceso que a su vez regulase la proliferación, apoptosis y diferenciación. En la retina de vertebrados se ha descrito que el morfógeno Shh participa también en la regulación de la proliferación y diferenciación de los PNR a través de la regulación de la cinética del ciclo celular (Locker y cols., 2006). Por tanto, sería interesante estudiar si la vía de señalización de Wnt está regulando el ciclo celular.

Para comprobar esta hipótesis se estudió el ciclo celular de los ojos de embriones transgénicos mediante el uso de la tinción celular con PI y posterior análisis por citometría de flujo. En primer lugar, se analizó el efecto de la vía tempranamente, antes del st. 26. Para ello, los embriones transgénicos *HS-Wnt8* y *HS-DNWnt8* o controles CAB fueron tratados con HS en st. 17 y posteriormente se extrajeron los ojos en st. 22. Una vez extraídos los ojos, sus células fueron disgregadas y procesadas para su análisis por citometría de flujo. La activación de la vía en st. 17, mediante la

expresión de *HS-Wnt8*, produjo una disminución en el porcentaje de células en fase G0/G1 y un incremento en el porcentaje de células en fase S y fase G2/M en los ojos de st. 22 (Tabla 14 y Fig. 66A, B). Estos resultados apoyan los resultados previos con pH3 sobre proliferación y, adicionalmente, indican que la sobreexpresión de la señalización de Wnt acelera la transición de la fase G1 a S, por lo que hay una acumulación en las fases S y G2/M. Por otra parte, la activación de *HS-DNWnt8* en st. 17, que inhibe la vía de señalización de Wnt, provocó un incremento en el porcentaje de células en fase G0/G1 y una disminución del porcentaje de células en fase S y G2/M en st. 22 en comparación con el control (Tabla 14 y Fig. 66A, B).

Tabla 14. Resultados obtenidos mediante el análisis de citometría en el estudio de la vía de señalización de Wnt sobre el ciclo celular. Los datos representan el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. “n” es el número de experimentos realizados para cada condición.

HS st.	Análisis st.	Fases	Control			<i>HS-Wnt8</i>			<i>HS-DNWnt8</i>		
			Media (%)	sd	n	Media (%)	sd	n	Media (%)	sd	n
17	22	G0/G1	45,58	1,42	3	39,97	2,08	4	69,91	6,85	3
		S	42,70	0,62	3	45,26	2,26	4	26,91	6,34	3
		G2/M	11,72	1,08	3	14,77	0,73	4	6,51	1,82	3
26	30	G0/G1	45,68	0,84	3	49,71	9,51	3	48,19	5,74	3
		S	50,98	0,90	3	47,40	8,54	3	49,63	6,01	3
		G2/M	3,34	0,09	3	2,89	1,01	3	2,17	0,66	3

En segundo lugar, se analizó el efecto de los transgenes sobre la vía de señalización después del st. 26. En este caso, la activación de estos transgenes en st. 26 y posterior análisis en st. 30 no provocó ningún cambio en la distribución de células en las distintas fases del ciclo celular (Tabla 14 y Fig. 66C, D). De nuevo, estos resultados apoyan los descritos previamente para el análisis de pH3 y sugieren que durante el desarrollo de la retina antes de st. 26, la señalización de Wnt es necesaria para la

progresión del ciclo celular en la transición de la fase G1 a S. Por tanto, la señalización de Wnt regula la proliferación de las células PNR durante el desarrollo temprano del ojo.

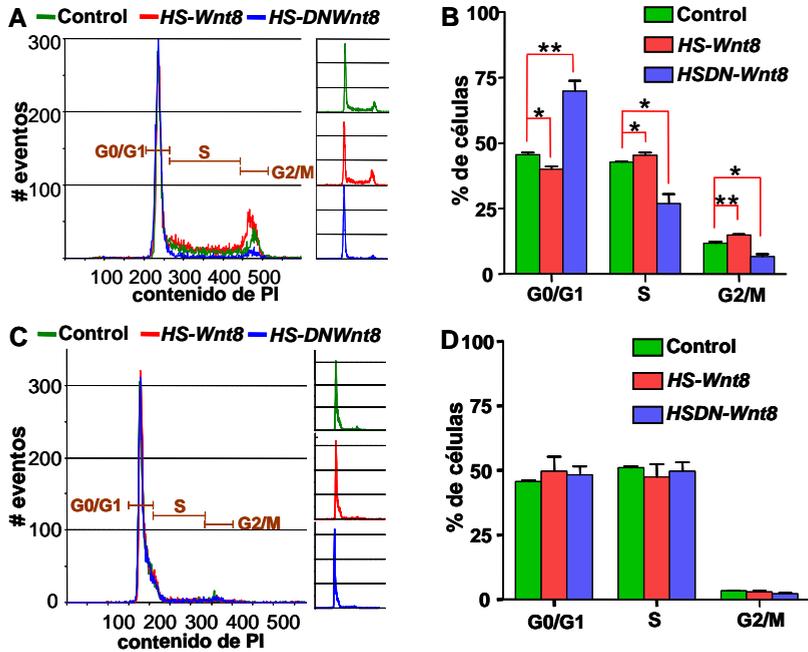


Fig. 66. La vía de señalización de Wnt regula la transición de la fase G1 a S. (A, C) Histograma que muestra la distribución del contenido de PI por citometría de flujo en células extraídas de ojos de embriones en st. 22, tras el tratamiento de HS en st. 17 (A) o en células extraídas de ojos de embriones en st. 30 tras el tratamiento de HS a st. 26 (C). (B, D) Gráficas que representan el porcentaje de células en fase G0/G1, S y G2/M de ojos de embriones en st. 22 tras HS en st. 17 (B) o a partir de ojos de embriones en st. 30 tras HS en st. 26 (D). * p < 0,05; ** p < 0,01. Los datos representan la media ± sd (barra de error).

Tras observar que la vía de Wnt regula el ciclo celular, se analizó el efecto de la manipulación de Wnt sobre la expresión de varias proteínas reguladoras de distintas fases del ciclo celular. De este modo, mediante RT-PCR, se analizaron los niveles de expresión de *CcnD1*, *CcnA*, *Cdk2*, *Cdk4*, *Cdk6*, *cdc25a* y *p53*. El análisis mostró que sólo la expresión de *CcnD1* se veía incrementada tras la activación de *HS-Wnt8* o disminuida tras la

activación de *HS-DNWnt8* en st. 17 (Fig. 67A). Sin embargo, si la modulación de la vía de Wnt se realizaba en el st. 26, no se detectaban cambios en la expresión de ninguno de estos genes (Fig. 67B). Tras estos resultados, se cuantificaron mediante qRT-PCR los cambios de expresión de *CcnD1*, que regula la transición de la fase G1 a S, y de *CcnA*, que regula la transición de G2 a M.

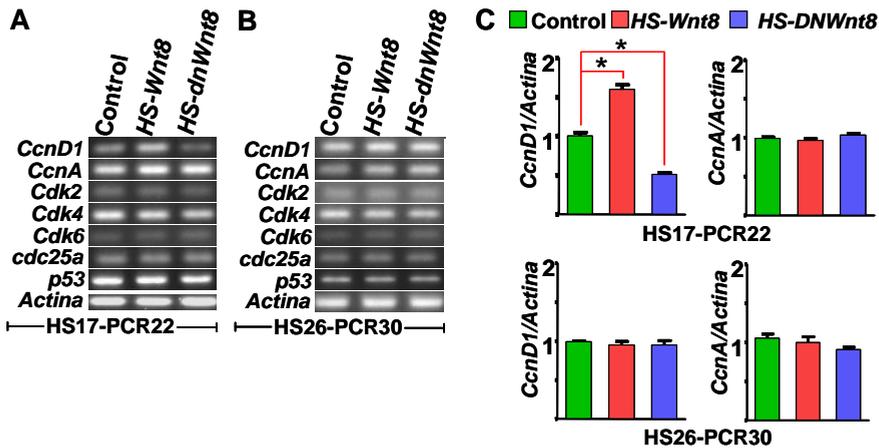


Fig. 67. Wnt regula la expresión de *CcnD1* durante el desarrollo temprano del ojo. (A, B) Análisis por RT-PCR de la expresión de varios genes implicados en la regulación de diferentes fases del ciclo en st. 22 tras un tratamiento de HS en st. 17 (A) o en st. 30 tras un tratamiento de HS en st. 26 (B). (C) Análisis por qRT-PCR de la expresión de *CcnD1* y *CcnA* relativo a la expresión del control de *Actina* en ojos de embriones de st. 22 tras un HS en st. 17, o análisis en st. 30 tras el tratamiento de HS en st. 26. * $p < 0,0001$. Los datos representan la media \pm sd (barra de error).

Como indicaban los resultados previos con RT-PCR, mediante qRT-PCR se detectó que la activación de *HS-Wnt8* en st. 17 provocaba un incremento en la expresión de *CcnD1*, pero no de *CcnA* en los ojos de st. 22. Además, la activación de *HS-DNWnt8* en st. 17 producía una disminución en la expresión de *CcnD1* pero ningún cambio en la expresión de *CcnA*. Por otro lado, no se detectaron cambios en la expresión de estos

dos genes tras la activación de *HS-Wnt8* o *HS-DNWnt8* en st. 26 y análisis en st. 30. Por tanto, los resultados indican que la señalización de Wnt regula el ciclo celular de los PNR en estadios tempranos del desarrollo de la retina (< st. 26) mediante la regulación de la expresión de *CcnD1* que actúa en la transición de la fase G1 a S.

En resumen, la vía de señalización de Wnt presenta dos funciones distintas a lo largo del proceso de desarrollo de la retina. La función temprana, antes de st. 26, consiste en la regulación de la proliferación de los PNR, progresión del ciclo celular, apoptosis y diferenciación de los tipos celulares tempranos (CGR y células amacrinas). La función tardía de la vía de Wnt consiste en regular la diferenciación de las células bipolares.

A fluorescence micrograph showing a cross-section of plant tissue. The cells are stained with various dyes, resulting in a vibrant, multi-colored appearance. The cell walls are highlighted in blue and green, while the internal structures, including what appears to be a central vascular bundle, show a mix of red, orange, and yellow. The overall image has a dark background, making the stained cells stand out prominently.

*El ignorante afirma,
el sabio duda y reflexiona.
Aristóteles*

DISCUSIÓN

1. Regulación de la proliferación y diferenciación durante el desarrollo embrionario de los peces Medaka.

La utilización del pez Medaka como modelo para el estudio *in vivo* del desarrollo aporta numerosas ventajas: gran número de embriones transparentes, desarrollo ex útero, fácil detección y manipulación de la expresión génica, mantenimiento relativamente económico y sencillo para un vertebrado (ver apartado 2.1 en Introducción para más detalles). Todo ello convierte a este vertebrado en un modelo ideal para investigar la expresión y función de genes clave del desarrollo embrionario. En este trabajo, hemos utilizado Medaka para abordar el estudio de la regulación de la pluripotencialidad y diferenciación en distintos momentos del desarrollo.

En primer lugar, nos hemos centrado en el estudio de la expresión y función de los genes *Nanog* y *Oct4*, lo que nos ha permitido validar el pez Medaka como modelo para el estudio del proceso de pluripotencialidad *in vivo*, complementando al modelo murino. Así hemos aportado nuevos datos sobre la función de *Nanog* *in vivo*. En segundo lugar, hemos analizado los mecanismos de diferenciación de los PN, centrándonos en una de las primeras estructuras del SNC que se diferencia durante el desarrollo embrionario: el ojo. Concretamente, hemos investigado la función de la vía de Wnt sobre los PNR durante el desarrollo de la retina neural, estableciendo diferentes funciones temporales para Wnt.

2. Control de genes de proliferación y diferenciación durante el desarrollo embrionario temprano.

Anteriormente a este trabajo, el único modelo animal en el que se podía estudiar la pluripotencialidad *in vivo* era el ratón. La falta de otros modelos se debía principalmente a la inexistencia de homólogos del gen *Nanog* en otras especies y sugería que la pluripotencialidad regulada por *Nanog*, *Oct4* y *Sox2* era una característica adquirida durante la evolución

sólo por los mamíferos. En este trabajo hemos caracterizado funcionalmente el gen *Nanog* en el pez Medaka tras haber sido identificada su secuencia en nuestro laboratorio. En primer lugar, hemos analizado el patrón de expresión del mRNA y de la proteína. Tras ello, hemos demostrado que en embriones de peces el gen *Nanog* controla la proliferación de los blastómeros, pero no su diferenciación. Por último, hemos analizado la función más tardía de *Nanog* en la migración de las CPG, que son las únicas células que mantienen la pluripotencialidad de una generación a otra. De esta manera, hemos introducido el pez Medaka como un nuevo modelo animal en el que estudiar *in vivo* los mecanismos moleculares que controlan la pluripotencialidad.

2.1. Expresión de *Nanog* y *Oct4* durante el desarrollo embrionario temprano de Medaka.

En este trabajo hemos descrito el patrón de expresión génica y proteica de *Nanog* y *Oct4* en peces Medaka, dos genes claves en la regulación de la pluripotencialidad y la diferenciación de las ESC (Nichols y cols., 1998; Chambers y cols., 2003; Mitsui y cols., 2003; Torres y Watt, 2008).

En el pez Medaka, el mRNA de *OI-Nanog* y *OI-Oct4* se detecta a lo largo de todo el desarrollo embrionario aunque con distintos niveles. La detección de estos mRNAs en el embrión de una célula y posteriores estadios antes de la activación del genoma zigótico indica que estos mRNAs se heredan maternalmente. Esto explicaría la expresión de los mRNAs en los ovocitos en maduración para su almacenamiento y posterior uso tras la fecundación. Sin embargo, el mRNA y la proteína también se detectan en las espermatogonias, si bien el espermatozoide no aporta información proteica o de mRNA al embrión. Por tanto, la expresión de *OI-Oct4* y *OI-Nanog*, especialmente la expresión proteica, durante la gametogénesis masculina y femenina parece indicar una función específica

relacionada con las SC de las gónadas además de una función de depósito de mRNA en el ovocito. Este resultado coincide con la expresión de *Oct4* murino, que inicialmente se detecta en el ovocito sin fecundar y en el cigoto (Yeom y cols., 1996) y la expresión de *Spg/Pou2* en Zebrafish (Takeda y cols., 1994). Sin embargo, la expresión de *Mm-Nanog* en ratón no se hereda maternalmente, y el primer signo de mRNA se observa en el estadio de mórula (Chambers y cols. 2003). Tras la fertilización del huevo, ambos genes se expresan en todas las células del embrión durante la etapa de segmentación y en el estadio de mórula. Este patrón de expresión, en el caso de *OI-Oct4*, es similar al descrito para *Spg/Pou2* en Zebrafish (Takeda y cols., 1994) y *Mm-Oct4* (Yeom y cols., 1996).

Por otra parte, la expresión embrionaria temprana de las proteínas OI-Nanog y OI-Oct4 presenta un patrón nuclear en los blastómeros. Este patrón es similar al patrón nuclear de Nanog y Oct4 en los cultivos de ESC de ratón, mono y humano (Hatano et al., 2005). La distribución nuclear de OI-Nanog y OI-Oct4 también coincide con la descrita en embriones de ratón, donde la proteína Mm-Nanog se detecta a partir del estadio de mórula (Hatano et al., 2005) y Mm-Oct4 se expresa en embriones de todos los estadios de división (Palmieri y cols., 1994), posteriormente, ambas proteínas están restringidas a la ICM en el blastocisto de ratón. La localización nuclear de estas proteínas apoya su función como FT de unión al DNA a través de sus dominios POU (Oct4) y HD (Nanog). Además, OI-Oct4 presenta un patrón punteado en el citoplasma cuya función no ha sido descrita.

2.2. OI-Nanog regula la proliferación a través de la transición de la fase de síntesis durante el desarrollo embrionario temprano de Medaka.

El estudio de la función de OI-Nanog *in vivo* durante el desarrollo temprano de Medaka indica que Nanog juega un papel importante en la

regulación de la proliferación de las ESC, y que esta función está conservada en los vertebrados (Chambers et al, 2007; Camp y cols., 2009; Zhang y cols., 2009).

Mediante el análisis de la proliferación y el ciclo celular en los embriones de Medaka deficientes en la proteína OI-Nanog, hemos observado que estos embriones mostraban menor proliferación y una acumulación de células en la fase S del ciclo celular. Estos resultados sugieren que el control de la proliferación de OI-Nanog se realiza en la transición de las células en la fase S, posiblemente a través de *CcnA*.

En los cultivos de ESC, la mayoría de las células se encuentran en fase S, y solamente unas pocas en fase G1. La activación del gen *c-Myc* promueve la transición de la fase G1 a S y permite que los cultivos de mESC se autorrenueven independientemente de la señalización de LIF/Stat3 (Burdon y cols., 2002). Este efecto es similar al producido por la sobreexpresión de *Nanog* en los cultivos de mESC (Mitsui y cols., 2003). De hecho, *c-Myc* es uno de los factores necesarios, junto con *Oct4*, *Klf4* y *Sox2*, para la inducción de la pluripotencialidad en las células somáticas, remarcándose así la importancia de la regulación del ciclo celular en la troncalidad celular (Burdon y cols., 2002; Takahashi y cols., 2006 y 2007). El laboratorio de Zhang y colaboradores (2009) han mostrado recientemente que NANOG regula la transición entre la fase G1 a S en hESC mediante la regulación directa de la expresión de *CDC25A* y *CDK6*. Siguiendo esta línea de resultados, nuestros experimentos de citometría de flujo en embriones Medaka deficientes de OI-Nanog mostraron un aumento en el número de células en fase S y una disminución en el número de células en fase G1. Además, los resultados de qRT-PCR en estos embriones deficientes de OI-Nanog mostraron la disminución de *CcnA*, que es un gen implicado en la progresión del ciclo celular a través de la fase S. En conjunto, ambos resultados sugieren que en los embriones Medaka, OI-Nanog está regulando la transición de la fase S, o la salida de esta fase (Fig. 68). Por otra parte, los embriones inyectados con *MO-Nanog* mostraron una

disminución en la expresión de *Smp*, que regula el ciclo celular en el embrión temprano (Thermes y cols., 2006) aportando más evidencias del papel de *OI-Nanog* en el control del ciclo celular de los blastómeros tempranos. Parece ser que el papel de *OI-Nanog* en la regulación del ciclo celular puede ser complejo pues estarían implicadas varias proteínas mediadoras directa o indirectamente. No obstante, el hecho de que en humanos y *Medaka* la proteína *Nanog* esté implicada en la regulación del ciclo celular a nivel de la fase S (Camp y cols., 2009; Zhang y cols., 2009) sugiere que *Medaka* es un modelo válido para el estudio funcional de los genes de pluripotencialidad *in vivo*.

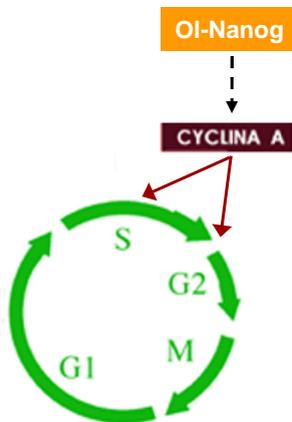


Fig. 68. Representación esquemática del ciclo celular mostrando la función de *OI-Nanog* en el embrión temprano de *Medaka*. *OI-Nanog* regula la expresión de *CcnA* que a su vez regula la transición de la fase S y la salida de la fase S hacia fase G2.

Como consecuencia de este defecto en la regulación del ciclo celular, los embriones de *Medaka* deficientes para *OI-Nanog* no completaban la epibolia. Su fenotipo corresponde a los defectos causados por la disminución de la proliferación, con la formación de una masa desorganizada de células de gran tamaño. De la misma manera, la eliminación de *Mm-Nanog* en ratón generaba embriones formados completamente de tejidos extraembrionarios desorganizados sin epiblasto o ectodermo extraembrionario (Mitsui y cols., 2003). Al igual que en *Medaka*, el fenotipo de los ratones deficientes en *Mm-Nanog* podría ser una

consecuencia de defectos en el proceso de proliferación, de hecho, los blastocistos provenientes de ratones nulos para *Mm-Nanog* no proliferan (Mitsui y cols., 2003).

Por otro lado, cuando la ICM de mutantes nulos para *Mm-Nanog* se cultivaba *in vitro*, se diferenciaba únicamente hacia células similares al endodermo parietal, por lo que presentaban un potencial limitado de diferenciación (Mitsui y cols., 2003). Esta observación difiere significativamente con nuestros resultados en Medaka donde, a pesar de la inhibición de la proliferación causada por la disminución de *OI-Nanog*, la diferenciación inicial hacia las tres capas germinales embrionarias se producía de manera normal en los embriones inyectados con *MO-Nanog*. Esta diferencia puede deberse a la falta de señales embrionarias en el medio de cultivo de los explantes de la ICM, que podría afectar al comportamiento de las células deficientes de *Nanog in vitro*.

En Medaka, *OI-Nanog* no regula la determinación temprana del linaje celular y por tanto, no parece estar implicado en la diferenciación celular. Sin embargo, tras la disminución de *OI-Nanog*, observamos una disminución en la expresión de varios marcadores de regionalización, como son *Pax6*, *Pax2* y *Shh*. Este resultado indicaría un efecto de *OI-Nanog* en la regionalización del ectodermo neural y por tanto sobre la diferenciación. Sin embargo, estos marcadores son inducidos durante la regionalización neural, que depende de la interacción entre el mesodermo subyacente y el ectodermo neural. En el caso de la falta de *Nanog* se producía un defecto en la proliferación que provocaba a su vez una deficiencia en el número de células necesarias para que se dé una correcta migración celular y morfogénesis. Estos defectos podrían alterar las interacciones entre mesodermo y ectodermo neural. Por ello, la inhibición de la regionalización neural podría ser debida indirectamente al defecto en la proliferación provocado por la falta de *Nanog* y no a un efecto directo sobre la diferenciación. Para conocer de manera exacta la función de *OI-Nanog*

sobre la regionalización del ectodermo neural serán necesarios posteriores estudios.

Muchas publicaciones sugieren un papel de Nanog en la diferenciación de las ESC de mamífero *in vitro*, particularmente las ESC de ratón (Chambers y cols., 2003; Mitsui y cols., 2003; Boyer y cols., 2005; Hyslop y cols., 2005; Ivanova y cols., 2006; Loh y cols., 2006; Wang y cols., 2006; Laval y cols., 2007; Torres y Watt, 2008). Sin embargo, en Medaka, la sobreexpresión de *OI-Nanog* o la inhibición de *OI-Nanog* endógeno no afectaban al proceso de diferenciación de manera directa. Esta diferencia entre los cultivos *in vitro* y nuestros resultados *in vivo* puede deberse a varios factores, entre ellos las distintas condiciones de cultivo de las ESC *in vitro*, ya que las consecuencias de manipular los niveles de expresión de *Nanog in vitro* en las ESC varían dependiendo de los niveles de *Nanog* y de las líneas de ESC utilizadas (Hatano y cols., 2005; Darr y cols., 2006; Chambers y cols., 2007; Laval y cols., 2007).

Por otra parte, los estudios *in vitro* también muestran que Nanog puede ser completamente eliminado de las mESC sin eliminar la capacidad de autorrenovación y el potencial de diferenciación de multilinaje. Además, las quimeras creadas fusionando embriones normales de ratón con células nulas de *Mm-Nanog* mostraban que las células deficientes para Nanog se diferenciaban normalmente a todos los tejidos excepto en las gónadas (Chambers y cols., 2007). Este último dato obtenido en embriones de ratón *in vivo* es fundamental, ya que demuestra que estas células mutantes para *Mm-Nanog* son viables, pluripotentes y se comportan de manera normal en un embrión salvaje. Por otra parte, estas células nulas para *Mm-Nanog* en cultivo se expandían más despacio que las células salvajes y mostraban una reducción en el número de las colonias de SC formadas (Chambers y cols., 2007). Estas observaciones apoyan nuestros resultados en Medaka, indicando que *Nanog* juega un papel importante en la regulación de la proliferación *in vivo* y no está implicado en el control de la diferenciación celular ni en ratón ni en Medaka, apoyando la hipótesis de que en el caso

de Nanog, los datos obtenidos *in vitro* no reflejan completamente su función *in vivo*. De hecho, en cultivos de ESC humanas se ha demostrado también que NANOG regula el ciclo celular (Zhang y cols., 2009). Será interesante comprobar la capacidad proliferativa de las células deficientes de *Mm-Nanog* en los embriones quiméricos puesto que nuestros resultados predicen que la capacidad proliferativa estará comprometida también *in vivo*.

Previamente se ha propuesto que el estado básico de pluripotencialidad puede ser logrado mediante la eliminación de todas las señales inductoras del medio de los cultivos de mESC, lo que sugiere que las mESC poseen un programa innato de autorrenovación (Ying y cols., 2008). En este contexto *in vitro*, Nanog podría regular sólo la característica proliferativa del estado básico de pluripotencialidad. *In vivo*, la función biológica que proponemos para Nanog durante el desarrollo embrionario temprano consiste en la regulación de la proliferación celular, de manera similar a lo que ocurre en las hESC en cultivo (Zhang y cols., 2009).

3. Regulación de la pluripotencialidad y la diferenciación durante el desarrollo embrionario tardío y adulto: Células del primordio germinal.

3.1. Expresión de Nanog y Oct4 durante el desarrollo embrionario tardío de Medaka.

OI-Nanog y *OI-Oct4* se expresan a lo largo de todo el desarrollo embrionario de Medaka, sin embargo, hemos detectado diferentes niveles de expresión del mRNA mediante el uso de RT-PCR semicuantitativa. La principal diferencia consiste en que mientras *OI-Oct4* mantiene un nivel de expresión muy similar en todos los estadios de desarrollo estudiados, la expresión de *OI-Nanog* decae a partir del st. 13 (estadio de gástrula temprana) y no se recupera hasta que el embrión ha eclosionado. Debido a

esta baja expresión de *OI-Nanog* a partir de st. 13, no pudimos estudiar la distribución de este gen mediante WMISH. Por otra parte, como los niveles de expresión de *OI-Oct4* se mantienen elevados durante todo el desarrollo embrionario, se pudo realizar el estudio de la distribución de mRNA mediante WMISH a partir de los estadios de gastrulación. De este modo, se detectaron dos dominios de expresión del gen *OI-Oct4* en distintos estadios de desarrollo, uno en la zona central del cuerpo embrionario y el otro en la punta posterior de embrión. Sin embargo, al contrario de lo que sucede con el ortólogo de Zebrafish *spg/pou2* y al igual que sucede en ratón, en Medaka no se detectó expresión de *OI-Oct4* en la región cerebral, lo que sugiere que la expresión de *spg/pou2* en el cerebro de Zebrafish no está conservada entre todos los peces teleósteos (Belting y cols., 2001) ni en mamíferos y que puede ser una adquisición evolutiva propia del linaje de Zebrafish. Esto indica que algunas de las funciones de *Oct4* pueden ser diferentes entre Medaka y Zebrafish, cuyos linajes se ramificaron hace 320 millones de años, muy tempranamente en la evolución de los teleósteos (Kasahara y cols., 2007).

Por otra parte, la expresión de las proteínas de *OI-Nanog* y *OI-Oct4* tras la neurulación está restringida a las CPG. Sin embargo, mientras que *OI-Nanog* se expresa en todas las CPG, *OI-Oct4* sólo se expresa en las CPG con morfología ameboidea que no se encuentran en la posición final de formación de las gónadas, sugiriendo que *OI-Oct4* se expresa en las CPG en migración. Por tanto, los genes *Nanog* y *Oct4* se expresan en las CPG de Medaka y otros vertebrados como el ratón y el pollo (Pesce y cols., 1998; Laval y cols., 2007; Cañón y cols., 2006; ^aSánchez-Sánchez y cols., 2010), esto sugiere que estos genes pueden ser importantes en el mantenimiento de la pluripotencialidad del linaje germinal, el cual puede ser considerado como el único tipo celular que mantiene las propiedades de pluripotencialidad de manera perpetua.

3.2. Función de Nanog en el desarrollo de las células del primordio germinal de Medaka.

La mayoría de genes implicados en el desarrollo embrionario suelen ser reutilizados en varios procesos. Sin embargo, la escasez de modelos animales en los que estudiar las funciones de Nanog *in vivo* ha provocado que la mayoría de estudios se centren en sus funciones *in vitro*. Tras la caracterización inicial de sus funciones tempranas en el embrión, decidimos abordar el papel que podría tener Nanog durante el desarrollo embrionario tardío.

Tras las etapas iniciales del desarrollo embrionario, se conocía muy poco sobre las funciones que Nanog puede tener en el desarrollo de las CPG y la biología de las gónadas. Tal y como hemos mencionado anteriormente, experimentos realizados en ratones mostraban que las quimeras formadas por la implantación de ESC nulas para *Nanog* en embriones de tipo salvaje se desarrollaban normalmente. En estos ratones quiméricos, las células *Nanog*^{-/-} se detectaban en todos los tejidos excepto en las células germinales de las gónadas, indicando que Nanog es necesario para el desarrollo del tejido gonadal en ratones (Chambers y cols., 2007).

Puesto que OI-Nanog se expresa en las CPG de Medaka, decidimos analizar la función que desempeña OI-Nanog en el desarrollo de las CPG *in vivo*. Para ello realizamos experimentos de GDF y PDF de OI-Nanog en embriones de Medaka. Para evitar los efectos tempranos sobre la proliferación y la letalidad asociada a este fenotipo temprano de falta de función de OI-Nanog, inyectamos el MO de *OI-Nanog* en una célula del embrión de 4-8 células. De esta forma, sólo una parte del embrión era deficiente para OI-Nanog (máximo un 25 %) y se generaba el equivalente a una quimera de ratón con un embrión formado por células normales y células deficientes para OI-Nanog. Los resultados mostraban que en estos embriones las CPG deficientes para OI-Nanog presentaban una migración

anormal. Estos embriones tenían inhibida la expresión del gen *Cxcr4b* en las CPG, que es el receptor de la quimioquina *Sdf1* y juega un papel importante en la migración de las CPG en Medaka (Fig. 69; Herpin y cols., 2008), Zebrafish y ratón (Doitsidou y cols., 2002; Ara y cols., 2003; Molyneaux y cols., 2003). Además, mediante el experimento de ChIP pudimos comprobar que *OI-Nanog* se unía a la región reguladora de *Cxcr4b*, lo que sugiere que *OI-Nanog* regula de manera directa la expresión de *Cxcr4b*. De hecho, el defecto de migración provocado por el MO de *OI-Nanog* se rescataba completamente por la coinyección del mRNA de *Cxcr4b*, indicando que este gen no sólo está regulado por *OI-Nanog*, sino que además es necesario para mediar la función de *OI-Nanog* en la regulación de la migración de las CPG. Sin embargo, la coinfección del

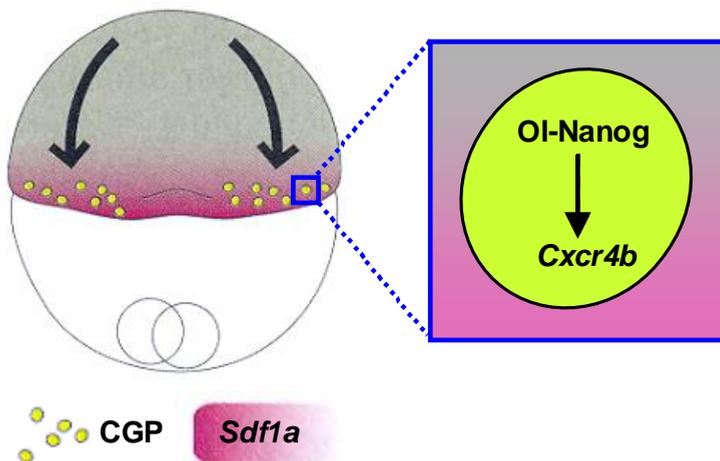


Fig. 69. *OI-Nanog* regula la expresión de *Cxcr4b* durante la migración de las CPG de Medaka. En la primera fase de migración las CPG, que expresan *Cxcr4b*, migran hacia la zona marginal del embrión en respuesta a la quimioquina *Sdf1a*. Nuestros resultados indican que *OI-Nanog* regula la expresión de *Cxcr4b* en las CPG, por lo que la inhibición de *OI-Nanog* produce un fenotipo anormal de migración de las CPG. En el dibujo, las flechas indican la dirección de migración de las CPG en un embrión de st. 15 (gástrula media), y la ampliación muestra la relación entre *OI-Nanog* y *Cxcr4b* en una CPG. Dibujo adaptado de Kinoshita y cols. (2009).

ligando *Sdf1a* con el MO de *OI-Nanog* no era suficiente para rescatar el fenotipo, destacando la especificidad de la relación *OI-Nanog/Cxcr4b*. Por tanto, utilizando el modelo de Medaka hemos descrito el papel de *Nanog* en la regulación de la migración de las CPG y hemos caracterizado parte de la cascada molecular por la que regula este proceso a través de la regulación del gen *Cxcr4b*.

El papel que hemos descrito para *OI-Nanog* en la migración de las CPG de Medaka podría aplicarse al modelo murino para explicar el fenotipo observado en las quimeras de ratón. Tal y como hemos introducido anteriormente, en quimeras murinas las ESC nulas para *Nanog* contribuían a todos los tejidos adultos, excepto a las gónadas. Según nuestro modelo, las ESC *Nanog*^{-/-} serían capaces de diferenciarse hacia CPG, sin embargo, estas CPG no podrían migrar a los sitios de diferenciación de las gónadas provocando el fenotipo ya descrito.

Además de *Nanog*, *Oct4* también se expresa en las CPG de Medaka y otros vertebrados (Pesce y cols., 1998; Laval y cols., 2007; Cañón y cols., 2006; Camp y cols., 2009; ^aSánchez-Sánchez y cols., 2010). En ratones, la eliminación de *Oct4* en las CPG deterioraba su mantenimiento y conducía a la esterilidad parcial o total de los adultos sin presentar ningún fenotipo evidente. En estos ratones, las hembras eran estériles, pero los machos presentaban variabilidad en su grado de esterilidad (Kehler y cols., 2004). Por tanto, los dos factores de transcripción *Oct4* y *Nanog*, necesarios para el mantenimiento de la pluripotencialidad, son necesarios también para el mantenimiento de las CPG y el desarrollo de las gónadas. Ya que las CPG son las células encargadas de mantener y transmitir a la descendencia las características de pluripotencialidad, es interesante comprobar que los mismos genes que regulan la pluripotencialidad están implicados también en la regulación de la biología de las CPG.

3.3. Expresión de *OI-Nanog* y *OI-Oct4* en las gónadas adultas.

Muchos genes de pluripotencialidad se expresan en las gónadas en desarrollo de los vertebrados, como es el caso de *Nanog* en ratón y pollo (Mitsui y cols., 2003; Chambers y cols., 2003; Cañón y cols., 2006; Laval y cols., 2007) y *Oct4* en humano y ratón (Pesce y cols., 1998; Anderson y cols., 2007).

En este estudio, hemos demostrado que en el pez *Medaka*, *OI-Nanog* y *OI-Oct4* se expresan en las gónadas de machos y hembras. Sin embargo, no está claro qué función realizan estas proteínas en las gónadas.

Como se ha indicado en el apartado anterior, en los embriones quiméricos de ratón, las células nulas para *Nanog* nunca contribuían a las gónadas adultas, lo que apoya la asignación de un papel de *Nanog* en el desarrollo de la línea germinal (Chambers y cols., 2007). Además, las CPG humanas mantienen la expresión de *NANOG* en un pequeño porcentaje de células en el testículo fetal (Kerr y cols., 2008) y *NANOG* también se expresa en los tumores de las células germinales humanas (Hart y cols., 2005). En los ovarios de *Medaka*, la expresión del gen y la proteína de *OI-Nanog* se localiza en los ovocitos previtelogénicos, pero cuando maduran la señal disminuye y es indetectable en los ovocitos vitelogénicos. Por otra parte, en los testículos de *Medaka*, la expresión del gen *OI-Nanog* se detecta en el núcleo de las células de la periferia, donde se localizan las espermatogonias. Esta expresión de *OI-Nanog* en las células germinales tempranas de las gónadas es similar a la expresión que presenta en las gónadas en desarrollo de ratón y pollo, aunque tampoco en estos modelos está descrita la función que tiene en las gónadas (Yamaguchi S. y cols., 2005; Laval y cols., 2007).

Es interesante indicar que la expresión de la proteína de *OI-Nanog* se detecta en el núcleo de las células periféricas donde se localizan las espermatogonias y en el citoplasma de células que se distribuyen en cistos,

donde sucede la espermatogénesis en Medaka. Esta distribución de la proteína podría indicar una función en el mantenimiento de las SC adultas de la gónada masculina y femenina, ya que la expresión se pierde según maduran los precursores gaméticos. Por otro lado, el patrón de expresión de *OI-Nanog* en las gónadas adultas de Medaka también es similar al observado para el gen *O/vas*, el homólogo de *Vasa*, que se expresa específicamente en las CPG y es necesario para el desarrollo de la gónada (Shinomiya y cols., 2000). Por lo tanto, el patrón de expresión del gen y de la proteína *OI-Nanog* en las gónadas masculinas y femeninas podría sugerir un papel específico para *OI-Nanog* en el mantenimiento de las SC adultas de las gónadas a partir de las que se diferencian los gametos.

La expresión de *OI-Oct4* en las gónadas de Medaka también se localiza mayoritariamente en las células germinales tempranas. En el ovario, *OI-Oct4* se detecta en los ovocitos previtelogénicos, al igual que *OI-Nanog*, pero también se expresa en las células periféricas y se detecta concentrado en el plasma germinal de los ovocitos. El plasma germinal es una aglomeración de orgánulos y estructuras subcelulares (aparato de Golgi, mitocondrias, citoesqueleto) que se detecta en los ovocitos. Una vez fecundado, las células que hereden el plasma germinal serán las que se diferencien en CPG. Por tanto, la expresión de *Oct4* en este orgánulo puede estar relacionada con la determinación posterior de las CPG.

Por otro lado, en el testículo, *OI-Oct4* se expresa en las células de la periferia donde se localizan las espermatogonias. Este patrón de expresión en Medaka (Sánchez-Sánchez y cols., 2010) es similar al patrón de expresión en los gametos en desarrollo de las gónadas masculinas y femeninas de ratón (Pesce y cols., 1998). En ratón, *Mm-Oct4* se expresa en las espermatogonias tipo A del testículo, que son las más indiferenciadas (Pesce y cols., 1998) y es necesario para la autorrenovación de las espermatogonias (Dann y cols., 2008). El patrón de expresión de la proteína en los testículos y los ovarios sugiere que *OI-Oct4* desempeña un papel durante la maduración de gametos más allá de la simple acumulación de

mRNA y proteína materna para su uso temprano por el embrión. De hecho, en ratones, la inactivación condicional de Mm-Oct4 en las CPG provoca un fenotipo de esterilidad en los ratones adultos, donde las hembras tienen pocos folículos primordiales y los machos presentan una desaparición total o parcial de las espermatogonias (Kehler, y cols., 2004). Además, Mm-Oct4 regula la competencia para el desarrollo de los ovocitos de ratón, lo que indica que Mm-Oct4 tiene un papel funcional en la maduración de gametos (Zuccotti y cols., 2008).

En resumen, en este trabajo de investigación, hemos caracterizado la expresión génica y de proteína de *Oi-Nanog* y *Oi-Oct4* en Medaka a lo largo del desarrollo embrionario y en las gónadas adultas, mostrando que son similares a los descritos en mamíferos (Fig. 70). Hemos analizado la función del gen *Oi-Nanog in vivo* durante el desarrollo embrionario de Medaka, tanto en estadios tempranos como tardíos durante el desarrollo de las CPG. Tempranamente en el embrión de Medaka, *Oi-Nanog* regula la proliferación a través de la regulación de la transición o salida de la fase S del ciclo celular, de manera similar al descrito en ESC humanas *in vitro* (Zhang y cols., 2009). En estos estadios tempranos, *Oi-Nanog* no regula la determinación del linaje celular de Medaka *in vivo*, lo que contrasta con los resultados descritos en cultivos de ESC *in vitro* (Chambers y cols., 2003; Mitsui y cols., 2003; Boyer y cols., 2005; Hyslop y cols., 2005; Ivanova y cols., 2006; Loh y cols., 2006; Wang y cols., 2006; Laval y cols., 2007), pero está en consonancia con los resultados obtenidos *in vivo* en ratón (Chambers y cols., 2007) y destaca la necesidad de realizar más estudios *in vivo* en distintos organismos para entender las funciones biológicas del gen. Finalmente, en estadios más tardíos, a partir de la gastrulación, *Oi-Nanog* regula de manera directa la migración de las CPG a través del gen *Cxcr4b*. Este resultado enlaza el mantenimiento de la pluripotencialidad durante el desarrollo temprano del embrión con el desarrollo de las CPG.

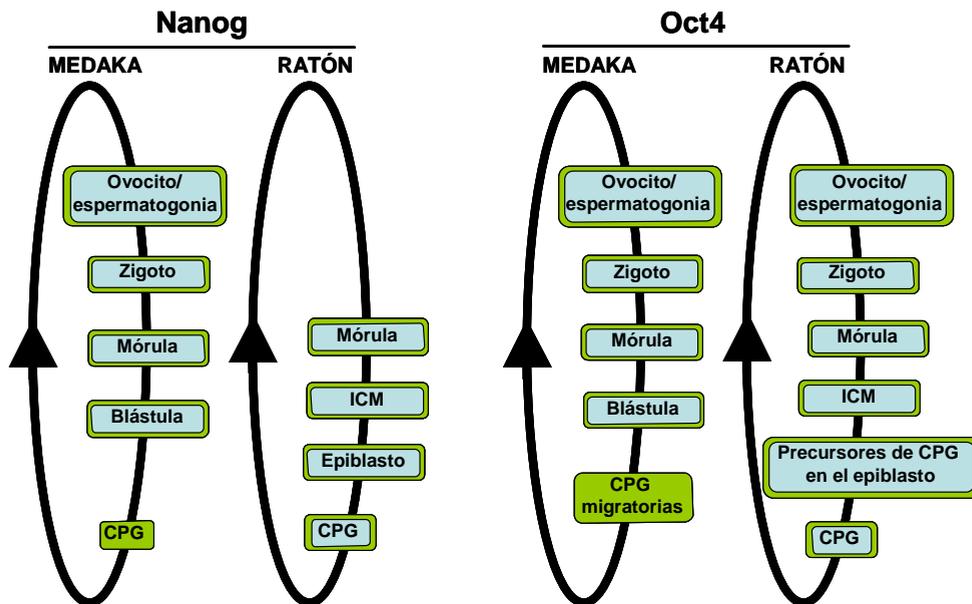


Fig. 70. Expresión de Nanog y Oct4 durante el desarrollo de Medaka y ratón. El ciclo totipotente está indicado con la flecha circular. Las células y tejidos que expresan Oct4 (Palmieri y cols., 1994; Yeom y cols., 1996; Pesce y cols., 1998; ^aSánchez-Sánchez y cols., 2010) o Nanog (Chambers y cols., 2003; Hatano y cols., 2005; Yamaguchi S. y cols., 2005; Camp y cols., 2009) están recuadradas, en color azul donde se ha detectado la expresión de mRNA y en color verde donde se ha detectado la expresión de la proteína. La expresión de los dos genes en ambos organismos es muy similar, aunque Nanog en ratón no se expresa hasta el estadio de mórula.

4. Diferenciación durante el desarrollo embrionario tardío: el sistema nervioso central.

Uno de los procesos más importantes en el desarrollo embrionario es la diferenciación celular. Los progenitores embrionarios sin diferenciar reciben las señales del entorno en el que se encuentran para dirigir su diferenciación. Uno de los primeros órganos en diferenciarse en el SNC es el ojo. La formación de la vesícula óptica es la primera estructura

claramente diferenciada del tubo neural, alrededor del cual se orquestará el posterior desarrollo del embrión. Este proceso es particularmente llamativo en los embriones de peces teleósteos que son transparentes y se puede seguir el proceso *in vivo* observando el embrión a través de una lupa. Además, por su interés biológico y terapéutico, el ojo es una estructura ampliamente estudiada y bien descrita. Por todo ello, decidimos centrarnos en esta estructura para estudiar algunos de los mecanismos de diferenciación de los progenitores embrionarios en su entorno natural: el embrión. Una de las posibles vías de señalización implicadas en el desarrollo de la retina neural es la vía de Wnt, por lo que en este trabajo nos hemos centrado en describir las funciones que desempeña esta vía en la retina de Medaka.

4.1. La vía de señalización de Wnt tiene diferentes funciones temporales durante el desarrollo de la retina.

Hemos realizado un análisis detallado de la vía de señalización de Wnt durante la diferenciación de la retina. Este análisis ha englobado dos puntos de manera simultánea:

1) Análisis funcional: hemos utilizado GDF y PDF de la vía utilizando embriones transgénicos combinado con la activación farmacológica de la vía para confirmar los fenotipos obtenidos.

2) Análisis temporal: la activación o la inhibición de la vía de Wnt ha sido condicional para poder analizar los efectos producidos en distintos estadios del desarrollo embrionario del ojo.

En este análisis hemos identificado dos funciones temporales distintas de la vía de Wnt en el desarrollo de la retina. Nuestros resultados muestran por primera vez que la señalización de Wnt tiene un papel en la regulación de la progresión del ciclo celular en las células PNR durante las primeras etapas de desarrollo del ojo (entre st. 17 y 26; Fig. 71A; ^bSánchez-

Sánchez y cols., 2010). Esta regulación sobre el ciclo celular está mediada por el gen *CcnD1*. En trabajos previos, Cayouette y colaboradores (2006) propusieron que la salida del ciclo celular podría regular la diferenciación de la retina al menos en estadios tempranos. Basándonos en esta hipótesis, la regulación del ciclo celular por la vía de Wnt provocaría los cambios observados tras la modificación de la vía en los procesos de proliferación, apoptosis y la expresión de *Ath5* y *Prox1*. Es decir, la activación de Wnt provocaría un ciclo celular más rápido por lo que los procesos programados de diferenciación, proliferación y apoptosis se producirían antes que en el control. Complementariamente, una inhibición de la vía de Wnt provocaría un ciclo celular más lento y que los procesos programados se produjesen de manera más lenta que en el control, tal y como hemos observado. De esta forma, se explicaría también la aparente contradicción según la cual, Wnt activa al mismo tiempo la proliferación y la apoptosis, dos procesos con efectos contrarios sobre los progenitores. Nuestros resultados apoyan por tanto el modelo que propone que la diferenciación temprana de la retina está estrechamente vinculada a la progresión del ciclo celular.

Tras esta primera fase del desarrollo de la retina (después del st. 26), la vía de señalización de Wnt adquiere una función distinta que consiste en la regulación de la expresión de *Vsx1* (Fig. 71B; ^bSánchez-Sánchez y cols., 2010). Durante esta etapa más tardía, la vía de señalización de Wnt no afectaba a la expresión de genes que regulan la progresión del ciclo celular y tampoco afectaba a la proliferación, la apoptosis o la expresión de *Ath5*, *Prox1* y *Rhod*. Por tanto, Wnt adquiere una función tardía específica en la regulación de *Vsx1* durante la diferenciación de los PNR (Fig. 71B). En este modelo, la vía de señalización de Wnt participa en el desarrollo de la retina con dos funciones distintas, en una fase inicial regula la diferenciación celular dependiente del ciclo celular y en una fase posterior regula la diferenciación celular.

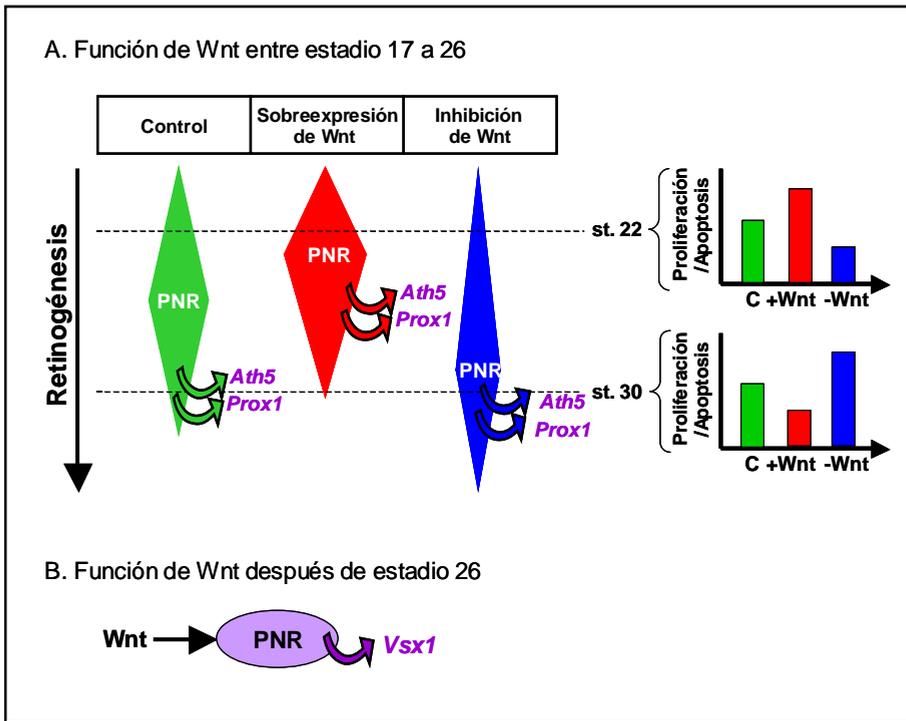


Fig. 71. Esquemas que representan las dos funciones de la vía de Wnt a lo largo de los distintos estadios de desarrollo. (A) Efecto temprano de la vía de Wnt sobre los PNR. En la situación control, el grupo de células proliferativas, representadas por un rombo, incrementan inicialmente y luego decrece debido a la salida del ciclo celular (flechas). La sobreexpresión de Wnt lleva a una aceleración del ciclo celular seguido de una salida prematura del ciclo celular. Comparado con el control, hay un aumento en la población de células en proliferación en los estadios tempranos. La inhibición de Wnt provoca el fenotipo contrario por lo que tempranamente la población de células en proliferación es menor debido al ciclo de división más lento. (B) Efecto tardío de la vía de señalización de Wnt que regula la diferenciación de los PNR hacia células *Vsx1* positivas.

En cuanto al mecanismo molecular que media esta acción de Wnt, podemos decir que para obtener los animales transgénicos de expresión condicional, hemos usado un miembro de la vía canónica de Wnt, el gen *Wnt8*, y un inhibidor específico de la vía canónica de Wnt, *DNWnt8* (Hoppler y cols., 1996; Itoh y Sokol, 1999; Tada y Smith, 2000). Además, tanto el LiCl

como la indirubina actúan inhibiendo a la enzima GSK3 β , una quinasa crucial en la transducción de la cascada de señalización de la vía canónica de Wnt (Osakada y cols., 2007) y apoyan los resultados obtenidos con los transgenes. La activación de *Wnt8* o de *DNWnt8* activaba o inhibía respectivamente la expresión de *Lef1*, un coactivador de β Cat, y la expresión de *Axin2*, ambos genes son diana de la señalización canónica de Wnt. Por otra parte, los fenotipos observados en el eje A-P inducidos por los transgenes eran similares a los obtenidos tras la manipulación de la vía canónica de Wnt (Erter y cols., 2001; Lekven y cols., 2001; Houart y cols., 2002; Kudoh y cols. 2002). Estos datos apoyarían que las diferentes funciones temporales de Wnt durante el desarrollo de la retina están mediadas por la vía canónica.

Por otra parte, hay datos que sugerían que la vía de Wnt podría no ser funcional en la retina. La falta de actividad TOP-GFP (construcción formada por 4 sitios de unión de Tcf regulando la expresión del gen *GFP*) en las primeras etapas de desarrollo de la retina del pez Zebrafish sugería que la señalización canónica de Wnt no está activa en la retina (Dorsky y cols., 2002; Veien y cols., 2008). Sin embargo, al menos un miembro de la familia Tcf, Tcf7, que juega un papel clave en la mediación de la señalización canónica de Wnt, se expresa en la retina de Zebrafish (Veien y cols., 2005) y la señalización canónica de Wnt en el RPE es necesaria para que se forme el patrón de la retina de manera correcta (Veien y cols., 2008). Es más, la activación de Tcf en la retina del ratón no se correlaciona con la activación de la construcción TOP-gal (que utiliza el mismo promotor sintético que TOP-GFP), lo que indicaría que este promotor sintético (TOP) podría no reflejar toda la señalización canónica de Wnt, especialmente una posible señalización transitoria o dinámica como puede estar ocurriendo en la retina (Fuhrmann y cols., 2009). A esto habría que añadir que la proteína GFP utilizada en la construcción TOP-GFP es una proteína desestabilizada que necesita de una expresión alta para ser detectada (Dorsky y cols., 2002).

Tal y como hemos mencionado anteriormente, el hecho de que la vía de Wnt regulase de la misma forma procesos a priori con efectos opuestos, como son la proliferación y la apoptosis, puede parecer contradictorio. Sin embargo, en *X. laevis* se ha demostrado que, durante el desarrollo de la retina, Shh también regula múltiples procesos de desarrollo a través de una regulación directa de la cinética del ciclo celular, donde actúa acelerando el ciclo celular y aumentando la diferenciación de las células PNR (Locker y cols., 2006). De manera similar, la acción simultánea de Wnt puede explicarse por la participación de la señalización de Wnt en la regulación de la cinética del ciclo celular. Nuestros resultados sugieren que entre el st. 17 y 26 del desarrollo embrionario de Medaka, la señalización de Wnt regula la transición del ciclo celular a través de la fase G1, mediante la regulación de la expresión del gen *CcnD1* (Fig. 72). Esta hipótesis está en concordancia con los datos descritos previamente en otros laboratorios que muestran como la señalización de Wnt regula *CcnD1* en células de carcinoma de colon para controlar la proliferación (Shtutman y cols., 1999; Tetsu y McCormick, 1999).

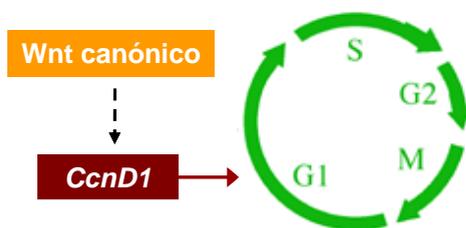


Fig. 72. Representación esquemática del ciclo celular mostrando la función de la vía canónica de Wnt en el desarrollo inicial de la retina de Medaka. La vía de Wnt regula la expresión de *CcnD1* que a su vez regula la transición de la fase G1.

Otra posible explicación a la regulación simultánea de la proliferación y apoptosis por Wnt podría basarse en un mecanismo de compensación mutuo. Es decir, un aumento de la proliferación provocaría un aumento de la apoptosis y viceversa con la finalidad de mantener el número de células de la retina. Sin embargo, hemos observado que ambos

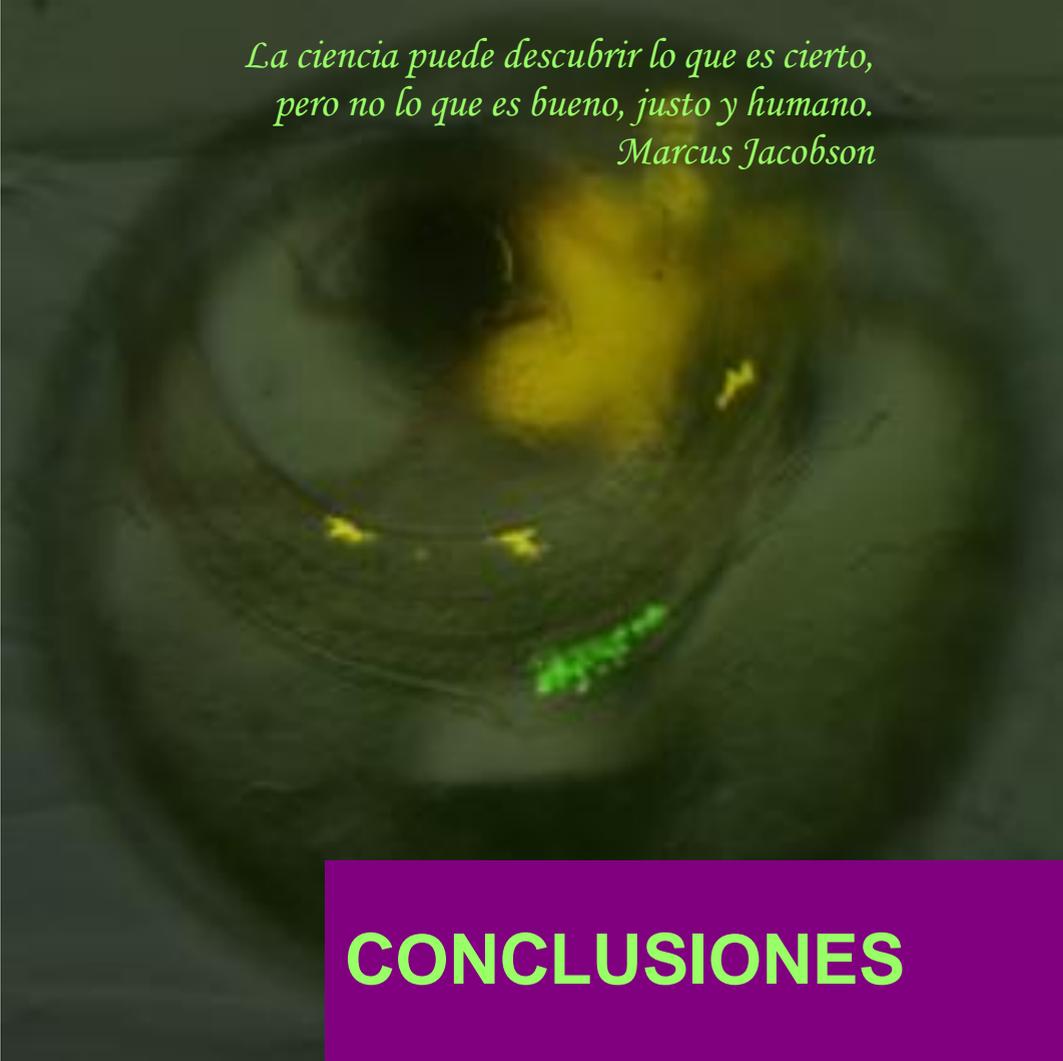
procesos responden a la señalización de Wnt simultáneamente. Por otro lado, cualquier cambio introducido por Wnt es posteriormente compensado para que la retina mantenga su proporcionalidad y tamaño. Este mecanismo de compensación puede estar asociado a la unión entre ciclo celular y diferenciación. De esta manera, al aumentar la velocidad del ciclo aumentaría el número de células diferenciadas, pero hasta el límite impuesto por la programación interna. Es decir, una vez diferenciadas un número determinado de células, no se diferenciarían más hasta la siguiente fase de diferenciación.

El papel que describimos sobre la vía de señalización de Wnt en la proliferación y la diferenciación en Medaka parece discrepar con las publicaciones previas sobre la manipulación de la expresión de β Cat en el modelo de ratón. En ratones, la β Cat se ha vinculado a la laminación de la retina, pero no a la neurogénesis o la proliferación (Fu y cols., 2006). La eliminación de la β Cat en las células donde se expresa *Six3* causa una desorganización grave de la retina central. Sin embargo, experimentos en ratón han demostrado que la actividad TOP-gal se mantiene incluso en ausencia de β Cat (Fuhrmann y cols., 2009), sugiriendo que β Cat puede no ser necesaria para la activación de algunos componentes de la vía Wnt. Además, los defectos inducidos por la manipulación de β Cat, que es un componente tardío de la cascada de transducción de la señalización de Wnt, pueden ser distintos a los inducidos por la manipulación de la expresión de los genes Wnt, que están sujetos a la modulación postranscripcional de su concentración y efectos. Además, este fenotipo murino de defectos en la laminación de la retina puede estar provocado por la falta de β Cat como elemento estructural más que por su función como transductor de la señal Wnt.

Los resultados que hemos obtenido en relación a la regulación del ciclo celular por la vía de Wnt son consistentes con estudios anteriores *in vitro* donde se describe que, en cultivos de retinas, Wnt3a promueve la proliferación de los PNR (Das y cols., 2006; Inoue y cols., 2006; Osakada y

cols., 2007). Además, la microinyección de β Cat en embriones de *Xenopus* y de Zebrafish promueve la proliferación en la retina (Van Raay y cols., 2005; Yamaguchi M. y cols., 2005). En explantes de retina de pollo, inicialmente las publicaciones sugirieron que Wnt2b sólo controla la proliferación (Kubo y cols., 2003, 2005). Sin embargo, estas publicaciones han sido rebatidas por otro estudio *in vivo* más reciente que demuestra que Wnt2b sólo está implicado en la determinación del destino de las células de la retina periférica (Cho y Cepko, 2006). Los resultados que presentamos sugieren que el principal motivo de las discrepancias entre estas publicaciones puede ser las etapas en que se modificó la señalización de Wnt, lo cual puede alterar significativamente la respuesta de las células PNR debido a las distintas funciones temporales que presenta la vía de Wnt en la retina. Además, la hipótesis de que la señalización de Wnt controla la cinética del ciclo celular podría explicar los resultados observados en la proliferación de explantes de retina (Kubo y cols., 2003, 2005), puesto que la señalización de Wnt reduciría la duración del ciclo celular en las retinas explantadas, aumentando así la proliferación.

Finalmente, es interesante indicar que la señalización de Wnt también juega un papel en la proliferación en la retina postnatal. En los renacuajos de *Xenopus*, la señalización de Wnt está activa en la ZMC y controla la proliferación de las RSC (Denayer y cols., 2008). El papel que juega la vía de señalización de Wnt regulando la proliferación de las RSC postnatal es similar a la función inicial que hemos descrito durante el desarrollo embrionario de la retina de Medaka. Sin embargo, como las SC tienen una capacidad de proliferación indefinida, la aceleración de la cinética del ciclo celular debida a la señalización de Wnt no encuentra ningún programa de desarrollo adicional que detenga la proliferación, por lo que ésta se mantiene. Sería interesante analizar la presencia de posibles efectos sobre las RSC causado por la señalización de Wnt en este contexto postembrionario.



*La ciencia puede descubrir lo que es cierto,
pero no lo que es bueno, justo y humano.
Marcus Jacobson*

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo se enumeran a continuación:

1. En este trabajo hemos descrito por primera vez el **patrón de expresión génica y proteica de *Nanog* y *Oct4*** en peces Medaka. El mRNA de ambos genes se expresa a lo largo de todo el desarrollo embrionario, incluyendo las primeras etapas de desarrollo, por lo que se heredan maternalmente. Por otra parte, la expresión embrionaria temprana de las proteínas OI-Nanog y OI-Oct4 en los blastómeros presenta un patrón nuclear, acorde con la función que desempeñan como FT. Estos patrones de expresión son similares al ratón en el caso de OI-Oct4, sin embargo, la expresión de Nanog en ratón se detecta a partir del estadio de mórula, mientras que OI-Nanog se detecta a lo largo de todo el desarrollo embrionario.

2. La función de **OI-Nanog** durante el desarrollo embrionario temprano de Medaka consiste en **regular la proliferación celular**. Para ello, OI-Nanog controla la transición de la fase de síntesis en el ciclo celular a través de la regulación de la expresión de la ***CcnA***. Además, OI-Nanog no es necesario para la diferenciación temprana de las hojas embrionarias.

3. En conjunto, la descripción del patrón de expresión de OI-Nanog y OI-Oct4, así como la función de OI-Nanog en el desarrollo embrionario temprano de **Medaka** ha permitido validar este animal como **modelo** para el estudio del **proceso de pluripotencialidad**.

4. El uso de Medaka como animal modelo nos ha permitido estudiar la función que desempeña Nanog *in vivo* en etapas más tardías del desarrollo embrionario, concretamente en la biología de las CPG. **OI-Nanog se expresa en las CPG de Medaka para regular su migración**. Para ello, OI-Nanog **regula de manera directa la expresión del gen *Cxcr4b***, que es el receptor en las CPG de la quimioquina Sdf1a. Además, el fenotipo de

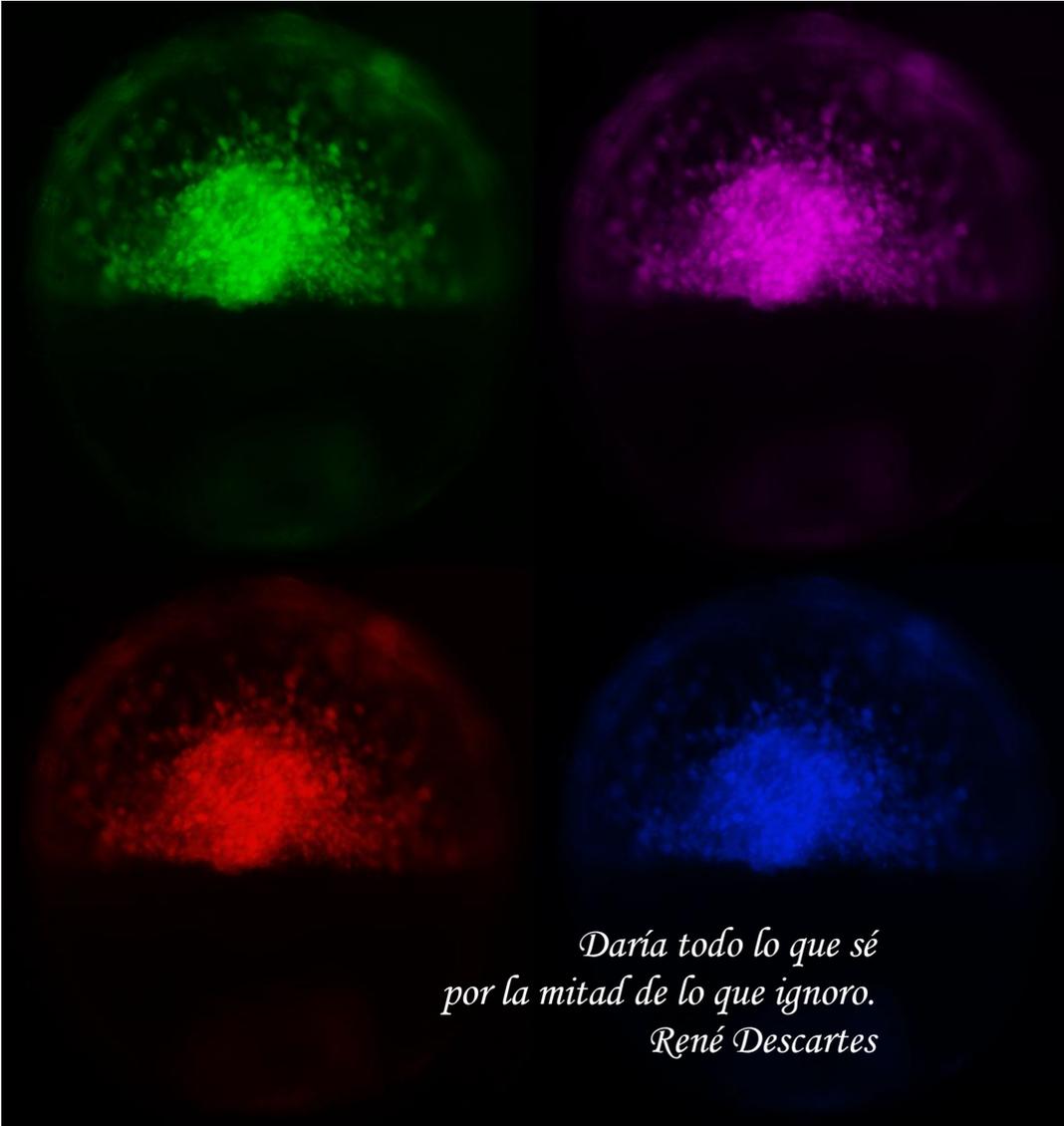
migración anormal de las CPG en los embriones deficientes en OI-Nanog es rescatada por la expresión exógena en las CPG de *Cxcr4b*, lo que indica que el efecto de Nanog sobre la migración de las CPG está mediado por *Cxcr4b*.

5. En **Medaka adulto**, la expresión de **OI-Nanog y OI-Oct4** se detecta en las **gónadas** de machos y hembras. Tanto sus mRNA como sus proteínas se localizan mayoritariamente en las **células germinales tempranas** de las gónadas, que son los ovocitos previtelogénicos y las espermatogonias. Además, la proteína de OI-Oct4 se detecta en el plasma germinal de los ovocitos.

6. El estudio tardío de la función de la vía de **Wnt sobre los PNR** durante el desarrollo de la retina neural ha revelado **dos funciones temporales** distintas para esta vía:

- En los **estadios tempranos** de formación del ojo (entre st. 17 y 26), **Wnt regula la progresión del ciclo celular** mediante la regulación del gen ***CcnD1***. Por tanto, la desregulación de la vía de Wnt altera la cinética del ciclo celular, lo que modifica los procesos de proliferación, apoptosis y diferenciación de los tipos neuronales tempranos.

- En los **estadios tardíos** del desarrollo de la retina (después del st. 26), la vía de señalización de **Wnt regula** de manera específica la expresión del gen ***Vsx1***, que es un marcador de las neuronas bipolares de la retina, sin regular el ciclo celular.



*Darí­a todo lo que sé
por la mitad de lo que ignoro.
René Descartes*

BIBLIOGRAFÍA

- Amati B, Alevizopoulos K, Vlach J. 1998. Myc and the cell cycle. *Front Biosci.* 3:250-268.
- Anderson RA, Fulton N, Cowan G, Coutts S, Saunders PT. 2007. Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *BMC Dev. Biol.* 7:136.
- Ara T, Nakamura Y, Egawa T, Sugiyama T, Abe K, Kishimoto T, Matsui Y, Nagasawa T. 2003. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:5319-5323.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17:126-140.
- Backman M, Machon O, Mygland L, van den Bout CJ, Zhong W, Taketo MM, Krauss S. 2005. Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon. *Dev. Biol.* 279:155-168.
- Barboux S, Niaudet P, Gubler MC, Grünfeld JP, Jaubert F, Kuttann F, Fékété CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K. 1997. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat. Genet.* 17:467-470.
- Belting HG, Hauptmann G, Meyer D, Abdelilah-Seyfried S, Chitnis A, Eschbach C, Söll I, Thisse C, Thisse B, Artinger KB, Lunde K, Driever W. 2001. *spiel ohne grenzen/pou2* is required during establishment of the Zebrafish midbrain-hindbrain boundary organizer. *Development* 128:4165-4176.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122:947-956.
- Brown NL, Kanekar S, Vetter ML, Tucker PK, Gemza DL, Glaser T. 1998. *Math5* encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis. *Development* 125:4821-4833.
- Burdon T, Smith A, Savatier P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 12:432-438.
- Burgess S, Reim G, Chen W, Hopkins N, Brand M. 2002. The Zebrafish *spielohne-grenzen (spg)* gene encodes the POU domain protein *Pou2* related to mammalian *Oct4* and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. *Development* 129:905-916.
- Cadigan KM, Nusse R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 11:3286-3305.

- Camp E, Sánchez-Sánchez AV, García-España A, Desalle R, Odqvist L, O'Connor JE, Mullor JL. 2009. Nanog regulates proliferation during early fish development. *Stem Cells* 27:2081-2091.
- Cañón S, Herranz C, Manzanares M. 2006. Germ cell restricted expression of chick Nanog. *Dev. Dyn.* 235:2889-2894.
- Carl M, Loosli F, Wittbrodt J. 2002. Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye. *Development* 129:4057-4063.
- Castelo-Branco G, Ramal N, Arenas E. 2004. GSK-3 β inhibition/ β catenin stabilization in ventral midbrain precursors increases differentiation into dopamine neurons. *J. Cell Sci.* 117:5731-5737.
- Cavodeassi F, Carreira-Barbosa F, Young RM, Concha ML, Allende ML, Houart C, Tada M, Wilson SW. 2005. Early stages of Zebrafish eye formation require the coordinated activity of Wnt11, Fz5, and the Wnt/ β -catenin pathway. *Neuron* 47:43-56.
- Cayouette M, Poggi L, Harris WA. 2006. Lineage in the vertebrate retina. *Trends Neurosci.* 29:563-570.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113:643-655.
- Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, Vrana J, Jones K, Grotewold L, Smith A. 2007. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450:1230-1234.
- Chizhikov VV, Millen KJ. 2005. Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Dev. Biol.* 277:287-295.
- Cho SH, Cepko CL. 2006. Wnt2b/ β -catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye. *Development* 133:3167-3177.
- Chou CY, Horng LS, Tsai HJ. 2001. Uniform GFP-expression in transgenic Medaka (*Oryzias latipes*) at the F0 generation. *Transgenic Res.* 10:303-315.
- Ciani L, Salinas PC. 2005. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci.* 6:351-362.
- ^aDahl JA, Collas P. 2007. A quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay for small cell samples. *Front Biosci.* 12:4925-4931.
- ^bDahl JA, Collas P. 2007. Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells. *Stem Cells* 25:1037-1046.

- Dann CT, Alvarado AL, Molyneux LA, Denard BS, Garbers DL, Porteus MH. 2008. Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor downregulated during retinoic acid-induced differentiation. *Stem Cells* 26:2928-2937.
- Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. 2006. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 133:1193-1201.
- Das AV, Zhao X, James J, Kim M, Cowan KH, Ahmad I. 2006. Neural stem cells in the adult ciliary epithelium express GFAP and are regulated by Wnt signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339:708-716.
- Del Bene F, Ettwiller L, Skowronska-Krawczyk D, Baier H, Matter JM, Birney E, Wittbrodt J. 2007. In vivo validation of a computationally predicted conserved *Ath5* target gene set. *PLoS Genet.* 3:1661-1671.
- Denayer T, Locker M, Borday C, Deroo T, Janssens S, Hecht A, van Roy F, Perron M, Vleminckx K. 2008. Canonical Wnt Signaling Controls Proliferation of Retinal Stem/progenitor Cells in Post-embryonic *Xenopus* Eyes. *Stem Cells* 26:2063-2074.
- Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler J, Köprunner M, Dörries J, Meyer D, Esguerra CV, Leung T, Raz E. 2002. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111, 647-659.
- Dorsky RI, Sheldahl LC, Moon RT. 2002. A transgenic *Lef1*/beta-catenin-dependent reporter is expressed in spatially restricted domains throughout Zebrafish development. *Dev. Biol.* 241:229-237.
- Dyer MA, Livesey FJ, Cepko CL, Oliver G. 2003. *Prox1* function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat. Genet.* 34:53-58.
- Erter CE, Wilm TP, Basler N, Wright CV, Solnica-Krezel L. 2001. *Wnt8* is required in lateral mesendodermal precursors for neural posteriorization in vivo. *Development* 128:3571-3583.
- Esteve P, Morcillo J, Bovolenta P. 2000. Early and dynamic expression of *cSfrp1* during chick embryo development. *Mech. Dev.* 97:217-221.
- Fan MJ, Grüning W, Walz G, Sokol SY. 1998. Wnt signaling and transcriptional control of *Siamois* in *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5626-5631.
- Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V, Engelhardt JF. 2002. *Wnt-3A*/beta-catenin signaling induces transcription from the *LEF-1* promoter. *J Biol Chem.* 277:33398-33410.
- Fu X, Sun H, Klein WH, Mu X. 2006. Beta-catenin is essential for lamination but not neurogenesis in mouse retinal development. *Dev. Biol.* 299:424-437.

- Fuhrmann S, Stark MR, Heller S. 2003. Expression of Frizzled genes in the developing chick eye. *Gene Expr. Patterns* 3:659–662.
- Fuhrmann S, Riesenberg AN, Mathiesen AM, Brown EC, Vetter ML, Brown NL. 2009. Characterization of a transient TCF/LEF-responsive progenitor population in the embryonic mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50:432-440.
- Galceran J, Miyashita-Lin EM, Devaney E, Rubenstein JL, Grosschedl R. 2000. Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* 127:469-482.
- Garrido JL, Godoy JA, Alvarez A, Bronfman M, Inestrosa NC. 2002. Protein kinase C inhibits amyloid beta peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway. *FASEB J.* 16:1982-1984.
- Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. 1990. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343:774-778.
- Gilbert SF. *Developmental Biology*. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc. 8th Ed. 2006.
- Gordon MD, Nusse R. 2006. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* 281:22429-22433.
- Grabher C, Wittbrodt J. 2004. Efficient activation of gene expression using a heat-shock inducible Gal4/Vp16-UAS system in Medaka. *BMC Biotechnol.* 4:26.
- Grabher C, Wittbrodt J. 2007. Meganuclease and transposon mediated transgenesis in Medaka. *Genome Biol.* 8 Suppl 1:S10.
- Hanna LA, Foreman RK, Tarasenko IA, Kessler DS, Labosky PA. 2002. Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. *Genes Dev.* 16:2650-2661.
- Hart AH, Hartley L, Parker K, Ibrahim M, Looijenga LH, Pauchnik M, Chow CW, Robb L. 2005. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer* 15:2092-2098.
- Hasegawa S, Maruyama K, Takenaka H, Furukawa T, Saga T. 2009. A Medaka model of cancer allowing direct observation of transplanted tumor cells in vivo at a cellular-level resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:13832-13837.
- Hatano SY, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T. 2005. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech Dev.* 122:67-79.

- Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang HC, Lee VM, Klein PS. 1997. Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev. Biol.* 185:82-91.
- Herpin A, Rohr S, Riedel D, Kluever N, Raz E, Schartl M. 2007. Specification of primordial germ cells in Medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev. Biol.* 7:3-13.
- Herpin A, Fischer P, Liedtke D, Kluever N, Neuner C, Raz E, Schartl M. 2008. Sequential SDF1a and b-induced mobility guides Medaka PGC migration. *Dev. Biol.* 320:319-327.
- Hobmayer B, Rentzsch F, Kuhn K, Happel CM, von Laue CC, Snyder P, Rothbacher U, Holstein TW. 2000. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* 407:186-189.
- Hong Y, Winkler C, Schartl M. 1996. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the Medakafish (*Oryzias latipes*). *Mech. Dev.* 60:33-44.
- Hong Y, Winkler C, Liu T, Chai G, Schartl M. 2004. Activation of the mouse Oct4 promoter in Medaka embryonic stem cells and its use for ablation of spontaneous differentiation. *Mech. Dev.* 121:933-943.
- Hoppler S, Brown JD, Moon RT. 1996. Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in *Xenopus* embryos. *Genes Dev.* 10:2805-2817.
- Houart C, Caneparo L, Heisenberg C, Barth K, Take-Uchi M, Wilson S. 2002. Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* 35:255-265.
- Huelsken J, Behrens J. 2002. The Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* 115:3977-3978.
- Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, Herbert M, Murdoch A, Strachan T, Lako M. 2005. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 23:1035-1043.
- Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. 1998. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J.* 17:1371-1384.
- Ikeya M, Lee SM, Johnson JE, McMahon AP, Takada S. 1997. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* 389:966-970.
- Inoue T, Kagawa T, Fukushima M, Shimizu T, Yoshinaga Y, Takada S, Tanihara H, Taga T. 2006. Activation of canonical Wnt pathway

- promotes proliferation of retinal stem cells derived from adult mouse ciliary margin. *Stem Cells* 24:95-104.
- Ishikawa Y. 1997. Embryonic development of the Medaka brain. *Fish Biol. J. MEDAKA* 9:17-31.
- Ishikawa Y. 2000. Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics. *Bioessays* 22:487-495.
- Ishikawa Y, Yasuda T, Maeda K, Matsumoto A, Maruyama K. 2007. Apoptosis in neural tube during normal development of Medaka. *Fish Biol. J. MEDAKA* 11:23-30.
- Ishibashi H, Matsumura N, Hanafusa H, Matsumoto K, De Robertis EM, Kuroda H. 2008. Expression of Siamois and Twin in the blastula Chordin/Noggin signaling center is required for brain formation in *Xenopus laevis* embryos. *Mech. Dev.* 125:58-66.
- Itoh K, Sokol SY. 1999. Axis determination by inhibition of Wnt signaling in *Xenopus*. *Genes Dev.* 13:2328-2336.
- Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR. 2006. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442:533-538.
- Iwamatsu T. 1988. Oogenesis in the Medaka *Oryzias latipes*-stages of the oocyte development. *Zool. Sci.* 5:353-373.
- Iwamatsu T. 2004. Stages of normal development in the Medaka *Oryzias latipes*. *Mech. Development* 121:605-618.
- Janssens N, Janicot M, Perera T. 2006. The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery. *Invest. New Drugs* 24:263-280.
- Jasoni C, Hendrickson A, Roelink H. 1999. Analysis of chicken Wnt-13 expression demonstrates coincidence with cell division in the developing eye and is consistent with a role in induction. *Dev. Dyn.* 215:215-224.
- Jauch R, Ng CK, Saikatendu KS, Stevens RC, Kolatkar PR. 2008. Crystal structure and DNA binding of the homeodomain of the stem cell transcription factor Nanog. *J Mol Biol.* 376:758-770.
- Jin EJ, Burrus LW, Erickson CA. 2002. The expression patterns of Wnts and their antagonists during avian eye development. *Mech. Dev.* 116:173-176.
- Jones SE, Jomary C, Grist J, Stewart HJ, Neal MJ. 2000. Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration. *Neuroreport* 11:3963-3967.

- Johnson BV, Shindo N, Rathjen PD, Rathjen J, Keough RA. 2008. Understanding pluripotency--how embryonic stem cells keep their options open. *Mol Hum Reprod.* 14:513-520.
- Kage T, Takeda H, Yasuda T, Maruyama K, Yamamoto N, Yoshimoto M, Araki K, Inohaya K, Okamoto H, Yasumasu S, Watanabe K, Ito H, Ishikawa Y. 2004. Morphogenesis and regionalization of the Medaka embryonic brain. *J. Comp. Neurol.* 476:219-239.
- Kanekar S, Perron M, Dorsky R, Harris WA, Jan LY, Jan YN, Vetter ML. 1998. Xath5 participates in a network of bHLH genes in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* 19:981-994.
- Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, Ahsan B, Yamada T, Nagayasu Y, Doi K, Kasai Y, Jindo T, Kobayashi D, Shimada A, Toyoda A, Kuroki Y, Fujiyama A, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Shimizu N, Hashimoto S, Yang J, Lee Y, Matsushima K, Sugano S, Sakaizumi M, Narita T, Ohishi K, Haga S, Ohta F, Nomoto H, Nogata K, Morishita T, Endo T, Shin-I T, Takeda H, Morishita S, Kohara Y. 2007. The Medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447:714-719.
- Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, Lomelí H, Nagy A, McLaughlin KJ, Schöler HR, Tomilin A. 2004. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep.* 5:1078-1083.
- Kerr CL, Hill CM, Blumenthal PD, Gearhart JD. 2008. Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal testis. *Stem Cells* 26:412-421.
- Kiecker C, Niehrs C. 2001. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* 128:4189-4201.
- Kinoshita M, Murata K, Naruse K, Tanaka M. Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols. Wiley-Blackwell ed. 2009.
- Kitambi SS, Malicki JJ. 2008. Spatiotemporal features of neurogenesis in the retina of Medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.* 237:3870-3881.
- Klamt B, Koziell A, Poulat F, Wieacker P, Scambler P, Berta P, Gessler M. 1998. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum. Mol. Genet.* 7:709-714.
- Klüver N, Herpin A, Braasch I, Driessle J, Scharf M. 2009. Regulatory back-up circuit of Medaka Wt1 co-orthologs ensures PGC maintenance. *Dev. Biol.* 325:179-188.
- Knaut H, Werz C, Geisler R, Nüsslein-Volhard C. 2003. A Zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* 421:279-282.

- Kobayashi T, Matsuda M, Kajjura-Kobayashi H, Suzuki A, Saito N, Nakamoto M, Shibata N, Nagahama Y. 2004. Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.* 231:518-526.
- Kodjabachian L, Lemaire P. 2001. Siamois functions in the early blastula to induce Spemann's organiser. *Mech. Dev.* 108:71-79.
- Kubo F, Takeichi M, Nakagawa S. 2003. Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development* 130:587-598.
- Kubo F, Takeichi M, Nakagawa S. 2005. Wnt2b inhibits differentiation of retinal progenitor cells in the absence of Notch activity by downregulating the expression of proneural genes. *Development* 132:2759-2770.
- Kudoh T, Wilson SW, Dawid IB. 2002. Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development* 129:4335-4346.
- Kurokawa H, Aoki Y, Nakamura S, Ebe Y, Kobayashi D, Tanaka M. 2006. Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the Medaka *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* 48:209-221.
- Kurokawa H, Saito D, Nakamura S, Katoh-Fukui Y, Ohta K, Baba T, Morohashi K, Tanaka M. 2007. Germ cells are essential for sexual dimorphism in the Medaka gonad. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:16958-16963.
- Kuroyanagi Y, Okuyama T, Suehiro Y, Imada H, Shimada A, Naruse K, Takeda H, Kubo T, Takeuchi H. 2010. Proliferation zones in adult Medaka (*Oryzias latipes*) brain. *Brain Res.* [Epub ahead of print].
- Lasorella A, Iavarone A, Israel MA. 1996. Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. *Mol. Cell Biol.* 16:2570-2578.
- Laurent MN, Blitz IL, Hashimoto C, Rothbacher U, Cho KW. 1997. The *Xenopus* homeobox gene *twin* mediates Wnt induction of gooseoid in establishment of Spemann's organizer. *Development* 124:4905-4916.
- Lavial F, Acloque H, Bertocchini F, Macleod DJ, Boast S, Bachelard E, Montillet G, Thenot S, Sang HM, Stern CD, Samarut J, Pain B. 2007. The Oct4 homolog PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells. *Development* 134:3549-3563.
- Lee HY, Kleber M, Hari L, Brault V, Suter U, Taketo MM, Kemler R, Sommer L. 2004. Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stemcells. *Science* 303:1020-1023.

- Lekven AC, Thorpe CJ, Waxman JS, Moon RT. 2001. Zebrafish *wnt8* encodes two *wnt8* proteins on a bicistronic transcript and is required for mesoderm and neurectoderm patterning. *Dev. Cell* 1:103-114.
- Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, Welstead GG, Zaidi S, Gokhale S, Scholer HR, Tomilin A, Jaenisch R. 2007. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 1:403-415.
- Livesey FJ, Cepko CL. 2001. Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:109-118.
- Liu H, Mohamed O, Dufort D, Wallace VA. 2003. Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Dev. Dyn.* 227:323-334.
- Locker M, Agathocleous M, Amato MA, Parain K, Harris WA, Perron M. 2006. Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes Dev.* 20:3036-3048.
- Loh YH, Wu Q, Chew JL y cols. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38:431-440.
- Loosli F, Winkler S, Wittbrodt J. 1999. Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* 13:649-654.
- Loosli F, Köster RW, Carl M, Kühnlein R, Henrich T, Mücke M, Krone A, Wittbrodt J. 2000. A genetic screen for mutations affecting embryonic development in Medaka fish (*Oryzias latipes*). *Mech. Dev.* 97:133-139.
- Loosli F, Winkler S, Burgtorf C, Wurmbach E, Ansorge W, Henrich T, Grabher C, Arendt D, Carl M, Krone A, Grzebisz E, Wittbrodt J. 2001. Medaka *eyeless* is the key factor linking retinal determination and eye growth. *Development* 128:4035-4044.
- Loosli F, Del Bene F, Quiring R, Rembold M, Martinez-Morales JR, Carl M, Grabher C, Iquel C, Krone A, Wittbrodt B, Winkler S, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Henrich T, Deguchi T, Hirose Y, Iwanami N, Kanimatsu S, Osakada M, Watanabe T, Yasuoka A, Yoda H, Winkler C, Elmasri H, Kondoh H, Furutani-Seiki M, Wittbrodt J. 2004. Mutations affecting retina development in Medaka. *Mech. Dev.* 121:703-714.
- Lunde K, Belting HG, Driever W. 2004. Zebrafish *pou5f1/pou2*, homolog of mammalian Oct4, functions in the endoderm specification cascade. *Curr. Biol.* 14:48-55.

- Luo J, Chen J, Deng ZL, Luo X, Song WX, Sharff KA, Tang N, Haydon RC, Luu HH, He TC. 2007. Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications?. *Lab. Invest.* 87:97-103.
- Lupo G, Harris WA, Lewis KE. 2006. Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:103-114.
- Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J. 2002. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol. Cell Biol.* 22:1184-1193.
- McWhir J, Schnieke AE, Ansell R, Wallace H, Colman A, Scott AR, Kind AJ. 1996. Selective ablation of differentiated cells permits isolation of embryonic stem cell lines from murine embryos with a nonpermissive genetic background. *Nat. Genet.* 14:223-226.
- Marlow FL, Mullins MC. 2008. Bucky ball functions in Balbiani body assembly and animal-vegetal polarity in the oocyte and follicle cell layer in Zebrafish. *Dev. Biol.* 321:40-50.
- Martínez-Morales JR, Del Bene F, Nica G, Hammerschmidt M, Bovolenta P, Wittbrodt J. 2005. Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center. *Dev. Cell* 8:565–574.
- Martins RA, Pearson RA. 2008. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res.* 1192:37-60.
- Masai I, Stemple DL, Okamoto H, Wilson SW. 2000. Midline signals regulate retinal neurogenesis in Zebrafish. *Neuron* 27:251-263.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the Medaka fish. *Nature* 417:559-563.
- Matsuda M. 2005. Sex determination in the teleost Medaka, *Oryzias latipes*. *Annu. Rev. Genet.* 39:293-307.
- McMahon AP, Moon RT. 1989. Ectopic expression of the proto-oncogene *int-1* in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell.* 58:1075-1084.
- Memezawa A, Takada I, Takeyama K, Igarashi M, Ito S, Aiba S, Kato S, Kouzmenko AP. 2007. *Id2* gene-targeted crosstalk between Wnt and retinoid signaling regulates proliferation in human keratinocytes. *Oncogene* 26:5038-5045.

- Michiue T, Fukui A, Yukita A, Sakurai K, Danno H, Kikuchi A, Asashima M. 2004. Xldax, an inhibitor of the canonical Wnt pathway, is required for anterior neural structure formation in *Xenopus*. *Dev. Dyn.* 230:79-90.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113:631-642.
- Miyaoka T, Seno H, Ishino H. 1999. Increased expression of Wnt-1 in schizophrenic brains. *Schizophr. Res.* 38:1-6.
- Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Wylie C, Lehmann R. 2003. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 130:4279-4786.
- Montcouquiol M, Crenshaw EB 3rd, Kelley MW. 2006. Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* 29:363-386.
- Morinaga C, Tomonaga T, Sasado T, Suwa H, Niwa K, Yasuoka A, Henrich T, Watanabe T, Deguchi T, Yoda H, Hirose Y, Iwanami N, Kunimatsu S, Okamoto Y, Yamanaka T, Shinomiya A, Tanaka M, Kondoh H, Furutani-Seiki M. 2004. Mutations affecting gonadal development in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* 121:829-39.
- Morrison GM, Brickman JM. 2006. Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development.* 133:2011-2022.
- Muroyama Y, Fujihara M, Ikeya M, Kondoh H, Takada S. 2002. Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev.* 16:548-553.
- Nakamura RE, Hunter DD, Yi H, Brunken WJ, Hackam AS. 2007. Identification of two novel activities of the Wnt signaling regulator Dickkopf 3 and characterization of its expression in the mouse retina. *BMC Cell Biol.* 8:52.
- Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, Schmid M, Schartl M. 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the Medaka, *Oryzias latipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:11778-11783.
- Naruse K, Hori H, Shimizu N, Kohara Y, Takeda H. 2004. Medaka genomics: a bridge between mutant phenotype and gene function. *Mech. Dev.* 121:619-628.
- Neumann CJ, Nusslein-Volhard C. 2000. Patterning of the Zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* 289:2137-2139.

- Niakan KK, Davis EC, Clipsham RC, Jiang M, Dehart DB, Sulik KK, McCabe ER. 2006. Novel role for the orphan nuclear receptor Dax1 in embryogenesis, different from steroidogenesis. *Mol. Genet. Metab.* 88:261-271.
- Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-391.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 24:372-376.
- Niwa H. 2007. How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134:635-646.
- Nusse R. 2005. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* 15:28-32.
- Ohnuma S, Hopper S, Wang KC, Philpott A, Harris WA. 2002. Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development* 129:2435-2446.
- Orkin SH. 2005. Chipping away at the embryonic stem cell network. *Cell* 122:828-830.
- Osakada F, Ooto S, Akagi T, Mandai M, Akaike A, Takahashi M. 2007. Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J. Neurosci.* 27:4210-4219.
- Ozato K, Kondoh H, Inohara H, Iwamatsu T, Wakamatsu Y, Okada TS. 1986. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken delta-crystallin gene in Medaka embryos. *Cell Differ.* 19:237-244.
- Palmieri SL, Peter W, Hess H, Schöler HR. 1994. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* 166:259-267.
- Panhuisen M, Vogt Weisenhorn DM, Blanquet V, Brodski C, Heinzmann U, Beisker W, Wurst W. 2004. Effects of Wnt1 signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region. *Mol. Cell Neurosci.* 26:101-111.
- Passini MA, Kurtzman AL, Canger AK, Asch WS, Wray GA, Raymond PA, Schechter N. 1998. Cloning of Zebrafish *vsx1*: expression of a paired-like homeobox gene during CNS development. *Dev. Genet.* 23:128-141.

- Peifer M, Polakis P. 2000. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287:1606-1609.
- Pereira L, Yi F, Merrill BJ. 2006. Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol. Cell Biol.* 26:7479-7491.
- Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Schöler H. 1998. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech. Dev.* 71:89-98.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- Poggi L, Vitorino M, Masai I, Harris WA. 2005. Influences on neural lineage and mode of division in the Zebrafish retina in vivo. *J. Cell Biol.* 171:991-999.
- Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14:1837-1851.
- Prada C, Puga J, Perez-Mendez L, Lopez AR, Ramirez G. 1991. Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Eur. J. Neurosci.* 3:1187.
- Prendergast GC. 1999. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18:2967-2987.
- Ramón y Cajal S. 1892. La rétine des vertebres. *Cell* 9:119-258.
- Reim G, Mizoguchi T, Stainier DY, Kikuchi Y, Brand M. 2004. The POU domain protein spg (*pou2/Oct4*) is essential for endoderm formation in cooperation with the HMG domain protein *casanova*. *Dev. Cell* 6:91-101.
- Reim G, Brand M. 2006. Maternal control of vertebrate dorsoventral axis formation and epiboly by the POU domain protein *Spg/Pou2/Oct4*. *Development* 133: 2757-2770.
- Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature.* 423:409-414.
- Rosner MH, Viganò MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM. 1990. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345:686-692.
- Saito T, Fujimoto T, Maegawa S, Inoue K, Tanaka M, Arai K, Yamaha E. 2006. Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.* 50:691-699.
- Satoh N. 1974. An ultrastructural study of sex differentiation in the teleost *Oryzias latipes*. *J Embryol Exp Morphol.* 32:195-215.

- ^aSánchez-Sánchez AV, Camp E, García-España A, Leal-Tassias A, Mullor JL. 2010. Medaka Oct4 is expressed during early embryo development, primordial germ cells and adult gonads. *Dev. Dyn.* 239:672-679.
- ^bSánchez-Sánchez AV, Camp E, Leal-Tassias A, Mullor JL. 2010. Wnt signaling has different temporal roles during retinal development. *Dev Dyn.* 239:297-310.
- Sasado T, Morinaga C, Niwa K, Shinomiya A, Yasuoka A, Suwa H, Hirose Y, Yoda H, Henrich T, Deguchi T, Iwanami N, Watanabe T, Kunimatsu S, Osakada M, Okamoto Y, Kota Y, Yamanaka T, Tanaka M, Kondoh H, Furutani-Seiki M. 2004. Mutations affecting early distribution of primordial germ cells in Medaka (*Oryzias latipes*) embryo. *Mech. Dev.* 121:817-828.
- Sasado T, Yasuoka A, Abe K, Mitani H, Furutani-Seiki M, Tanaka M, Kondoh H. 2008. Distinct contributions of CXCR4b and CXCR7/RDC1 receptor systems in regulation of PGC migration revealed by Medaka mutants *kazura* and *yanagi*. *Dev. Biol.* 320:328-339.
- Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, Fujimura S, Matsumoto Y, Takasato M, Kodama T, Aburatani H, Asashima M, Yoshida N, Nishinakamura R. 2006. The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okhiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development* 133:3005-3013.
- Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. 1990. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344:435-439.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5522-5527.
- Sheng G, Stern CD. 1999. Gata2 and Gata3: novel markers for early embryonic polarity and for non-neural ectoderm in the chick embryo. *Mech. Dev.* 87:213-216.
- Shima A, Mitani H. 2004. Medaka as a research organism: past, present and future. *Mech Dev.* 121:599-604.
- Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, Nagahama Y, Hamaguchi S. 2000. The vasa-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* 42:317-326.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5522-5527.

- Silva J, Chambers I, Pollard S, Smith A. 2006. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*. 441:997-1001.
- Singh AM, Dalton S. 2009. The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell*. 5:141-149.
- Sinner D, Rankin S, Lee M, Zorn AM. 2004. Sox17 and β catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes. *Development* 131:3069-3080.
- Smith JC, Price BM, Green JB, Weigel D, Herrmann BG. 1991. Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67:79-87.
- Stirchak EP, Summerton JE, Weller DD. Uncharged stereoregular nucleic acid analogs: 2. Morpholino nucleoside oligomers with carbamate internucleoside linkages. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:6129-6141.
- Stoykova A, Gruss P. 1994. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J. Neurosci*. 14:1395-1412.
- Sun L, Bradford CS, Ghosh C, Colodi P, Barnes DW. 1995. ES-like cell cultures derived from early Zebrafish embryos. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*. 4:193-199.
- Tada M, Smith JC. 2000. Wnt11 is a target of *Xenopus* brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development* 127:2227-2238.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872.
- Takeda H, Matsuzaki T, Oki T, Miyagawa T, Amanuma H. 1994. A novel POU domain gene, Zebrafish pou2: expression and roles of two alternatively spliced twin products in early development. *Genes Dev*. 8:45-59.
- Take-Uchi M, Clarke JD, Wilson SW. 2003. Hedgehog signalling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of Vax gene activity. *Development*. 130:955-968.
- Tetsu O, McCormick F. 1999. h-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-426.

- Thermes V, Grabher C, Ristoratore F, Bourrat F, Choulika A, Wittbrodt J, Joly JS. 2002. I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech. Dev.* 118:91-98.
- Thermes V, Candal E, Alunni A, Serin G, Bourrat F, Joly JS. 2006. Medaka simplet (FAM53B) belongs to a family of novel vertebrate genes controlling cell proliferation. *Development* 133:1881-1890.
- Thisse B, Pflumio S, Fürthauer M, Loppin B, Heyer V, Degraeve A, Woehl R, Lux A, Steffan T, Charbonnier XQ, Thisse C. 2001. Expression of the Zebrafish genome during embryogenesis (NIH R01 RR15402). ZFIN Direct Data Submission (<http://zfin.org>).
- Tetsu O, McCormick F. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-426.
- Torres J, Watt FM. 2008. Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFkappaB and cooperating with Stat3. *Nat. Cell. Biol.* 10:194-201.
- Uwanogho D, Rex M, Cartwright EJ, Pearl G, Healy C, Scotting PJ, Sharpe PT. 1995. Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech. Dev.* 49: 23-36.
- Van Raay TJ, Vetter ML. 2004. Wnt/frizzled signaling during vertebrate retinal development. *Dev. Neurosci* 26:352–358.
- Van Raay TJ, Moore KB, Iordanova I, Steele M, Jamrich M, Harris WA, Vetter ML. 2005. Frizzled 5 signaling governs the neural potential of progenitors in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* 46:23-36.
- Veien ES, Grierson MJ, Saund RS, Dorsky RI. 2005. Expression pattern of Zebrafish *tcf7* suggests unexplored domains of Wnt/beta-catenin activity. *Dev. Dyn.* 233:233-239.
- Veien ES, Rosenthal JS, Kruse-Bend RC, Chien CB, Dorsky RI. 2008. Canonical Wnt signaling is required for the maintenance of dorsal retinal identity. *Development* 135:4101-4111.
- Vihelic TS, Doro CJ, Hyde DR. 1999. Cloning and characterization of six Zebrafish photoreceptor opsin cDNAs and immunolocalization of their corresponding proteins. *Vis. Neurosci.* 16:571-585.
- Wakamatsu Y, Pristiyazhnyuk S, Kinoshita M, Tanaka M, Ozato K. 2001. The see-through Medaka: a fish model that is transparent throughout life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10046-10050.
- Wallace VA. 2008. Proliferative and cell fate effects of Hedgehog signaling in the vertebrate retina. *Brain Res.* 1192:61-75.

- Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, Orkin SH. 2006. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 444:364-368.
- Wilson SW, Houart C. 2004. Early steps in the development of the forebrain. *Dev. Cell* 6:167-181.
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 423:448-452.
- Wittbrodt J, Shima A, Schartl M. 2002. Medaka-a model organism from the Far East. *Nat. Rev. Genet.* 3:53-64.
- Wodarz A, Nusse R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:59-88.
- Yamaguchi M, Tonou-Fujimori N, Komori A, Maeda R, Nojima Y, Li H, Okamoto H, Masai I. 2005. Histone deacetylase 1 regulates retinal neurogenesis in Zebrafish by suppressing Wnt and Notch signaling pathways. *Development* 132:3027-3043.
- Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. 2005. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr. Patterns* 5:639-646.
- Yamamoto T. 1975. Medaka (killifish): biology and strains. Heigaku, Tokyo.
- Yamamoto Y, Henderson CE. 1999. Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse and rat. *Dev. Biol.* 214:60-71.
- Yeom YI, Ha HS, Balling R, Schöler HR, Artzt K. 1991. Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech. Dev.* 35:171-179.
- Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hübner K, Schöler HR. 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122:881-894.
- Yi M, Hong N, Hong Y. 2009. Generation of Medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science* 326:430-433.
- Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453:519-523.
- Yokoi H, Nishimatsu A, Ozato K, Yoda K. 2003. Cloning and embryonic expression of six wnt genes in the Medaka (*Oryzias latipes*) with special reference to expression of wnt5a in the pectoral fin buds. *Dev. Growth Differ.* 45:51-61.
- You Z, Saims D, Chen S, Zhang Z, Guttridge DC, Guan KL, MacDougald OA, Brown AM, Evan G, Kitajewski J, Wang CY. 2002. Wnt signaling

- promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 157:429-440.
- Zeng L, Fagotto F, Zhang T, Hsu W, Vasicek TJ, Perry WL 3rd, Lee JJ, Tilghman SM, Gumbiner BM, Costantini F. 1997. The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* 90:181-192.
- Zhang J, Tam WL, Tong GQ, Wu Q, Chan HY, Soh BS, Lou Y, Yang J, Ma Y, Chai L, Ng HH, Lufkin T, Robson P, Lim B. 2006. Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat. Cell Biol.* 8:1114-1123.
- Zhang X, Neganova I, Przyborski S, Yang C, Cooke M, Atkinson SP, Anyfantis G, Fenyk S, Keith WN, Hoare SF, Hughes O, Strachan T, Stojkovic M, Hinds PW, Armstrong L, Lako M. 2009. A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A. *J. Cell Biol.* 184:67-82.
- Zuccotti M, Merico V, Sacchi L, Bellone M, Brink TC, Bellazzi R, Stefanelli M, Redi CA, Garagna S, Adjaye J. 2008. Maternal Oct-4 is a potential key regulator of the developmental competence of mouse oocytes. *BMC Dev. Biol.* 8:97.

F S N