



Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

***Rol de los microARNs durante la
especificación de la cresta neural.***

Tomás J. Steeman

Tesis para optar al título de Licenciado en Biotecnología

Directora:

Dra. Andrea M. J. Weiner

Agradecimientos

Estos últimos años estuvieron llenos de emociones, dificultades, alegrías, retos, noches de desvelo, días de nervios, tardes de estudio con mate (*todos* mis apuntes tienen al menos una salpicadura de mate en *todas* las hojas), y muchas otras cosas que si empiezo a enumerar no me entraría en esta página que tengo para escribir. Lo importante es que no lo viví solo, sino que tuve a muchas personas alrededor, quienes me acompañaron a lo largo de este camino, ayudándome, haciéndolo más llevadero y llenándolo de momentos valiosos. Es a estas personas a quién quiero agradecerles.

En primer lugar, gracias a Andrea, por su gran ayuda, por haberme dirigido con paciencia y determinación durante este trabajo, incluso a la distancia. También a Nora por haberme dado un lugar en su laboratorio, por haber confiado en mí. A los chicos del Lab4, por la buena onda y por haberme ayudado siempre que lo necesitaba.

Gracias a aquellas personas sin las cuales literalmente no estaría acá y a quienes les debo todo lo que soy, mamá y papá, y a aquellos a los que les tocó acompañarme, hayan querido o no, Iván, Franco, Augusto y Sara. A mis abuelos, que estuvieron siempre ahí conmigo.

Hay gente que me viene acompañando hace rato, esos amigos que uno conoce y por suerte nunca se van, con sus juegos de mesa bizarros, sus largas noches de conversaciones de lo más variadas y sus historias que parecen de libros de ficción. Gracias Daf, Lucas A, Lucas B, Ciro, Mauro y Ro.

También hay gente que conocí en el camino, que se sumaron hace sólo unos pocos años, pero que indudablemente le dieron otro valor a mi paso por la facultad. Cami, Vale, Viru, Berna, Pau F, Pau V, Emi, sin ustedes esta etapa no hubiese sido lo mismo.

También está esa persona que apareció en mi vida de repente y en poco tiempo pasó a ser una de las más importantes. Gracias Fran por estar ahí conmigo en todo momento, por más difícil y adverso que sea, por alegrarme los días con tan sólo tu presencia, y por ayudarme a darme cuenta de quién soy.

Índice

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	II
RESUMEN	III
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 PEZ CEBRA.....	1
1.2 CRESTA NEURAL	5
1.3 SOX9B.....	9
1.4 MICROARN	11
2 OBJETIVOS	16
3 MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 MEDIOS Y SOLUCIONES	17
3.2 MANIPULACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	18
3.3 TINCIÓN DE ACIAN BLUE	21
3.4 CLONADO	23
3.5 ENSAYOS DE RT-QPCR	29
3.6 HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> EN EMBRIONES ENTEROS (<i>WISH</i> , DE SUS SIGLAS EN INGLÉS).....	31
3.7 HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	34
4 RESULTADOS	35
4.1 MORFOLOGÍA DE LOS PECES DEPLETADOS DE <i>DICER1</i>	35
4.2 ESTUDIO DE LAS ESTRUCTURAS CRANEOFACIALES EN LARVAS DEPLETADAS DE <i>DICER1</i>	37
4.3 ANÁLISIS DE LA REGIÓN 3'UTR DE <i>SOX9B</i>	40
4.4 ESTUDIOS MOLECULARES DE <i>SOX9B</i>	48
4.5 ESTUDIOS MOLECULARES DEL GEN <i>COL2A1</i>	53
4.6 NIVELES DE EXPRESIÓN DE MICROARN	56
5 CONCLUSIONES	60
6 BIBLIOGRAFÍA	61

Abreviaturas

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

CCN: Células de la cresta neural

CN: Cresta neural

DMSO: Dimetilsulfóxido

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

NBT: Nitroazul de tetrazolio

TEM: Transición epitelio-mesénquima

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

Resumen

La cresta neural (CN) es una población transitoria de células multipotentes cuya formación ocurre temprano en el desarrollo. Al cerrarse el tubo neural, las células sufren una transición epitelio-mesénquima, luego delaminan, migran y finalmente se diferencian en diversas estructuras. Cada etapa del desarrollo de las células de cresta neural (CCN) está caracterizada por la activación de ciertos factores de transcripción fundamentales para el éxito de las mismas. La expresión de estos factores es estrictamente regulada por varios mecanismos, siendo uno de ellos los microARNs. Nuestro objetivo es contribuir al conocimiento del rol que cumplen los microARNs durante el desarrollo de las CCN. En este trabajo se analizaron los efectos de la alteración de la biogénesis de microARNs en embriones de pez cebra, con un enfoque en los derivados craneofaciales de la CN. Se analizó además el efecto de los microARNs sobre el gen especificador de la CN *sox9b* y sobre el gen del colágeno mayoritario en cartílago, *col2a1*. A su vez, se diseñaron dos sondas para la detección *in situ* de *sox9b* y se detectó un microARN por RT-qPCR. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que los microARNs están involucrados en la regulación de dichos genes al haber observado cambios en los niveles de mensajero de *sox9b*, en el patrón de expresión espacio-temporal de *col2a1* y en los parámetros craneofaciales estudiados.

1 Introducción

1.1 Pez cebra

1.1.1 Características y ventajas del pez cebra como animal modelo

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez teleósteo originalmente descubierto en el noreste de India, que habita generalmente en cuerpos de agua poco profundos con temperaturas que pueden variar entre los 12-39°C, siendo 28,5°C la óptima para su crecimiento y desarrollo (Parichy, 2015). Estos peces son organismos omnívoros, sin requerimientos dietarios estrictos. Además, presentan dimorfismo sexual: los machos tienden a ser pequeños, estilizados y con una tonalidad amarilla, mientras que las hembras son grandes y con cuerpo redondeado (Figura 1.1) (Spence et al., 2007).

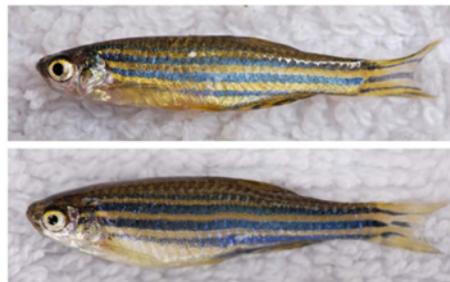


Figura 1.1 - Ejemplares adultos de pez cebra. Superior: macho; inferior: hembra. Adaptado de Parichy 2015.

La forma de fecundación y el desarrollo embrionario del pez cebra son externos. Las hembras expulsan los ovocitos al medio y son rápidamente fecundados por los espermatozoides liberados por el macho. Los ovocitos poseen una cobertura de fibras de glicoproteínas, llamada corion, que sirve de protección mecánica. Aproximadamente después de 2-3 días de haber sido fecundados, los embriones rompen la cobertura, son liberados al medio y pasan a llamarse larvas (Bonsignorio et al., 1996; Spence et al., 2007).

El pez cebra se convirtió en un importante modelo para el estudio del desarrollo embrionario en vertebrados y de enfermedades humanas (Rubinstein, 2003). Se detallan a continuación las características más sobresalientes que lo hacen atractivo como un buen modelo:

- Los adultos pueden cruzarse de forma sencilla y eficaz, dando lugar a centenas de embriones por pareja por semana, siendo los embriones relativamente grandes (0,5 cm) y con un desarrollo rápido.
- No tienen altos requerimientos alimenticios y se los puede mantener en espacios reducidos, permitiendo una alta densidad de ejemplares.
- Sus embriones son transparentes, permitiendo que múltiples procesos del desarrollo sean detectados en ejemplares vivos sin necesidad de excesiva manipulación. Para sistemas craneofaciales, esto es cierto también hasta unos pocos días después de la fecundación, ya que los elementos esqueléticos se encuentran bajo una capa delgada de tejido y pueden ser fácilmente observados (Parsons et al., 2011).
- Existe una miríada de técnicas aplicadas a los embriones y larvas, entre ellas manipulación génica, microinyección, generación de líneas transgénicas y mutantes, métodos de trasplante y estudios de nuevas drogas (Braunbeck et al., 2015; Parichy, 2015).
- Su genoma fue secuenciado y presenta alta homología de secuencia con el de humanos (compartiendo hasta el 70%), permitiendo extrapolar los resultados obtenidos (Parichy, 2015; Parsons et al., 2011).
- En particular, numerosos trabajos científicos han contribuido a dilucidar las vías de señalización que dirigen las actividades celulares y las interacciones entre tejidos necesarias para el correcto desarrollo de las estructuras craneofaciales (Parsons et al., 2011).

1.1.2 Estadios del desarrollo embrionario del pez cebra

El desarrollo de los embriones de pez cebra es fácilmente observable y relativamente rápido. Una forma de describir cronológicamente el desarrollo consiste en dividir el proceso en 8 etapas (Kimmel et al., 1995):

1. Zigoto (0 - $\frac{3}{4}$ h): El huevo recién fecundado cursa el primer ciclo celular (Figura 1.2 A).

2. Divisiones ($\frac{3}{4}$ - 2 $\frac{1}{4}$ h): Los ciclos celulares 2 a 7 ocurren rápidamente y de forma sincronizada (Figura 1.2 B-G).
3. Blástula (2 $\frac{1}{4}$ - 5 $\frac{1}{4}$ h): Ciclos de división celular metasincrónicos rápidos dan lugar a ciclos más largos asincrónicos. Comienza el período de epibolia (Figura 1.2 H-M).
4. Gástrula (5 $\frac{1}{4}$ - 10h): Ocurren los movimientos de involución, convergencia y extensión del epiblasto, hipoblasto y eje embrionario (Figura 1.2 N-R).
5. Segmentación (10 - 24h): Se desarrollan los somitos, el arco faríngeo primordial y los neurómeros. Aparecen la cola, organogénesis primaria y primeros movimientos (Figura 1.2 S-Y).
6. Faríngrula (24 - 48h): Se endereza el embrión desde la curvatura alrededor del saco vitelino. Comienzan a desarrollarse la circulación, pigmentación y aletas (Figura 1.2 Z-AD).
7. Eclosión (48- 72h): Se completa la morfogénesis de los sistemas de órganos primarios y se desarrollan los cartílagos de la cabeza y aleta pectoral
8. Larva temprana (más de 72h): Se infla la vejiga natatoria. Las larvas comienzan a nadar activamente y desarrollan comportamientos de búsqueda de alimento.

Dado que los embriones, incluso los pertenecientes a una misma camada, se desarrollan a ritmos distintos, es más conveniente definir los estadios por ciertas características morfológicas que por el tiempo transcurrido desde la fecundación (horas post-fecundación: hpf, o días post-fecundación: dpf). Por otro lado, se puede variar la temperatura de incubación para acelerar o ralentizar el desarrollo del embrión. Aún así, la confirmación del estadio correspondiente analizando las características por lupa o microscopio con sistema Nomarski es lo correcto (Kimmel et al., 1995).

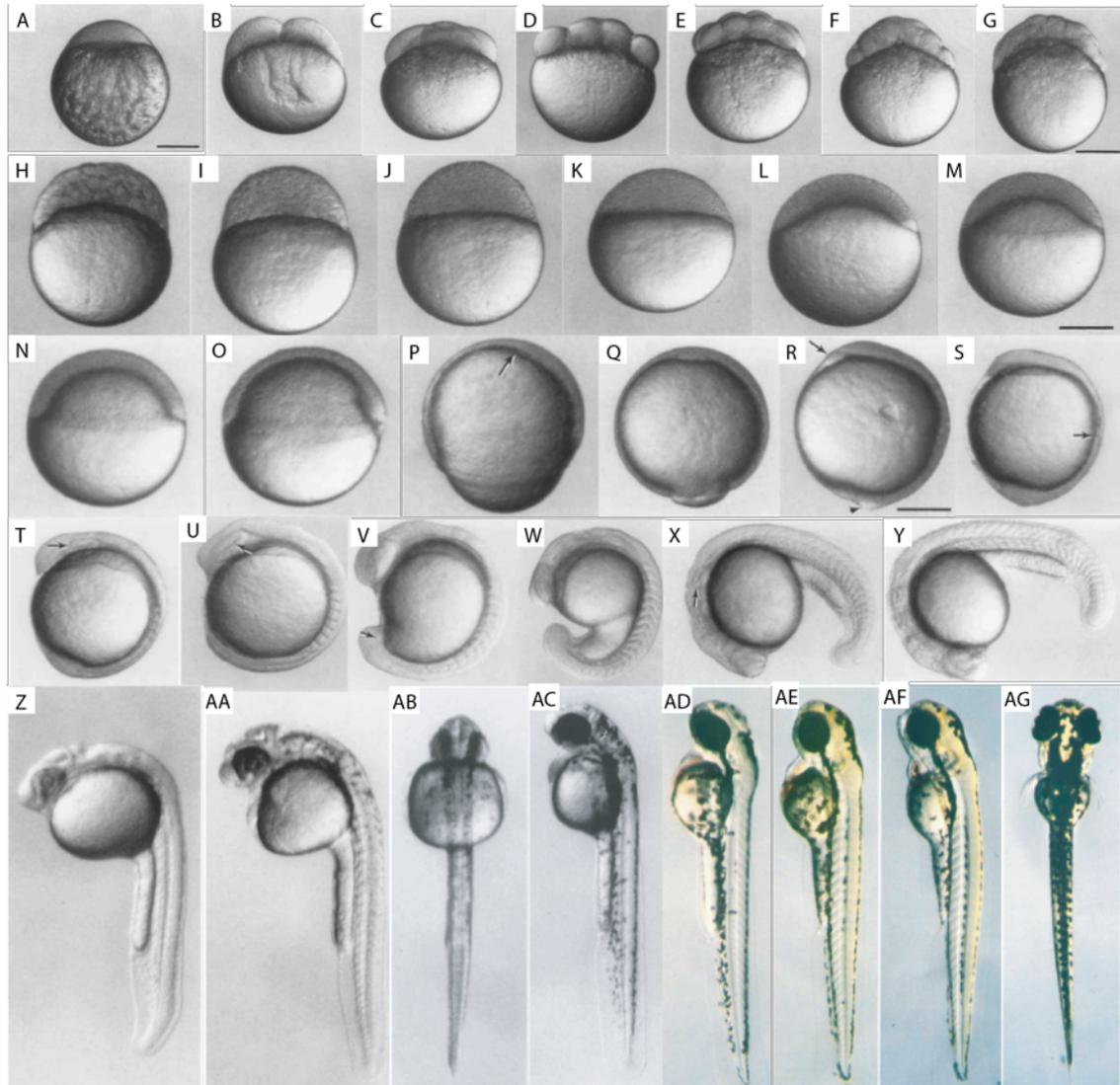


Figura 1.2 - Estadios embrionarios del pez cebra:

1- A) Una célula.

2- B) 2 células; C) 4 células; D) 8 células; E) 16 células; F) 32 células; G) 64 células.

3- H) 256 células; I) 512 células; J) Óvalo; K) Esfera; L) Domo; M) 30% Epibolia.

4- N) 50% Epibolia; O) Escudo; P) 70% Epibolia; Q) 90% Epibolia; R) Brote caudal.

5- S) 2 somitos; T) 4 somitos; U) 8 somitos; V) 13 somitos; W) 17 somitos; X) 20 somitos; Y) 25 somitos.

6- Z) 24hpf; AA) 28hpf lateral; AB) 28hpf dorsal; AC) 36hpf; AD) 48hpf.

7- AE) 60hpf; AF) 72hpf lateral; AG) 72hpf dorsal

Adaptado de Kimmel et al., 1995.

1.2 Cresta neural

1.2.1 Características y origen de la cresta neural

La cresta neural (CN) es una estructura ubicada sobre el tubo neural y está formada por células que proliferan e invaden distintas regiones del organismo por medio de una extensa migración (Kelsh & Raible, 2002). Estas células transitorias y pluripotentes pueden dividirse en dos regiones, la craneal y la troncal, según su ubicación en el embrión y los derivados a los que dan lugar (Kelsh & Raible, 2002). A partir de ambas regiones pueden derivar células neuronales, de la glía y de Schwann, melanocitos y células endócrinas (Dupin & Le Douarin, 2014)(Figura 1.3). De la región cefálica además se diferencian tendones, músculo liso, osteocitos y condrocitos craneofaciales, células de la córnea y estructuras dentaria y cardíacas (Dupin & Le Douarin, 2014; Theveneau & Mayor, 2012).

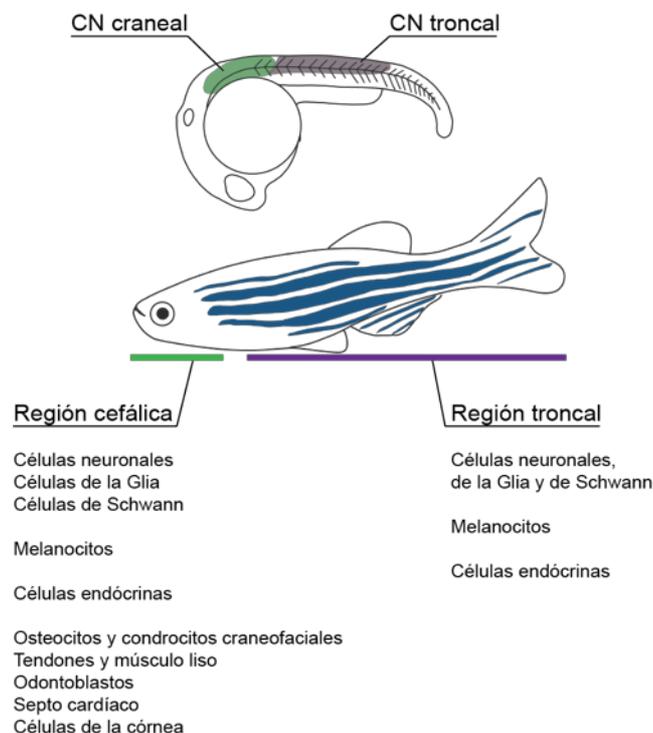


Figura 1.3 – Derivados de la CN, según su origen espacial. Arriba se muestra un embrión de 24 hpf con la CN craneal marcada en verde y la CN troncal en lila. Abajo, un ejemplar adulto con la región cefálica marcada en verde y la troncal en lila.

La formación de la CN se da por un proceso llamado neurulación. La especificación del neuroectodermo es la primera etapa hacia el desarrollo de la CN y se denomina “inducción neural”. La misma ocurre al inicio de la gastrulación, cuando el endodermo secreta factores que promueven o inhiben la inducción neural en el ectodermo. Entre los elementos más importantes se encuentran los factores extrínsecos de señalización como las proteínas *Bone Morphogenic Proteins* (BMP), *Wingless-Integrated* (Wnt) y *Fibroblast Growth Factors* (Fgf), como así también factores de transcripción intrínsecos, principalmente la familia de los genes *Sox* (Schmidt et al., 2013).

Una vez especificado, el neuroectodermo forma la placa neural y las células que se encuentran en el borde formarán la CN. Durante la somitogénesis, la placa neural converge dando lugar a una primera estructura llamada quilla neural que se fusiona a lo largo de la línea media dorsal y forma el cilindro neural (Kimmel et al., 1995; Papan & Campos-Ortega, 1994; Schmidt et al., 2013). Por último, el tubo neural se estructura durante la neurulación secundaria, donde el cilindro neural se ahueca por repetidas divisiones celulares en la región central (Figura 1.4) (Kimmel et al., 1995; Schmidt et al., 2013).

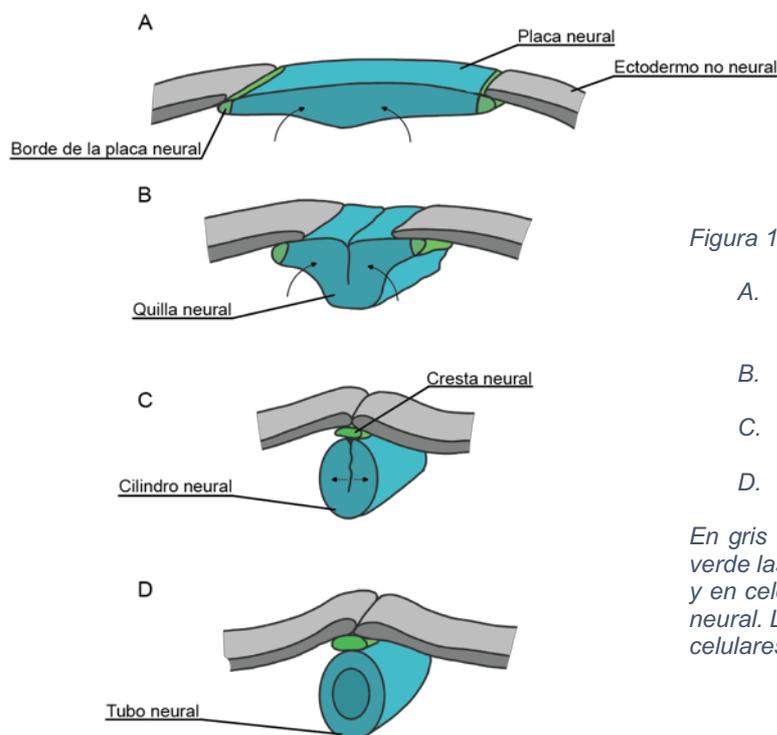


Figura 1.4 - Desarrollo de la CN.

- A. Inicio de la convergencia de la placa neural
- B. Formación de la quilla neural
- C. Formación del cilindro neural
- D. Neurulación secundaria

En gris se muestra el ectodermo no neural, en verde las células que finalmente formarán la CN y en celeste las células que darán lugar al tubo neural. Las flechas representan los movimientos celulares.

1.2.2 Delaminación y migración de la CN

La formación del tubo neural es seguida por la delaminación y migración de las células de la cresta neural (CCN, Figura 1.5) (Theveneau & Mayor, 2012). Para esto, las CCN sufren una transición epitelio-mesénquima (TEM), proceso que se asemeja al que cursan las células cancerígenas al iniciar metástasis. Las CCN epiteliales sufren profundos cambios fenotípicos como ser la pérdida de adhesión célula-célula y de polaridad y adquieren propiedades migratorias e invasivas (Thiery et al., 2009). La delaminación, definida como la separación de las CCN de las células neuroepiteliales, requiere de una completa o parcialmente completa TEM e involucra un amplio rango de mecanismos celulares (Theveneau & Mayor, 2012).

El comienzo de la delaminación de las células de la región craneal varía de acuerdo a la especie, siendo en pez cebra posterior a la neurulación secundaria (Martik & Bronner, 2017). En esta región las CCN inician la migración en conjunto para luego dividirse en distintos caminos (Theveneau & Mayor, 2012). Estas células darán lugar principalmente a los condrocitos y osteocitos craneales y vesículas óticas, entre otras estructuras.

Por otro lado, en todos los modelos animales la delaminación de las células de la región troncal ocurre luego de la formación del tubo neural y se da de forma progresiva (Theveneau & Mayor, 2012). Sin embargo, las vías de migración de las células troncales presentan diferencias entre especies. Por ejemplo en pez cebra, estas células comienzan a moverse entre la epidermis y los somitos a lo largo de toda la región troncal, hasta diferenciarse en melanocitos y células neuronales, entre otras (Theveneau & Mayor, 2012).

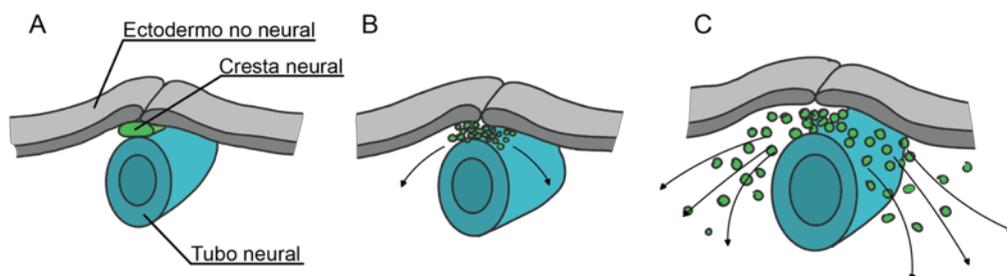


Figura 1.5 – Delaminación y migración de la cresta neural. A: CN al finalizar la formación del tubo neural. B: Delaminación de las CCN. C: Migración de las CCN. En gris se muestra el ectodermo no neural, en verde las células que finalmente formarán la CN, y en celeste las células que darán lugar al tubo neural. Las flechas representan los movimientos celulares.

A medida que las CCN migran y colonizan diferentes partes del embrión, sufren otra transición recíproca a la TEM, nombrada transición mesénquima-epitelial, mediada por un programa de regulación génica que compartimentaliza los progenitores de la CN en territorios con estados regulatorios distintivos (Simoès-Costa & Bronner, 2015). De esta forma, las células migratorias se agregan en complejas organizaciones, finalmente contribuyendo a los órganos y estructuras derivadas de la CN (Simoès-Costa & Bronner, 2015).

1.2.3 Red regulatoria génica

Un aspecto fundamental del estudio del desarrollo embrionario es entender los mecanismos de generación de células diferenciadas a partir de precursores multipotentes. En el caso de la CN, múltiples factores de transcripción y moléculas de señalización están involucrados en los procesos de formación y diferenciación, organizados en forma de niveles témporo-espaciales (Martik & Bronner, 2017). La interacción de estos factores con los genes que regulan es lo que se llama red regulatoria génica (Greenhill et al., 2011).

El proceso de neurulación comienza con la acción concertada de Fgfs e inhibidores de BMP y Wnt que desencadenan la activación de la transcripción de genes neurales (Streit et al., 2000). Un balance entre las señales de BMP y Wnt, provenientes de las regiones laterales del embrión, y sus inhibidores, provenientes de las regiones medias, produce un gradiente medio-lateral de actividad de estas señales. En un nivel intermedio de estas señales se originará el borde de la placa neural (Figura 1.6) (Simoès-Costa & Bronner, 2015).

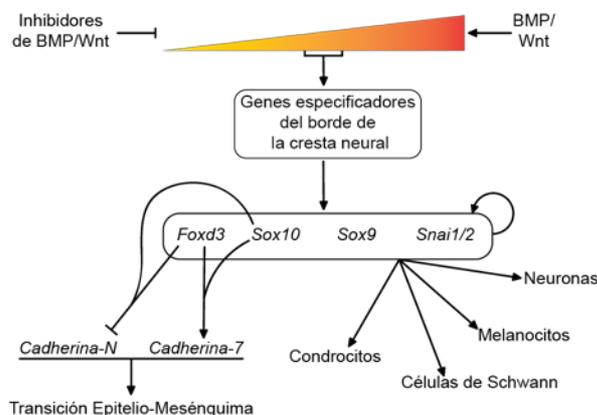


Figura 1.6 – Simplificación de una sección de la Red regulatoria génica de la CN, con algunos de los genes principales.

La futura CN se ve evidenciada por la activación de la expresión de los genes especificadores del borde de la placa neural, tales como *Tfap2a*, *Zic1* y *Dlx5/6* (Simoés-Costa & Bronner, 2015). Dichos genes permiten el pasaje a la siguiente etapa: la especificación de la CN, marcada por la expresión de genes como *Foxd3*, *Sox9/10* y *Snai1/2* (Martik & Bronner, 2017). Estos últimos factores son capaces de regularse entre sí como también activar otros genes y promover la TEM. Por ejemplo, se ha reportado en pollo que *Sox10* y *FoxD3* reprimen N-Cadherina y que *FoxD3* a su vez activa Cadherina-7, lo cual es esencial para permitir la delaminación de las CCN (Cheung et al., 2005). Varios de estos especificadores son auto-regulados y mantienen su expresión a lo largo de la migración. Es esencial entonces una estabilidad regulatoria ya que las células migratorias deben mantener cierta plasticidad al mismo tiempo que adquieren motilidad y responden a distintos estímulos hasta llegar a su destino (Martik & Bronner, 2017).

1.3 Sox9b

1.3.1 Proteínas Sox9

La familia de proteínas Sox incluye a todas aquellas que contengan el dominio de unión a ADN llamado *SRY-related HMG-box*, el cual reconoce la secuencia consenso AACAAAT (Mertin et al., 1999). Más de 20 genes Sox han sido caracterizados y muchos de éstos actúan como factores transcripcionales en diferentes vías del desarrollo embrionario (Chiang et al., 2001). Uno de estos genes es *Sox9*, que actúa en el desarrollo de la CN y en la diferenciación de algunos de sus derivados, como los condrocitos y osteocitos. Debido a un evento de duplicación genómica específica de los teleósteos ocurrido aproximadamente hace 330 millones de años, muchos de los genes de estos peces se encuentran duplicados (Glasauer & Neuhauss, 2014). La combinación de mutaciones y presión de selección puede producir que se mantengan ambas copias repartiéndose las funciones (sub-funcionalización), adquiriendo nuevas (neo-funcionalización) o que se pierda alguna de las copias. En pez cebra existen dos ortólogos de *Sox9*, llamados *sox9a* y *sox9b*, los cuales se repartieron las funciones originales (Chiang et al., 2001; Yan et al., 2005).

1.3.2 Expresión de *sox9b*

Los primeros indicios de expresión de *sox9b* se detectan por hibridación *in situ* en el estadio de 90% de epibolia (aproximadamente 9hpf) en regiones del futuro neuroectodermo, marcándose más intensamente hacia las 10hpf (Li et al., 2002). Desde el inicio de la segmentación hasta el estadio de 10 somitos (10 ½ - 14hpf), se aprecia expresión en el romboencéfalo, mesencéfalo y la CN. Esto concuerda con los estudios de regulación génica, donde *Sox9* (*sox9b* en caso de pez cebra) se encontraba presente al momento de la especificación de la CN, actuando como activador de varios genes, entre ellos *snai1b*, *foxd3* y *sox10* (Dutton et al., 2008; Yan et al., 2005). En el estadio de 18 somitos (18pf) se puede apreciar además una leve expresión en la región de la notocorda (Li et al., 2002).

Al momento de la migración celular, la transcripción de *sox9b* se apaga para luego ser re-expresado en algunos derivados de la CN, como cartílagos craneofaciales y rudimentos de las aletas pectorales (Li et al., 2002). Su actividad no es necesaria para la migración, pero es esencial para establecer el tamaño de la población de células que expresan *dlx2a*, un marcador de células pre- y post-migratorias de la CN craneal (Kelsh & Raible, 2002; Yan et al., 2005). En el caso de los cartílagos, la expresión se observa principalmente al inicio de la condrogénesis, y sus niveles disminuyen a medida que se concreta la diferenciación celular (Chiang et al., 2001). Mutantes homocigotas para *sox9b* en pez cebra muestran un fenotipo donde su eje corporal no se endereza correctamente, adoptando una forma curvada, lo cual se ha atribuido a la falta de expresión en la notocorda a las 18hpf (Yan et al., 2005).

1.3.3 Rol de *sox9b* en el desarrollo los derivados de la cresta neural.

Ambos *sox9a* y *sox9b* son esenciales para la condrogénesis, cumpliendo en conjunto las funciones atribuidas al ortólogo *Sox9* de otros vertebrados. Embriones de pez cebra mutantes homocigotas para *sox9b* muestran reducciones de tamaño en los arcos faríngeos y algunos cartílagos craneales (Yan et al., 2005). Además, los embriones mutantes presentan un número reducido de iridóforos, oídos y otolitos más pequeños y la mayoría de los huesos craneofaciales están ausentes (Yan et al., 2005).

El endodermo faríngeo es esencial para la formación de algunos cartílagos craneofaciales. Los factores *runx3* y *egr1* activan a *sox9b* en ese tejido, el cual regula la proliferación, muerte celular y arreglos espaciales de los condrocitos (Dalcq et al., 2012; Yan et al., 2005). Además, *sox9b* activa de manera indirecta al gen *runx2*, un factor requerido para la diferenciación de los condrocitos y osteoblastos (Dalcq et al., 2012).

El gen *col2a1* codifica para el colágeno mayoritario presente en el cartílago, el colágeno de tipo II (Yan et al., 1995). Larvas de pez cebra mutantes para *sox9b* presentan un patrón de expresión de *col2a1* reducido en los arcos faríngeos y en las aletas pectorales (Yan et al., 2005). Además, se encontró que *sox9b* regula positivamente la expresión de determinados microARNs involucrados en la condrogénesis (Nakamura et al., 2012).

1.4 microARN

1.4.1 Función de los microARNs

Existen cuatro tipos principales de ARNs pequeños involucrados en vías de silenciamiento génico (Kloosterman & Plasterk, 2006). Uno de estos, los microARNs, corresponde a elementos de aproximadamente 22 nucleótidos de simple cadena, endógenos y no codificantes que actúan a nivel de estabilidad de los ARNm y de regulación traduccional (Kloosterman & Plasterk, 2006). Un único microARN puede regular diversos ARNm y un ARNm puede estar regulado por varios microARNs en acción concertada (V. N. Kim, 2005). Está predicho que en mamíferos, alrededor del 50% de los genes codificantes de proteínas están regulados por microARNs y que cambios en su expresión deriva en múltiples patologías humanas (Krol et al., 2010).

Una gran parte de los microARNs de distintas especies, como *H. sapiens* y *C. elegans*, están ubicados en regiones intergénicas o en segmentos intrónicos de otros genes, ya sea en la cadena sentido o antisentido, y cerca del 50% se encuentra cercano a otros microARNs (V. N. Kim, 2005). Pueden ser transcritos a partir de

promotores propios y en el caso de agrupamientos o *clusters* pueden generarse transcritos primarios policistrónicos (V. N. Kim, 2005; Lee et al., 2002).

El complejo efector de la regulación es generalmente llamado miRISC (del inglés *miRNA-containing RNA-induced silencing complex*, complejo silenciador inducido por ARN mediado por microARN). Está formado principalmente por el microARN y una proteína de la familia Argonauta, llamada Ago2 en pez cebra (Bartel, 2009). La clave del mecanismo de acción reside en la llamada “región semilla” del microARN, comprendida por los nucleótidos 2 a 7 (Lewis et al., 2005). Estas bases son las que presentan complementariedad con el ARNm del gen a regular. Una vez formado el complejo ARNm-miRISC, la endonucleasa Ago2 cataliza el corte del ARNm, desencadenando así un proceso de degradación (Pasquinelli, 2012). El complejo miRISC es también capaz de reclutar otras proteínas involucradas en otros mecanismos de regulación por microARN como inhibición del inicio o progreso de la traducción, deadenilación o incluso estimulación de la traducción (Figura 1.7) (Krol et al., 2010; Pasquinelli, 2012).

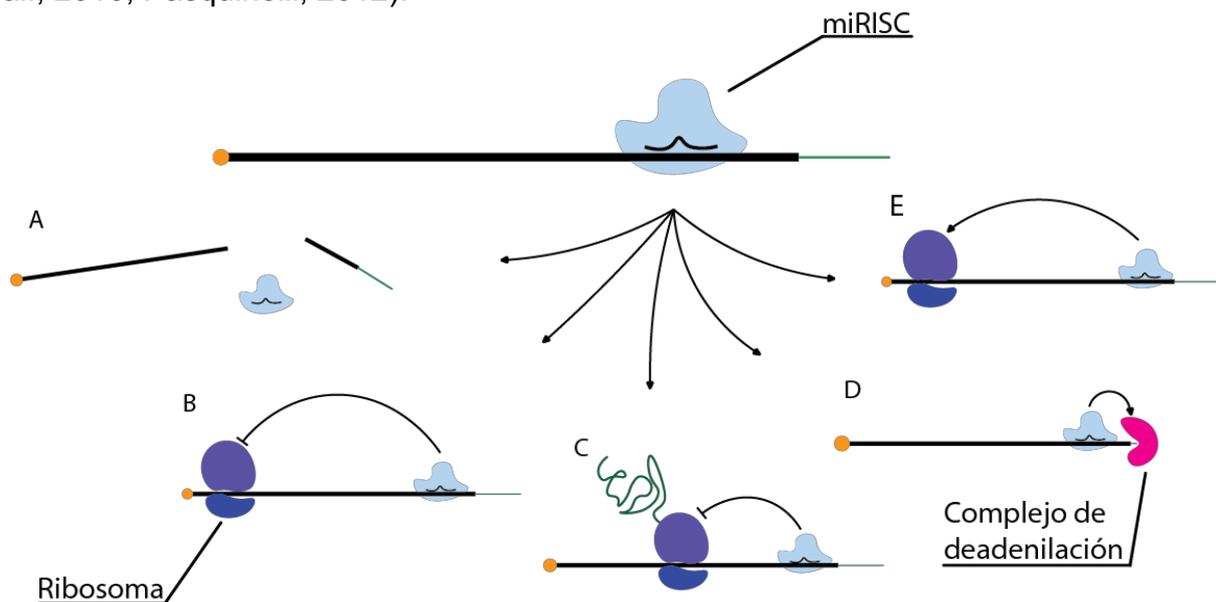


Figura 1.7 – Mecanismos de regulación mediados por miRISC. A: Corte nucleolítico del ARNm, seguido de degradación. B: Inhibición del inicio de la traducción. C: Inhibición de la continuación de la traducción. D: Deadenilación del ARNm seguida de degradación. E: Estimulación de la traducción. En celeste se representa el miRISC, en violeta el ribosoma, en rosa el complejo de deadenilación, en naranja la caperuza de m^7G y en verde la cola de Poli-A.

Como se mencionó anteriormente, los microARN están involucrados en muchos eventos celulares como la miogénesis, cardiogénesis, apoptosis, metabolismo, morfogénesis del encéfalo, osteogénesis y condrogénesis (Dong et al.,

2012; Z. Huang et al., 2010; Kloosterman & Plasterk, 2006). Éstos también juegan un papel importante durante el desarrollo de la CN, habiéndose identificado y descrito microARNs en las etapas de especificación del borde de la placa neural y de la CN, durante la migración y la diferenciación de los distintos derivados (Weiner, 2018).

1.4.2 Biogénesis de microARN

El proceso de biogénesis de los microARNs se resume en la Figura 1.8. La síntesis comienza con la transcripción mediada por la ARN-polimerasa II de un fragmento de ARN que puede alcanzar varios miles de bases de longitud. Este transcrito primario, llamado pri-microARN, forma una estructura de tallo-burbuja y puede poseer una cola de poli-A y una caperuza de m⁷G (Lee et al., 2004). En el caso de los microARNs intrónicos (*mirtrons*), el pri-microARN surge a partir del procesamiento por corte y empalme del transcrito primario y no posee estos elementos (V. N. Kim, 2005). Este transcrito primario es procesado en el núcleo por la enzima RNasa III Drosha junto con Dgcr8, liberando un precursor de microARN de aproximadamente 70nt, llamado pre-microARN, y los fragmentos flanqueantes son generalmente degradados (V. N. Kim, 2005; Krol et al., 2010). Posteriormente, el pre-microARN es exportado al citoplasma a través del poro nuclear mediado por el receptor de transporte nuclear Exportin-5 (V. N. Kim, 2005).

La enzima RNasa III Dicer, presente en el citoplasma, es una proteína multidominio de 200kDa involucrada en varios procesos de la biogénesis de microARNs. Está formada por dos dominios RNasa III (RIIID), un dominio de unión a ARN doble hebra (dsRBD), la caja DEAD (utiliza la hidrólisis de ATP para separar dúplex de ARN) y el dominio PAZ (dominio de unión a ARN presente en proteínas Dicer y Argonata, con preferencia por extremos 3') (Krol et al., 2010). En primer lugar, Dicer interacciona con el pre-microARN, escindiendo la región burbuja y produciendo un dúplex de microARN de aproximadamente 22nt. Luego, una de las hebras (llamada hebra guía) es seleccionada y cargada en el complejo miRISC (V. N. Kim, 2005). La otra hebra, llamada hebra pasajera, es rápidamente degradada. Dicer es considerada una enzima central en el procesamiento de microARN, sin embargo

recientemente se describió la posibilidad de que algunos microARNs salteen su corte nucleolítico para ser escindidos por Ago2 (Cifuentes et al., 2010).

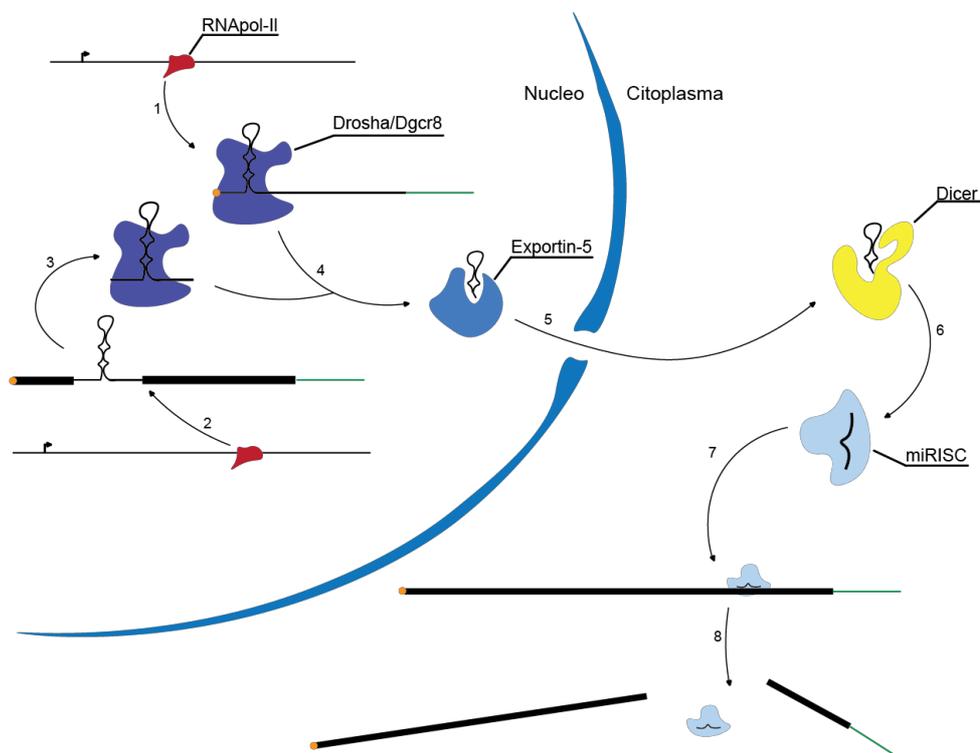


Figura 1.8 – Biogénesis de microARN.

- 1: Transcripción y modificación postranscripcional de un pri-microARN exónico.
- 2: Transcripción y modificación postranscripcional de un gen que contiene un pri-microARN intrónico.
- 3: Procesamiento por corte y empalme y liberación del pri-microARN intrónico
- 4: Procesamiento por Droscha/Dgcr8 para generar el pre-microARN
- 5: Transporte al citoplasma del pre-microARN mediado por Exportin-5
- 6: Procesamiento por Dicer para generar el microARN, y ensamblaje del miRISC
- 7: Reconocimiento de ARNm diana
- 8: Corte del ARNm diana

En rojo se representa la ARN-polimerasa II, en violeta el complejo Droscha/Dgcr8, en azul el receptor Exportin-5, en amarillo la enzima Dicer, en celeste el complejo miRISC, en naranja la caperuza de m⁷G y en verde la cola de Poli-A

1.4.3 Importancia de Dicer en el desarrollo de la CN

La enzima Dicer1 es esencial durante el desarrollo embrionario del pez cebra (Wienholds et al., 2003). Mutantes homocigotas para este gen muestran un arresto del desarrollo alrededor de los 8dpf y no logran sobrevivir las 3 semanas. Es posible eliminar el aporte materno de Dicer1 al reemplazar las células germinales de embriones tipo salvaje con células germinales mutantes *dicer1* (Giraldez et al., 2005). Las cruces de estos peces producen embriones mutantes materno-zigóticos que no

generan microARNs maduros y muestran defectos morfogénicos exacerbados. En ratones, el silenciamiento de *Dicer* en células post-migratorias de la CN mostró que éste es un gen esencial para la supervivencia celular (Zehir et al., 2010). Otro estudio reveló que ratones con inactivación de *Dicer* en las CCN eran letales, y padecían severas anormalidades en la morfogénesis y organogénesis craneofaciales (Nie et al., 2011). Si bien existen microARNs asociados a la etapa de diferenciación de la CN, aún quedan aspectos por dilucidar sobre su rol en las complejas redes de regulación génica.

2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo de tesina es contribuir al conocimiento actual de la regulación de la expresión génica mediada por microARNs durante la especificación de la cresta neural.

Los objetivos particulares planteados son los siguientes:

1-Analizar mediante RT-qPCR e hibridación *in situ* los niveles de expresión del gen *sox9b* en embriones de pez cebra controles, depletados de Dicer1 y mutantes de Dicer1.

2-Detectar mediante ensayos de gen reportero la regulación de la expresión de Sox9b por microARNs.

3 Materiales y Métodos

3.1 Medios y soluciones

LB:	LB en polvo 2,5% (p/v)
LB-Agar:	LB líquido Agar 2% (p/v)
PBS 10x:	NaCl 1,4M KCl 27mM Na ₂ HPO ₄ 100mM KH ₂ PO ₄ 18mM pH=(7,2-7,4)
PFA 4% en PBS 1x:	PFA 4% (p/v) PBS 1x pH=7
Solución de Alcian Blue	HCl 0,37% (v/v) Etanol 70% (v/v) Alcian Blue 0,1% (p/v)
Solución de Blanqueo AB	KOH 1% (p/v) H ₂ O ₂ 1,5% (v/v)
Solución de Blanqueo WISH	SSC 0,5x Formamida 5% (v/v) H ₂ O ₂ 10% (v/v)
Solución de Bloqueo	PBST 1x BSA 0,2% (p/v) Suero Fetal Bovino 5% (v/v)
Solución de Hibridación	Formamida 50% (v/v) SSC 5x Heparina 0,005% (p/v) ARNt de Torula 0,05% (p/v) Tween20 0,1% (v/v) Ácido Cítrico 1M

Solución de Siembra ADN 10x:	Azul de bromofenol 0,25% (p/v) Xilene cianol 0,25% (p/v) Glicerol 30% (v/v)
Solución de Tinción	Tris HCl pH=9,5 1M NaCl 10mM Tween20 0,1% (v/v)
SSC20x	NaCl 3M Citrato de Sodio 300mM pH=7
TAE 50x	Tris 2M Ácido acético 1M EDTA 50mM

3.2 Manipulación de muestras biológicas

3.2.1 Ética en el manejo de animales de laboratorio

El manejo de los peces y sus embriones se llevó a cabo según lo estipulado en las principales pautas nacionales e internacionales de bioética animal. El proyecto de tesina fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR (Resolución decanal N° 207/2018).

3.2.2 Condiciones de cuidado del pez cebrá

Los ejemplares de pez cebrá utilizados se encontraban en sistemas de temperatura controlada de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y bajo un ciclo de luz:oscuridad de 14:10 horas. Los acuarios contenían agua de ósmosis inversa y un sistema cerrado de filtrado biológico, físico y químico para mantener las condiciones ideales de pH (cerca de 8) y concentración de oxígeno disuelto (mayor a 5mg/L). Los peces fueron alimentados 3 veces al día alternando entre comida seca comercial y cultivos de *Artemia spp.*

En nuestro acuario se cuenta con distintas líneas de pez cebrá. En el presente trabajo se han utilizado las siguientes:

- Salvaje:
 - AB: Deriva de las líneas A y B, originarias de una tienda de mascotas de Oregon, EEUU. Aquellas hembras que daban lugar a progenie sana fueron utilizadas para generar la línea cruzándolas con machos no seleccionados.
 - AB/TU: Peces provenientes de una tienda de mascota de Tübingen, Alemania, fueron mantenidos por 6 años en un laboratorio acumulando mutaciones recesivas. Estos peces fueron cruzados con peces AB, y aquellas cruza que dieron lugar a embriones sin fenotipos recesivos originaron la línea AB/TU.
 - Gra: Línea que se originó en nuestro acuario en el año 2005 a partir de peces provenientes de una tienda de peces de Rosario, mantenidos de forma endogámica. Su fundamental característica es que son robustos y más resistentes a enfermedades que las dos líneas salvajes antes mencionadas.
- Mutante:
 - *dicer1^{sa9205}*: Línea generada por el Proyecto de Mutaciones de Pez Cebra (*Zebrafish Mutation Project, ZMF*) en el Wellcome Trust Sanger Institute, Reino Unido, a partir de embriones AB. Una mutación puntual en el exón 9 del gen *dicer1* produce una proteína trunca inactiva. Peces adultos heterocigotas son mantenidos en el acuario debido a que los homocigotas son letales.

3.2.3 Obtención de embriones de pez cebra

Para obtener los embriones, aquellos adultos seleccionados para cruce fueron mantenidos en acuarios a 28,5°C durante la noche y separados los machos de las hembras, para estimular el comportamiento de apareamiento. A la mañana siguiente, se juntaron hembras y machos en una canasta en una proporción 4 a 3, respectivamente. Las canastas permitían que los ovocitos caigan al fondo del acuario, pero que los adultos no los puedan alcanzar, evitando que los coman, acción que en la naturaleza cumple la función de regular la superpoblación. En los casos de líneas mutantes, el procedimiento se llevó a cabo en tanques de cruce individuales, juntando sólo un macho con una hembra.

Las canastas contenían además elementos que simulan el ambiente natural para estimular el cortejo, como ser musgo y esferas de vidrio que aparentan piedras, además de disminuir el nivel del agua. Una vez que los ovocitos se depositaron en el fondo, fueron recolectados por succión y lavados con agua de ósmosis.

Los embriones se colocaron en placas de Petri con agua suplementada con Azul de Metileno 0,00001% (p/v) para evitar la contaminación fúngica. Los embriones fueron incubados en estufa a 23, 28 o 33°C. La clasificación de los estadios se hizo según su desarrollo morfológico de acuerdo a lo estipulado por Kimmel y col. (1995). Las observaciones de los embriones se realizó utilizando una lupa binocular Nikon SMZ-1.

3.2.4 Microinyección de embriones de pez cebra

Para realizar las microinyecciones en embriones de pez cebra se utilizaron tubos capilares de 10 cm de longitud, con un diámetro interno de 0,69 mm y externo de 1,2 mm (Sutter instruments, USA). Dichos capilares, al ser calentados en su punto medio y estirados (Narishige PC-10), dan lugar a dos agujas. Las mismas fueron cargadas con la solución a microinyectar con puntas descartables Eppendorf GELoading 0,5- 20 µl. Las microinyecciones se realizaron con un aparato dirigido por aire comprimido (MPPI-2 Pressure Injector, Applied scientific Instrumentation; Eugene, OR, USA), con la ayuda de una lupa Nikon SMZ-1. Los embriones fueron inyectados en el estadio de una célula en el vitelo, inmediatamente debajo de la célula embrionaria, con un volumen de aproximadamente 5 nL.

3.2.5 Morpholinos

El morpholino Dicer1-MO posee la secuencia: CTGTAGGCCAGCCATGCCTTAGAGAC (Gene Tools, Philomath, OR, USA) y actúa inhibiendo la traducción del ARNm para la enzima Dicer1, uniéndose por complementariedad de bases a la secuencia de inicio de la traducción. Los embriones microinyectados con este morpholino se los llamó **DicMO**. Como control, se utilizó el morpholino Dicer1-ctrlMO con la secuencia CTCTAGGCCIGCCATCCCTTAGIGAC, que posee cuatro bases diferentes al Dicer1-MO (subrayadas), impidiendo el apareamiento con el ARNm del gen y en consecuencia, no se produce el

silenciamiento del mismo. Los embriones microinyectados con este morpholino fueron llamados **DicMOctrl**.

Los morpholinos fueron inyectados en una concentración de 1µM, en una solución que contenía KCl 200mM para igualar la osmolaridad del vitelo y llevado a volumen final con agua ultrapura calidad MiliQ (Millipore Corporation, USA).

3.2.6 Decorionado

Debido que el corion que envuelve a los embriones puede interferir con múltiples técnicas, se removió de forma mecánica. Para esto se utilizaron agujas metálicas para jeringa de 30G para sujetar y romper el corion, liberando el embrión al medio. Los embriones de estadios previos a la etapa de segmentación son muy frágiles y con un envoltorio más rígido, por lo que requirieron mayor cuidado, y cuando el experimento lo permitió, fueron fijados en PFA 4% (p/v) en PBS 1x (como se explicará más adelante) previo al decorionado.

En los casos donde los embriones fuesen destinados a extracción de ARN, una vez decorionados fueron depositados en tubos Eppendorf de 1,5mL, se les extrajo toda el agua y fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

3.2.7 Fijación de embriones

Algunas técnicas (hibridación *in situ* y Tinción de Alcian Blue) requieren que los embriones se encuentren fijados para poder ser realizadas. Esto se logró creciendo los embriones hasta los estadios necesarios y luego incubándolos en PFA 4% (p/v) en PBS 1x durante toda la noche a 4°C. Luego, se realizaron 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con PBST 1x (PBS 1x con Tween20 0,1% (v/v)) y se utilizaron inmediatamente o se guardaron a -20°C en metanol 100% (v/v) hasta su uso.

3.3 Tinción de Acian Blue

3.3.1 Tinción

Larvas fijadas de 4 dpf fueron sometidas a 3 lavados de 5 minutos con buffer PBST 1x y posteriormente a una incubación en solución de blanqueo AB por 5-20

minutos, hasta lograr la decoloración total de las mismas. Luego, se las lavó tres veces con PBST 1x por 5 minutos, y se incubó con solución de Alcian Blue durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos con una solución que contiene HCl 1% (v/v) y Etanol 70% (v/v). Finalmente, se lavaron tres veces por 5 minutos con solución de KOH 0,5% (p/v) y Glicerol 50% (v/v), y se almacenaron en esta misma solución a 4°C hasta su análisis.

Todos los lavados e incubaciones (salvo la solución de blanqueo) fueron realizados en agitación suave.

Para observar y fotografiar las larvas se utilizó una lupa estereoscópica Olympus MVX10 y una cámara digital Olympus (C-60 ZOOM, 6,1 Mpix; 3x zoom óptico + 4x zoom digital). Las larvas fueron depositadas en Glicerol 80% (v/v), ubicándolas con agujas de 30G de forma de obtener imágenes ventrales.

3.3.2 Análisis de las imágenes

Una vez fotografiadas las larvas, se procesaron las imágenes con el *software* ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Utilizando un *plug-in* personalizado se realizaron las medidas de los siguientes parámetros:

- Longitud de los cartílagos de Meckel (LM)
- Área de Meckel (AM)
- Ángulo formado por los cartílagos de Meckel (AnM)
- Longitud de los cartílagos ceratohiales (CH)
- Ángulo formado por los cartílagos ceratohiales (AnCh)
- Longitud de los cartílagos palatocuadrados (PC)
- Distancia entre los ceratohiales y las aletas pectorales (DCh)
- Distancia cranial, desde el cartílago de Meckel a las aletas pectorales (DCr)

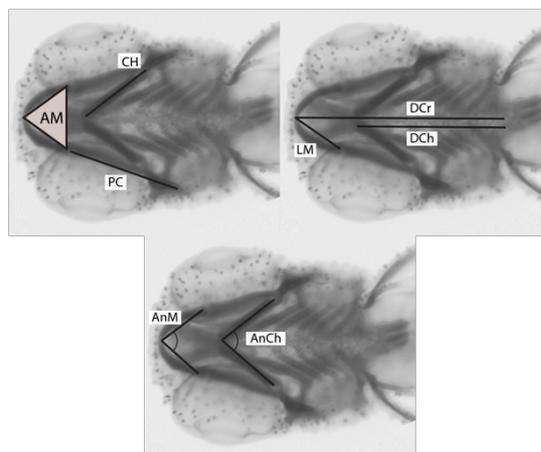


Figura 3.1 - Parámetros analizados. AM: Área de Meckel; PC: Longitud Palatocuadao; CH: Longitud Ceratohial; LM: Longitud de Meckel; DCr: Distancia Cranial; DCh: Distancia Ceratohial; AnM: Ángulo de Meckel; AnCh: Ángulo Ceratohial

3.4 Clonado

3.4.1 Cepas

La cepa de *E. coli* DH5 α *recA1 endA1 ϕ 80dlacZ58(M15)* se utilizó para el clonado de los constructos.

3.4.2 Plásmidos

Los fragmentos de la región 3'UTR de *sox9b* y la sonda de hibridación *in situ* de dicho gen fueron clonados en el plásmido pGEM-T-Easy (Promega) (Figura 3.2-A).

El plásmido pSP64T-1MYC-EGFP (Figura 3.2-B), el cual contiene el promotor SP6 para transcripción *in vitro* y el gen reportero eGFP fue utilizado para generar las fusiones eGFP-3'UTR*sox9b*.

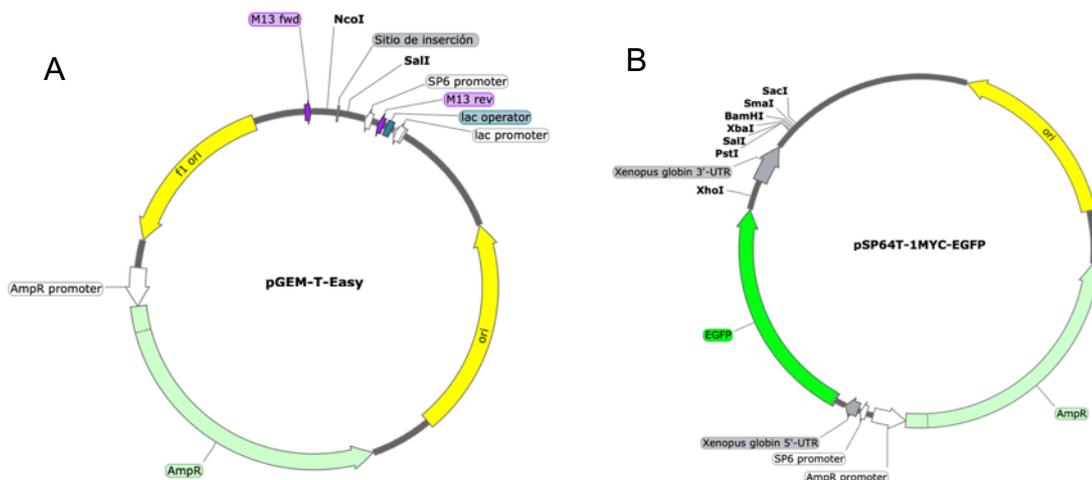


Figura 3.2 - Plásmidos utilizados con sus principales elementos. A: pGEM-T-Easy; B: pSP64T-1MYC-EGFP.

3.4.3 Extracción de ADN genómico de *Danio rerio*

Para realizar la extracción de ADN genómico, un ejemplar adulto de pez cebra se sacrificó con exceso de Tricaina (0,1% (p/v)) y se lo procesó con mortero y nitrógeno líquido hasta lograr un fino polvo. Luego, dicho polvo se resuspendió en 5 mL de solución de digestión (Tris-HCl pH=8 10mM, SDS 1% (p/v), EDTA 5mM, Proteinasa-K (Promega) 100 μ g/mL) y se incubó a 37°C por 5 horas en agitación. Posteriormente, se realizaron dos extracciones con 1 volumen de

fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:48:2), centrifugando a 8000g por 8 minutos. Luego, la concentración de NaCl de la fase acuosa se ajustó a 0,3M y se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol, mezclando por inversión y centrifugando inmediatamente a 13300rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con etanol 70% (v/v). El pellet se secó y resuspendió en 1mL de buffer conteniendo Tris-HCl pH=8 10mM y EDTA 1mM. Luego, se agregó NaCl a concentración final de 100mM y se incubó con Ribonucleasa-A a 37°C por 3 horas, seguido de una incubación a 70°C por 10 minutos. El ADN obtenido se guardó a -20°C para su posterior uso.

3.4.4 Amplificación de ADN

Para la amplificación inicial de los fragmentos de la región 3'UTR de *sox9b* se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en distintas condiciones, variando las temperaturas de anillado, las concentraciones de Mg²⁺, el origen del ADN molde y la adición de dimetilsulfóxido (DMSO). Las variaciones de prueba de la PCR se especifican en una tabla en la sección 4.3.1 de resultados. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes finales de 25 o 50µL. La mezcla de reacción final consiste en:

Protocolo 1	
Buffer10x	1x
Mg ²⁺	2,5mM
dNTPs	300µM
Oligos	200nM c/u
Taq polimerasa	3U/50µL
ADN molde	300ng/50µL
DMSO	5% (v/v)

La enzima utilizada fue Taq Pegasus (5U/µL, PB-L Productos Bio-Lógicos), y el Buffer de reacción 10x (PB-L Productos Bio-Lógicos) libre de magnesio. Los dNTPs provienen de Thermo Fisher Scientific. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador IVEMA T18 (IVEMA Argentina), según el siguiente programa:

	Temp (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	5min	
Desnaturalización	94	30s	} x5
Hibridación	55	30s	
Extensión	72	75s	
Desnaturalización	94	30s	} x30
Hibridación	65	30s	
Extensión	72	75s	
Extensión final	72	5min	

Para amplificaciones a partir de ADN plasmídico, se utilizó la siguiente mezcla de reacción, bajo el mismo programa de amplificación:

Protocolo 2	
Buffer10x	1x
Mg ²⁺	2,5mM
dNTPs	300µM
Oligos	200nM c/u
Taq polimerasa	3U
ADN molde	30ng/25µL

Para realizar PCR a partir de colonias de bacterianas, se utilizó la mezcla de reacción anterior, omitiendo el ADN molde y en su lugar se tocó con un palillo estéril la colonia a analizar, y se sumergió el palillo dentro de la mezcla por unos segundos. Se utilizó el mismo programa que en los casos anteriores.

Los oligonucleótidos de ADN utilizados fueron obtenidos en Genbiotech y sus secuencias las siguientes:

3UTRSox9bFwA: CCGCCGctcgagGAGCACACACACACACACATACTTG

3UTRSox9bRvAXbal: CTAGGGTCTAGAGACGTCCTCAATGCAGAA

3UTRSox9RvAXhol: CTAGGGctcgagGACGTCCTCAATGCAGAA

3UTRSox9bFwB: CCGCCGctcgagCTTAGCCACGCCCTGTTAG

3UTRSox9bRvBXbal: CTAGGGTCTAGATGTTGAGGATCTTTCTTTTATTGC

3UTRSox9bRvBXhol: CTAGGGctcgagTGTTGAGGATCTTTCTTTTATTGC

zSox9b-R: CTGGAGAACCCTGCACCGGC

SndSox9bFw: AGCTCAGCAAAACACTCGGC

FoxD3-Fw: ccgctcgagTAATCAAATATTTTTAGACATATATATATAC

FoxD3-Rv: ggcgagctcGGATTGTTTTCATTTATTAACAAA

En letra minúscula se encuentran resaltados los sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *Xho*I y subrayados los sitios para *Xba*I, y en la Figura 3.3 se muestran representadas las regiones de hibridación de los oligonucleótidos dentro del gen *sox9b*.

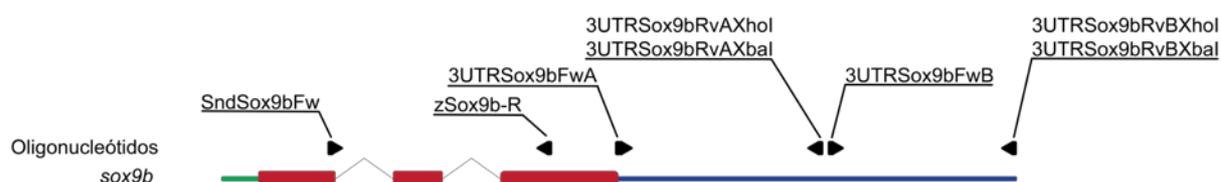


Figura 3.3 - Regiones de hibridación de los distintos oligonucleótidos dentro del gen *sox9b*. En negro se muestran los oligonucleótidos, en verde la región 5'UTR, en rojo la región codificante y en azul la región 3'UTR.

3.4.5 Purificación de productos de PCR

Los productos de reacción fueron analizados por corrida electroforética en geles de agarosa al 1% (p/v) en TAE 1x, utilizando cantidades traza de Gel Green (Biotium) como agente intercalante de bases. La totalidad de la reacción se mezcló con solución de siembra y ubicó en los pocillos del gel. Como marcador de peso molecular se usó Ladder 400 pb (PB-L Productos Bio-Lógicos). Las bandas con el peso molecular esperado se purificaron empleando un kit comercial (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega).

La determinación de la concentración y pureza de ADN (productos de PCR purificados, plásmidos o productos de corte por enzima de restricción) se realizó en un espectrofotómetro Biochrom NanoVue Plus (Holliston, MA, USA).

3.4.6 Reacciones de restricción y tratamiento con Fosfatasa alcalina.

Distintas enzimas de restricción se usaron para llevar a cabo los clonados, subclonados y para determinar la orientación de los insertos en los plásmidos. El protocolo utilizado fue el siguiente:

	Vol (μL)
Buffer10x	4
H ₂ O	25
Enzima 10U/ μL	1
ADN	10

Las reacciones se incubaron a 37°C durante 3h. El Buffer utilizado dependió de la enzima de restricción. Para *XhoI*, *NcoI* y *SaI* se utilizó el Buffer D (Promega), con agregado de 0,5 μL de BSA; para la enzima *XbaI* el buffer *Tango* (Thermo Fisher Scientific).

Las reacciones de fosfatasa alcalina se realizaron según el siguiente protocolo:

	Vol (μL)
Buffer10x	2
Enzima 10U/ μL	1
Plásmido	20

La enzima es de Promega y los 20 μL de plásmido corresponden al volumen de elusión obtenido a partir de la purificación realizada con el kit comercial.

3.4.7 Reacción de ligación.

Los fragmentos de ADN purificados fueron ligados en los distintos vectores en las siguientes condiciones:

pGEM-T Easy:

	Vol(μL)	Cantidad final, en 10 μL
Buffer T4 ADN Ligasa 2x	5	1x
T4 ADN Ligasa 3U/ μL	1	3U
pGEM-T-Easy	1	100ng
Inserto	3	30-200ng

pSP64T-1MYC-EGFP:

	Vol (μL)	Cantidad final, en 40 μL
Buffer T4 ADN Ligasa 10x	4	1x
T4 ADN Ligasa 3U/ μL	2	6U
pSP64T-1MYC-EGFP	15	165ng
Inserto	20	175ng

Las reacciones fueron incubadas toda la noche a 4°C.

3.4.8 Transformación bacteriana

Una vez realizadas las reacciones de ligación, se procedió a transformar células competentes químicas pertenecientes a la cepa *E. coli* DH5 α con los plásmidos ligados. Se mezclaron 100 μ L de dichas células con la reacción de ligación (10 μ L para el plásmido pGEM-T Easy, y 20 μ L para pSP64T-1MYC-EGFP) y se incubaron durante 30 minutos en hielo, 90 segundos a 42°C y 5 minutos en hielo. Inmediatamente, se agregó 1mL de LB líquido y se dejó crecer en estufa a 37°C por 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaron 100 μ L y se sembraron con espátula de Drigalsky en placas de Petri con LB Agar, suplementado con Ampicilina (Amp) 100 μ g/mL como método de selección (ambos plásmidos contienen el gen de resistencia al antibiótico). El restante de la mezcla de transformación fue centrifugado 8 minutos a 4000rpm, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 150 μ L de LB líquido y se sembró con Drigalsky en otra placa de LB Agar Amp. Las placas fueron incubadas durante la noche a 37°C. El plásmido pGEM-T Easy cuenta con el sistema de selección de colonias recombinantes Blancas-Azules, al contener el sitio de múltiple clonado dentro de la secuencia del péptido- α de la enzima β -Galactosidasa. Debido a esto, en los casos donde este plásmido fue utilizado, se suplementó el LB-Agar con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, concentración final de 200 μ g/mL) e IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido concentración final de 0,5mM).

Se seleccionaron, siempre que fuera posible, al menos 10 colonias aisladas para analizar por PCR, según el protocolo previamente mencionado.

Para obtener soluciones de plásmido purificado, se realizaron cultivos a partir de los repiques de colonias provenientes de las placas de transformación que hayan dado resultados positivos en los análisis por PCR. Para esto, se utilizaron cultivos de 2mL de LB líquido con Amp 100 μ g/mL, incubados durante la noche a 37°C. Posteriormente, los plásmidos fueron purificados utilizando un kit comercial siguiendo las instrucciones del mismo (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega).

3.5 Ensayos de RT-qPCR

3.5.1 Extracción de ARN

Las extracciones de ARN total fueron realizadas a partir de embriones tipo silvestre microinyectados con los morpholinos Dicer1-MO o Dicer1-ctrlMO, mediante el uso del reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cada muestra biológica conteniendo 35 embriones se procesó como se detalla a continuación en tubos Eppendorf de 1,5mL.

Los embriones se homogeneizaron en 150µL de TRIzol con una varilla plástica y se realizó una extracción con 30µL de cloroformo. Luego de una centrifugación de 15 minutos a 12000g y 4°C (en centrífuga Eppendorf 5804R), se tomó la fase superior y se precipitó con 75µL de isopropanol y se incubó durante toda la noche a -20°C para favorecer la precipitación del ARN. Al día siguiente, se centrifugó a 12000g por 8 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó con 150µL de etanol 80% (v/v), se secó completamente y se resuspendió en 24µL de agua estéril calidad MiliQ. Posteriormente, se realizó un tratamiento con DNAsa RQI (Promega), agregando 1,2µL de la enzima e incubándolo a 37°C durante 15 minutos. Finalmente, la enzima se inactivó a 70°C por 5 minutos.

Para determinar la concentración y pureza del ARN extraído, se utilizó el espectrofotómetro Biochrom NanoVue Plus (Holliston, MA, USA). Las concentraciones obtenidas se encontraron dentro del rango de 200-600ng/µL. La pureza se consideró aceptable si la relación de las medidas de Absorbancia A_{260}/A_{280} se encontraba dentro del rango 1,7-2,1.

3.5.2 Reacción de retrotranscripción

A partir del ARN extraído de embriones microinyectados, se procedió a la síntesis de ADN copia (ADNc) mediante una reacción de retrotranscripción. Se mezclaron 4µg de ARN total, 2µL de Oligo-dT y agua calidad MiliQ hasta un volumen final de 12,5µL. Se incubó a 65°C por 5 minutos e inmediatamente se llevó a hielo. Se agregaron 4µL de Buffer de reacción 5x (Tris-HCl pH=8,3 250 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 50 mM; Thermo Fisher Scientific), 0,5µL de inhibidor de ribonucleasa RiboLock (40U/µL; Thermo Fisher Scientific), 2µL de mezcla de dNTPs

(10mM de cada uno) y 1µL de enzima RevertAid (200U/µL; Thermo Fisher Scientific). La reacción se dejó cursar 1 h a 42°C, finalizando con 10 minutos a 72°C de inactivación enzimática. El ADNc fue almacenado a -20°C.

3.5.3 Reacción de retrotranscripción y poliadenilación para microARN

Para realizar mediciones de microARN por PCR cuantitativa es necesario someter a una reacción de poliadenilación al ARN total extraído. Esta reacción se realiza en conjunto con la retrotranscripción. Las mezclas de reacción contienen Buffer PolyA 1x (New England BioLabs), mezcla de dNTPs 0,1mM de cada uno, RT-primer 1µM, ATP 0,5mM, RT RevertAid 200U (Thermo Fisher Scientific), Poly(A) Polimerasa 2,5U (New England BioLabs) y 500ng de ARN, llevado a volumen final 15µL con agua calidad MiliQ estéril. La reacción se incubó 1 h a 42°C, seguido de 5 minutos a 95°C. Finalmente, el ADNc fue almacenado a -20°C. El oligonucleótido RT-primer tiene la siguiente secuencia: CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTVN (V=A,C o G; N=A,C,T o G).

3.5.4 PCR cuantitativa (qPCR)

Para las reacciones de qPCR se utilizó como molde una dilución 1/10 del ADNc proveniente de las retrotranscripciones. Cada reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler ep Realplex2 o Realplex4 (Eppendorf), en volumen final de 20µL, según el siguiente protocolo:

	Vol(µL)
Buffer10x	2µL
Mg ²⁺ 50mM	1µL
dNTPs 10µM c/u	0,4µL
Mix Oligos 10µM c/u	0,4µL
Mix Sybr	1µL
Taq 5U/µL	0,1µL
ADNc	2µL
Agua MiliQ	13µL

El Buffer10x contiene Tris-HCl pH=8,4 200mM y KCl 500mM, la enzima *Platinum Taq Polimerase* proviene de Invitrogen, la solución Mix Sybr contiene 500µL DMSO, 100µL Buffer10x, 400µl agua calidad MiliQ y 1µL Sybr Green (Thermo Fisher Scientific). El programa utilizado fue el siguiente:

	Temp (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	10min	
Desnaturalización	95	30s	} x40
Hibridación	58	30s	
Extensión	68	20s	
Curva de desnaturalización			

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes analizados son los siguientes (Tang et al., 2007):

sox9b:

zSox9b-F: GGACATCGGCGAGCTGAGCA

zSox9b-R: CTGGAGAACCCTGCACCGGC

col2a1:

Col2a1a-F: CCGGTGCGGCTTGGTCCATC

Col2a1a-R: CCGAGCAGGCTGTGTGTGTCC

miR145:

miR145-F: GCAGGTCCAGTTTCCCAG

miR145-R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTGGGATT

rpl13:

Rpl13-F: TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC

Rpl13-R: AGACGCACAATCTTGAGAGCAG

ef1 α :

Ef1a-F: CTGGAGGCCAGCTCAAACAT

Ef1a-R: ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC

Los resultados fueron procesados con el *software* *qBase* versión 2.2 (Biogazelle, Bélgica).

3.6 Hibridación *in situ* en embriones enteros (WISH, de sus siglas en inglés)

3.6.1 Síntesis de la sonda

Dos sondas para el gen *sox9b* fueron sintetizadas. Los plásmidos fueron linealizados con las enzimas de restricción *Sall* en el caso de SNDsox9bUTR y *NcoI* para SNDsox9bORF siguiendo el protocolo antes descrito. Los productos de

reacción se separaron en gel de agarosa al 0,8% (p/v) en TAE 1x y Gel Green, y se purificaron con el kit comercial antes mencionado. El protocolo utilizado para la síntesis de las sondas fue el siguiente:

ADN lineal	5,5µL (1-2µg)
NTPmixDig	4µL
ARNpol (T7 o SP6)	2µL
RiboLock	0,5µL
H ₂ O MiliQ	4µL
Buffer5x	4µL

La NTPmixDig contiene 2µL de una mezcla de los nucleótidos trifosfato adenina, citosina y guanina a concentración 10mM cada uno, 1,7µL del nucleótido trifosfato uracilo (Thermo Fisher Scientific) y 0,7µL de Digoxigenin-11-UTP (Roche). Las enzimas T7 y SP6 son de Thermo Fisher Scientific. La reacción se incubó 3 horas a 37°C. Posteriormente se separó 1µL de la mezcla y el resto fue tratada con DNAsa RQI (Promega) por 30 minutos a 37°C, para eliminar el molde de reacción. La concentración de la sonda se estimó por corrida electroforética en gel de agarosa 1% (p/v) en TAE 1x.

Para purificar la sonda, se la incubó con LiCl 0,2M y etanol 80% (v/v) a -20°C durante toda la noche. Luego, se centrifugó a 20000g por 30 minutos a 4°C en centrifuga Eppendorf 5804R. El pellet obtenido se lavó con etanol 80% (v/v), se centrifugó a 20000g por 15 minutos a 4°C y se resuspendió en 50µL de agua calidad MiliQ y 950µL de Buffer de hibridación.

3.6.2 Protocolo de hibridación *in situ*

El protocolo de hibridación *in situ* consiste de múltiples incubaciones agrupadas en distintas etapas: Rehidratación, Blanqueamiento (solo en caso de embriones de más de 24hpf), Digestión, Prehibridación, Hibridación, Lavados 1, Bloqueo, Anticuerpo, Lavados 2, Tinción y Lavados 3. Se partió de embriones previamente fijados y almacenados en metanol 100% (v/v). Las sucesivas incubaciones se realizaron en tubos Eppendorf de 1,5mL, conteniendo 10-15 embriones por tubo y 1mL de la solución correspondiente. A partir de la etapa de Tinción las muestras fueron transferidas a una placa de 24 pocillos utilizando 500µL de solución.

Etapa	Incubación	Tiempo	Temperatura
Rehidratación	Metanol 75% (v/v) PBST 1x	5min	20-25°C
	Metanol 50% (v/v) PBST 1x	5min	20-25°C
	Metanol 25% (v/v) PBST 1x	5min	20-25°C
	PBST 1x	2x5min	20-25°C
Blanqueamiento	Solución de Blanqueo WISH	variable	20-25°C
	PBST 1x	3x5min	20-25°C
Digestión	Proteinasa K 10µg/mL	variable	20-25°C
	PBST 1x	5min	20-25°C
	PFA 4% (p/v) en PBS 1x	20min	20-25°C
	PBST 1x	5x5min	20-25°C
Prehibridación	Solución de hibridación	10min	55-65°C
	Solución de hibridación	4h	55-65°C
Hibridación	(Desnaturalizar sonda)	10min	55-65°C
	Sonda 1x	16h	55-65°C
Lavados 1	Formamida 50% (v/v) en SSC 2x	10min	55-65°C
	Formamida 25% (v/v) en SSC 2x	10min	55-65°C
	SSC 2x	10min	55-65°C
	SSC 0,2x	2x30min	55-65°C
	PBST 1x	2x5min	20-25°C
Bloqueo	Solución de Bloqueo	4h	20-25°C
Anticuerpo	Anticuerpo Anti-Dig (Roche) 1:2000	16h	4°C
Lavados 2	PBST 1x	6x5min	20-25°C
	Solución de Tinción	3x5min	20-25°C
Tinción	NBT 175µL/mL, BCIP 175µL/mL		
	Solución de Tinción	variable	20-25°C
Lavados 3	PBST 1x	4x5min	20-25°C
	Metanol 100% (v/v)	10min	20-25°C
	PBST 1x	3x5min	20-25°C
	PFA 4% en PBS 1x	20min	20-25°C
	PBST 1x	3x5min	20-25°C
	Glicerol 50% (v/v) en PBS 1x	5min	20-25°C
	Glicerol 100% (v/v)	almacenar	4°C

Una vez finalizado el protocolo, las muestras fueron analizadas y fotografiadas con lupa estereoscópica Olympus MVX10 y cámara digital Olympus. Se ubicaron los embriones en placas de Petri con solución de Glicerol 100% (v/v), y con ayuda de dos agujas 30G, se los orientó de forma tal de obtener imágenes laterales y dorsales.

3.7 Herramientas informáticas

Para el procesamiento de las imágenes de los experimentos de Alcian Blue se utilizó el programa ImageJ (sección 3.3.2).

El análisis de los resultados provenientes de las qPCR se realizó con el *software* qBase v2.2 (sección 3.5.3).

Para los análisis *in silico* y diseños de oligonucleótidos, se utilizaron las herramientas de TargetScanFish (targetscan.org/fish_62/), Primer3 (primer3.ut.ee), UCSC Genome Browser (genome.ucsc.edu) y NEBcutter (nc2.neb.com/NEBcutter2/).

Para el análisis de los resultados de secuenciación se utilizó el programa SnapGeneViewer (GSL Biotech LLC).

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software SigmaStat, dentro del SigmaPlot v11.0 (Systat Software Corporation). Se analizó por t de Student bicaudal o por test no paramétrico de Mann-Whitney, dependiendo del experimento. Se consideró diferencia significativa cuando su probabilidad asociada fue menor a 0,05 ($p < 0,05$).

4 Resultados

4.1 Morfología de los peces depletados de *dicer1*

La mutación *dicer1*^{sa9205} produce una proteína trunca de 459 aminoácidos carente de la mayoría de los motivos conservados. En trabajos previos del laboratorio, se observó que embriones heterocigotas (*dicer1*^{+/-}) son fenotípicamente indistinguibles de los homocigota tipo salvaje (*dicer1*^{+/+}), mostrando un desarrollo embrionario normal (Weiner et al., 2019). Embriones homocigotas mutantes (*dicer1*^{-/-}) presentaron un desarrollo normal hasta las 48hpf. Sin embargo, en estadios posteriores se observaron malformaciones en ciertas estructuras, como ojos de menor tamaño y defectos en la cabeza y el encéfalo. La mayoría de las larvas *dicer1*^{-/-} murieron a los 10dpf y ninguna sobrevivió más de dos semanas (Weiner et al., 2019). Resultados similares han sido reportados para tres alelos mutantes distintos (Wienholds et al., 2003). A su vez, aquellos embriones tipo salvaje microinyectados con el morpholino Dicer1-MO (**DicMO**) presentaron fenotipos más severos, sugiriendo que la presencia del ARNm de origen materno para *dicer1* cumple una función importante durante el desarrollo embrionario temprano. Las Figuras 4.1, 4.2 y 4.3 muestran embriones de 32, 48 y 72 hpf respectivamente, permitiendo comparar los fenotipos en vistas laterales de embriones tipo salvaje (A), homocigotas mutantes *dicer1*^{sa9205} (B) y **DicMO** (C).

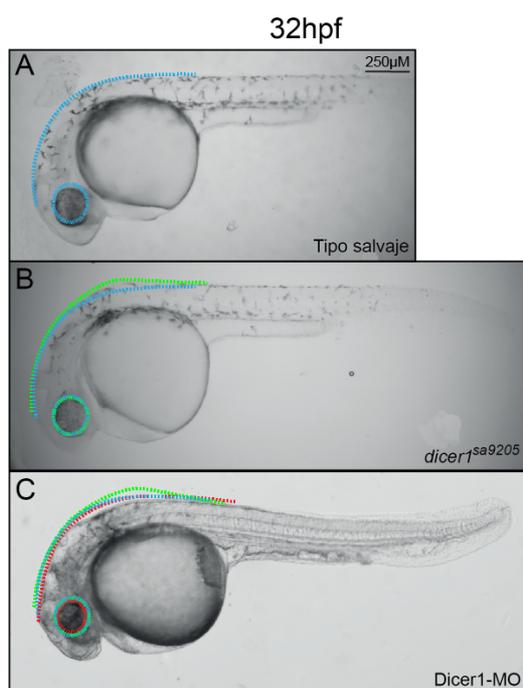


Figura 4.1 - Efecto de la alteración de los niveles de expresión de *Dicer1* sobre el desarrollo embrionario de *D. rerio*. Vista lateral de embriones de 32hpf. A: tipo salvaje control. B: homocigota mutante *dicer1*^{sa9205}. C: tipo salvaje microinyectado con *Dicer1*-MO. Región cefálica hacia la izquierda. Las líneas y óvalos azules (tipo salvaje), verdes (homocigota mutante *dicer1*) y rojos (**DicMo**) señalan las principales diferencias observadas entre los diferentes grupos de embriones. Barra de referencia en A para A-C: 250µM.

48hpf

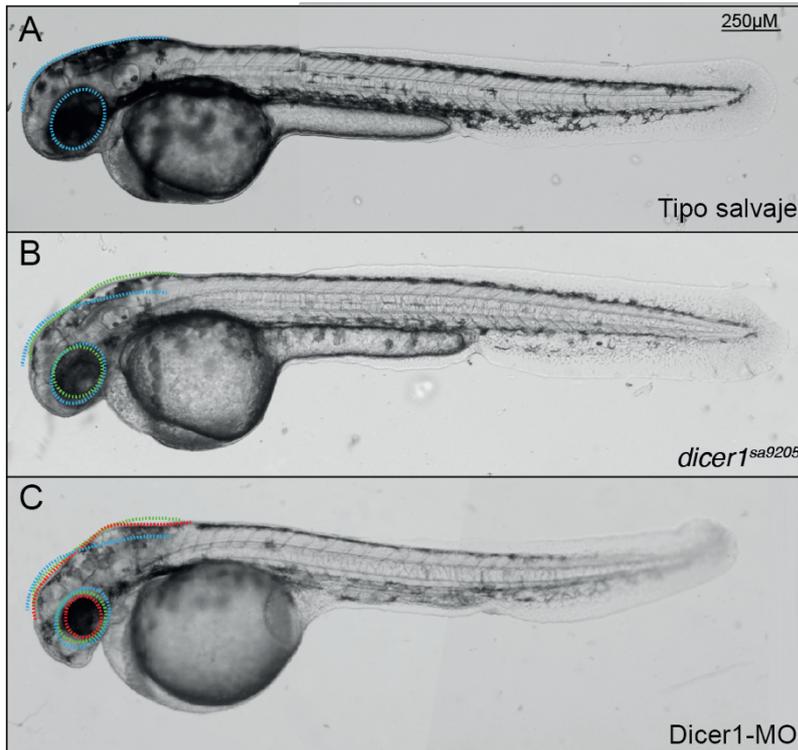


Figura 4.2 - Efecto de la alteración de los niveles de expresión de *Dicer1* sobre el desarrollo embrionario de *D. rerio*. Vista lateral de embriones de 48hpf. A: tipo salvaje control. B: homocigota mutante *dicer1^{sa9205}*. C: tipo salvaje microinyectado con *Dicer1*-MO. Región cefálica hacia la izquierda. Las líneas y óvalos azules (tipo salvaje), verdes (homocigota mutante *dicer1*) y rojos (**DicMo**) señalan las principales diferencias observadas entre los diferentes grupos de embriones. Barra de referencia en A para A-C: 250µM.

72hpf

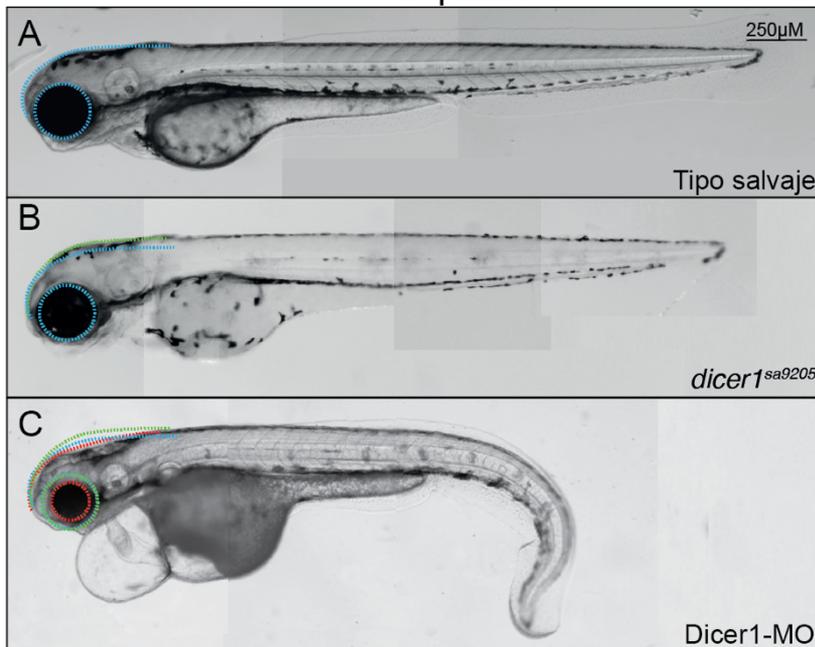


Figura 4.3 – Efecto de la alteración de los niveles de expresión de *Dicer1* sobre el desarrollo embrionario de *D. rerio*. Vista lateral de embriones de 72hpf. A: tipo salvaje control. B: homocigota mutante *dicer1^{sa9205}*. C: tipo salvaje microinyectado con *Dicer1*-MO. Región cefálica hacia la izquierda. Las líneas y óvalos azules (tipo salvaje), verdes (homocigota mutante *dicer1*) y rojos (**DicMo**) señalan las principales diferencias observadas entre los diferentes grupos de embriones. Barra de referencia en A para A-C: 250µM.

4.2 Estudio de las estructuras craneofaciales en larvas depletadas de Dicer1

Con el objetivo de analizar y cuantificar malformaciones en las estructuras craneofaciales, cuatro diferentes grupos de larvas de 4dpf fueron teñidas con Alcian Blue:

- tipo salvaje sin microinyectar
- tipo salvaje microinyectados con Dicer1-ctrlMO (**DicMOctrl**)
- tipo salvaje microinyectados con Dicer1-MO (**DicMO**)
- homocigotas mutantes *dicer1*^{sa9205}

La tinción de Alcian Blue se utiliza para visualizar cartílagos ya que el colorante catiónico polivalente interacciona con los glucosaminoglucanos de carga negativa de la matriz extracelular de dichos tejidos. Con ayuda de un procesador de imágenes se midió la longitud de distintos cartílagos craneofaciales, la distancia entre las aletas pectorales y los cartílagos de Meckel y Ceratohial y el área de Meckel, definido como el triángulo formado por dichos cartílagos (sección 3.3.2). Debido a que las larvas **DicMOctrl** mostraron los mismos fenotipos que las tipo salvaje sin microinyectar, sólo se muestran los resultados para estas últimas.

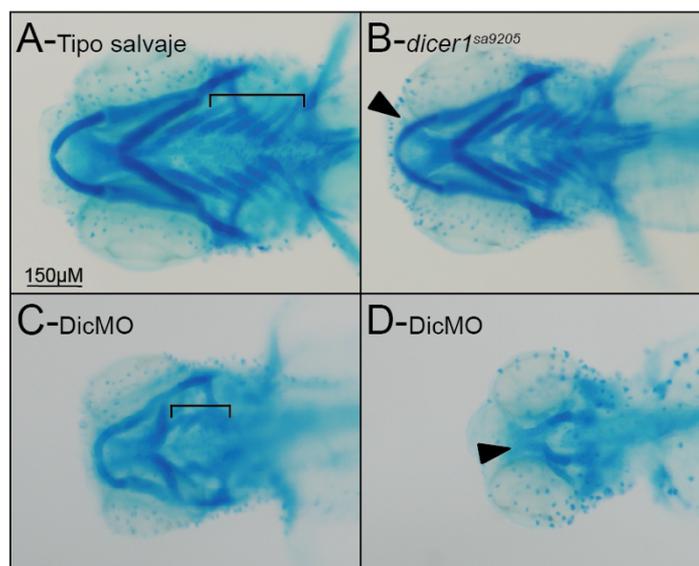


Figura 4.4 - Efecto de la alteración de la expresión de Dicer1 sobre las estructuras craneofaciales. Vistas ventrales de: A-Larva tipo salvaje; B-Larva homocigota mutante *dicer1*^{sa9205}; C y D- Larvas **DicMO**, con distintos grados de severidad. Región cefálica hacia la izquierda. Corchetes: arcos branquiales; punta de flecha: placa etmoidea. Barra de referencia en A para A-D: 150µM

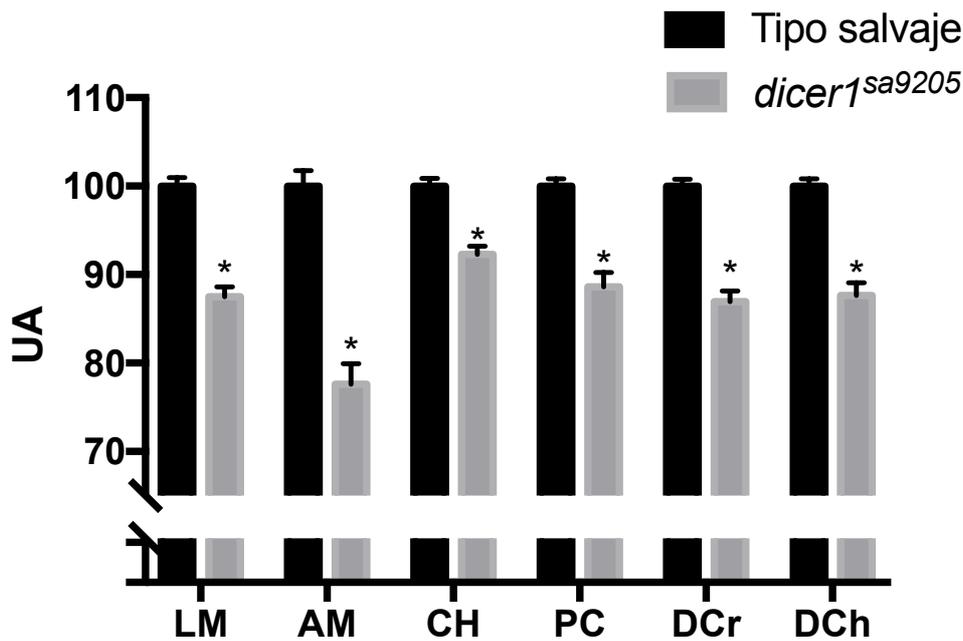


Figura 4.5 - Efecto de la mutación *dicer1^{sa9205}* sobre los parámetros craneofaciales: LM (Longitud del cartílago de Meckel), AM (Área de Meckel), CH (Longitud promedio de cartílagos Ceratohiales), PC (Longitud promedio de cartílagos Palatocadrado), DCr (Distancia Craneal) y DCh (Distancia entre Ceratohiales y aletas pectorales). Asteriscos: diferencias significativas con respecto al tipo salvaje, según t-Student bicaudal, $P < 0,001$

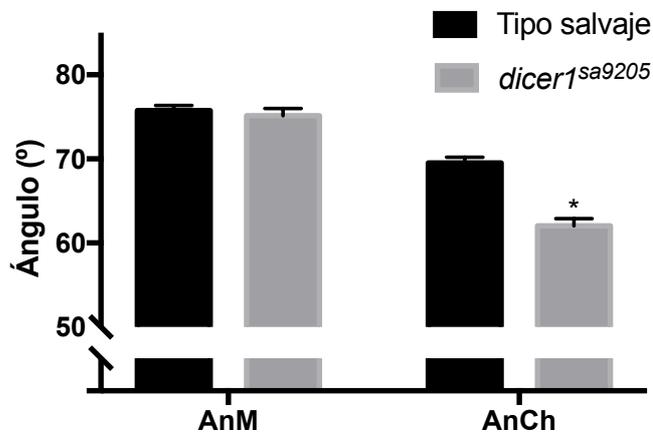


Figura 4.6 - Efecto de la mutación *dicer1^{sa9205}* sobre los parámetros craneofaciales: AnM (Ángulo de Meckel) y AnCh (Ángulo formado por los Ceratohiales). Asterisco: diferencias significativas con respecto al tipo salvaje, según t-Student bicaudal, $P < 0,001$

Como puede observarse en la Figura 4.4, las larvas homocigotas mutantes *dicer1^{sa9205}* al ser comparadas con larvas salvajes presentan un desarrollo alterado de los cartílagos craneofaciales, derivando en una cabeza de menor tamaño y una mandíbula inferior (cartílagos de Meckel) que no logra extenderse correctamente sobre la superior (placa etmoidea, ver punta de flecha en Figura 4.4-B). Esto último se vio reflejado en las mediciones de la distancia craneal y la distancia ceratohial, las cuales disminuyeron en un 10% aproximadamente con respecto a las larvas control

(Figura 4.5: DCr y DCh). Además, el resto de las mediciones explican la reducción aparente del tamaño de la cabeza en las larvas *dicer1^{sa9205}*. Las longitudes de todos los cartílagos analizados se vieron reducidas entre un 10-20% (Figura 4.5: LM, CH y PC), así como el área de Meckel (Figura 4.5: AM). El ángulo formado por los cartílagos ceratohiales también se vio modificado, pero no el ángulo de Meckel (Figura 4.6 AnCh y AnM).

Las larvas **DicMO** mostraron fenotipos más severos y diversos (comparar Figura 4.4-A con C y D). En algunos casos se vio un incorrecto posicionamiento de los cartílagos ceratohiales (formando un ángulo cercano a 180°), una distancia craneal muy reducida y ausencia de algunos arcos branquiales (ver corchetes en Figura 4.4-A y C). Algunos casos más severos no mostraron una correcta formación de los cartílagos de la mandíbula inferior, sólo detectándose algunos pertenecientes a la mandíbula superior como la placa etmoidea (ver flecha Figura 4.4-D). Debido a la ausencia o severa malformación de los cartílagos en estudio en larvas **DicMO**, los parámetros craneofaciales no pudieron ser calculados para llevar a cabo un análisis estadístico.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que una correcta biogénesis de microARNs es necesaria para la formación de las estructuras craneofaciales en pez cebra. Estudios en cultivos celulares de distintas especies mostraron que existe regulación por parte de microARNs sobre genes de diferenciación condrogénica, como por ejemplo miR-145 sobre *SOX9* (condrocitos articulares humanos), miR-199 sobre *Smad1* (células pluripotentes de ratón) y miR-221 sobre *MDM2* (células mesenquimales de pollo) (Dong et al., 2012; D. Kim et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2012). Además, ratones mutantes *Dicer* mostraron severas malformaciones craneofaciales, incluida la ausencia de los huesos derivados de la CN (T. Huang et al., 2010). Por lo tanto, es factible que algo similar ocurra en *D. rerio*, y que al inhibir la maduración de los microARNs se produzca un desbalance general de ciertos factores involucrados en el desarrollo craneofacial resultando en malformaciones de dichas estructuras.

4.3 Análisis de la región 3'UTR de *sox9b*

Uno de los genes reguladores de la condrogénesis en *D. rerio* es el factor transcripcional *sox9b* (Yan et al., 2002). Larvas de pez cebra mutantes en este gen presentan arcos faríngeos y cartílagos craneales reducidos en tamaño. Sox9b es capaz de activar la expresión de genes de la CN, como *sox10*, *foxd3* y *snai1b*, y es necesario para la expresión de *col2a1* en condrocitos (Nakamura et al., 2012; Yan et al., 2005). Por estas razones se decidió estudiar la región 3'UTR de *sox9b in silico*, buscando posibles sitios de unión para microARNs que podrían estar regulando su expresión a nivel post-transcripcional.

El sitio de internet TargetScan se utilizó para la búsqueda de los sitios putativos de unión para microARNs dentro de la región 3'UTR, utilizando secuencias obtenidas de la *Zebrafish genome assembly* *Zv9* (danRer7, RefSeq assembly accession GCF_000002035.4) según Ulitsky y col. (2012). Esta herramienta analiza distintos factores relacionados con el microARN y el entorno en el cual se encuentra el sitio de unión, mostrando los resultados en forma de *Context score*, donde un score más negativo indica un sitio putativo de unión más favorable. En la Figura 4.7 se representan los sitios putativos de unión para microARNs en la región 3'UTR de *sox9b* y en la Tabla 4.1 se detallan las cinco familias de microARNs conservadas con mejor score.

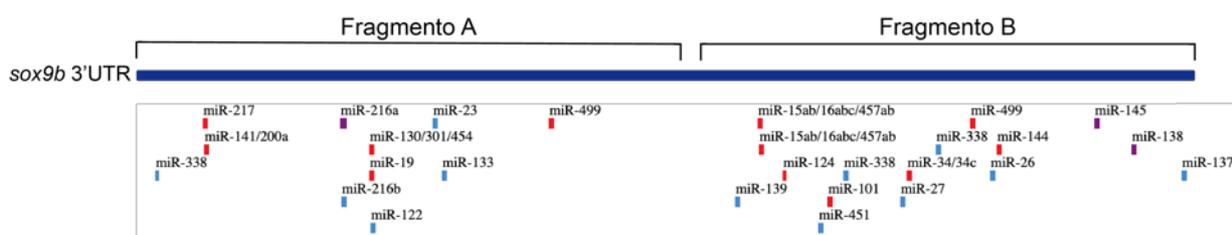


Figura 4.7 - Región 3'UTR de *sox9b* y sus sitios putativos de unión para microARN. Análisis realizado con TargetScanFish. Los microARNs representados son los más conservados dentro de los vertebrados.

miRNA	Sitios				Context score Total
	Total	8mer	7mer-m8	7mer-1A	
miR-138	1	1	0	0	-0,37
miR-338	3	0	0	3	-0,32
miR-145	1	1	0	0	-0,28
miR-499	2	0	2	0	-0,20
miR-34/34c	1	0	1	0	-0,20

Tabla 4.1 - Sitios putativos de unión para microARNs en la región 3'UTR de *sox9b*. Familias de microARN conservadas con mejor score. targetscan.org/fish_62

Entre las familias de microARNs con mejor *score* se encuentra la de miR-138. Estudios recientes sugieren que este microARN está involucrado en la diferenciación neuronal, al promover la transición a células de Schwann (Lin et al., 2018). Otro microARN, el miR-338, estaría involucrado en las etapas de inducción y especificación de la CN (Weiner, 2018). Por otro lado, miR-145 es capaz de regular en células de ratón la expresión de *Sox9* (Banerjee et al., 2016; Yang et al., 2011), como también regular la diferenciación de células del tejido cardíaco (Cordes et al., 2009). En conjunto, estos resultados informados alientan el desarrollo de un análisis experimental para determinar si la región 3'UTR de *sox9b* actuaría como regulador de su expresión durante el desarrollo embrionario de pez cebra.

Como se puede ver en la Figura 4.7, los microARNs se ubican distintivamente en dos grupos dentro de la región 3'UTR. Esto permitió el diseño de un experimento utilizando el gen reportero eGFP para evaluar la posible regulación de *sox9b* por microARNs. La región 3'UTR de *sox9b* posee aproximadamente 2000 pb. Dicha secuencia se dividió en dos fragmentos, uno de 1037pb (Fragmento A) y otro de 942pb (Fragmento B), para poder determinar de forma más precisa aquellas familias de microARN involucradas en su regulación. Estos fragmentos serían clonados corriente abajo de la secuencia de la proteína fluorescente eGFP, los transcritos serían generados utilizando un sistema de transcripción *in vitro* y co-inyectados con los morpholinos Dicer1-MO y Dicer1-ctrlMO. Extractos de proteína y ARN totales de embriones microinyectados serían utilizados para analizar por *Western blot* y RT-qPCR las variaciones en los niveles del reportero eGFP (Figura 4.8). Como control de referencia de las mediciones, se microinyectarían embriones con un ARNm que contiene el gen reportero sin región reguladora 3'UTR. En el caso que exista regulación mediante algún microARN, se observaría una disminución de los niveles de proteína y mensajero de eGFP al co-inyectar con Dicer1-ctrlMO. Dichos niveles deberían restituirse y no se observarían cambios en los niveles del reportero al co-inyectar con Dicer1-MO.

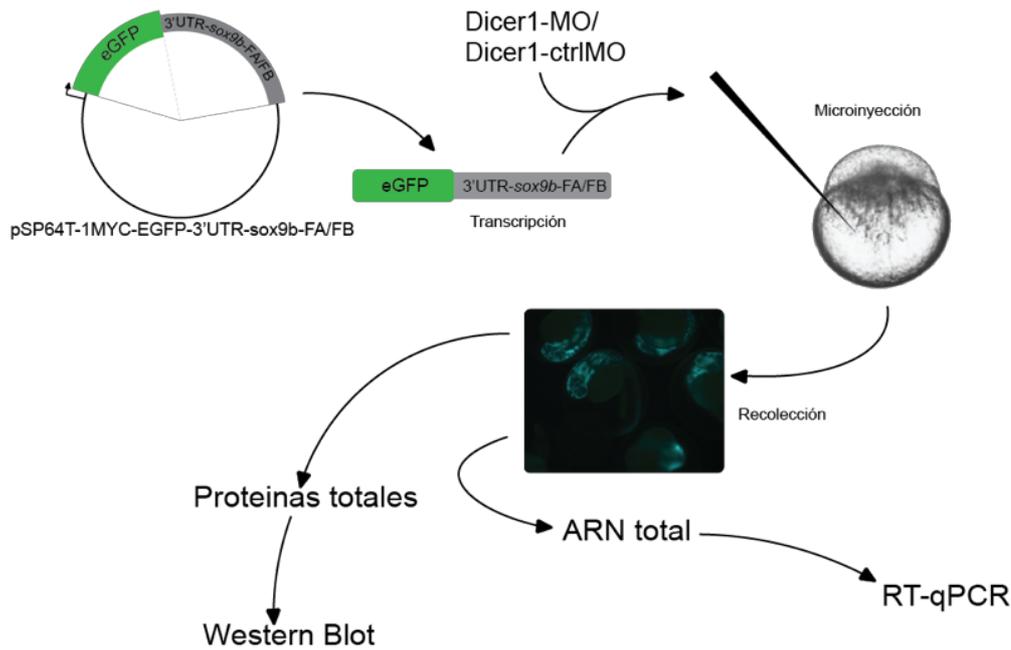


Figura 4.8 – Experimentos con gen reportero eGFP. Primero, se transcriben con el sistema in vitro los mensajeros de fusión eGFP-3'UTR-sox9b. Luego, éstos son co-inyectados con los morpholinos Dicer1-MO o Dicer1-ctrlMO en embriones en el estadio de una célula. Aquellos que presenten fluorescencia al llegar al estadio de 50% epibolia son seleccionados, y su desarrollo continua hasta el estadio necesario para luego realizar extractos de proteína y ARN totales para ensayos de Western Blot y RT-qPCR respectivamente.

4.3.1 Construcción de los plásmidos pGEM-T-Easy-3'UTRsox9b

Múltiples protocolos de PCR fueron llevados a cabo para poder amplificar correctamente los fragmentos A y B. Se hicieron distintas reacciones de prueba, variando la composición de la mezcla de reacción y el programa utilizado, hasta encontrar una condición óptima de amplificación específica para cada fragmento. Las distintas variaciones se detallan a continuación:

- Concentración de Mg^{2+}
 - 0,5mM
 - 1mM
 - 1,5mM
 - 2mM
 - 2,5mM
- Temperatura de anillado
 - 52,9°C
 - 55,4°C
 - 58°C

- 58,5°C
- 60°C
- 61,6°C
- 63,6°C
- En dos etapas: 5 ciclos a 55°C seguidos por 30 ciclos a 60°C
- Molde de ADN
 - ADNc
 - ADN genómico de aleta
 - ADN genómico de ejemplar adulto
- Adición de dimetilsulfóxido (DMSO)

El protocolo más eficiente fue el Protocolo 1 especificado en la sección 3.4.4. Para las reacciones de PCR se utilizaron para el fragmento A los oligonucleótidos 3UTRSox9bFwA y 3UTRSox9bRvAXbaI, y para el fragmento B 3UTRSox9bFwB y 3UTRSox9bRvBXbaI. Estos oligonucleótidos incluyen sitios para las enzimas de restricción *XhoI* (directo) y *XbaI* (reverso). Los productos de la reacción fueron utilizados como molde para una segunda amplificación en las mismas condiciones. Se realizaron corridas electroforéticas en gel de agarosa 1% (p/v) en TAE 1x y Gel Green para evaluar los resultados.

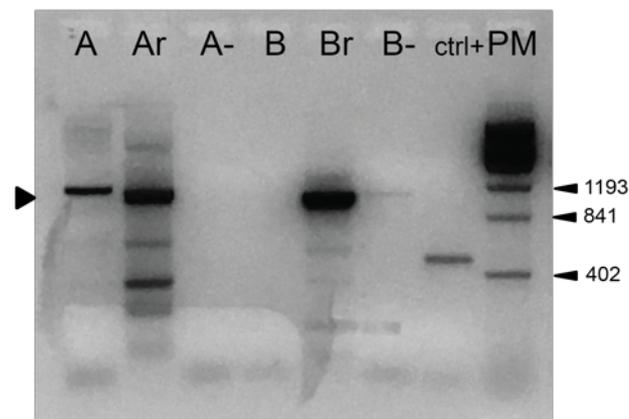


Figura 4.9 - Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) teñido con Gel Green. A, Ar y A-: Amplificación, segunda amplificación y control negativo del fragmento A. B, Br y B-: Amplificación, segunda amplificación y control negativo del fragmento B. ctrl+: control positivo de reacción, con oligonucleótidos FoxD3-Fw y FoxD3-Rv, los cuales hibridan en el gen foxD3 produciendo un fragmento de 500pb. PM: marcador de peso molecular Ladder 400pb

La Figura 4.9 muestra los resultados de las reacciones de amplificación. La punta de flecha indica las bandas de aproximadamente 1000pb correspondientes a cada fragmento. Los productos de amplificación correspondientes fueron purificados mediante el uso del kit comercial y medida su concentración. Los fragmentos fueron ligados en el plásmido pGEM-T-Easy y utilizados para transformar cultivos de *E. coli* DH5 α . Al menos diez colonias blancas de cada fragmento se seleccionaron para ser analizadas por PCR. Los plásmidos de dos colonias positivas para cada fragmento fueron purificados y secuenciados utilizando el oligonucleótido universal M13Fwd por la DNA Sequencing Facility de la University of Maine, Maine, EEUU. Así, se lograron clonar en el plásmido pGEM-T-Easy los fragmentos A y B de la región 3'UTR de *sox9b*, con los sitios de *Xba*I y *Xho*I flanqueantes para luego poder realizar el subclonado en el vector de expresión *in vitro*. Los plásmidos fueron nombrados pGEM-T-Easy-3'UTR-*sox9b*-FA para el fragmento A y pGEM-T-Easy-3'UTR-*sox9b*-FB para el B.

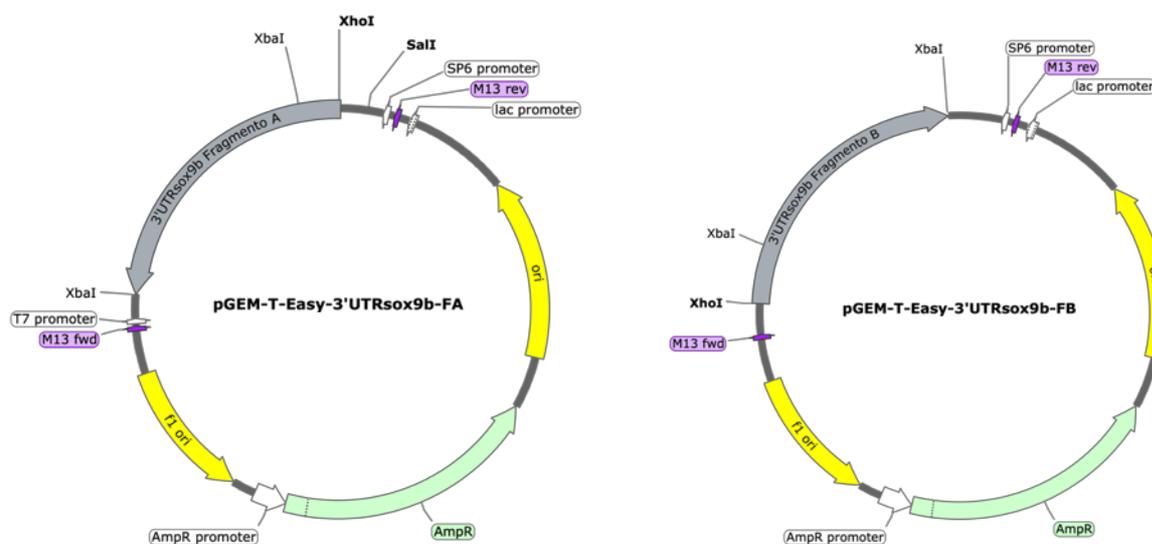


Figura 4.10 - Representación de los fragmentos A (izq) y B (der) clonados en el plásmido pGEM-T-Easy, con sitios de restricción *Xho*I y *Xba*I flanqueantes.

La Figura 4.10 muestra los fragmentos y su orientación dentro del plásmido. También se representaron los sitios de restricción incluidos en los oligonucleótidos para las enzimas *Xho*I y *Xba*I. Como se puede ver, ambos fragmentos contienen además un sitio interno para la enzima *Xba*I, alrededor de los 190pb desde el comienzo. El siguiente subclonado en el plásmido de fusión transcripcional fue planeado utilizando ambas enzimas de restricción. Sin embargo, los sitios internos

para *Xba*I podrían suponer un problema al momento de obtener los fragmentos completos de aproximadamente 1000pb. Para evaluar esto, se sometió a cada plásmido a tratamiento con dicha enzima incubando la reacción a distintos tiempos (20, 40 y 60 minutos). En la Figura 4.11 se observan los resultados de los cortes de cada plásmido con la enzima *Xba*I. Como se puede apreciar, para los tres tiempos de incubación es liberado un fragmento de peso molecular similar al correspondiente para la secuencia comprendida entre ambos sitios de restricción *Xba*I (843pb para el fragmento A y 756pb para el fragmento B, ver Figura 4.11, punta de flecha F). La punta de flecha L señala al plásmido que sufrió dos cortes con la enzima liberando los segmentos previamente mencionados, resultando en un fragmento de ADN de aproximadamente 3200pb. Lamentablemente, no se observa en ningún caso la banda correspondiente a plásmido linealizado (cortado una sola vez por la enzima) que debería correr como un fragmento de 4000pb, el cual sería utilizado para los subclonados.

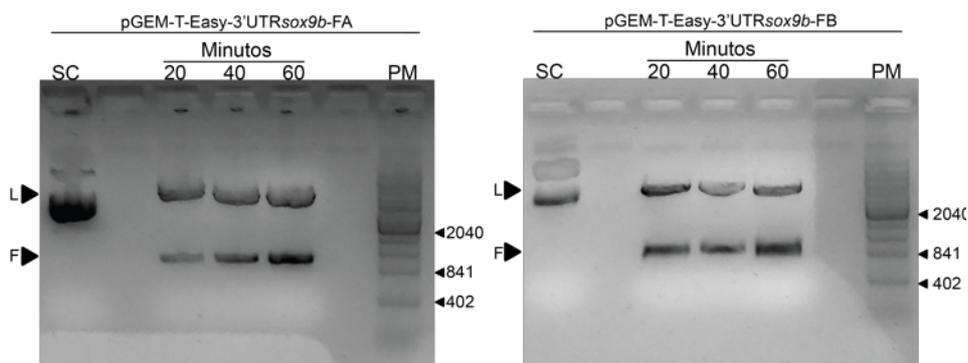


Figura 4.11 - Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de los cortes por enzima de restricción con enzima *Xba*I con distintos tiempos de incubación. Izquierda: Fragmento A; Derecha: Fragmento B. Flechas: L, plásmido linealizado; F, fragmento liberado. SC: plásmido sin tratamiento con enzima de restricción; PM: marcador de peso molecular Ladder 400pb

En base a los resultados anteriores, se decidió cambiar la estrategia de subclonado. Para ello, los fragmentos de interés fueron clonados nuevamente en el vector pGEM-T-Easy utilizando oligonucleótidos que posean el sitio de reconocimiento para la enzima *Xho*I (directo y reverso). Se usaron para su amplificación los cebadores 3UTRSox9bFwA y 3UTRSox9bRvAXhoI para el fragmento A, y 3UTRSox9bFwB y 3UTRSox9bRvBXhoI para el fragmento B. Como molde de ADN se utilizaron los plásmidos pGEM-T-Easy-3'UTR-sox9b-FA y pGEM-T-Easy-3'UTR-sox9b-FB, respectivamente. Las amplificaciones se realizaron con el protocolo 2 (página 25, sección 3.4.4). Los productos de PCR fueron separados por

corrida electroforética en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE 1x y Gel Green, purificados mediante un kit comercial, ligados en el plásmido pGEM-T-Easy y transformados en *E. coli* DH5 α . Nuevamente, diez y ocho colonias blancas para los fragmentos A y B, respectivamente, fueron seleccionadas, analizadas por PCR en colonia (Figura 4.12) y dos clones para el fragmento A y uno para el B fueron purificados para ser secuenciados, confirmando la presencia de los insertos en los plásmidos.

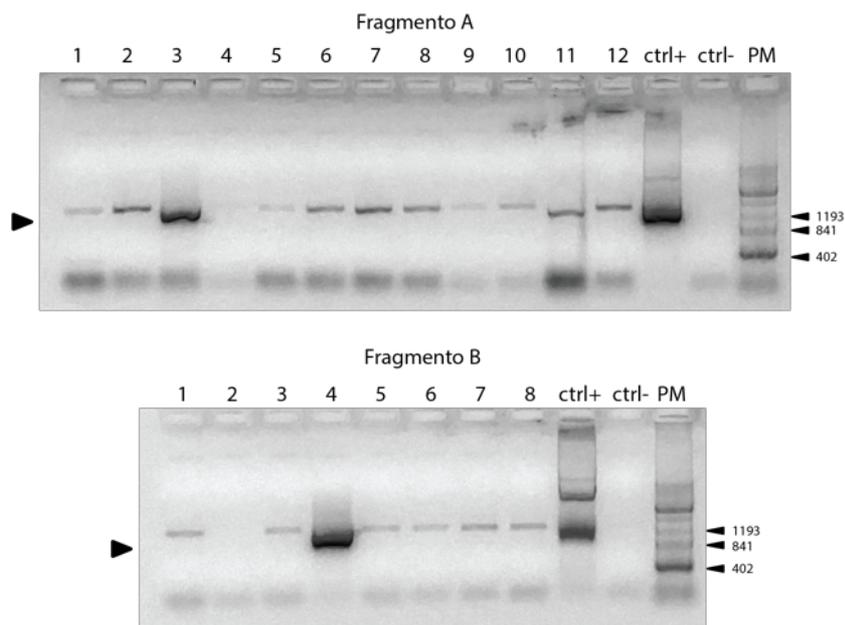


Figura 4.12 - PCR en colonias de *E. coli* transformadas con los fragmentos A y B clonados en el vector pGEM-T-Easy con oligonucleótidos que incorporaban sitios XhoI en ambos extremos. Las puntas de flecha indican los productos del peso molecular esperado.

-Superior (fragmento A): calles 1-12 PCR en distintas colonias; ctrl+ control positivo con el plásmido pGEM-T-Easy-3'UTR-sox9b-FA como molde; ctrl- control negativo sin ADN molde; PM marcados de peso molecular Ladder 400.
 -Inferior (fragmento B): calles 1-8 PCR en distintas colonias; ctrl+ control positivo con el plásmido pGEM-T-Easy-3'UTR-sox9b-FB como molde; ctrl- control negativo sin ADN molde; PM marcados de peso molecular Ladder 400pb.

De esta forma se pudieron clonar ambos fragmentos de la región 3'UTR de *sox9b* en el plásmido pGEM-T-Easy y determinar su orientación. Los plásmidos obtenidos fueron nombrados pGEM-T-Easy-3'UTR-*sox9b*-XhoI/XhoI-FA para el fragmento A y pGEM-T-Easy-3'UTR-*sox9b*-XhoI/XhoI-FB para el fragmento B (Figura 4.13), y posteriormente utilizados para el subclonado en el vector de transcripción *in vitro*.

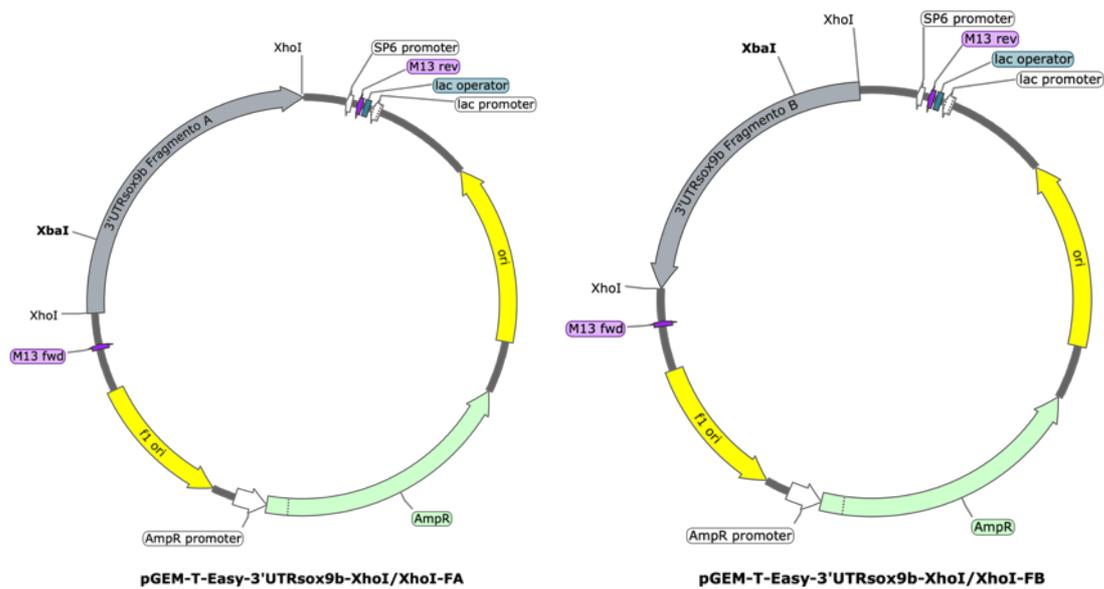


Figura 4.13 - Representación de los fragmentos A (izq) y B (der) clonados en el plásmido pGEM-T-Easy, con sitios de restricción XhoI.

4.3.2 Subclonado en el vector de transcripción pSP64T-1MYC-EGFP

Una vez obtenidos los fragmentos en el vector pGEM-T-Easy se procedió con el subclonado en el vector de transcripción *in vitro* pSP64T-1MYC-EGFP (Figura 3.2, sección 3.4.2). Para esto, los plásmidos que contenían los insertos de interés, el pGEM-T-Easy-3'UTR-sox9b-XhoI/XhoI-FA y el pGEM-T-Easy-3'UTR-sox9b-XhoI/XhoI-FB, fueron sometidos a corte con la enzima de restricción XhoI y separados en agarosa 1% (p/v) en TAE 1x y Gel Green. El vector receptor pSP64T-1MYC-EGFP linealizado con la enzima XhoI se separó por corrida electroforética en gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1x y Gel Green. Una vez purificado, el plásmido receptor fue sometido a reacción de fosfatasa alcalina para reducir la probabilidad de religado. Posteriormente, se llevaron a cabo las reacciones de ligación y transformación de células competentes *E. coli* DH5 α . Al menos diez colonias para cada fragmento se analizaron por PCR y se seleccionaron 2 para obtener los plásmidos, enviar a secuenciar y determinar la orientación del inserto. Se lograron obtener clones con los fragmentos de interés, pero sólo el fragmento B fue clonado en la orientación correcta, y al plásmido obtenido se lo llamó pSP64T-1MYC-EGFP-3'UTR-sox9b-FB (Figura 4.14). Es por esto que los experimentos proyectados para el análisis de los sitios putativos de unión para microARNs en la región 3'UTR del gen sox9b no pudieron ser

concluidos (objetivo particular N°2). No obstante, los resultados obtenidos hasta el momento son útiles para continuar con los experimentos en el futuro.

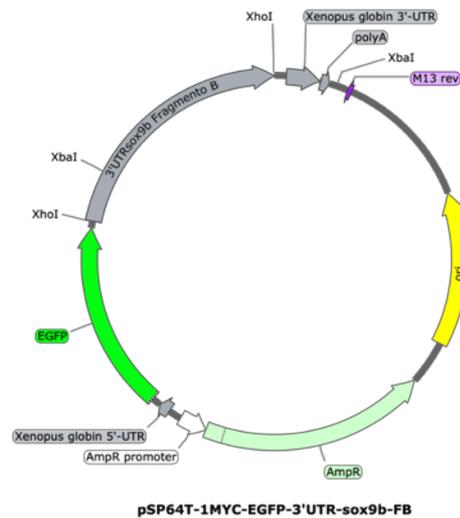


Figura 4.14 - Representación del plásmido pSP64T-1MYC-EGFP con el fragmento B de la 3'UTR de *sox9b*.

4.4 Estudios moleculares de *sox9b*

4.4.1 Niveles de expresión de *sox9b*

Con el objetivo de evaluar el efecto de los microARNs sobre el gen regulador de la condrogénesis *sox9b*, se decidió estudiar los cambios en los niveles de expresión de *sox9b* mediante la técnica de RT-qPCR. Como controles endógenos de normalización se utilizaron los genes *rpl13* (*60S ribosomal Protein L13*) y *ef1α* (*elongation factor 1-alpha*) (Tang et al., 2007). Los resultados fueron procesados con el software *qBase* versión 2.2 (Biogazelle, Bélgica).

Los ensayos de RT-qPCR fueron realizados en muestras de embriones **DicMO** y **DicMOctrl** en los estadios de 18, 24 y 28hpf realizando 4 réplicas biológicas para cada uno. En embriones de 18hpf, los niveles de ARNm de *sox9b* aumentan significativamente al doble al interrumpir la traducción de *Dicer1*, pero en estadios posteriores disminuyen significativamente (Figura 4.15). Esto estaría indicando una regulación directa de la expresión de *sox9b* por parte de microRNAs, la cual varía temporalmente durante el desarrollo embrionario.

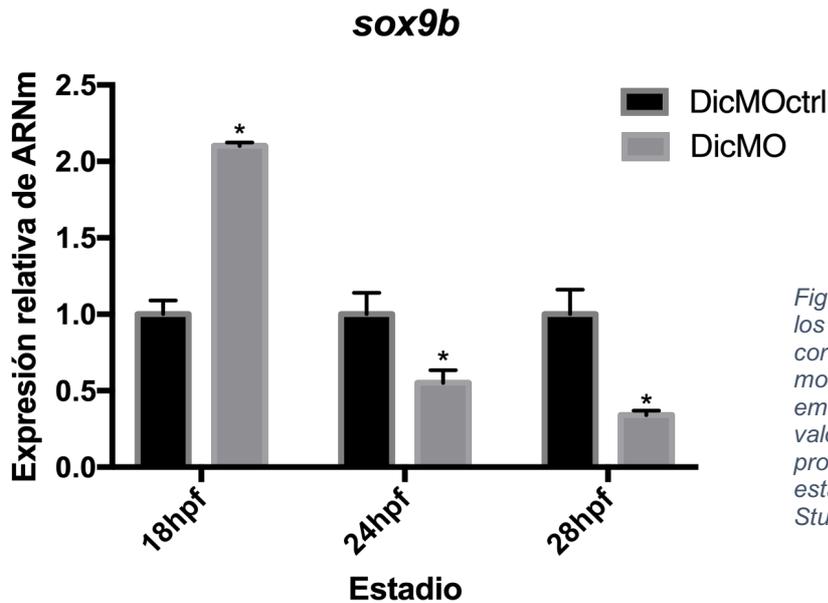


Figura 4.15 - Cuantificación por RT-qPCR de los niveles de ARNm de *sox9b*. DicMOctrl corresponde a embriones inyectados con el morpholino control *Dicer1-ctrlMO*, DicMO a los embriones inyectados con *Dicer1-MO*. Los valores representados corresponden a promedios aritméticos de las réplicas \pm SEM, estandarizados con respecto a los control. *t*-Student bicaudal $P < 0,001$.

El aumento en el nivel de expresión observado a las 18hpf podría estar dado por una regulación directa por parte de ciertos microARNs sobre la región 3'UTR del gen. Al microinyectar el morpholino *Dicer1-MO*, se afecta la expresión de *Dicer1*, y por ende la biogénesis de microARN se bloquea, elevando los niveles de los ARNm blanco. En embriones de pez cebra de 14hpf se vio que *sox9b* se expresa principalmente en las células premigratorias craneales de la CN y que sus niveles disminuyen a medida que empiezan a migrar (Yan et al., 2005). Posteriormente, al llegar a las 18hpf su expresión se ve delimitada a la línea media, la vesícula ótica y la epífisis (Li et al., 2002). Una desregulación en estos estadios podría afectar los tejidos derivados de la CN, al no permitir que los niveles de expresión disminuyan una vez que las células migren.

En los estadios posteriores (24 y 28hpf) la disminución de la expresión observada puede deberse a la ausencia de algún activador o la sobreexpresión de algún represor, ya que diferentes elementos regulatorios fueron descritos para el promotor de *sox9b* (Burns et al., 2016). También podría deberse a una disminución en el número de células que deberían expresar *sox9b*. En nuestro laboratorio, por tinción con Naranja de Acridina se vio un aumento de la apoptosis en las CCN en estos estadios (Weiner et al., 2019). En embriones de 26hpf, *sox9b* se expresa principalmente en los rombómeros y posteriormente en las aletas pectorales y los arcos faríngeos (B. Thisse & Thisse, 2004; Yan et al., 2005). Por lo tanto, una disminución de la expresión a partir de las 24hpf podría generar una incorrecta

diferenciación o ausencia de estas estructuras, como fue visualizado en la tinción de Alcian Blue.

4.4.2 Patrón de expresión espacio-temporal de *sox9b*

Las hibridaciones *in situ* se utilizan para localizar secuencias específicas de ADN o ARN dentro de una muestra biológica. Si la muestra es lo suficientemente pequeña, como es el caso de los embriones de pez cebra, la técnica puede realizarse en el organismo entero (*Whole mount in situ hybridization*, WISH). En nuestro caso se diseñaron y sintetizaron sondas de ARN específicas para *sox9b* marcadas con UTP-Digoxigenina.

La técnica de WISH fue llevada a cabo en embriones de pez cebra con el objetivo de analizar cambios en el patrón de expresión espacio-temporal de *sox9b* cuando se los trata con morpholino Dicer1-MO. Debido a que en el laboratorio no se contaba con una sonda específica para este gen, se decidió diseñarla. Para esto, utilizando los oligonucleótidos zSox9b-R y SndSox9bFw se amplificó por PCR un fragmento de 535pb perteneciente a la región codificante de *sox9b* utilizando como molde ADNc. Los productos de la reacción de PCR se corrieron en gel de agarosa 1% (p/v) en TAE 1x y Gel Green y la banda correspondiente fue purificada con un kit comercial. El fragmento fue clonado en el plásmido pGEM-T-Easy y transformado en cultivos de *E. coli* DH5 α . Al menos diez colonias blancas fueron seleccionadas para ser analizadas por PCR. Los plásmidos de dos colonias positivas fueron purificados y enviados a secuenciar. Como resultado se obtuvo un fragmento de la región codificante del gen *sox9b* en el vector pGEM-T-Easy para poder ser utilizado como molde para la síntesis de una sonda para WISH (Figura 4.16).

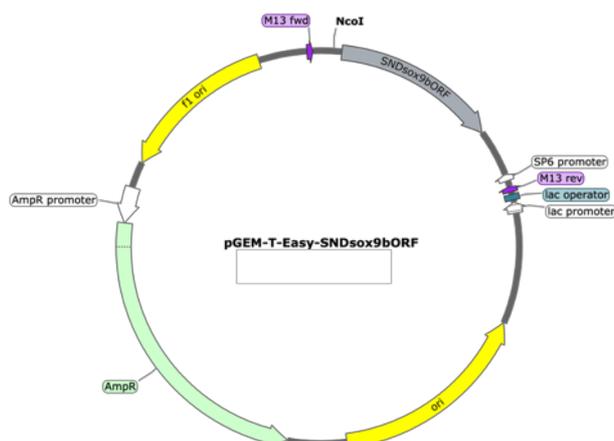


Figura 4.16 – Representación del fragmento de 535pb del gen *sox9b* clonado en el plásmido pGEM-T-Easy, indicando su orientación y el sitio de corte de la enzima *NcoI*.

El plásmido pGEM-T-Easy-3'UTR-sox9b-FA linealizado con la enzima *Sall* (Figura 4.10) y el plásmido pGEM-T-Easy-SNDsox9bORF con *NcoI* (Figura 4.16) fueron utilizados como molde para la síntesis de las sondas SNDsox9bUTR y SNDsox9bORF, respectivamente. Las sondas difieren en el lugar de hibridación y en su longitud (~550pb SNDsox9bORF y ~1000pb SNDsox9bUTR). Al hibridar en regiones distintas del ARNm de *sox9b* podrían brindar diferente información. Por otro lado, la diferencia en tamaño hace que una sonda más larga resulta más específica, mientras que una más corta es de mayor penetración. Estas características se ven representadas en la Figura 4.17.

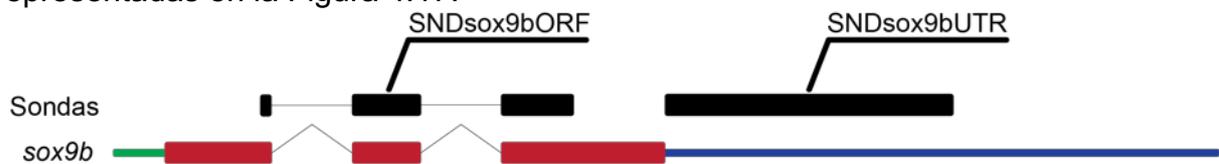


Figura 4.17 – Regiones de hibridación de las sondas utilizadas para WISH de *sox9b*. En negro se muestran las sondas, en verde la región 5'UTR, en rojo la región codificante y en azul la región 3'UTR.

Una vez sintetizadas las sondas se procedió a poner a punto el protocolo de hibridación *in situ* en embriones tipo salvaje de *D. rerio* de 17, 24 y 48hpf. Para llevar a cabo el análisis de los resultados se utilizaron como referencia ensayos ya reportados para *sox9b* en la bibliografía mostrados en la Figura 4.18 (B. Thisse & Thisse, 2004).

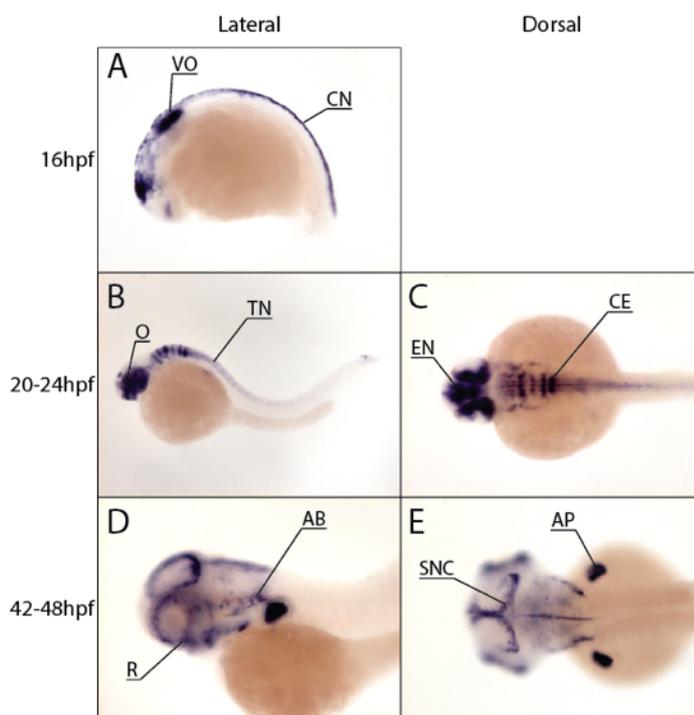


Figura 4.18 - WISH para *sox9b* en embriones tipo salvaje, adaptado de Thisse & Thisse, 2004.

A) 16hpf, vista lateral. VO: vesícula ótica, CN: cresta neural

B) 20-24hpf, vista lateral. O: ojo primitivo, TN: tubo neural

C) 20-24hpf, vista dorsal. EN: encéfalo, CE: columna espinal

D) 42-48hpf, vista lateral. AB: arcos branquiales, R: retina

E) 42-48hpf, vista dorsal. SNC: sistema nervioso central, AP: aletas pectorales

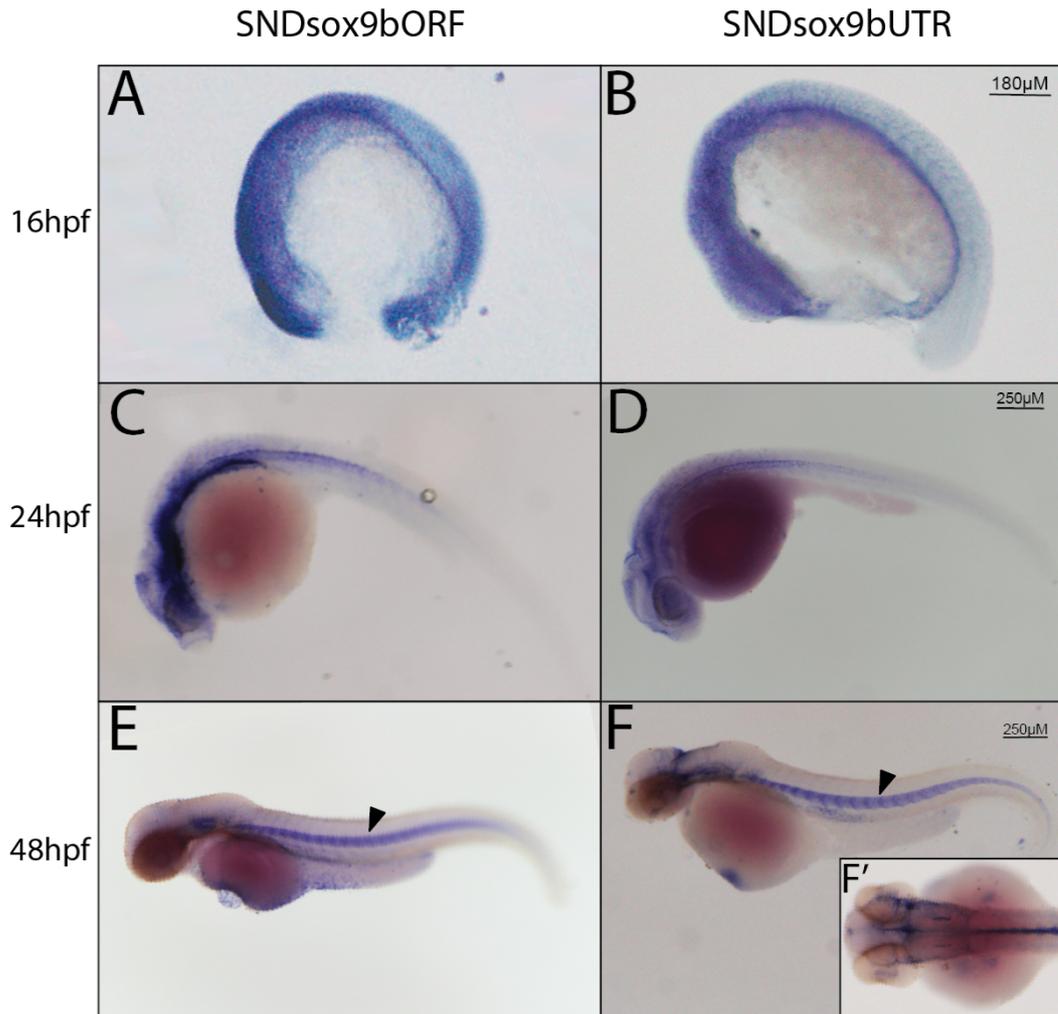


Figura 4.19 - Determinación del patrón espacial de expresión de *sox9b* en embriones de *D. rerio*. Hibridación in situ con la sonda SNDsox9bORF: A) 16hpf, C) 24hpf, E) 48hpf. Con la sonda SNDsox9bUTR: B) 16hpf, D) 24hpf, F) 48hpf vista lateral, F') 48hpf vista dorsal. Puntas de flecha: Tubo neural. Barras de referencia en B para A-B: 180µM; en D para C-D y en F para E-F: 250µM.

Los resultados obtenidos no fueron acordes a lo esperado en ejemplares de 16hpf. La sonda SNDsox9bORF no mostró la especificidad prevista, tiñéndose el embrión entero en lugar de estructuras específicas como la vesícula ótica y las CCN (Figura 4.19-A). Los resultados con la SNDsox9bUTR fueron igualmente inespecíficos, observándose marca en casi la totalidad del embrión (Figura 4.19-B). Una posible interpretación es que la sonda no haya logrado penetrar al interior, tal vez por un tratamiento insuficiente con Proteinasa K. Para mejorar estos resultados, se probará incrementar el tiempo de incubación con dicha enzima en futuros experimentos.

En el caso de los embriones de 24hpf, comenzó a verse coloración de inespecificidad previo a la aparición de las marcas ya reportadas para este estadio como ser la médula espinal, el ojo primitivo y el encéfalo (Figura 4.19 C, para SNDsox9bORF y Figura 4.19 D para SNDsox9bUTR).

Los embriones de 48hpf (Figura 4.19 E, F y F') muestran una coloración muy tenue en algunas de las estructuras esperadas, como las aletas pectorales y el sistema nervioso central con ambas sondas, pero también presentan coloración exacerbada en el tubo neural (Figura 4.19 E y F, puntas de flecha) el cual no debería haberse teñido en esta etapa del desarrollo.

En base a los resultados obtenidos, concluimos que la técnica debe ser optimizada para poder utilizarla como herramienta de análisis de la expresión. Dentro de las correcciones que se pueden realizar incluyen optimización en las temperaturas de hibridación, astringencia en los lavados, concentración de sonda utilizada y tiempo de fijación (C. Thisse & Thisse, 2008). La optimización de esta técnica para las sondas de *sox9b* nos permitirá realizar estudios comparativos del patrón de expresión en embriones **DicMO** y **DicMOctrl**. Estos estudios junto con los obtenidos por qPCR nos permitirán emitir una conclusión acerca de la regulación de la expresión de *sox9b* por miARNs durante el desarrollo embrionario de pez cebra.

4.5 Estudios moleculares del gen *col2a1*

4.5.1 Niveles de expresión de *col2a1*

El gen *col2a1* codifica para el colágeno de tipo II que predomina en la matriz extracelular de los cartílagos, como los arcos faríngeos. Además, este gen es expresado transitoriamente en tejidos no condrogénicos, como la notocorda (Yan et al., 1995). Con el propósito de evaluar si el fenotipo craneofacial de las larvas **DicMO** es dado en parte por una desregulación de *col2a1*, se procedió a analizar por RT-qPCR los niveles de expresión de dicho gen en embriones tipo salvaje microinyectados con los morpholinos Dicer1-MO y Dicer1-ctrlMO. Los experimentos de RT-qPCR fueron realizados con muestras de embriones de 24 y 43hpf, realizando cuatro réplicas biológicas para cada estadio, con los oligonucleótidos Col2a1a-F y

Col2a1a-R para *col2a1* y usando *rpl13* y *ef1 α* como controles internos de normalización.

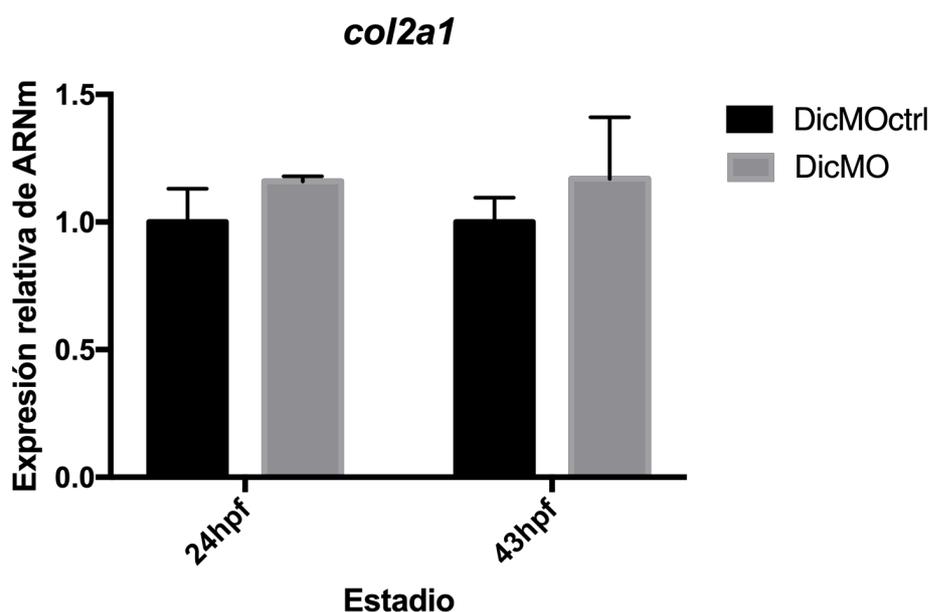


Figura 4.20 – Niveles de expresión de *col2a1*. Ensayos de RT-qPCR a partir de embriones tipo salvaje de 24 y 43hpf microinyectados con morpholinos *Dicer1-ctrlMO* (*DicMOctrl*) y *Dicer1-MO* (*DicMO*). Los valores representados corresponden al promedio aritmético \pm SEM estandarizado al control.

Los resultados no mostraron cambios significativos en la expresión de *col2a1* en los estadios analizados (Figura 4.20). Se sabe que los factores de transcripción Sox9a y Sox9b actúan en conjunto tanto en la activación de la expresión de *col2a1* como en el control de supervivencia y proliferación de las células que se diferenciarán en condrocitos (Yan et al., 2005). Por lo tanto, considerando la disminución de la expresión de *sox9b* observada en embriones **DicMO** en el estadio de 24hpf (Sección 4.4.1, Figura 4.15), se esperaba que los niveles de ARNm de *col2a1* también disminuyan en dichas condiciones. Sin embargo, aún existe la posibilidad de que *col2a1* esté a su vez regulado por microARNs produciendo un aumento de los niveles de ARNm al eliminar *Dicer1*, contrarrestando el efecto de la ausencia de Sox9b, lo cual explicaría que los niveles de *col2a1* no varíen significativamente. Por otro lado, estudios en pez cebra muestran que los niveles de expresión de *col2a1* aumentan considerablemente a partir de la etapa de segmentación (10 hpf) (David et al., 2016), y por lo tanto, pensamos que pequeñas variaciones en sus niveles serían difíciles de apreciar por esta técnica.

4.5.2 Patrón de expresión espacio-temporal de *col2a1*.

Una vez analizados los niveles de ARNm de *col2a1* se consideró estudiar el patrón de expresión espacio-temporal de dicho gen, mediante la técnica de WISH. Embriones de 24 y 43hpf **DicMO** y **Dic-ctrlMO** fueron sometidos a WISH con una sonda específica para *col2a1*.

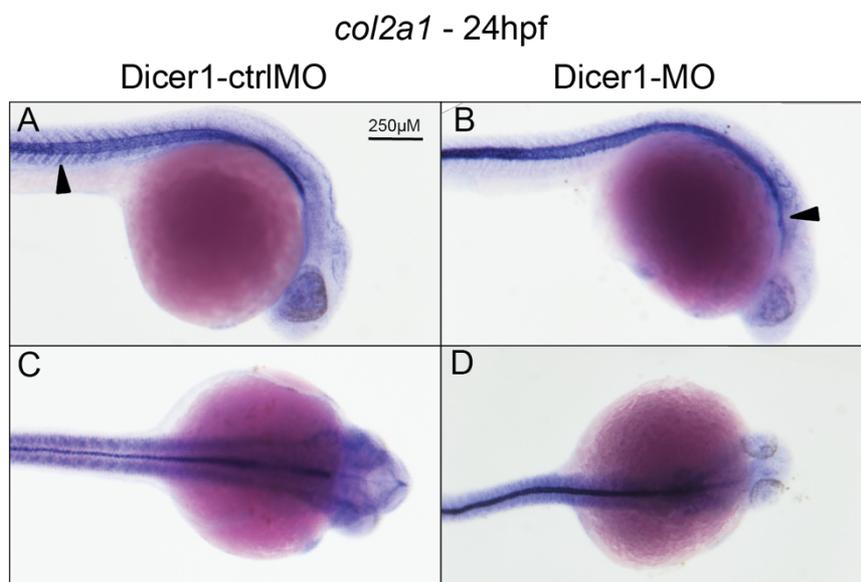


Figura 4.21 - Patrón espacial de expresión de col2a1. Hibridación in situ en embriones tipo salvaje de 24hpf microinyectados con morpholinos Dicer1-ctrlMO (A y C) o Dicer1-MO (B y D). Punta de flecha en A: separación de los somitos; en B: expresión en región cefálica. Barra de referencia en A para A-D: 250µM.

El análisis de los resultados mostró que a las 24hpf en los embriones control se puede apreciar tinción en la separación de los somitos (Figura 4.21 A, punta de flecha) mientras que en los embriones **DicMO** estas marcas están ausentes. Además, en los embriones **DicMO** la coloración se extiende más hacia la región cefálica en comparación con los **DicMOctrl** (Figura 4.21 B, punta de flecha). Por otro lado, a las 43hpf se aprecian diferencias en las estructuras craneofaciales. En los controles se ven claramente teñidas las regiones que formarán la mandíbula inferior (Figura 4.22 A y C, puntas de flecha), pero en los **DicMO**, estas estructuras no se encuentran bien definidas y son de menor tamaño (Figura 4.22 B y D, puntas de flecha).

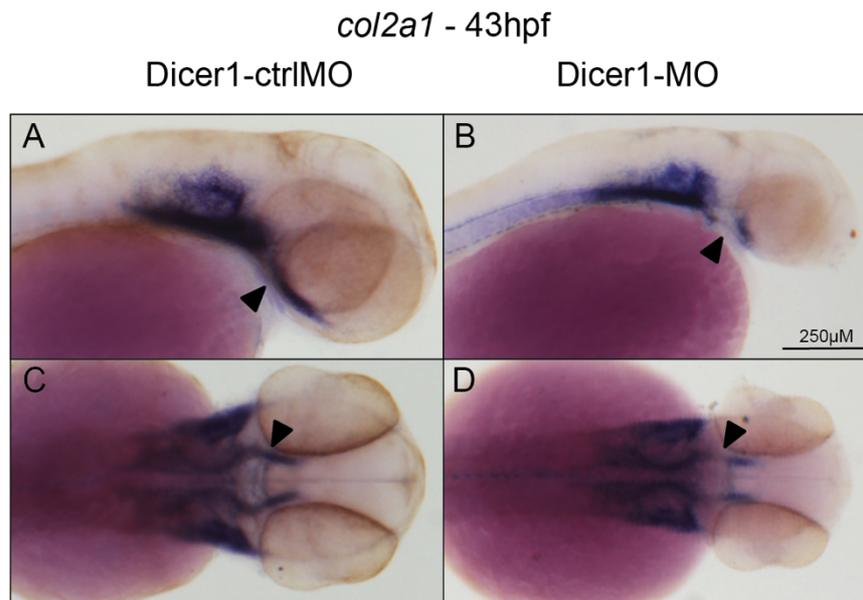


Figura 4.22 - Patrón espacial de expresión de *col2a1*. Hibridación in situ en embriones tipo salvaje de 43hpf microinyectados con morpholinos *Dicer1-ctrlMO* (A y C) o *Dicer1-MO* (B y D). Puntas de flecha: futuras estructuras de la mandíbula inferior. Barra de referencia en B para A-D: 250µM.

Las diferencias observadas en los patrones de expresión de *col2a1* entre embriones **DicMO** y **DicMOctrl** en los estadios analizados explican los fenotipos craneofaciales observados a los 4dpf (tinción de Alcian Blue, sección 4.2). Al verse alterado el patrón de expresión de *col2a1* en embriones depletados de Dicer1, las estructuras craneofaciales cartilaginosas no pueden formarse correctamente, dando lugar a mandíbulas de menor tamaño detectadas en larvas homocigotas mutantes *dicer1^{sa9205}*, o incluso su ausencia en larvas **DicMO**. Por lo tanto, es factible decir que un desbalance de la vía de regulación por microARN estaría produciendo alteraciones en los niveles del factor transcripcional *sox9b*, lo cual llevaría a cambios en el patrón de expresión de *col2a1* y finalmente a las malformaciones craneofaciales observadas mediante la tinción de Alcian Blue.

4.6 Niveles de expresión de microARN

Una condición necesaria para la regulación de un gen por parte de un microARN es que ambos coincidan temporal y espacialmente en su expresión. Para poder analizar los niveles de expresión de microARN se procedió a poner a punto una técnica de RT-qPCR modificada que permite detectar ARNs cortos. El análisis *in silico* de la región 3'UTR de *sox9b* reveló múltiples sitios putativos de unión para distintas

familias de microARNs conservadas en invertebrados. Una de estas familias corresponde a la del miR-145, con un *score* de -0,28 (Tabla 4.1). Estudios realizados en células madre embrionarias de ratón diferenciadas a CCN mostraron que la expresión de Sox9 (homólogo de *sox9b* en *M. musculus*) es regulada por miR-145 (Banerjee et al., 2016). Se ha reportado además que la sobreexpresión de miR-145 en células madre mesenquimáticas de ratón afectaba de forma negativa la expresión de Sox9 y de otros marcadores condrogénicos como Col2a1, Agc1 y Col9a2 a nivel traduccional (Yang et al., 2011). Además, la inhibición de dicho microARN elevaba los niveles de Sox9. A su vez, se vio que en condrocitos articulares humanos SOX9 es regulado por miR-145, actuando de forma directa por unión a un sitio específico en la región 3'UTR del gen (Martinez-Sanchez et al., 2012). Por estos motivos, se lo consideró como un candidato atractivo para estudiar sus niveles de expresión y vincularlo como regulador de *sox9b* en el desarrollo embrionario de pez cebra.

El principal problema al momento de amplificar por PCR un microARN es su longitud, ya que generalmente tienen entre 21-25 bases. Entonces, se procedió a poner a punto una técnica de RT-qPCR modificada que permite detectar ARNs cortos. La estrategia consiste en extender el microARN agregando una cola de poli-A con ayuda de la enzima Poly(A) polimerasa. Luego, en la reacción de retrotranscripción se utiliza un oligonucleótido (dT)₁₅ que contiene una extensión secuencia específica de 9 nucleótidos en el extremo 3'. De esta forma, el ADNc de un microARN se puede extender hasta unas 45-50 bases. Esto posibilita usar un oligonucleótido específico (directo) y uno semi-específico (reverso, 4-8 bases de homología de secuencia) para el microARN extendido al momento de realizar la qPCR (Balcells et al., 2011). Una particularidad de este método es que permite amplificar selectivamente microARNs maduros ya que los pre-microARNs contienen una extensión en el extremo 3' y el oligonucleótido reverso no hibridaría correctamente. Además, la reacción de retrotranscripción produce ADNc de todos los transcriptos presentes en la muestra, pudiéndose utilizar la misma muestra para los genes de control interno. Un esquema de esta técnica se muestra en la Figura 4-24.

Las reacciones de retrotranscripción y qPCR se llevaron a cabo utilizando muestras de embriones tipo salvaje de 18, 24 y 28hpf, realizando dos réplicas

biológicas (salvo para 18hpf donde se utilizó una sola réplica) y usando los genes *ef1α* y *rp13* como controles internos de normalización.

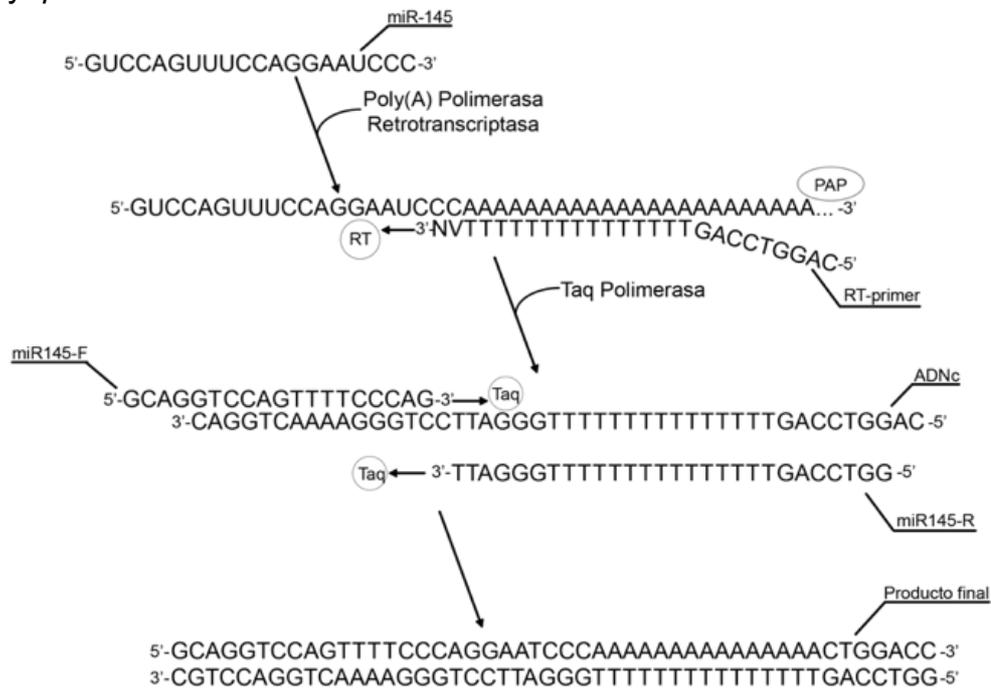


Figura 4.23 – Análisis de la expresión de microARN. Técnica de RT-qPCR para la detección y medición de niveles de expresión de *miR-145*. PAP: Poly(A) Polimerasa; RT: Retrotranscriptasa; Taq: Taq polimerasa. *miR145-F* y *miR145-R*: oligonucleótidos específicos utilizados para qPCR

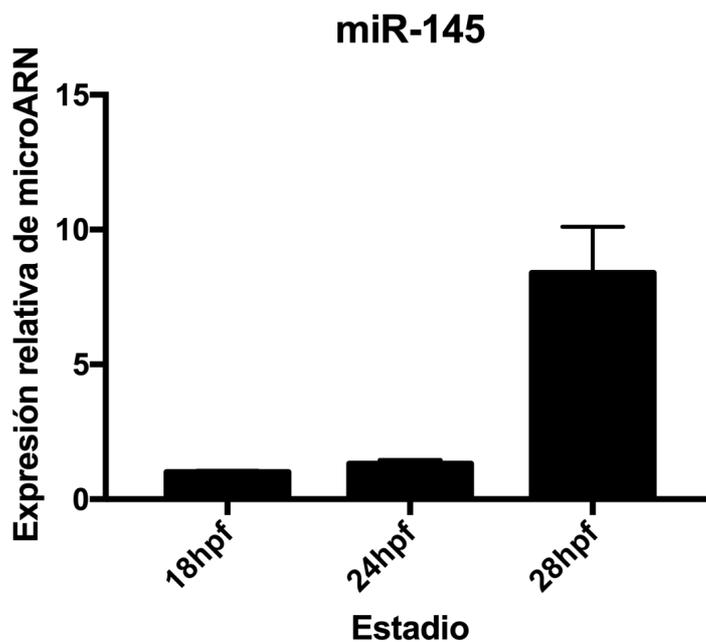


Figura 4.24 - Análisis de la expresión de microARN. RT-qPCR de *miR-145* de embriones tipo salvaje en estadios de 18, 24 y 28hpf. Los valores representados son promedios aritméticos de las réplicas \pm SEM, estandarizados con respecto al estadio de 18hpf.

Estadio	Réplica	Expresión relativa de miR-145	SEM	Promedio de Ct ± SD		
				<i>ef1α</i>	<i>rp13</i>	miR-145
18hpf	1	1,0	0,05	29,00 ± 0,03	28,90 ± 0,07	27,90 ± 0,14
24hpf	1	0,8	0,1	27,67 ± 0,53	26,86 ± 0,54	26,49 ± 0,10
	2	1,8	0,2	28,81 ± 0,01	28,42 ± 0,06	26,70 ± 0,21
28hpf	1	5,2	0,6	30,32 ± 0,09	29,24 ± 0,18	26,34 ± 0,25
	2	11,6	2,9	31,13 ± 0,08	30,47 ± 0,15	26,21 ± 0,61

Tabla 4.2 - Análisis de la expresión de microARN. RT-qPCR de miR-145 de embriones tipo salvaje en estadios de 18, 24 y 28hpf. La expresión relativa fue normalizada con respecto al estadio de 18hpf. Las últimas tres columnas muestran los promedios de los valores de Ct (threshold-cycle) obtenidos para cada gen analizado en cada muestra, con sus respectivas desviaciones standard.

Se vio que es posible detectar la presencia del miR-145, y su concentración aumenta a medida que avanza el desarrollo embrionario, siendo mayor en el estadio de 28hpf (Figura 4.24). En la Tabla 4.2 se muestran los valores de Ct obtenidos para los genes control de normalización y para el microARN. Los resultados muestran que si bien es posible detectar microARN por esta técnica se deben realizar modificaciones y optimizaciones al protocolo, ya que las variaciones en la expresión para cada réplica biológica son demasiados grandes (Tabla 4.2, columna 3, SEM). Los valores de Ct correspondientes a *ef1α* y *rp13* son muy variables y elevados al compararlos con un ensayo de RT-qPCR normal, donde se obtienen valores de Ct menores a 20. Esto podría indicar que la reacción de retrotranscripción al realizarse en conjunto y en las condiciones de la reacción de poliadenilación es de baja eficiencia. Un paso a mejorar puede ser en la extracción de ARN y el almacenamiento, ya que si bien algunos microARN pueden permanecer almacenados hasta diez meses a -80°C (Mraz et al., 2009), un manejo incorrecto de los mismos o restos de reactivo TRIzol pueden producir la degradación de la muestra, reduciendo la eficiencia de las reacciones de poliadenilación, retrotranscripción y qPCR (Bravo et al., 2007). Sin embargo, una vez optimizada la técnica, será útil para estudiar los niveles de expresión de distintos microARNs candidatos de regular la expresión de *sox9b* y *col2a1* durante el desarrollo embrionario de pez cebra.

5 Conclusiones

La alteración de la expresión de *dicer1*, ya sea por homocigosis del alelo mutante *dicer1^{sa9205}* o por la acción de morpholino, ocasiona malformaciones craneofaciales en larvas de pez cebra.

Existe una relación entre los microARN y la condrogénesis craneofacial, demostrada por cambios en longitud, área y ángulo de los cartílagos analizados en larvas mutantes *dicer1^{-/-}*.

Se logró clonar un fragmento de aproximadamente 1000pb correspondiente a una sección de la región 3'UTR del gen *sox9b* en un plásmido que permite la transcripción *in vitro*, fusionado al gen reportero eGFP.

Los niveles de expresión de *sox9b* analizados por RT-qPCR se vieron alterados en embriones microinyectados con morpholino Dicer1-MO, indicando una posible regulación de dicho gen mediada por microARNs.

Se sintetizaron *de novo* dos sondas para estudiar la expresión espacio-temporal de *sox9b* durante el desarrollo embrionario de pez cebra. Debe optimizarse la técnica para una correcta tinción de los embriones.

No se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión de *col2a1* analizados por RT-qPCR en embriones microinyectados con morpholino Dicer1-MO. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que ciertos microARNs estén involucrados en su regulación.

El patrón espacio-temporal de expresión de *col2a1* se vio alterado en embriones **DicMO**, particularmente en la región de la mandíbula inferior. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la tinción de Alcian Blue y podrían explicar los fenotipos de los embriones *dicer1^{-/-}* y morphantes **DicMO**.

Fue posible la detección del miR-145 a partir de muestras de embriones tipo salvaje utilizando una técnica basada en RT-qPCR.

6 Bibliografía

- Balcells, I., Cirera, S., & Busk, P. K. (2011). Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnology*, *11*(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-70>
- Banerjee, P., Dutta, S., & Pal, R. (2016). Dysregulation of Wnt-Signaling and a Candidate Set of miRNAs Underlie the Effect of Metformin on Neural Crest Cell Development. *STEM CELLS*, *34*(2), 334–345. <https://doi.org/10.1002/stem.2245>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, *136*(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bonsignorio, D., Perego, L., Giacco, L. Del, & Cotelli, F. (1996). Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. *Zygote*, *4*(02), 101–108. <https://doi.org/10.1017/S0967199400002975>
- Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider, K., Stengel, D., & Strecker, R. (2015). The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(21), 16247–16261. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3814-7>
- Bravo, V., Rosero, S., Ricordi, C., & Pastori, R. L. (2007). Instability of miRNA and cDNAs derivatives in RNA preparations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *353*(4), 1052–1055. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.135>
- Burns, F. R., Lanham, K. A., Xiong, K. M., Gooding, A. J., Peterson, R. E., & Heideman, W. (2016). Analysis of the zebrafish *sox9b* promoter: Identification of elements that recapitulate organ-specific expression of *sox9b*. *Gene*, *578*(2), 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.041>
- Cheung, M., Chaboissier, M.-C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A., & Briscoe, J. (2005). The Transcriptional Control of Trunk Neural Crest Induction, Survival, and Delamination. *Developmental Cell*, *8*(2), 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.12.010>
- Chiang, E. F.-L., Pai, C.-I., Wyatt, M., Yan, Y.-L., Postlethwait, J., & Chung, B. (2001). Two Sox9 Genes on Duplicated Zebrafish Chromosomes: Expression of Similar Transcription Activators in Distinct Sites. *Developmental Biology*, *231*(1), 149–163. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0129>
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D. W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., ... Giraldez, A. J. (2010). A Novel miRNA Processing Pathway Independent of Dicer

- Requires Argonaute2 Catalytic Activity. *Science*, 328(5986), 1694–1698. <https://doi.org/10.1126/science.1190809>
- Cordes, K. R., Sheehy, N. T., White, M. P., Berry, E. C., Morton, S. U., Muth, A. N., ... Srivastava, D. (2009). miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*, 460(7256), 705–710. <https://doi.org/10.1038/nature08195>
- Dalcq, J., Pasque, V., Ghaye, A., Larbuisson, A., Motte, P., Martial, J. A., & Muller, M. (2012). RUNX3, EGR1 and SOX9B Form a Regulatory Cascade Required to Modulate BMP-Signaling during Cranial Cartilage Development in Zebrafish. *PLoS ONE*, 7(11), e50140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050140>
- David, A. P., Margarit, E., Domizi, P., Banchio, C., Armas, P., & Calcaterra, N. B. (2016). G-quadruplexes as novel cis-elements controlling transcription during embryonic development. *Nucleic Acids Research*, 44(9), 4163–4173. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw011>
- Dong, S., Yang, B., Guo, H., & Kang, F. (2012). MicroRNAs regulate osteogenesis and chondrogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(4), 587–591. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.075>
- Dupin, E., & Le Douarin, N. M. (2014). The neural crest, A multifaceted structure of the vertebrates. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 102(3), 187–209. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21080>
- Dutton, J. R., Antonellis, A., Carney, T. J., Rodrigues, F. S., Pavan, W. J., Ward, A., & Kelsh, R. N. (2008). An evolutionarily conserved intronic region controls the spatiotemporal expression of the transcription factor Sox10. *BMC Developmental Biology*, 8(1), 105. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-105>
- Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S., ... Schier, A. F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5723), 833–838. <https://doi.org/10.1126/science.1109020>
- Glasauer, S. M. K., & Neuhauss, S. C. F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), 1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>
- Greenhill, E. R., Rocco, A., Vibert, L., Nikaido, M., & Kelsh, R. N. (2011). An Iterative Genetic and Dynamical Modelling Approach Identifies Novel Features of the Gene Regulatory Network Underlying Melanocyte Development. *PLoS Genetics*,

- 7(9), e1002265. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002265>
- Huang, T., Liu, Y., Huang, M., Zhao, X., & Cheng, L. (2010). Wnt1-cre-mediated Conditional Loss of Dicer Results in Malformation of the Midbrain and Cerebellum and Failure of Neural Crest and Dopaminergic Differentiation in Mice. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(3), 152–163. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq008>
- Huang, Z., Chen, J., Regan, J. N., Maguire, C. T., Tang, R., Dong, X. R., ... Wang, D. (2010). Loss of MicroRNAs in Neural Crest Leads to Cardiovascular Syndromes Resembling Human Congenital Heart Defects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(12), 2575–2586. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.213306>
- Kelsh, R. N., & Raible, D. W. (2002). Specification of Zebrafish Neural Crest. In *Results and Problems in Cell Differentiation* (Vol. 40, pp. 216–236). https://doi.org/10.1007/978-3-540-46041-1_11
- Kim, D., Song, J., & Jin, E.-J. (2010). MicroRNA-221 Regulates Chondrogenic Differentiation through Promoting Proteosomal Degradation of Slug by Targeting Mdm2. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 26900–26907. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.115105>
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(5), 376–385. <https://doi.org/10.1038/nrm1644>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kloosterman, W. P., & Plasterk, R. H. A. (2006). The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. *Developmental Cell*, 11(4), 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.09.009>
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg2843>
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21(17), 4663–4670. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*,

- 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell*, 120(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>
- Li, M., Zhao, C., Wang, Y., Zhao, Z., & Meng, A. (2002). Zebrafish sox9b is an early neural crest marker. *Development Genes and Evolution*, 212(4), 203–206. <https://doi.org/10.1007/s00427-002-0235-2>
- Lin, H.-P., Oksuz, I., Svaren, J., & Awatramani, R. (2018). Egr2-dependent microRNA-138 is dispensable for peripheral nerve myelination. *Scientific Reports*, 8(1), 3817. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22010-8>
- Martik, M. L., & Bronner, M. E. (2017). Regulatory Logic Underlying Diversification of the Neural Crest. *Trends in Genetics*, 33(10), 715–727. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.07.015>
- Martinez-Sanchez, A., Dudek, K. A., & Murphy, C. L. (2012). Regulation of Human Chondrocyte Function through Direct Inhibition of Cartilage Master Regulator SOX9 by MicroRNA-145 (miRNA-145). *Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 916–924. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302430>
- Mertin, S., McDowall, S. G., & Harley, V. R. (1999). The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Research*, 27(5), 1359–1364. <https://doi.org/10.1093/nar/27.5.1359>
- Mraz, M., Malinova, K., Mayer, J., & Pospisilova, S. (2009). MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.061>
- Nakamura, Y., He, X., Kato, H., Wakitani, S., Kobayashi, T., Watanabe, S., ... Postlethwait, J. H. (2012). Sox9 Is Upstream of MicroRNA-140 in Cartilage. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(1), 64–71. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9404-y>
- Nie, X., Wang, Q., & Jiao, K. (2011). Dicer activity in neural crest cells is essential for craniofacial organogenesis and pharyngeal arch artery morphogenesis. *Mechanisms of Development*, 128(3–4), 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2010.12.002>
- Papan, C., & Campos-Ortega, J. A. (1994). On the formation of the neural keel and neural tube in the zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio*. *Roux's Archives of*

- Developmental Biology*, 203(4), 178–186. <https://doi.org/10.1007/BF00636333>
- Parichy, D. M. (2015). Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *ELife*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.7554/eLife.05635>
- Parsons, K. J., Andreeva, V., James Cooper, W., Yelick, P. C., & Craig Albertson, R. (2011). Morphogenesis of the Zebrafish Jaw: Development Beyond the Embryo. In *Methods in Cell Biology* (Third Edit, Vol. 101, pp. 225–248). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387036-0.00011-6>
- Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 271–282. <https://doi.org/10.1038/nrg3162>
- Rubinstein, A. L. (2003). Zebrafish : From disease modeling to drug discovery. *Drug Discovery & Development*, 6(2), 218–223.
- Schmidt, R., Strähle, U., & Scholpp, S. (2013). Neurogenesis in zebrafish – from embryo to adult. *Neural Development*, 8(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>
- Simoës-Costa, M., & Bronner, M. E. (2015). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*, 142(2), 242–257. <https://doi.org/10.1242/dev.105445>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2007). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Streit, A., Berliner, A. J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., & Stern, C. D. (2000). Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature*, 406(6791), 74–78. <https://doi.org/10.1038/35017617>
- Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W. C., & Love, D. R. (2007). Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Normalization. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(5), 384–390. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00283.x>
- Theveneau, E., & Mayor, R. (2012). Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology*, 366(1), 34–54. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.041>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>

- Thisse, B., & Thisse, C. (2004). Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. *ZFIN Direct Data Submission*. ([Http://Zfin.Org](http://Zfin.Org)).
- Thisse, C., & Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature Protocols*, 3(1), 59–69. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.514>
- Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C. H., Subtelny, A. O., Koppstein, D., Bell, G. W., ... Bartel, D. P. (2012). Extensive alternative polyadenylation during zebrafish development. *Genome Research*, 22(10), 2054–2066. <https://doi.org/10.1101/gr.139733.112>
- Weiner, A. M. J. (2018). MicroRNAs and the neural crest: From induction to differentiation. *Mechanisms of Development*, 154, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.05.009>
- Weiner, A. M. J., Scampoli, N. L., Steeman, T. J., Dooley, C. M., Busch-Nentwich, E. M., Kelsh, R. N., & Calcaterra, N. B. (2019). Dicer1 is required for pigment cell and craniofacial development in zebrafish. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(4), 472–485. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.02.005>
- Wienholds, E., Koudijs, M. J., van Eeden, F. J. M., Cuppen, E., & Plasterk, R. H. A. (2003). The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nature Genetics*, 35(3), 217–218. <https://doi.org/10.1038/ng1251>
- Yan, Y., Hatta, K., Riggelman, B., & Postlethwait, J. H. (1995). Expression of a type II collagen gene in the zebrafish embryonic axis. *Developmental Dynamics*, 203(3), 363–376. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030308>
- Yan, Y., Miller, C. T., Nissen, R. M., Singer, A., Liu, D., Kirn, A., ... Nissen, R. (2002). A zebrafish sox9 gene required for cartilage morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 129(21), 5065–5079. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12397114>
- Yan, Y., Willoughby, J., Liu, D., Crump, J. G., Wilson, C., Miller, C. T., ... Postlethwait, J. H. (2005). A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish sox9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development. *Development (Cambridge, England)*, 132(5), 1069–1083. <https://doi.org/10.1242/dev.01674>
- Yang, B., Guo, H., Zhang, Y., Chen, L., Ying, D., & Dong, S. (2011). MicroRNA-145

Regulates Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Targeting Sox9. *PLoS ONE*, 6(7), e21679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021679>

Zehir, A., Hua, L. L., Maska, E. L., Morikawa, Y., & Cserjesi, P. (2010). Dicer is required for survival of differentiating neural crest cells. *Developmental Biology*, 340(2), 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.01.039>