

**EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN *HAND2*
EN LA MORFOGÉNESIS DEL PRONEFROS DURANTE EL DESARROLLO EN PEZ
CEBRA**

GINA PAOLA GUIO VEGA

Trabajo de Grado para optar por el título de
BIÓLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C. NOVIEMBRE 2014

**EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN *HAND2*
EN LA MORFOGÉNESIS DEL PRONEFROS DURANTE EL DESARROLLO EN PEZ
CEBRA**

GINA PAOLA GUIO VEGA

APROBADO

CONCEPCION JUDITH PUERTA BULA
DECANA ACADÉMICA

ANDREA FORERO PhD.
DIRECTORA CARRERA

**EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN *HAND2*
EN LA MORFOGÉNESIS DEL PRONEFROS DURANTE EL DESARROLLO EN PEZ
CEBRA**

GINA PAOLA GUIO VEGA

APROBADO

Zayra Viviana Garavito-Aguilar, PhD.

Directora

María Lucía Gutiérrez, PhD.

Jurado

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de Tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al Dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien sea en ellas el anhelo de buscar la Verdad y la Justicia”

AGRADECIMIENTOS

Primero, a la vida por haberme dado todas esas grandes oportunidades que me permitieron llegar hasta acá. Al mundo, por permitir maravillarme cada día con su belleza, su sabiduría y su “magia”, gracias por dejarme descubrir y aprender cosas que superan la imaginación.

A mis padres, Rafael Guio y Yolanda Vega, por estar durante todo este proceso y toda mi vida presentes, por su apoyo incondicional, darme fortaleza y ánimo en los momentos más difíciles. A mi Tata, mi admiración y mi orgullo. Gracias por estar siempre presente, por siempre saber que decir para hacerme sentir mejor, saber que puedo contigo hace todo mucho más fácil. A mi familia, porque aunque no entendían del todo de que se trataba este trabajo siempre se mostraron interesados y sentí su apoyo en todo momento. A Juan Pablo, por tener una paciencia inagotable durante todo este trabajo, por ayudarme y escucharme aun cuando no entendía de qué le estaba hablando. Gracias de corazón.

A mis abuelitos Manuel y Salvador, y a mis abuelitas Isabel y María Antonia, sin ustedes no habría llegado hasta acá. Gracias por compartir su sabiduría, enseñanzas y pensamientos conmigo. Los extraño y los llevo en el corazón.

Agradezco al Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Universidad de Los Andes, por recibirme y permitirme hacer este trabajo, crecer y aprender junto a ustedes. A mi directora Zayra Garavito por esta oportunidad y por compartir sus conocimientos conmigo y a Tatiana Peña, por guiarme durante este proceso y compartir conmigo risas y anécdotas todos los días.

A mis amigos de la Universidad Javeriana: Daniela Landaeta, Nathalia Duque, Paula Moncaleano, Cristian Fernández y Choco por permitirme conocerlos, reír y crecer junto a ustedes. Gracias especialmente a La Tropa, Angie Luna y Diana Molina, por apoyarme en todo momento y enseñarme la belleza de una amistad, por acompañarme durante este viaje con risas, lágrimas, abrazos y peleas, porque me han ayudado a crecer y aprender todos los días.

Gracias a mis amigos del colegio Angie, Lina, Jose, Adriana, Camilo, Felipe, Lucho, Pecas, Luisa y Sergio por todos estos años de amistad, porque se han convertido en una familia para mí. Gracias por todo su apoyo, sus palabras de aliento y por los momentos de locura que hemos compartido. Han hecho de este un viaje maravilloso.

Finalmente, gracias a todos los que me han acompañado en este viaje, profesores y compañeros, he aprendido algo valioso de todos ustedes, ya que cada uno ha aportado algo nuevo para mi vida ayudándome a crecer y a ser mejor persona con cada paso que doy.

GRACIAS!!

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1 Enfermedades renales.....	5
4.2 Características del riñón mamífero.....	5
4.2.1 Estructura y función	6
4.3 Modelo animal para el estudio del riñón	7
4.3.1 Pez cebra (<i>Dania rerio</i>)	7
4.3.2 Pez cebra como modelo animal	8
4.4 Desarrollo renal en pez cebra.....	8
4.4.1 Generalidades.....	8
4.4.2 Morfología del riñón en pez cebra	10
4.4.3 Mecanismos moleculares	11
4.5 Factor de transcripción Hand2	14
4.5.1 Características generales	14
4.5.2 Funciones	14
4.5.3 Posibles funciones en el desarrollo renal	15
5. OBJETIVOS	16
5.1 General.....	16
5.2 Específicos.....	16
6. METODOLOGIA	16
6.1 Mantenimiento de animales	16
6.2 Obtención de embriones homocigotos para la mutación en el gen <i>hand2</i>	17
6.3 Fijación	17
6.4 Microscopia de alta resolución (MOAR)	17
6.5 Obtención de secciones histológicas para MOAR	17
6.6 Análisis histológico	18
6.7 Análisis morfométrico.....	18
6.8 Análisis estadístico	18

7. RESULTADOS	19
7.1 Análisis histológico de los cortes.....	19
7.1.1 Descripción morfológica de cortes a 36 hpf.....	20
7.1.2 Descripción morfológica de cortes a 24 hpf.....	22
7.1.3 Descripción morfológica de cortes a 18 hpf.....	24
7.2 Análisis morfométrico	24
8. DISCUSIÓN	29
8.1 Diferencias entre individuos silvestres y mutantes	29
8.1.1 Proliferación	30
8.1.2 Morfogénesis y limitación de dominio renal y diferenciación.....	31
8.1.3 Polaridad.	32
8.1.4 Migración.....	32
9. CONCLUSIONES.....	33
10. RECOMENDACIONES.....	34
11. BIBLIOGRAFÍA.....	36
12. ANEXOS.....	41

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS DENTRO DEL TEXTO

Figura 1. Esquema del riñón mamífero con sus partes. Tomado de Curtis & Barnes, 2003.....	6
Figura 2. Pronefros del pez cebra. A. Vistas lateral y superior del pronefros. B. Esquema de los segmentos del pronefros. G: glomérulo. N: cuello. PCT: túbulo contorneado proximal. PST: túbulo contorneado recto. DE: distal temprano. DL: distal tardío. CD: ducto colector. Modificado de Drummond & Davidson, 2010.....	7
Figura 3. Embrión de pez cebra en estadio “tail-bud” y con 5 somitas donde se muestra la posición del IM con respecto al PM y la LPM. Imagen modificada de Gerlach & Wingert, 2013...	9
Figura 4. Desarrollo de pronefros en pez cebra. Modificado de Drummond & Davidson, 2010. IM: mesodermo intermedio, pn: pronefros, gl: glomérulo, pt: túbulo proximal, cv: vena cardiaca, da: aorta dorsal.....	9
Figura 5. Hibridación <i>in-situ</i> doble definiendo el mesodermo intermedio a las 18 hpf. A. Se muestra área de expresión de marcadores del mesodermo intermedio. B. Marcadores de túbulos pronefricos a las 18 hpf. Imagen tomada de Horsfield, et al. 2002.....	10
Figura 6. Inmunohistoquímica de pez cebra a las 24 hpf mostrando Cdh17:EGFP. A. posición de nefronas A. Túbulo formado, detalle del epitelio. Imagen tomada de Gerlach y Wingert, 2013..	11
Figura 7. A y B. Embrión de 24hpf. A. Primordio de nefrona como una invaginación del celoma. B. corte sagital que muestra el ducto pronefrico anterior adyacente al primordio. C y D. Embrión de 32hpf. C. Primordio ha sido separado del celoma y parece un saco de células. D. Vista sagital. Primordios de túbulo y glomérulo. np: primordio de nefrona. nst: nefrostoma. c: celoma. pd: ducto pronefrico. tp: primordio del túbulo. gp: primordio del glomérulo. Tomada de Drummond, et al., 1998.....	11
Tabla 1. Mecanismos moleculares involucrados en desarrollo renal.....	12
Figura 8. Esquema de cortes a realizar en embriones de pez cebra. 1. Anterior 2. Medio 3 posterior Donde A. es un embrión a las 18hpf donde el IM no se ha segmentado y B. representa a las 24 y 32 hpf donde ya se ha dado la segmentación.....	18
Figura 9. Cortes transversales de embriones silvestres y mutantes <i>han</i> a 36 hpf. A. silvestre 40x. Barra equivale a 20µm B. silvestre 100x. Barra equivale a 10 µm C. mutante 40x. D. mutante	

100x. Se puede apreciar la estructura tubular resaltada con las líneas punteadas. Y: yema. Tn: tubo neural. L: lumen. *: Lumen en silvestres.	20
Figura 10. Cortes transversales de embriones a 24 hpf. A. silvestre 40x. B. silvestre 100x. C. mutante 40x. D. mutante 100x.	22
Figura 11. Cortes transversales de embriones a 18 hpf. A. 10x. B. 40x.....	24
Tabla 2. Estimaciones de número de células, área del túbulo y del lumen con los tipos observados.....	25
Figura 12. Número de células en el túbulo del pronefros a las 36 hpf y las 24 hpf. Se encontraron diferencias significativas entre fenotipos más no entre estadios.....	26
Figura 13. . A. Área del túbulo del pronefros a las 36 y 24 hpf. Se encontraron diferencias altamente significativas entre los fenotipos. B. Área del lumen a las 36 y 24 hpf. Se encuentran diferencias significativas entre mutantes y silvestres para las 24 hpf.....	27
Tabla 3. Promedios para número de células, área de túbulo y área del lumen por niveles.....	28

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Figuras de niveles 1 y 2 para individuos silvestres de 36 hpf.....	41
ANEXO 2. Figuras de niveles 1 y 2 para individuos mutantes de 36 hpf.....	42
ANEXO 3. Figuras de niveles 1 y 2 para individuos silvestres de 24 hpf.....	43
ANEXO 4. Figuras de niveles 1 y 2 para individuos mutantes de 24 hpf.....	44

1. RESUMEN

Las enfermedades y problemas renales son más frecuentes en la actualidad. A nivel mundial, aproximadamente 1 de cada 1000 personas requieren un trasplante de riñón, y solo el 10% logra conseguirlo a tiempo. En el 2013 se reportó que cerca del 2.1% de adultos en Colombia presenta alguna clase de afección renal (National Kidney and Urologic Diseases, 2012; Merchán et al. 2014). Desafortunadamente, según el conocimiento actual el riñón no presenta ningún tipo de habilidad regenerativa. Por esto es necesario plantear nuevas alternativas de tratamiento, pero para poder generarlas es necesario comprender los mecanismos celulares y moleculares que actúan durante el desarrollo renal (McCambell & Wingert, 2012; Qi & Wu, 2013).

Para contribuir a este conocimiento básico, se planteó evaluar morfológicamente la posible función de Hand2, un factor de transcripción que se expresa en la placa mesodermal lateral (LPM) durante la morfogénesis del pronefros durante el desarrollo renal. Para esto se utilizó el pez cebra como modelo animal y se hicieron comparaciones histológicas entre individuos que portaban una mutación nula para *hand2* y su contraparte silvestre en tres estadios de desarrollo. Se encontraron diferencias significativas entre silvestres y mutantes en cuanto a tamaño del túbulo de $500\mu\text{m}^2$ a $300\mu\text{m}^2$, área del lumen de $30\mu\text{m}^2$ a $10\mu\text{m}^2$, número de 7 ± 2 a 5 ± 2 y organización de células y disposición de la estructura. Estos datos sugieren que Hand2 actúa en procesos como proliferación celular, delimitación de dominio del área renal, migración, diferenciación y morfogénesis influenciando el desarrollo renal.

2. INTRODUCCIÓN

Los cambios culturales que se han dado durante los últimos años en la dieta y el sedentarismo, ligados a factores genéticos y ambientales, han contribuido al aumento de enfermedades como la diabetes y la hipertensión. Simultáneamente, el aumento en estas enfermedades ha llevado a que se presenten cada vez más casos de enfermedades y afecciones renales, convirtiéndose en una preocupación para la comunidad médica internacional (Soriano, 2004). Como el riñón es el encargado de mantener la homeostasis del cuerpo, su funcionamiento es de vital importancia, puesto que los daños que este presente traerán grandes consecuencias para el bienestar del individuo. Debido a esto, y a la baja capacidad regenerativa que tiene este órgano es necesario

encontrar alternativas viables y prácticas para tratar estas enfermedades, de forma que se le pueda brindar una mejor calidad de vida a los pacientes con afecciones renales (McCambell & Wingert, 2012; McCambell & Wingert, 2013).

En estudios recientes se han planteado alternativas de tratamiento utilizando células madre. Pero para que estas funcionen correctamente, primero es necesario entender el origen embrionario del riñón y los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso (McCambell & Wingert, 2012; Qi & Wu, 2013). Por eso, con este trabajo se buscó hacer un aporte al conocimiento básico sobre el desarrollo renal que contribuirá, a largo plazo, a establecer mejores soluciones a las enfermedades que afectan a un porcentaje importante de la población.

Actualmente, se sabe que el riñón emerge del mesodermo intermedio o IM (intermediate mesoderm). Esta capa embrionaria está ubicada entre el mesodermo paraxial (PM, paraxial mesoderm) y la placa mesodermal lateral (LPM, Lateral Plate Mesoderm) e interactúa activamente con estos componentes durante el desarrollo. Estas interacciones cumplen importantes funciones durante la especificación, morfogénesis y diferenciación de este órgano. Además, se tiene conocimiento que durante el desarrollo temprano renal intervienen genes como *lhx1*, *pax2*, *wt1*, entre otros (Boyle & de Caestecker, 2006; Drummond & Davidson, 2010). Sin embargo, las redes de interacciones entre tejidos y entre genes necesarias para la formación de este órgano aún están incompletas y hay factores involucrados que aún se desconocen e interacciones que falta aclarar.

Para contribuir al conocimiento sobre el riñón y los procesos que afectan su desarrollo, en este trabajo se usó el pez cebra como modelo animal. Específicamente, se buscó evaluar morfológicamente el efecto del factor de transcripción Hand2 en el desarrollo y diferenciación del pronefros en este organismo. Aunque el gen que codifica para Hand2, se expresa en la LPM donde tiene un papel en el origen de varios órganos como el corazón, la aleta pectoral, sistema nervioso entérico e intestino juega un papel importante en diferenciación, proliferación, limitación de dominios y como regulador de otras moléculas (Garavito, Riley, & Yelon, 2010; Yelon, et al. 2000; Reichenbach et al. 2008), se desconoce su papel en el desarrollo renal. Para esto, se realizaron comparaciones de cortes histológicos del pronefros usando Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) entre animales portadores de una mutación nula para *hand2* y sus hermanos silvestres en diferentes estadios de desarrollo. Esto permitió establecer diferencias cualitativas y cuantitativas para poder inferir la posible función de este factor en el desarrollo

renal. Además se reportan por primera vez las medidas del túbulo y del lumen, así como el número de células del túbulo del pronefros en pez cebra.

Aunque Hand2 presenta un área de expresión restringida a la LPM, estudios preliminares sugirieron que este factor podría tener una influencia en la especificación, desarrollo y diferenciación del IM, estructura a partir de la cual se origina el pronefros. Según estos datos, los mutantes para *hand2* presentan una mayor cantidad de células diferenciadas y pronefros de mayor tamaño (Rincón et al. 2014. Datos no publicados). De esta manera, este trabajo tuvo como objetivo confirmar estas observaciones y aportar un análisis detallado que las respaldara, contribuyendo así al conocimiento básico del riñón y los mecanismos moleculares que influyen su desarrollo. A largo plazo, este conocimiento será útil en el desarrollo y uso de células madre que eventualmente podrán desarrollar nuevos tratamientos.

Este trabajo se no solo permitió confirmar las observaciones preliminares antes mencionadas, si no también aportar datos cuantitativos que las respaldan. Específicamente se encontró que los individuos mutantes para Hand2 (*han*) presentan un mayor número de células en los pronefros, así como un área de túbulo y lumen mayor al ser comparados con los individuos silvestres. Morfológicamente, se encontraron diferencias en cuanto a forma del túbulo, posición y organización celular. Estos datos sugieren que este factor de transcripción está influyendo en procesos de proliferación celular, migración, morfogénesis, diferenciación, limitación del dominio del pronefros y polaridad celular mediados por interacciones tisulares y genéticas entre IM y LPM durante el desarrollo renal. Sin embargo, este estudio no nos permite identificar los blancos o mecanismos específicos que estaría utilizando el factor de transcripción Hand2 para influenciar el desarrollo renal. De este modo, se hace necesario hacer otros estudios para dilucidar el papel de Hand2 durante el desarrollo renal.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento en las enfermedades y afecciones renales que se ha dado los últimos años se puede ver reflejado en las siguientes estadísticas. A nivel mundial, aproximadamente 1 de cada 1000 personas requieren un trasplante de riñón, y solo el 10% logra conseguirlo a tiempo. En Estados Unidos más de 20 millones de adultos sufren algún tipo de enfermedad crónica renal (National Kidney and Urologic Diseases, 2012). En Colombia, el Fondo Colombiano de Enfermedades de

Alto Costo reportó para el 2013 que 1.039.119 personas, aproximadamente el 2.1% de la población, sufrían de alguna afección renal crónica. En comparación en el 2010 cuando se reportaron solo 640.492 (Merchán et al. 2014; Ospina, Montaña, & Acuña, 2011)

Por esta razón, es necesario encontrar alternativas viables y prácticas para tratar las enfermedades renales, especialmente las que causan daños crónicos y llegan a requerir un trasplante o diálisis como solución (McC Campbell & Wingert, 2013). Aunque Campbell y Wingert (2012), y Qi y Wu (2013) han planteado alternativas como la utilización de células madre, el entendimiento del origen embrionario del riñón, y los mecanismos que se dan en este proceso aún son limitados. Desafortunadamente, según los conocimientos actuales, el riñón en mamíferos carece naturalmente de capacidad regenerativa (McC Campbell & Wingert, 2012), por lo que se hace evidente la necesidad de entender su desarrollo y funcionamiento, así como los mecanismos genéticos y moleculares que contribuyen a su formación (McC Campbell & Wingert, 2013). Con este conocimiento será posible generar mejores tratamientos para las enfermedades y dar una mejor calidad de vida a los pacientes que las padecen.

Se sabe que durante el desarrollo del riñón intervienen diferentes genes, tales como *lhx1*, *pax2*, *wt1*, *sim1* etc., que cumplen importantes papeles en la especificación y morfogénesis de este órgano, especialmente en el inicio del desarrollo cuando se forma el pronefros. Adicionalmente, durante la formación de este órgano se dan interacciones entre tejidos embrionarios, como el mesodermo intermedio, el paraxial y la placa mesodérmica lateral, desde las cuales se pueden enviar señales para dirigir diferentes procesos durante el desarrollo (Boyle & de Caestecker, 2006; Drummond & Davidson, 2010). Sin embargo, la red de interacciones específicas necesarias para la formación del pronefros entre diferentes genes y tejidos no está completamente clara.

Por ejemplo, estudios previos han mostrado que marcadores de diferenciación renal como *cadherin17* (*cdh17*), *tcf2* (*Transcription factor 2*), *atp1a1a.4* (*ATPase, Na⁺/K⁺ transporting*), entre otros, se encuentran diferencialmente regulados en animales con mutaciones en el gen que codifica para el factor de transcripción Hand2 (heart and neural crest derivatives expressed transcript 2) (Garavito-Aguilar et al. 2010) sugiriendo que este factor de transcripción, podría estar involucrado en morfogénesis, diferenciación o especificación de precursores renales es decir el pronefros. Sin embargo, a la fecha este factor no ha sido relacionado con el desarrollo renal.

Teniendo en cuenta que *Hand2* parece jugar un papel en el desarrollo de varios órganos como el corazón donde se expresa bilateralmente en la LPM (Yelon et al. 2000), en la formación del sistema nervioso entérico y músculo liso intestinal expresándose tanto en el endodermo como en el mesodermo, no es extraño que también esté asociado al desarrollo renal (Reichenbach, et al. 2008). De este modo, con el fin de contribuir al conocimiento morfológico y funcional básico del riñón y el papel de *hand2* en este proceso, este trabajo busca responder a la pregunta ¿cuál es la contribución del factor de transcripción *Hand2* en la morfogénesis del pronefros durante el desarrollo en pez cebra?

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Enfermedades renales

En los últimos años los casos de falencias renales han sido un índice creciente en la población, donde factores genéticos, ambientales y culturales pueden influenciar estas afecciones (Soriano, 2004). Dentro de las principales enfermedades se encuentran las ciliopatías, riñón poliquístico, nefronoptosis, daños crónicos (CKD, chronic kidney disease) y agudos (AKI, acute kidney injury), además de daños por drogas nefrotóxicas, como la gentamicina, un antibiótico fuerte y la cisplatina, una droga usada en tratamientos contra el cáncer (Swanhart et al. 2011; Qi & Wu, 2013; McCampbell & Wingert, 2013). Dado que actualmente no se conocen capacidades regenerativas renales en mamíferos, los procedimientos más utilizados para tratar estas enfermedades en estados avanzados son diálisis y/o trasplantes, los cuales tienen limitaciones significativas y requieren cuidados a largo plazo (McCampbell & Wingert, 2013). En otras palabras, si se comprenden los mecanismos detrás de la formación y funcionamiento de este órgano será posible reproducir las condiciones que favorezcan la regeneración o reparación del tejido dañado.

4.2 Características del riñón mamífero

4.2.1 Estructura y función

Los mamíferos cuentan con dos riñones que tienen una forma de fríjol y se ubican en la parte posterior del peritoneo, junto a la columna vertebral (Avendaño, 2008). Estos se subdividen en corteza, que es la capa externa de color rojizo y la médula o capa interna de color pálido. Esta última se encarga de regular la concentración de la orina (Ross & Pawlina, 2007). Cada riñón está

compuesto de cientos de nefronas, que son la unidad funcional, y a su vez se dividen en varias estructuras: el glomérulo, encargado de la filtración, el sistema tubular compuesto del túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y los túbulos colectores (Fig. 1). (Ross & Pawlina, 2007; Avendaño, 2008).

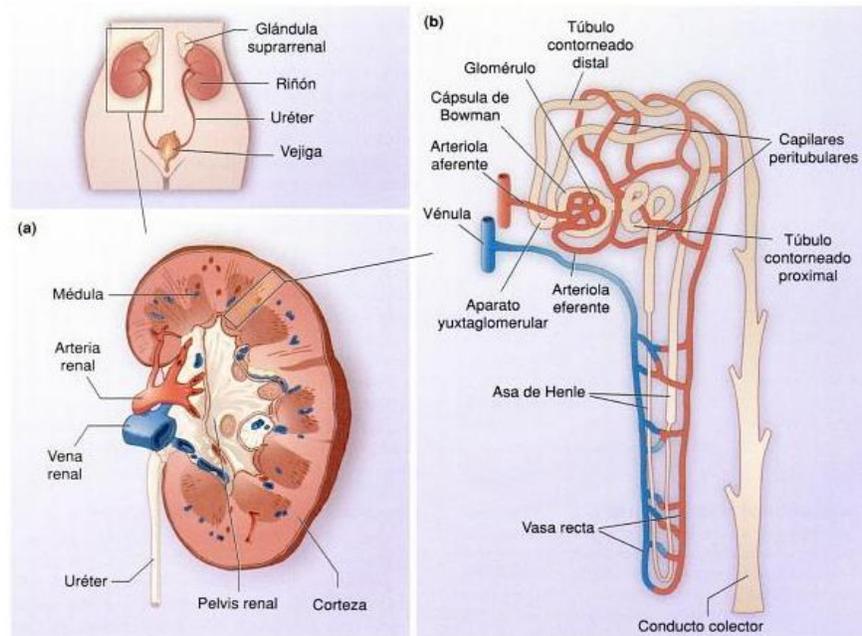


Figura 1. Esquema del riñón mamífero con sus partes. Tomado de Curtis & Barnes, 2003.

La principal función del riñón es la de estabilizar el medio celular mediante la excreción de desechos, reabsorción de metabolitos, mantenimiento del equilibrio ácido-base, secreción de hormonas y osmorregulación. De manera que tanto el medio extracelular e intracelular se encuentren en equilibrio, contribuyendo a la homeostasis del cuerpo (Koolman & Röhm, 2004).

Debido a esta importante función, los daños que sufre pueden tener un gran impacto fisiológico en el organismo. Por esto, se han realizado estudios con varios modelos animales para poder entender mejor este órgano y desarrollar nuevas terapias. Estos modelos se centran principalmente en el ratón debido a su parecido anatómico, genético y proximidad evolutiva con el riñón humano. Pero, la biología del roedor presenta limitaciones en cuanto a tamizaje genético y terapéutico a gran escala, por lo que ha sido necesario recurrir a modelos alternativos y complementarios con estas ventajas, como lo es el pez cebra (Lieschke & Currie, 2007).

4.3 Modelo animal para el estudio del riñón

4.3.1 Pez cebra (*Danio rerio*)

En el pez cebra la primera estructura funcional de filtración es el pronefros a las 40 horas post fertilización (hpf). Este órgano está compuesto de dos nefronas con glomérulos fusionados en la línea central, ubicados ventralmente a la aorta. Estos son los encargados de la filtración de la sangre y están compuestos por estructuras celulares similares a las de otros vertebrados, lo que sugiere una conservación morfofuncional en este grupo animal (Drummond, 2005). Hay dos túbulos pronefricos cuya función es secreción y reabsorción, que se unen a los glomérulos y ductos pronefricos que recorren lateralmente el organismo llevando la orina a la cloaca y finalmente al exterior, los cuales tienen diferentes segmentos de acuerdo a su función y marcadores moleculares (Fig. 2). Estas estructuras forman un sistema cerrado de reabsorción y excreción (Serluca & Fishman, 2001). Posteriormente, el pronefros se desarrolla dando origen a una nueva estructura funcional denominada mesonefros. La cual, constituye el riñón adulto en el pez cebra, que adicionalmente tiene funciones hematopoyéticas (Ivanovski, et al., 2009).

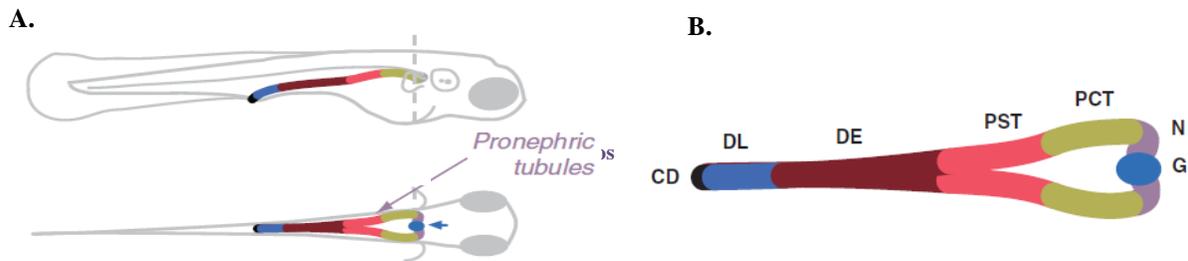


Figura 2. Pronefros del pez cebra. **A.** Vistas lateral y superior del pronefros. **B.** Esquema de los segmentos del pronefros. G: glomérulo. N: cuello. PCT: túbulo contorneado proximal. PST: túbulo contorneado recto. DE: distal temprano. DL: distal tardío. CD: ducto colector. Modificado de Drummond & Davidson, 2010.

4.3.2 Pez cebra como modelo animal

El pez cebra es ideal como modelo animal en biología del desarrollo debido a su fácil manutención en el laboratorio, su embriogénesis externa y a la transparencia de sus embriones que permiten seguir el desarrollo *in vivo* más fácilmente que en otros organismos (Westerfield, 2000). La simplicidad en tamaño y número celular, viabilidad para aplicar herramientas

genéticas, rápido desarrollo, alta tasa de fecundidad y generaciones cortas son algunas características que hacen del pez cebra un organismo ideal en estos estudios (Drummond, 2005). Debido al crecimiento regulatorio del pez cebra y otros teleósteos, se está renovando tejido continuamente, lo que les confiere una capacidad regenerativa elevada. En el caso específico del riñón, cuando se genera una lesión aguda se forma una agrupación de células conocida como cuerpos nefrogénicos lo que da paso a la regeneración (Swanhart et al. 2011).

Por otro lado, las estructuras generales (glomérulos, túbulos y ducto) y mecanismos de señalización en el pez cebra son conservados evolutivamente, es decir son comunes a los vertebrados (Drummond & Davidson, 2010). Por ejemplo, el desarrollo renal de mamíferos y peces es semejante en las 2 primeras etapas, el pronefros y el mesonefros. Sin embargo, en mamíferos existe una etapa adicional, el metanefros la cual es la estructura funcional en adultos (Swanhart et al. 2011). A pesar de esta diferencia en la estructura funcional adulta, estudiar genes, sus funciones e interacciones en el pez cebra durante el desarrollo temprano puede ayudar a buscar los fundamentos para entender estos mismos procesos en mamíferos (McCampbell & Wingert, 2013).

4.4 Desarrollo renal en pez cebra

4.4.1 Generalidades

Las células destinadas a formar el pronefros provienen del mesodermo ventral. Después de la epibolía estas células forman una banda lateral al mesodermo axial que se conoce como mesodermo intermedio o IM, entre el mesodermo paraxial y la placa lateral (LPM) de donde se origina el pronefros (Figura 3) (Serluca & Fishman, 2001; Drummond & Davidson, 2010).



Figura 3. Embrión de pez cebra en estadio “tail-bud” y con 5 somitas donde se muestra la posición del IM con respecto al PM y la LPM. Imagen modificada de Gerlach & Wingert, 2013.

Durante los dos primeros días se dan tres eventos 1) Se forma un ducto pronefrico, resultado de la transición mesénquimo-epitelial, 2) Se forman las nefronas, que se conectan al túbulo en la parte anterior y 3) Se forma el glomérulo por expansión de los vasos sanguíneos por angiogénesis (Drummond, 2005). En la Figura 4 se puede observar la esquematización del proceso desde especificación hasta la angiogénesis.

Particularmente, el desarrollo de la nefrona se da en cuatro pasos: 1) Especificación de mesodermo intermedio en mesénquima de la nefrona, 2) crecimiento y epitelialización del primordio, 3) inducción y modelamiento de la nefrona y 4) formación de capilares de glomérulo por invasión de células endoteliales. Este proceso se da una vez en peces cuando se forma el pronefros, ya que solo poseen 2 nefronas bilaterales. Mientras que en mamíferos y aves se da múltiples veces, al contar estos con miles de nefronas (Swanhart et al. 2011).



Figura 4. Desarrollo de pronefros en pez cebra. Modificado de Drummond & Davidson, 2010. IM: mesodermo intermedio, pn: pronefros, gl: glomérulo, pt: túbulo proximal, cv: vena cardíaca, da: aorta dorsal.

4.4.2 Morfología del riñón en pez cebra

La primera evidencia histológica de la formación de riñones es un agregado celular que se encuentra ventral a las somitas anteriores (somitas 1 - 6, entre las 10 y 11 hpf). Entre las 30 y 36 hpf, los primordios pronefricos se ven como sacos de células planas. Posteriormente la conexión con la cavidad celómica se cierra, los primordios glomerulares se fusionan en la línea media en la región anterior y se forman un solo par de nefronas. A las 40 hpf empieza la filtración de sangre proveniente de la aorta, por medio de los glomérulos (Serluca & Fishman, 2001).

Durante los estadios de interés en este estudio (18, 24 y 32 hpf) se observa que el campo renal ya se ha establecido para las 18 hpf (Fig. 5) y se inicia la segmentación antero-posterior de la nefrona. Esta segmentación se completa aproximadamente a las 24 hpf (Fig. 6 y Fig 7 A, B), por lo que a partir de este momento se espera observar diferencias morfológicas entre los diferentes segmentos antero-posteriores, además de observar estructuras tubulares diferenciadas. A las 32 hpf (Fig. 7 C, D) debe haber un mayor grado de organización tisular en la región anterior donde sean evidentes los podocitos y los glomérulos, los cuales tendrán una posición diferente de la que se observó a las 24 hpf (Gerlach & Wingert, 2013).

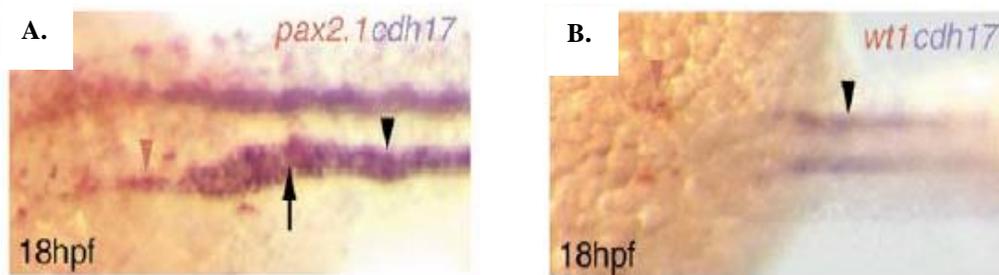


Figura 5. Hibridación *in-situ* doble definiendo el mesodermo intermedio a las 18 hpf. **A.** Se muestra área de expresión de marcadores del mesodermo intermedio. **B.** Marcadores de túbulos pronefricos a las 18 hpf. Imagen tomada de Horsfield, et al. 2002.

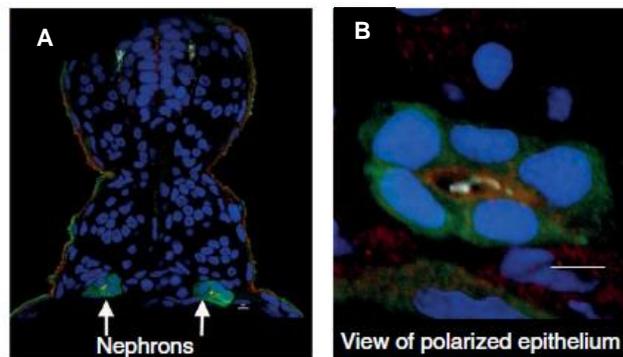


Figura 6. Inmunohistoquímica de pez cebra a las 24 hpf mostrando Cdh17:EGFP. **A.** posición de nefronas **A.** Túbulo formado, detalle del epitelio. Imagen tomada de Gerlach y Wingert, 2013.

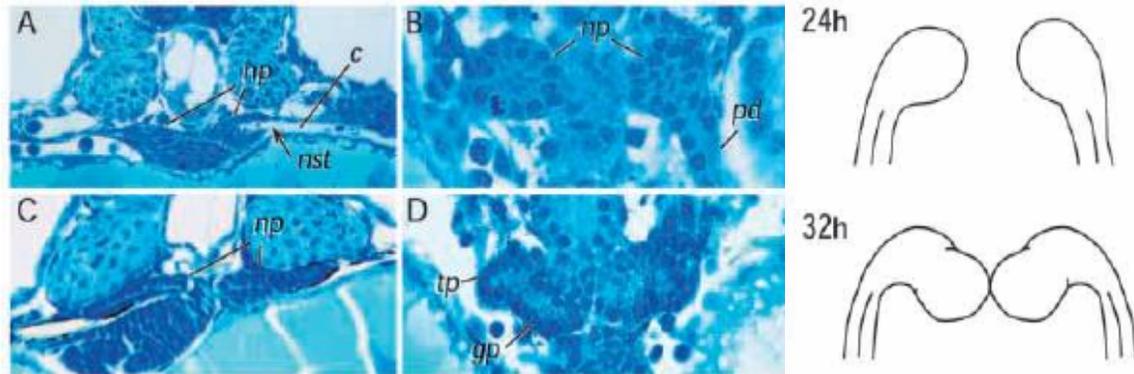


Figura 7. A y B. Embrión de 24hpf. **A.** Primordio de nefrona como una invaginación del celoma. **B.** corte sagital que muestra el ducto pronefrico anterior adyacente al primordio. **C y D.** Embrión de 32hpf. **C.** Primordio ha sido separado del celoma y parece un saco de células. **D.** Vista sagital. Primordios de túbulo y glomérulo. np: primordio de nefrona. nst: nefrostoma. c: celoma. pd: ducto pronefrico. tp: primordio del túbulo. gp: primordio del glomérulo. Tomada de Drummond, et al., 1998.

4.4.3 Mecanismos moleculares

Durante el desarrollo renal se ven involucrados varios genes, moléculas y estructuras que interactúan de diferentes maneras. Es importante conocer estos eventos para entender la complejidad de este órgano. Las células que forman el pronefros en pez cebra provienen del IM, el cual se forma a partir del mesodermo ventral y cuyas células expresan los primeros genes específicos renales. Dependiendo de la concentración del morfogen proteína morfogenética del hueso (BMP, por sus siglas en inglés *Bone Morphogenetic Protein*) se reprime o se activa la diferenciación del IM. A mayor concentración, se reprimen genes de IM y se activan los de la LPM. Además, factores ventralizantes como BMP y el gen homeótico *cdx* (*Caudal type homeobox*) regulan el tamaño y posición del IM que luego se diferencia en dos bandas bilaterales que forman el pronefros. El IM presenta una predisposición dada por la concentración de BMP para formar estructuras renales, y la especificación de estas parece depender de señales provenientes del mesodermo paraxial (ver Tabla 1). Antes de la somitogénesis el mesodermo paraxial expresa Noggin, inhibidor de BMP, el cual permite la activación de los genes *pax2a* y *pax8*, los cuales definen la aparición del IM y su límite con la LPM (Drummond & Davidson, 2010). Marcadores genéticos son expresados en la LPM y se restringen al IM antes de que

empiece la morfogénesis renal. La activación de estos marcadores caracteriza el inicio de la diferenciación de LPM y IM (Dressler, 2006).

Tabla 1. Mecanismos moleculares involucrados en desarrollo renal.

Estadio	Eventos
0-1 somitas (10 hpf)	Las células del mesodermo <u>paraxial</u> , estimuladas por genes <i>ntla</i> , <i>tbx16</i> y <i>cdx</i> secretan ácido retinoico (AR), lo que constituye la señal de especificación inicial rostro/caudal (Drummond & Davidson, 2010; Gerlach & Wingert, 2013). También induce la expresión de <i>Lhx1</i> (antes <i>lim1</i>), <i>pax2a</i> y <i>pax8</i> en IM para que empiece a formar el pronefros (Gilbert, 2010). <i>Lhx1</i> en co-expresión con <i>pax8</i> son esenciales para definir área renal (Cirio et al. 2011).
2 somitas (10.5hpf)	Se activa <i>wt1a</i> en parte anterior del IM a consecuencia de la expresión de AR en el mesodermo paraxial. <i>sim1</i> se expresa en la parte posterior del IM (Drummond & Davidson, 2010).
3 somitas (11hpf)	El área de expresión de <i>wt1a</i> se restringe a la región anterior del pez (Serluca & Fishman, 2001) probablemente asociado al gradiente de concentración de AR que es mayor en la parte anterior (Wingert & Davidson, 2008).
4-6 somitas (11.5hpf)	Inicio de segmentación antero-posterior de dominios renales. Mientras que <i>pax2a</i> se localiza cerca de la somita 2, expresión de <i>sim1</i> se restringe a los alrededores de los somitas 4 y 5 (Serluca & Fishman, 2001). <i>Notch2</i> se expresa en zona del túbulo proximal, en la parte anterior del cuerpo. Mientras que <i>brn1</i> y <i>evil</i> se encuentran en lo que será el túbulo distal temprano y tardío y en el ducto, en la región más posterior (Wingert & Davidson, 2008). El gen <i>wt1a</i> se expresa alrededor de somitas 2 y 3, mientras que el dominio de <i>dcl</i> y <i>jag2</i> es adyacente a somitas 2 a 5 (Gerlach & Wingert, 2013).
8-10 somitas (12hpf)	Pre-modelamiento temprano de IM (0-1somitas) dirige destino celular en esta fase. <i>Wt1a</i> se expresa entre somitas 1 y 2, en progenitores del glomérulo. Mientras <i>pax2a</i> se expresa en células que formaran los túbulos alrededor de somitas 2-5. Y <i>sim1</i> se concentra en somitas 5-9 donde están los progenitores del ducto (Serluca & Fishman, 2001). Dominio de expresión de <i>jag2</i> se extiende hasta los alrededores de la somita 7 (Gerlach & Wingert, 2013).

11 somitas (14hpf)	La expresión de <i>wt1a</i> se ve limitada solamente al primordio del glomérulo (Serluca & Fishman, 2001).
15 somitas (15 hpf)	Dominios rostral, central y caudal separados por expresión de genes específicos. <i>Wt1a</i> , <i>wt1</i> , <i>foxc1a</i> y <i>lhx1a</i> se encuentra solo en la zona de podocitos (adyacente a somitas 2 y 3), mientras que <i>hnf4a</i> se expresa en los alrededores de las somitas 4 a 11. Por su parte <i>irx3b</i> , <i>pou3f3</i> , <i>mecom</i> , <i>emx1</i> y <i>gata3</i> se expresan en zona central y caudal del IM (Gerlach & Wingert, 2013).
18 somitas (18 hpf)	El AR desde el mesodermo paraxial anterior, contribuye a la consolidación de la segmentación antero-posterior de la estructura afectando las células que expresan <i>wt1a</i> (Drummond & Davidson, 2010). <i>Wt1a+pax2a</i> limita la formación de glomérulos y por otro lado produce elongación del túbulo (Serluca & Fishman, 2001). Lo que indica que estos dos genes tienen una interacción directa durante el desarrollo renal. <i>Pax2a</i> en esta etapa establece límites entre podocitos, túbulo y ducto, reprimiendo genes de estas estructuras como <i>wt1</i> y <i>vegf</i> (Drummond & Davidson, 2010).
28 somitas (22 hpf)	Segmentos del ducto totalmente diferenciados. Marcadores como <i>wt1a</i> , <i>rfx2</i> , <i>slc20a1a</i> , <i>trpm7</i> , <i>slc2a1</i> y <i>slc12a3</i> marcan los límites de los dominios. Mientras que <i>wt1a</i> , <i>hnf4a</i> , <i>mecom</i> , <i>gata3</i> , <i>emx1</i> , entre otros, funcionan como factores de transcripción renales de cada uno de los segmentos (Gerlach & Wingert, 2013).
24 hpf (prim – 5)	La señal de <i>Notch</i> induce la formación de células ciliadas. El túbulo proximal recto expresa <i>slc3a1</i> y <i>trpm7</i> , que sirven para absorber iones particulares. El túbulo distal temprano expresa <i>slc12a1</i> , <i>romk2</i> y <i>clck</i> . El distal tardío expresa <i>slc12a3</i> , para absorción de sodio y cloro (Constantini & Kopan, 2010). <i>Pkd2</i> interviene en formación de tejidos ciliados como es el caso del ducto pronefrico y otros. La proteína inicia su localización en cilios y superficie basolateral de pronefros en esta fase (Swanhart et al. 2011).
40 hpf (long – pec)	Glomérulos y podocitos expresan <i>wt1a</i> . Mientras que los túbulos y la parte anterior del ducto presenta <i>pax2a</i> . Se da comienzo a la angiogénesis, donde los podocitos expresan <i>wt1a</i> y <i>vegf</i> , reclutan <i>flk1</i> y se forma un glomérulo funcional. Empieza la filtración de la orina (Drummond, 2005).

Como se ha resumido anteriormente en la Tabla 1, durante el desarrollo renal se dan interacciones entre tejidos y actúan varios genes, lo que contribuye a la especificación y morfogénesis de este órgano (Drummond & Davidson, 2010). Sin embargo, aun es necesario entender el papel que pueden tener otros genes e interacciones durante la embriogénesis renal. Dentro de estos genes con funciones desconocidas se encuentra *hand2*, el cual a pesar de expresarse en la LPM, parece influir en la diferenciación y especificación del IM, el cual le da origen al pronefros.

4.5 Factor de transcripción Hand2

4.5.1 Características generales

El Heart and neural crest derivatives-expressed protein 2 o Hand2 es una proteína codificada por el gen del mismo nombre, perteneciente a la familia hélice-bucle-hélice (bHLH). El gen se encuentra en el cromosoma 1 en pez cebra y tiene homólogos en organismos como el ratón y el ser humano (NCBI, 2014). En mamíferos, también se encuentra *hand1*, cuyo homólogo no ha sido encontrado en pez cebra y que parece compensar algunas de las funciones de *hand2* (Yelon et al. 2000). Debido a la alta conservación de este gen en vertebrados, estudiar su función en pez cebra durante el desarrollo permitirá evaluar su papel en la formación y especificación del IM y/o del pronefros, ayudando así a entender mejor el desarrollo del riñón.

4.5.2 Funciones

En estudios de mutantes de pez cebra con edemas y baja circulación se identificaron mutaciones en el gen *hand2*, y se demostró su influencia en el desarrollo cardiaco, muscular y de aletas pectorales, regulando diferenciación, definición de dominios y morfogénesis de estas estructuras (Yelon et al. 2000).

Partiendo del hecho que este gen se expresa fundamentalmente en la LPM la cual contribuye a la formación del corazón, vasos sanguíneos y linfáticos, músculo liso, componentes del sistema respiratorio, entre otros, se han descrito numerosas funciones para *hand2*. Es así como este gen participa en procesos de especificación, diferenciación, proliferación, morfogénesis y establecimiento de polaridad y dominios y como regulador de otros genes en estos procesos del desarrollo. Por ejemplo, mediante estudios con mutantes *han^{s6}* (mutación nula para *hand2*) en pez cebra, se ha establecido que *hand2* afecta el desarrollo del corazón interviniendo en la expresión de genes específicos del miocardio, contribuyendo a la diferenciación del músculo

cardíaco, polarización de precursores, identidad epitelial y el establecimiento del número de cardiomiocitos (Trinh, Yelon, & Stainier, 2005).

De igual forma, se han encontrado funciones en el establecimiento de los límites de dominios cardiogénicos en la LPM y control del ambiente extracelular que influye en la fusión cardíaca a través de la regulación negativa de fibronectina 1 (*fn1*), moderando la organogénesis del corazón (Yelon et al. 2000; Garavito, Riley, & Yelon, 2010).

En el desarrollo de la aleta pectoral se ha encontrado que Hand2 influye en la proliferación del mesénquima y su posterior diferenciación. Además tiene un papel importante durante el desarrollo y elongación de las extremidades en organismos como el ratón mediante su interacción con Sonic hedgehog (*Shh*) (Yelon et al. 2000).

Hand2 influye en el desarrollo de órganos posteriores como el sistema nervioso entérico, donde es necesario para la migración y proliferación de precursores neuronales en el intestino a partir de las 60 hpf y para su posterior diferenciación. Así mismo, se ha encontrado que *Hand2* se expresa en el mesodermo intestinal durante las etapas iniciales de desarrollo del músculo liso (Reichenbach et al. 2008).

4.5.3 Posibles funciones en el desarrollo renal

Hand2 es un factor de expresión temprana que influye en el desarrollo, proliferación y diferenciación de varios órganos como el corazón, aleta pectoral e intestino. Además, como ya se mencionó, se ha encontrado que influye en el desarrollo temprano de estructuras corporales posteriores, como el sistema nervioso entérico y músculo liso intestinal (Reichenbach et al. 2008). Este factor de transcripción, expresándose desde la LPM, puede llegar a influenciar el desarrollo de estructuras vecinas como el IM, actuando en procesos como su diferenciación y el establecimiento de límites. Con base en esto se sugiere que el dominio de expresión posterior de *hand2* también puede influenciar al desarrollo del pronefros, afectando proliferación celular y diferenciación mediante mecanismos parecidos a los del desarrollo cardíaco, de aleta pectoral y sistema nervioso entérico.

Estudiando roles desconocidos para factores de transcripción como Hand2 durante el desarrollo renal, se busca contribuir a mejorar el conocimiento que se tiene a cerca de la morfología, desarrollo y funcionalidad de este órgano. De esta manera se pueden entender nuevos mecanismos moleculares y genéticos que lo afectan.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar morfológicamente el efecto del factor de transcripción Hand2 en el desarrollo y diferenciación del pronefros en pez cebra

5.2 Específicos

- Establecer diferencias fenotípicas en la morfología del pronefros en peces cebra mutantes para el gen *hand2* en diferentes estadios de desarrollo.
- Evaluar parámetros cuantitativos para la valoración fenotípica de la morfogénesis del pronefros en pez cebra
- Inferir la posible función del factor de transcripción Hand2 durante el desarrollo renal del pez cebra.

6. METODOLOGÍA

6.1. *Mantenimiento de animales:* se utilizaron embriones de pez cebra (*Danio rerio*) entre 0 y 48 hpf como modelo animal. Los animales se manejaron de acuerdo a lo establecido en los manuales de ética en la experimentación animal (Bayne, 1998; Radzikowski, 2006). Para poder obtener los embriones se mantuvieron adultos activos reproductivamente, según las condiciones óptimas reportadas para la especie (Sprague et al. 2003). Los animales, tanto silvestres como mutantes para *hand2*, estuvieron en un sistema de recirculación de agua cerrado, a $28.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 7.5-8.0, saturación de oxígeno entre (7.5-8ppm) y concentración de sales de mar de 60 mg/L.

6.2. *Obtención de embriones homocigotos para la mutación en el gen hand2 (han):* los embriones homocigotos para la mutación recesiva en el gen *hand2 (han)* se obtuvieron por medio de cruces entre portadores heterocigotos y se identifican previo al procesamiento por medio de un análisis fenotípico. Los portadores de la mutación, denominados *han*, presentan campos cardiacos no unificados y un fenotipo cardiaco característico evidente por observación bajo estereoscopio en los estadios a evaluar haciendo innecesaria la genotipificación molecular (Yelon et al. 2000). En un cruce entre heterocigotos se obtiene una proporción genotípica mendeliana 1:2:1 y fenotípica 3:1. Para esto se cruzan de 1 a 3 parejas de adultos previamente identificados,

siguiendo los estándares para el manejo de pez cebra (Sprague et al. 2003; Westerfield, et al, 1999). Los embriones resultantes se incuban a $28.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en agua para embriones, y se mantienen hasta que alcancen el estado de desarrollo deseado (18, 24 y 32 hpf).

6.3 Fijación: una vez alcanzado en estado de desarrollo deseado, los embriones mutantes para *hand2* y sus hermanos silvestres se anestesian por inmersión en una solución de tricaina ms-222 a 0,2% preparada en agua para embriones y luego se transfieren a tubos previamente lavados con acetona, conteniendo la solución fijadora de karnovsky (2% PFA/2.5% glutaraldehído/ NaOH/0.1 M buffer fosfato, PBS) por 2 horas.

6.4 Microscopia óptica de alta resolución (MOAR): terminado el proceso de fijación, se lavaron los embriones. La post-fijación se realizó con tetraóxido de osmio (2%) por 2-3 horas. Se realizaron varios lavados que finalizan con alcohol al 70%. Posteriormente se realizó la deshidratación haciendo cambios en concentraciones crecientes de etanol hasta el 100%. La pre-impregnación se hizo con óxido de propileno y se procedió con la impregnación con resina Epon. Las muestras se colocaron en mezclas de Epon: óxido de propileno 1:2, 1:1 y 2:1 por 30 minutos cada una y finalmente Epon 100% durante 1 hora. Posteriormente se realizó la inclusión en Epon 100% en un molde que se incubaba a 60°C por 12-24 horas hasta alcanzar la polimerización de la resina.

6.5 Obtención de secciones histológicas para MOAR: se realizaron cortes transversales principalmente, y algunos sagitales de aproximadamente 1-2 μm de espesor a través del eje antero-posterior del embrión. Se colectaron en una gota de agua sobre una lámina portaobjetos y se dejaron adherir sobre una plancha a temperatura moderada. Una vez adheridas, las secciones se tiñeron con azul de toluidina (1%) por 10 - 20 min, el cual es el colorante estándar utilizado para la técnica empleada, y se lavaron con agua destilada. Se dejaron secar y se realizó el montaje. Las secciones evaluadas corresponden con 3 niveles, los cuales se identificaron cualitativamente de acuerdo a la cantidad y distribución relativa de vitelo que presentaba el corte del embrión. Estos, se ejemplifican en la **Figura 8**.

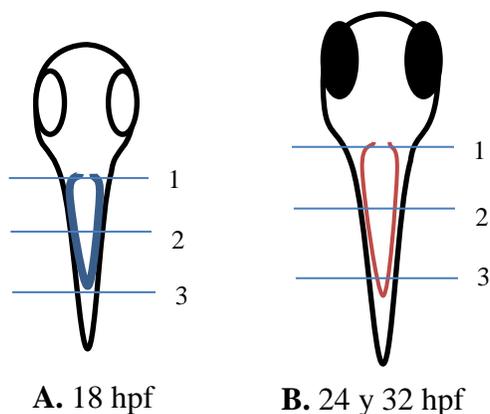


Figura 8. Esquema de cortes a realizar en embriones de pez cebra .1. Anterior 2. Medio 3 posterior Donde **A.** es un embrión a las 18hpf donde el IM no se ha segmentado y **B.** representa a las 24 y 32 hpf donde ya se ha dado la segmentación.

6.6 Análisis histológico: A los diferentes cortes se les realizó un análisis histológico con ayuda del microscopio Zeiss Axio Imager A2 acoplado a una cámara AxioCam ICc1 para determinar diferencias, si existen, entre el fenotipo del pronefros. Se evaluaron características cualitativas como la integridad del tejido, forma de las células y forma del túbulo.

6.7 Análisis morfométrico: Para este análisis con el programa ZEN se realizó una valoración cuantitativa de parámetros como número de células por túbulo teniendo en cuenta los núcleos celulares, área de túbulo y área del lumen.

6.8 Análisis estadístico: Por cada estadio se evalúan al menos 3 embriones por condición (mutante y silvestre) en cada uno de los niveles mencionados (**Fig. 8**). Lo que corresponde aproximadamente a 30 embriones por condición y un mínimo de 150 secciones histológicas aproximadamente. Los parámetros cuantitativos se tabularon y se procesaron estadísticamente para parámetros descriptivos (promedio, varianza, error estándar, entre otros). Con el programa IBM SPSS statistics 22 se evaluó si se cumplían los supuestos de homogeneidad de varianzas y distribución normal. Dado que en un principio no se cumplió alguno de los supuestos se transformaron los datos, y se comprobaron los supuestos que mostraron un $P > 0,05$. Posteriormente se realizó un ANOVA para evaluar si existían diferencias entre silvestres y mutantes, para *hand2* para cada uno de los tiempos y los niveles y se determinó si eran significativas ($P < 0,05$). Además se aplicó una prueba post-hoc de Tukey para evaluar entre niveles las diferencias existentes.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis histológico de los cortes

Se realizaron cortes para MOAR en embriones de pez cebra tanto silvestres como mutantes *han* en los estadios 36, 24 y 18 hpf. De acuerdo a estos cortes se observaron características morfológicas para evaluar si existía influencia de Hand2 en la formación del pronefros en pez cebra. Por simplicidad solo se muestran imágenes representativas del nivel 3, pero las características observadas son reproducibles en los otros niveles (Anexos 1 a 4).

En las figuras 9 a 10 se puede notar que en general, el túbulo en los mutantes es más grande con área promedio de $529,040 \mu\text{m}^2$ mientras que en silvestres es de $357,665 \mu\text{m}^2$ ($P=0,000$). Adicionalmente se encontró que los individuos *han* cuentan con un mayor número de células (7 ± 2) que su contraparte silvestres (5 ± 2) presentando diferencias significativas para esta característica ($P=0,008$). Finalmente se observaron diferencias en el tamaño del lumen, donde los silvestres presentaban en promedio $10,985 \mu\text{m}^2$ de área en contraste con los mutantes que tenían un tamaño de $21,636 \mu\text{m}^2$ ($P=0,000$).

Adicionalmente se hicieron comparaciones entre los estadios evaluados y los 3 niveles de corte pero en ninguno de los dos casos se encontraron diferencias significativas.

7.7.1 Descripción morfológica de cortes a 36 hpf

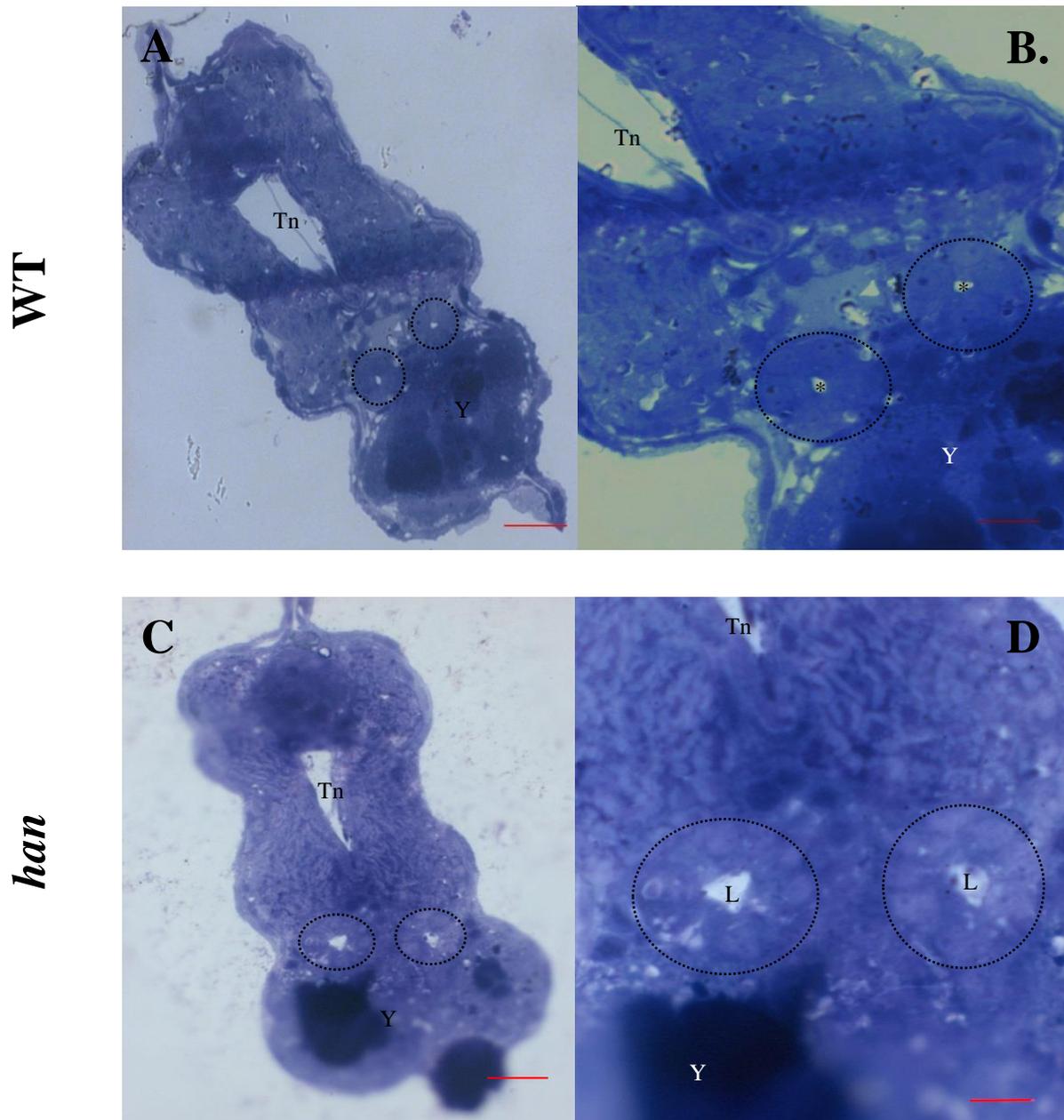


Figura 9. Cortes transversales de embriones silvestres y mutantes *han* a 36 hpf. **A.** silvestre 40x. Barra equivale a 20 μ m **B.** silvestre 100x. Barra equivale a 10 μ m **C.** mutante 40x. **D.** mutante 100x. Se puede apreciar la estructura tubular resaltada con las líneas punteadas. Y: yema. Tn: tubo neural. L: lumen. *: Lumen en silvestres.

Específicamente, en los animales silvestres (Fig. 9 A. y B.) se observó una estructura circular en ambos túbulos con área de $338,611 \mu\text{m}^2$ en promedio, la integridad del tejido entre ellos es similar y cada uno cuenta con 5 ± 2 células del mismo tamaño cada una. También se puede observar un lumen pequeño, con un promedio de $12,024 \mu\text{m}^2$, y la separación entre los túbulos correspondiente al nivel 3.

Por su parte en los animales mutantes (*han*) se observa que la integridad del tejido es parecida a la de los animales silvestres, aunque en el individuo mutante se puede observar en promedio un mayor número de células de aproximadamente 8 ± 2 ($P=0,000$). Adicionalmente, estas no están tan ordenadas y su forma no es uniforme. Por otro lado los túbulos son más grandes, con un área $500,937 \mu\text{m}^2$ ($P=0,001$), y una forma alargada presentando una separación mayor entre ellos comparada con las de sus pares silvestres. El lumen es de mayor tamaño, con un área de $18,177 \mu\text{m}^2$ en promedio, que el observado en los animales silvestres donde se registró un área de $12,024 \mu\text{m}^2$, pero las diferencias en esta característica no alcanzan a ser significativas ($P=0,178$). Aunque las imágenes presentadas muestran solo el nivel 3 de los embriones, las observaciones y comparaciones entre los otros niveles muestran las mismas diferencias globales, excepto para el área del lumen (Fig 9. C y D; Anexo 1).

7.1.2 Descripción morfológica de cortes a 24 hpf

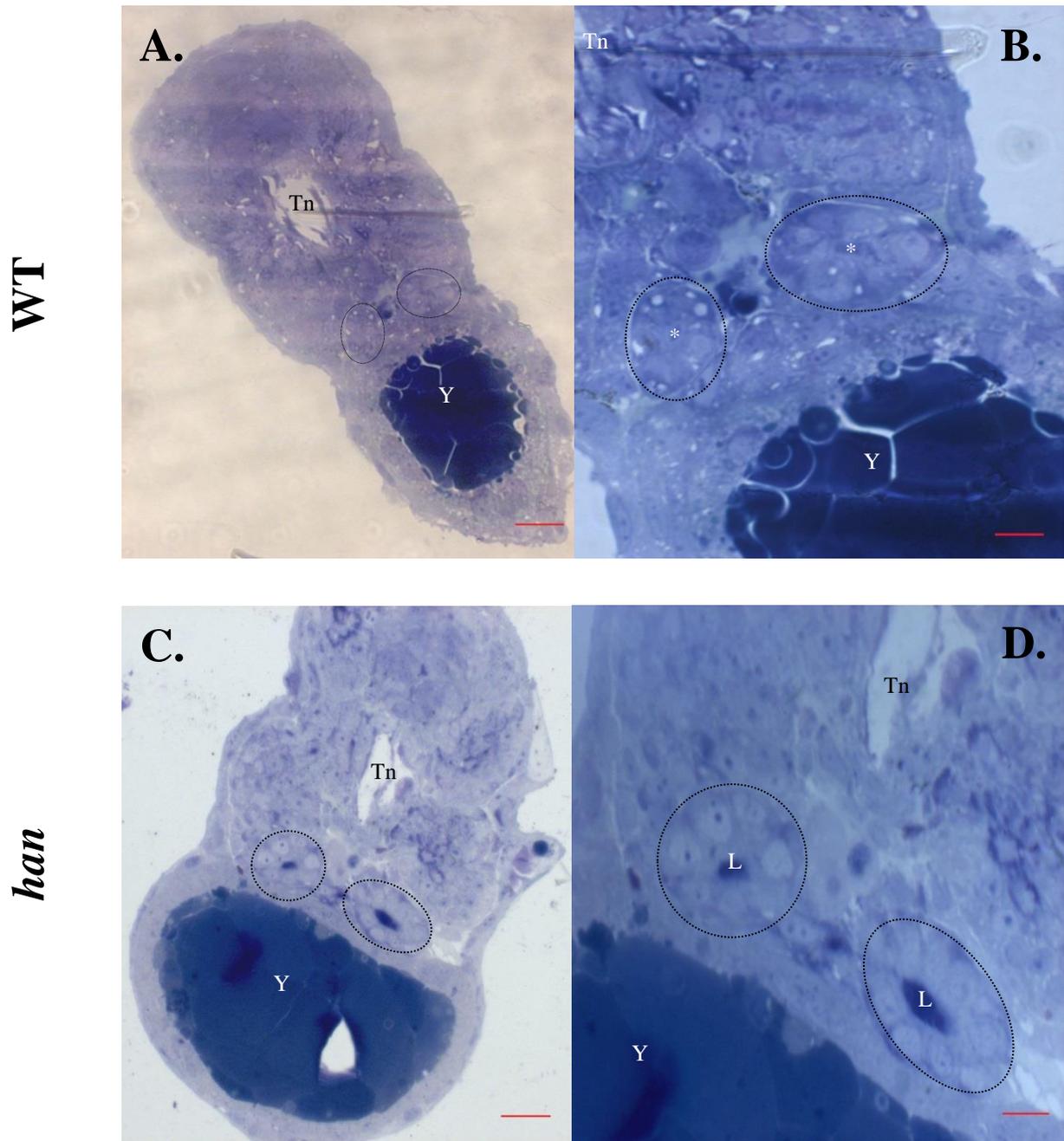


Figura 10. Cortes transversales de embriones a 24 hpf. **A.** silvestre 40x. Barra equivale a 20 μ m. **B.** silvestre 100x. Barra equivale a 10 μ m **C.** mutante 40x. **D.** mutante 100x. Se puede apreciar la estructura tubular resaltada con las líneas punteadas. Y: yema. Tn: tubo neural. L: lumen. *: Lumen en silvestres.

A las 24 hpf, en los individuos silvestres se aprecia que un túbulo tiene forma circular, mientras que el otro presenta una forma levemente ovalada (probablemente artefacto de la orientación del espécimen), presentan 5 y 4 células respectivamente, las cuales tienen forma circular y están dispuestas ordenadamente alrededor del lumen, que es apenas visible (Fig. 10. A y B).

Como se puede observar en la Figura 10 C y D de los individuos mutantes de 24 hpf, los dos túbulos presentan una forma diferente ya que uno es circular y el otro es alargado, lo mismo se observa en los silvestres. Como esta figura corresponde a corte del nivel 3 los túbulos ya están más cercanos entre ellos que en los cortes de la región anterior (Anexo 2), puesto que se acercan al cierre del túbulo, donde se formará la cloaca.

Al comparar los individuos silvestres y mutantes de este estadio en particular, se observó que en cuanto a integridad de tejido y forma de los túbulos los dos fenotipos presentan las mismas características. Por otro lado, la cantidad de las células que conforman el túbulo de los mutantes es promedio mayor (7 ± 2) respecto a sus pares silvestres que presentan (5 ± 2) células en los túbulos ($P=0,000$). Adicionalmente se observa que el tamaño del túbulo y del lumen en mutantes es más grande, con un área promedio de $555,143 \mu\text{m}^2$ y $25,095 \mu\text{m}^2$ respectivamente. Mientras que los individuos silvestres registraron un valor de $376,719 \mu\text{m}^2$ para el túbulo y $9,945 \mu\text{m}^2$ para el área del lumen ($P_{\text{túbulo}}=0,000$. $P_{\text{lumen}}=0,001$)

En cuanto a la separación de los túbulos entre sí de acuerdo al nivel evaluado, aunque no se hicieron mediciones de esta característica, los individuos mutantes presentan mayor distancia aparente relativa a sus pares silvestres.

7.1.3 Descripción morfológica de cortes a 18 hpf

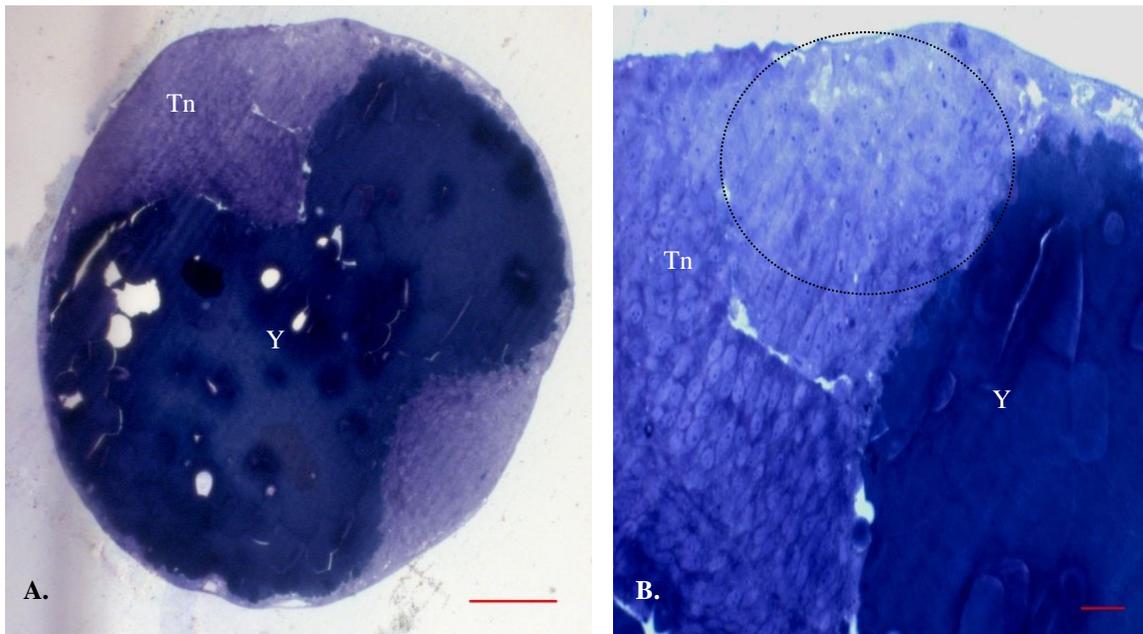


Figura 11. Cortes transversales de embriones a 18 hpf. **A.** 10x. Barra equivale a 10 μ m **B.** 40x. Barra equivale a 20 μ m. El círculo punteado indica el lugar donde se esperaba la posición del mesodermo intermedio (IM).

En los individuos correspondientes al estadio de 18 hpf se observó una composición celular uniforme en todo el embrión (Fig. 11. A y B). Por esto no se pueden diferenciar morfológicamente la estructura pronéfrica o ningún otro tejido en el embrión comparado con los otros estadios evaluados. Se supone la posición donde estarían los túbulos de acuerdo a lo observado anteriormente pero no se detalla ningún tipo de diferenciación estructural. Se pueden observar paquetes de células que presentan algún tipo de organización pero es imposible identificar una estructura específica, probablemente debido a que es un estadio muy temprano y todavía no se ha dado ningún tipo de diferenciación morfológica en esta área.

7.2 Análisis morfométrico

Se realizó un análisis de las características morfológicas estudiadas donde se encontró que los individuos mutantes presentaban diferencias significativas con respecto a su contraparte silvestre en la mayoría de los casos en cuanto a número de células que conformaban el túbulo, área del

lumen y del túbulo en los estadios evaluados. Aunque para las 36 hpf en área del lumen no se encontraron diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Promedios para número de células, área del túbulo y área del lumen por estadios.

		WT	<i>han</i>	P (entre fenotipos)
Número de células	24 hpf	5±2	7±2	0,0000
	36 hpf	5±2	7±2	0,0000
Área del túbulo	24 hpf	376,7191459	557,143413	0,0000
	36 hpf	338,6119485	500,937907	0,001
Área del lumen	24 hpf	9,945687527	25,0954386	0,001
	36 hpf	12,02460811	18,1776287	0,178

Adicionalmente se realizó una comparación entre los estadios de 24 y 36 hpf para las mismas características para cada uno de los fenotipos. En este caso no se reportaron diferencias significativas para silvestres en número de células ($P=0,262$), área del túbulo ($P=0,190$) ni en el área del lumen ($P=0,112$). De la misma forma los individuos mutantes tampoco presentaron diferencias entre los dos estadios de desarrollo ni para número de células ($P=0,541$) ni para área del túbulo ni lumen ($P_{\text{túbulo}}=0,228$. $P_{\text{lumen}}=0,170$). Esto nos lleva a concluir que no existen diferencias entre estos dos estadios tanto para los individuos silvestres como en los animales mutantes. Pero como se indicó anteriormente las diferencias entre los dos fenotipos en el número de células, área del túbulo y del lumen se mantienen.

Para ejemplificar los resultados observados se realizaron gráficos donde se comparan cada una de las características por separado contra los fenotipos y los estadios estudiados en este trabajo.

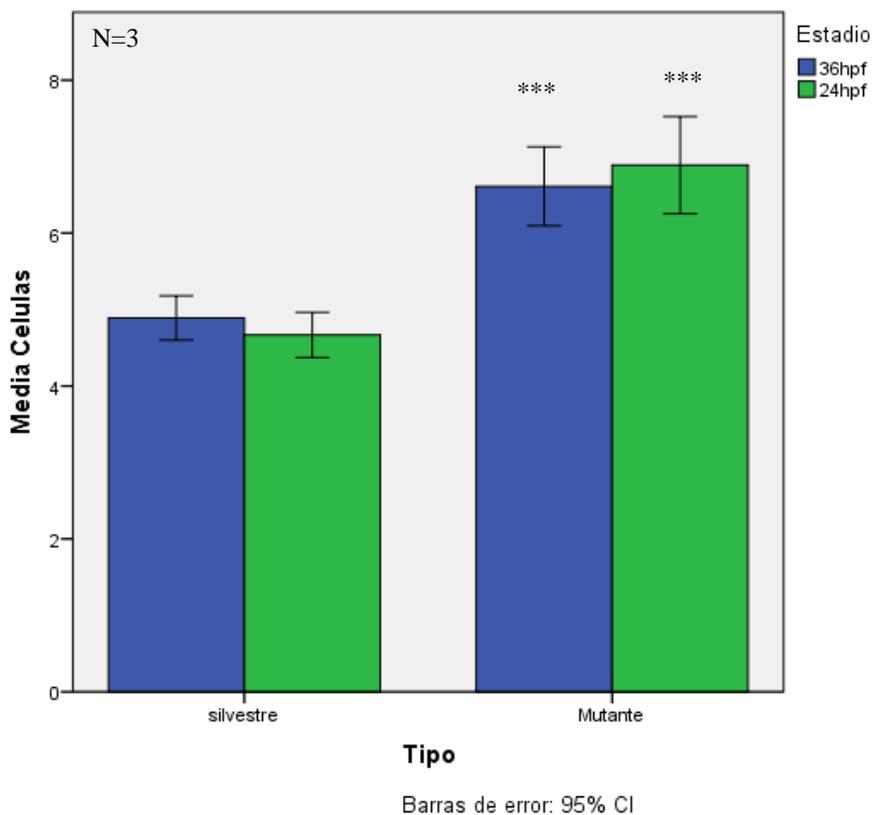


Figura 12. Número de células en el túbulo del pronefros a las 36 hpf y las 24 hpf. Se encontraron diferencias significativas entre fenotipos más no entre estadios.

En la figura anterior (Fig. 12) se puede comprobar lo descrito anteriormente. En este caso se afirma que existen diferencias significativas entre peces silvestres y mutantes ($P=0,000$), pero al analizar las barras verde y azul que representan los estadios de 24 hpf y 36 hpf respectivamente, vemos que estas no difieren entre estadios, por lo que se confirma el hecho que entre estos no hay diferencias significativas en cuanto al número de células que conforman la estructura tubular del pronefros en pez cebra en cada fenotipo.

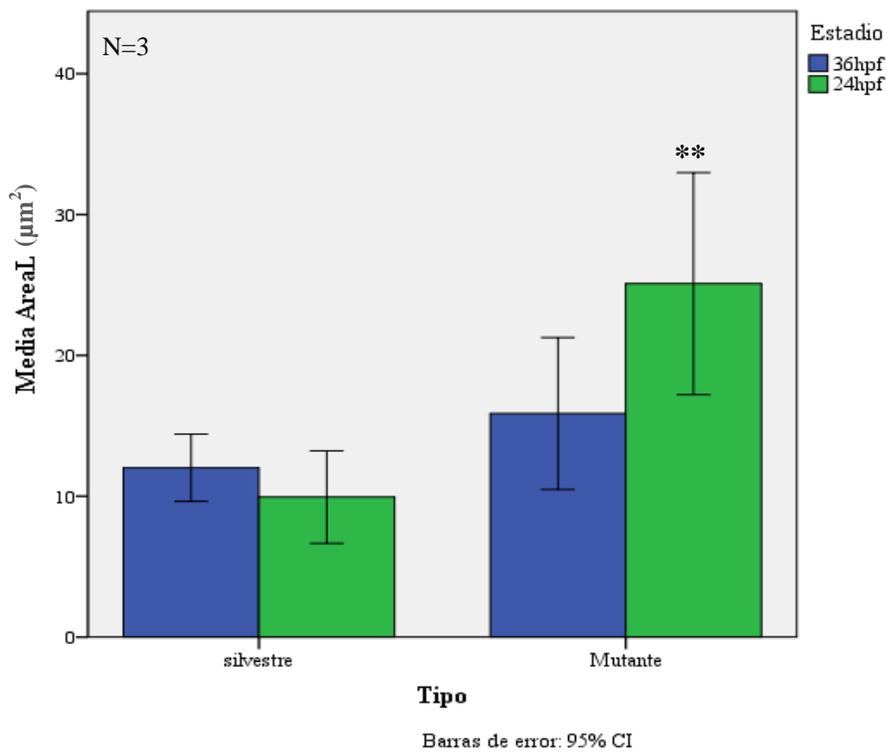
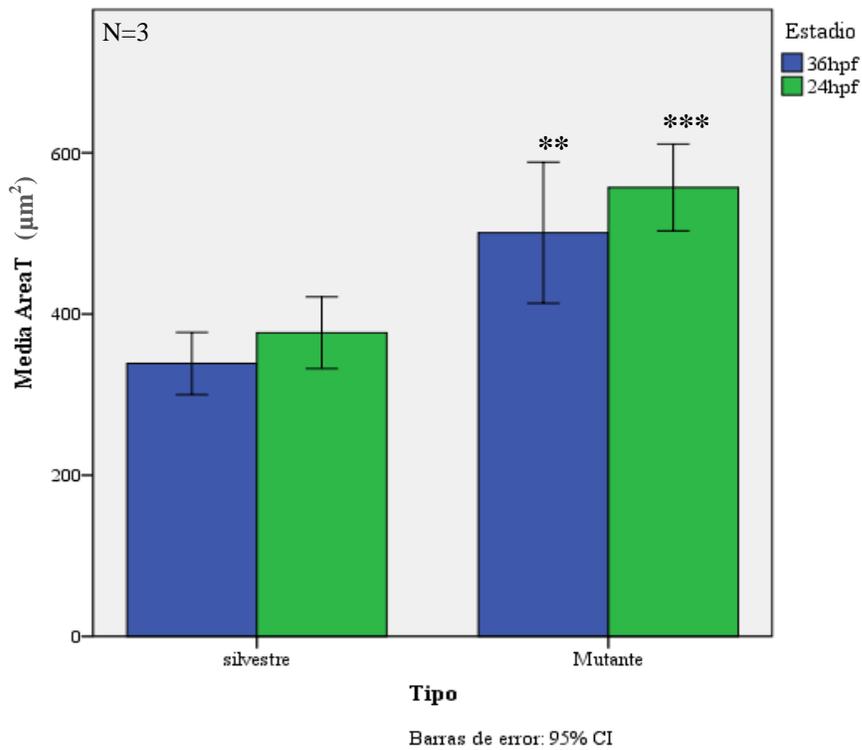


Figura 13. A. Área del túbulo del pronefros a las 36 y 24 hpf. Se encontraron diferencias altamente significativas entre los fenotipos. **B.** Área del lumen a las 36 y 24 hpf. Se encuentran diferencias significativas entre mutantes y silvestres para las 24 hpf.

En la figura 13A se comparan los datos encontrados para el área del túbulo contra fenotipo y estadio estudiado. De acuerdo con esta gráfica se afirma que existen diferencias altamente significativas entre el área del túbulo entre individuos mutantes y silvestres. En cuanto a las comparaciones entre estadios, aunque en la gráfica se muestran algunas diferencias en los análisis no se reportaron características significativas ($P=0,113$).

Los resultados que se pueden observar en la figura 13B corresponden a las diferencias encontradas en área del lumen entre silvestres-mutantes y 24 hpf-36 hpf. Donde se reportan diferencias significativas entre los fenotipos para las 24 hpf ($P=0,001$) pero no para las 36 hpf ($P=0,178$). Por otro lado, no se observan diferencias entre los estadios ya que las barras son más uniformes para cada fenotipo y el valor de P reportado es mayor a 0,05 lo que lleva a rechazar la hipótesis nula la cual afirma que no existen diferencias significativas.

Finalmente se realizaron comparaciones para evaluar las diferencias entre los 3 niveles estudiados en cada uno de los fenotipos. Según estas, en silvestres hay diferencias en el área del túbulo solo entre los niveles 2 y 3 ($P=0,019$), pero no hay diferencias en el número de células ($P=0,205$) ni el tamaño del lumen ($P=0,077$). En los individuos mutantes no se reportaron diferencias entre ninguno de los niveles evaluados ni para número de células ($P=0,762$), área del túbulo ($P=0,377$) ni área del lumen ($P=0,132$).

Tabla 3. Promedios para número de células, área de túbulo y área del lumen por niveles.

		WT	<i>han</i>	P (entre fenotipos)
Número de células	Nivel 1	5±2	7±2	0,000
	Nivel 2	5±2	7±2	0,000
	Nivel 3	5±2	7±2	0,000
Área del túbulo	Nivel 1	361,468635	559,403148	0,001
	Nivel 2	400,517778	540,583027	0,003
	Nivel 3	311,010228	487,135805	0,003
Área del lumen	Nivel 1	11,6968297	13,6035904	0,326
	Nivel 2	13,6507087	24,0070218	0,066
	Nivel 3	7,60790504	27,2989887	0,001

Por otro lado al comparar cada fenotipo por nivel (Tabla 3) se encontró que había diferencias altamente significativas para el número de células y área del túbulo en los 3 niveles. En cuanto al área del lumen solo el nivel 3 mostró diferencias entre silvestres y mutantes ($P=0,001$) mientras que en los otros niveles el valor de P era mayor a 0,05.

8. DISCUSIÓN

8.1. Diferencias entre individuos silvestres y mutantes.

Según los resultados reportados durante este trabajo, el primero basado en la morfología del pronefros en pez cebra, se encontraron diferencias significativas en cuanto a las características cuantitativas evaluadas como el número de células que conforman el túbulo, área del túbulo y área del lumen, además se observaron diferencias en cuanto a la forma de los túbulos, a la disposición de las células y a la posición o separación relativa de los túbulos entre ellos. Esto confirma las observaciones preliminares que se habían realizado utilizando hibridación in-situ donde se encontró que los individuos mutantes aparentaban tener mayor número de células, un área del lumen que tendía a ser más grande y una desorganización de las células que conforman la estructura tubular respecto a los individuos silvestres (Rincón, et al. 2014).

De acuerdo a los resultados, donde se observa que en los mutantes se ven afectadas varias características morfológicas del pronefros, se puede suponer que Hand2 podría jugar un papel durante el desarrollo afectando diferentes procesos. Hay que tener en cuenta que como se busca aportar al desarrollo de conocimiento sobre la embriogénesis renal para, a largo plazo, poder desarrollar mejores tratamientos para las enfermedades renales, en mamíferos también existe el factor Hand1 que se ha encontrado puede tener funciones parecidas o redundantes con Hand2 por lo que los efectos observados en pez cebra que solo presenta la forma Hand2, podrían ser más severos que en mamíferos, ya que Hand1 parece aliviar las consecuencias de no presentar el otro factor (Yelon, et al., 2000; Firulli, 2003; Vincentz, Barnes, & Firulli, 2011). Sin embargo, a la fecha no hay reportes en mamífero de fenotipos renales asociados a mutaciones en *hand2* ni en *hand1*.

8.1.1 Proliferación

Durante este trabajo se encontró que el número de células que conforman los túbulos de los pronefros aumenta significativamente en individuos mutantes para Hand2. Esto sugiere que este factor de transcripción podría estar afectando el proceso de proliferación en el desarrollo renal. En otros estudios que evaluaban la función de Hand2 durante el desarrollo se encontró que este es necesario para proliferación de precursores del sistema nervioso entérico (Reichenbach, et al. 2008). Adicionalmente, en otro trabajo se reportó que la ablación de este factor provoca un aumento en el tamaño del intestino (Lei & Howard, 2011). Esto concuerda con lo encontrado en este trabajo puesto que un mutantes sin función de *hand2* había un mayor número de células. Por el contrario, según Firulli (2003) Hand2 más que tener un papel en aumentar la proliferación parece inhibir apoptosis, ya que en estudios de desarrollo cardíaco análisis por TUNNEL (detección de apoptosis) mostró que individuos con mutaciones nulos para *hand2* presentaban más células apoptóticas en el modelo murino. Esta diferencia en cuanto a los resultados de este trabajo se puede deber a que se estudiaron diferentes órganos en diferentes modelos animales.

Por otro lado estudios en desarrollo cardíaco reportan que individuos con delección de *hand2* o con pérdida de función después del inicio de la diferenciación presentan una reducción en la población cardiogénica probablemente debido a que no hay una buena proliferación (Yelon, et al. 2000; Tsuchihashi, et al. 2011). Estas diferencias pueden ser un reflejo de las particularidades entre los programas de desarrollo cardíaco y pronefrico que podrían tener una interacción de diferente naturaleza con Hand2.

Adicionalmente, también se han encontrado reportes en cuanto al desarrollo de la aleta pectoral de pez cebra y la expansión de primordios en donde Hand2 parece tener un papel esencial en este proceso. En mutantes nulos se observaba mayor número de células y los primordios eran más grandes. En ratón, Hand2 también ha mostrado tener un papel importante en la elongación de extremidades mediante su interacción con *shh* (Yelon, et al. 2000). De este modo, *hand2* podría estar actuando como un promotor de la proliferación en el IM explicando el incremento en el número de células y el aumento de tamaño en los túbulos pronefricos. Teniendo en cuenta que *hand2* se expresa en la LPM su efecto en el desarrollo renal obedecería a la interacción entre la LPM y el IM.

8.1.2 Morfogénesis, limitación de dominios y diferenciación

Una explicación alternativa para entender el cambio en el tamaño del pronefros y el mayor número de células que lo componen en los animales mutantes para *hand2*, sería un papel de este gen en la definición de las dimensiones de los dominios competentes para diferenciación. Por ejemplo, genes como *cdh17*, cuyo producto es importante para las interacciones celulares que contribuyen a la formación, aumentan sus niveles de expresión y expanden su patrón de distribución en ausencia de *hand2* (Garavito, Riley, & Yelon, 2010).

Al analizar esta observación hay que tener en cuenta que precursores hematopoyéticos y vasculares surgen de la LPM, la cual es colindante con el IM de donde surge el pronefros. Dado que el riñón es el sitio de hematopoyesis en la edad adulta, es de esperar que algunos genes expresados en la zona renal se vean afectados por las señales de la LPM y que algunos de ellos se sobrelapen. Por ejemplo el gen *cdh17*, que es un marcador de pronefros, también se expresa en estadios tempranos en la LPM. Esta expresión parece ser remanente de marcadores sanguíneos tempranos como *scl*, que también está presente en el desarrollo de pronefros en el túbulo distal. Esto muestra la estrecha relación e interacciones existentes entre estos genes y su distribución en los tejidos colindantes (IM – LPM). Sobreexpresión de *slc* en pez cebra contribuye a que LPM tenga destino sanguíneo a expensas del riñón y del ducto pronéfrico. Es decir, a más presencia de *slc* menos *cdh17*, y menos estructura pronéfrica (Horsfield, et al. 2002). Según estas interacciones, se puede suponer que Hand2 podría tener un efecto sobre la expresión de *cdh17* aumentando el campo renal a expensas de la LPM.

Adicionalmente se ha encontrado que *cdh17* comparte su dominio de expresión con *lhx1*, el cual es un gen esencial para el desarrollo renal. Sin *lhx1* no hay dominio pronéfrico y cuando se sobreexpresa, el campo renal aumenta a expensas del MP (Cirio, y otros, 2011; Horsfield, et al. 2002). De acuerdo a esto, el hecho que mutantes nulos para Hand2 presenten mayores niveles de expresión de *cdh17* (Garavito, Riley, & Yelon, 2010) e incremento en el número y tamaño de los túbulos pronéfricos en comparación con los silvestres podría ser una consecuencia de la expansión del campo renal con su posterior diferenciación.

Por otro lado en el desarrollo del intestino, más específicamente del sistema nervioso, Hand2 parece jugar un papel en la diferenciación de precursores en neuronas y no solo en especificación, puesto que se ha encontrado que Inhibición de Hand2 detiene diferenciación de células neuronales entéricas. En el intestino, ratones con mutación para *hand2* mostraron una baja

diferenciación en células neuronales pero no se incrementó el número de glía sugiriendo que si bien se afecta la diferenciación no se desarrollan nuevos destinos celulares. Entonces Hand2 parece ser esencial para una completa diferenciación mas no para que las células entren al linaje neuronal (D'Austréaux, et al. 2007). Esto no apoya los resultados encontrados en este trabajo, ya que en este se encontró mayor número de células tubulares en el pronefros de pez cebra. Esta contradicción se puede deber a que si bien la diferenciación terminal parece ser dependiente de Hand2, en este proceso de precursores neuronales entran en acción varios factores que no se ven en el riñón, como HuD un marcador para células neuronales específicamente que se sabe es afectado por la baja presencia de Hand2 (D'Auutréaux, et al 2011).

8.1.3 Polaridad

Según los resultados encontrados la organización de las células del túbulo en mutantes es un poco diferente que la observada en los silvestres, pero al comparar estos resultados con la literatura no se han encontrado reportes que sustenten completamente esto, ya que en estudios de desarrollo cardíaco con mutantes para *hand2*, donde también se ve afectada la proliferación los pocos precursores presentes no formaban un epitelio, ni poseen polaridad apico-basal (Trinh, Yelon, & Stainier, 2005) pero otros estudios han revelado que Hand2 no parece tener efecto en la polaridad en otros tejidos epiteliales, ya que, aunque Hand2 se expresa en toda la LPM, la parte posterior de esta no parece exhibir defectos en cuanto a polaridad en mutantes para este gen (S. Horne-Badovinac and D.Y.R.S., datos no publicados En: Trinh, Yelon, & Stainier, 2005). Estudios por inmunohistoquímica podrían revelar diferencias, si existen, en la definición de la polaridad en los túbulos pronefricos de animales mutantes para *hand2*.

8.1.4 Migración

Aunque no se hicieron mediciones de la distancia entre los túbulos, en las fotografías tomadas de los pronefros se observa que en el caso de los mutantes los túbulos están más separados que en los cortes de peces de tipo silvestre esto podría indicar una posible función de parte de Hand2 en cuanto a los procesos de migración en desarrollo renal de pez cebra. Estudios reportados con mutantes *han* durante el desarrollo del corazón mostraron deficiencias significativas en la migración de los precursores cardiacos hacia la línea media a las 24 hpf (Yelon, et al. 2000). Adicionalmente la delección de *hand2* después de que haya dado inicio la diferenciación cardiaca

causó un efecto tardío en la expansión ventricular, similar a lo que se observa en la zona miocárdica en individuos con mutación nula para este gen (Tsuchihashi, et al. 2011). Estos reportes podrían explicar en parte lo encontrado en este trabajo, aunque hay que tener en cuenta que la mayoría de estudios para Hand2 se han hecho en el corazón, lo que significa que genes involucrados en desarrollo cardiaco podrían no reaccionar de la misma manera que los renales. Según Garavito, Riley, & Yelon (2010) mutaciones en *hand2* aumentan la expresión de precursores renales pero reducen la expresión de genes involucrados en desarrollo cardiaco.

Por otro lado, reportes del papel de *hand2* en órganos posteriores como el intestino y sistema nervioso entérico afirman que cuando no hay Hand2 se detiene la migración inicial de células de la cresta vagal al intestino, pero cuando está presente la migración se da normalmente apoyando que *hand2* podría jugar un papel en la migración durante el desarrollo renal (Reichenbach, et al. 2008). Adicionalmente, estudios de migración celular en la formación del intestino mirando el papel de HAND2 revelaron que este influye en este proceso. Aunque la migración de estas células empieza, no logran llegar a su destino final. En la mayoría de los individuos se observa que las células se detienen en la mitad (Yin, et al., 2010; D'Auutréaux, et al. 2011). Esto se puede apreciar en las figuras 7-10 donde los túbulos de los mutantes parecen más separados que en los individuos silvestres, ya que en mutantes para *hand2* durante procesos de migración los rearrreglos celulares fallan y la migración se detiene, esto se puede deber a una influencia directa de Hand2 sobre los precursores celulares involucrados en el desarrollo o a que Hand2 podría estar afectando la estructura de la matriz extracelular, lo que dificultaría el movimiento de las células hacia su destino (Trinh, Yelon, & Stainier, 2005; Vincentz, Barnes, & Firulli, 2011)

9. CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió establecer las diferencias fenotípicas en la morfología del pronefros en peces cebra mutantes para el gen *hand2* en diferentes estadios de desarrollo respecto a sus pares silvestres. Específicamente se encontró que los animales portadores de la mutación nula en *hand2* presentan un mayor tamaño de los túbulos y el lumen pronefricos, un grado de organización celular menor comparados con sus pares silvestres y un mayor número de células.

Las diferencias encontradas en el fenotipo del pronefros de animales mutantes para *hand2* son el reflejo del incremento significativo en el número de células que componen el túbulo, el área del lumen y del túbulo respecto a sus pares silvestres. Se encontró que los animales mutantes presentan en promedio 7 ± 2 células comparado con 5 ± 2 células en los animales silvestres por túbulo. De manera similar, el área del túbulo y de su lumen es mayor en los animales mutantes con valores de $500\mu\text{m}^2$ y $30\mu\text{m}^2$ respectivamente, en comparación con su contraparte silvestre que tiene un área promedio de $300\mu\text{m}^2$ para el túbulo y $10\mu\text{m}^2$ para el lumen.

En conjunto, los resultados de este trabajo revelan un papel antes desconocido para el factor de transcripción Hand2 en el desarrollo renal. Los datos obtenidos confirman que este factor está involucrado en los mecanismos que definen el número de células que componen los túbulos pronéfricos, sus dimensiones y la organización celular, sugiriendo un papel en diferentes procesos del desarrollo como proliferación, morfogénesis y delimitación del dominio renal. Sin embargo establecer si realmente cumple estas funciones específicas se escapa del alcance de este estudio.

10. RECOMENDACIONES

Durante este trabajo se logró comprobar mediante comparaciones morfológicas, las observaciones hechas en estudios preliminares donde se encontró que en peces cebra portadores de una mutación nula para Hand2 el animal sufría una serie de modificaciones en el pronefros. Sugiriendo un papel desconocido para este factor y una influencia de este desde la LPM sobre el IM no considerada antes.

Como este estudio era netamente morfológico, se sugiere en un futuro considerar usar algunos individuos con el IM o el pronefros marcados para poder apreciar la estructura más fácilmente, ya que en algunos cortes era difícil encontrar la estructura. Según esta misma consideración, como a las 18 hpf no se logró observar una estructura ya establecida, se sugiere usar marcadores de IM y además estudiar estadios entre las 18 y las 24 hpf para establecer el momento en que se empieza a diferenciar el pronefros.

Adicionalmente, para complementar este trabajo se pueden hacer mediciones complementarias como la distancia de los túbulos o el tamaño de las células. También sería recomendable hacer

estudios sobre la funcionalidad del pronefros en pez cebra, para comprobar que las células terminen de diferenciarse.

Hay que tener en cuenta que el conocimiento sobre las redes de interacciones entre tejidos y entre genes necesarias para la formación del pronefros aún está incompleto, que hay factores involucrados que aún se desconocen e interacciones que faltan aclarar. Además existen interacciones y blancos desconocidos para Hand2, ya que como no se habían reportado funciones para este factor durante el desarrollo renal, no se conocen las interacciones o blancos indirectos que este pueda tener desde la LPM sobre el IM.

Según lo anterior se recomienda hacer estudios, utilizando herramientas bioinformáticas, patrones de expresión de genes y/o peces con doble hibridación *in-situ* con marcadores renales, para establecer los posibles blancos de Hand2 que puedan estar afectando el desarrollo de los pronefros.

Por otro lado, al esperar que este trabajo contribuya al desarrollo de terapias para humanos cabe destacar que en estos existe el factor Hand1 que podría aliviar las consecuencias en caso de que falte Hand2, por lo que, en caso de comprobarse el papel de este último en el desarrollo renal, sería conveniente realizar estudios teniendo en cuenta esta diferencia en mamíferos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Avendaño, H. (2008). *Nefrología clínica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Bayne, K. (1998). Developing guidelines on the care and use of animales. . *Annals of the New York Academy of Science*, 105-110.
- Boyle, S., & de Caestecker, M. (Julio de 2006). Role of transcriptional networks in coordinating early events. *Journal of the American Physiological Society*, 291, F1-F8.
- Cirio, C., Hui, Z., Haldin, C., Consentino, C., Stuchenholz, C., Che, X., Huriede, N. et al. (Abril de 2011). Lhx1 is required for specification of renal progenitor cell field. *PLoS ONE*, 6(4).
- Constantini, F., & Kopan, R. (2010). Patterning a Complex Organ: Branching Morphogenesis and Nephron Segmentation in Kidney Development. *Developmental cell Review*, 608-712.
- Curtis y Barnes. (2003). *Biología*. Sexta edición en Español. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. pp. 1147.
- D'Austréaux, F., Morikawa, Y., Cserjesi, P., & Gershon, M. (2007). Hand2 is necessary for terminal differentiation of enteric neurons from crest-derived precursors but not for their migration into the gut or for formation of glia. *Development*, 137, 2237-2249.
- D'Austréaux, F., Margolis, K., Roberts, J., Stevanovic, K., Mawe, G., Li, Gershon, M. (2011). Expression Level of Hand2 Affects Specification of Enteric Neurons and Gastrointestinal Function in Mice. *Gastroenterology*, 140(8), 576-587.
- Dressler, G. (2006). Advances in early kidney, specification and patterning. *Development*, 136, 3863-3874.
- Drummond, I. (2005). Kidney development and disease in zebrafish. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16, 299-304.

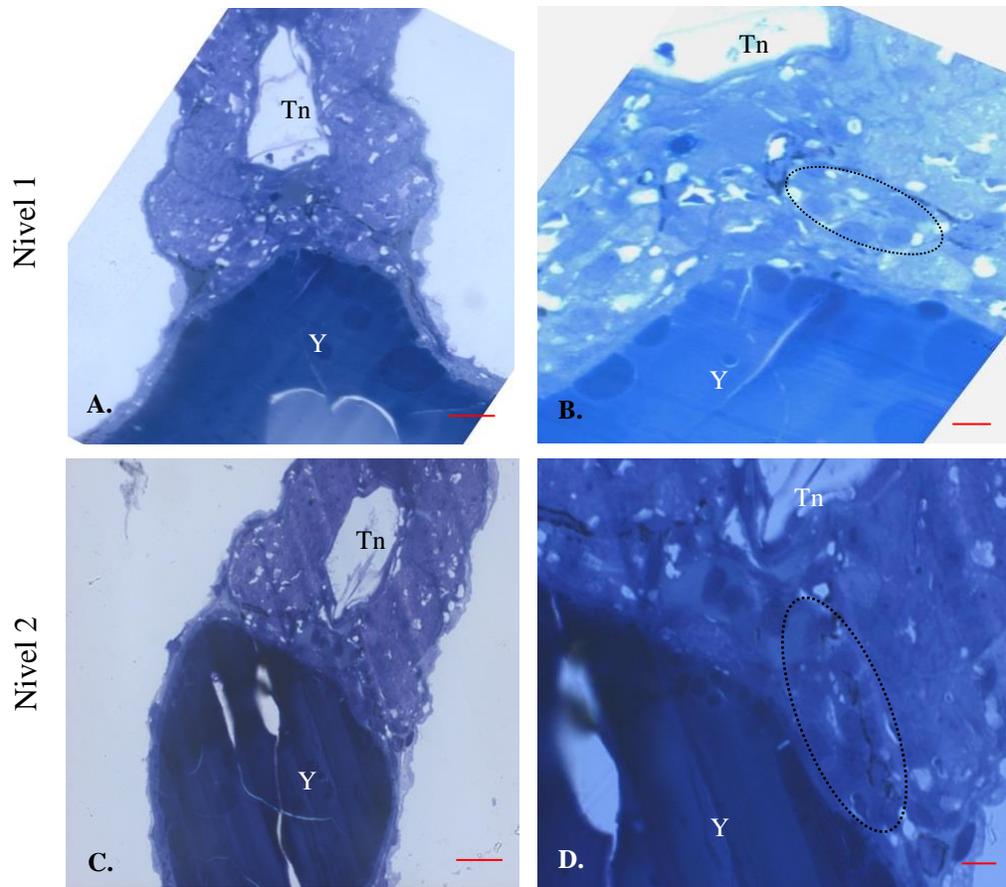
- Drummond, I., et al. (1998). Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development*, 125, 4655-4667.
- Drummond, I., & Davidson, A. (2010). Zebrafish Kidney Development. En I. Drummond, & A. Davidson. Estados Unidos: Academic Press.
- Firulli, A. (2003). A HANDful of questions: the molecular biology of the heart and neural crest derivatives (HAND)-subclass of basic helix–loop–helix transcription factors. *Gene*, 312, 27-40.
- Garavito, Z., Riley, H., & Yelon, D. (2010). Hand2 ensures an appropriate environment for cardiac fusion by limiting Fibronectin function. *Development*, 19(137), 3215-3220.
- Gerlach, G., & Wingert, R. (2013). Kidney organogenesis in the zebrafish: insights into vertebrate nephrogenesis and regeneration. *Developmental biology*, 559-585.
- Gilbert, S. (2010). *Developmental biology* (9na edición ed.). Massachusetts, USA: Sinauer Associates.
- Horsfield, J., Ramachandran, A., Reuter, K., LaVallie, E., Collins-Racie, L., Crosier, K., & Crosier, P. (2002). Cadherin-17 is required to maintain pronephric duct integrity during zebrafish development. *Mechanisms of Development*, 115, 15-26.
- Ivanovski, O., Kulkeaw, K., Nakagawa, M., Sasaki, T., Mizuochi, C., Horio, Y., Sugiyama, D. (2009). Characterization of kidney marrow in zebrafish (danio rerio) by using a new surgical technique . *Contributions. Section biological nad mediocl sciences*, 71-80.
- Koolman, J., & Röhm, K.-h. (2004). *Bioquímica: texto y atlas* (3ra edición ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial médica Panamericana.

- Lei, J., & Howard, M. (2011). Targeted deletion of Hand2 in enteric neural precursor cells affects its functions in neurogenesis, neurotransmitter especification and gangliogenesis, causing functional aganglionosis. *Development*, 138, 4789-4800.
- McCambell, K., & Wingert, R. (2012). Renal stem cells: fact or science fiction? *Biochemical Journal*, 444, 153-168.
- McCampbell, K., & Wingert, R. (2013). New tides: using zebrafish to study renal regeneration. *Translational research*, 1-14.
- Merchán, L., Soler, L., Sanchez, P., Martínez, D., Torres, L., Mercado, E., & Hernández, A. (2014). *Situación enfermedad crónica renal en Colombia 2013*. Bogotá: Citygraf Ltda.
- National Kidney and Urologic Diseases. (Noviembre de 2012). *National Kidney and Urologic Diseases*. Obtenido de <http://kidney.niddk.nih.gov/KUDiseases/pubs/kustats/index.aspx>
- NCBI. (4 de Mayo de 2014). *National Center of Biotechnology Information*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/58150>
- Ospina, M., Montaña, J., & Acuña, L. (2011). *Situación enfermedad crónica renal en Colombia 2010*. Bogotá.
- Qi, S., & Wu, D. (2013). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced acute kidney injury in rats by inhibiting cell apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 32, 1262-1272.
- Radzikowski, C. (2006). Protection of animal research subjects. *Science an engineering ethics*, 103-110.
- Reichenbach, B., Delalande, J.-M., Kolmogorova, E., Prier, A., Nguyen, T., Smith, C., Shepherd, I. (2008). Endoderm-derived Sonic hedgehog and mesoderm Hand2 expression are required for enteric nervous system development in zebrafish. *Developmental Biology*, 318, 52-64.

- Rincon, L., Peña, K., Parens, E., Yelon, D., Garavito-aguilar, & Zayra. (Abril de 2014). Does the transcription factor Hand2 have a role in kidney development? *Latin American Zebrafish Network*. Valparaiso, Chile.
- Ross, M., & Pawlina, W. (2007). *Histologia*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Serluca, F., & Fishman, M. (2001). Pre-pattern in the pronephric kidney field of zebrafish. *Development*, 128, 2233-2241.
- Soriano, S. (2004). *Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica. Prevalencia. Claves para el diagnóstico precoz. Factores de riesgo de enfermedad renal crónica*. Recuperado el 13 de Mayo de 2014, de <http://www.revistanefrologia.com/revistas/P7-E237/P7-E237-S141-A3100.pdf>
- Sprague, J., Clements, D., Conlin, T., Edwards, P., Frazer, K., & Schaper, K. (2003). The Zebrafish Information Network (ZFIN): the zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 241-243.
- Swanhart, L., Consentino, C., Diep, C., Davidson, A., de Caestecker, M., & Hukriede, N. (Junio de 2011). Zebrafish Kidney Development: Basic Science to Translational. *Birth Defects Research Part C Embryo Today*, 93(2), 141-156.
- Trinh, L., Yelon, D., & Stainier, D. (8 de Marzo de 2005). Hand2 Regulates Epithelial Formation during Myocardial Differentiation. *Current biology*, 15, 441-446.
- Tsuchihashi, T., Maeda, J., Shin, C., Ivey, K., Black, B., Olson, E., Srivastava, D. (2011). Hand2 Function in Second Heart Field Progenitors is Essential for cardiogenesis. *Developmental biology*, 351(1), 62-69.
- Vincentz, J., Barnes, R., & Firulli, A. (Junio de 2011). Hand factors as regulators of cardiac morphogenesis and implications for congenital heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.*, 91(6), 485-494.

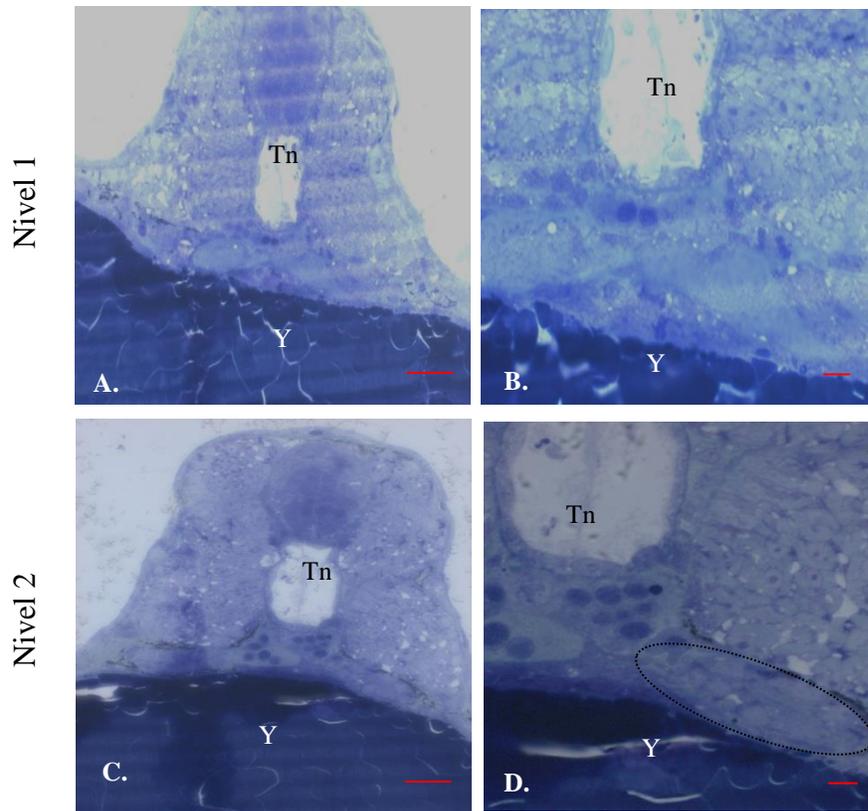
- Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)* (4th ed. ed.). Eugene, Oregon, USA: Univ. of Oregon Press, Eugene.
- Westerfield, M., Doerry, E., Kirkpatrick, A., & Douglas, S. (1999). Zebrafish Informatics and the ZFIN database. *Methods in cell biology*, 15(6), 248-249.
- Wingert, R., & Davidson, A. (2008). The zebrafish pronephros: A model to study nephron segmentation. *International Society of Nephrology*, 1120–1127.
- Yelon, D., Ticho, B., Halpern, M., Ruvinsky, I., Ho, R., Silver, L., & Stainier, D. (2000). The bHLH transcription factor Hand2 plays parallel roles in zebrafish head and pectoral fin development. *Development*(127), 2573-2582.
- Yin, C., Kikuchi, K., Hochgreb, T., Poss, K., & Stainier, D. (15 de Junio de 2010). Hand2 Regulates Extracellular Matrix Remodeling Essential for Gut-Looping Morphogenesis in Zebrafish. *Developmental cell*, 18, 973-984.

ANEXO 1. Figuras de niveles 1 y 2 para individuos silvestres de 36 hpf



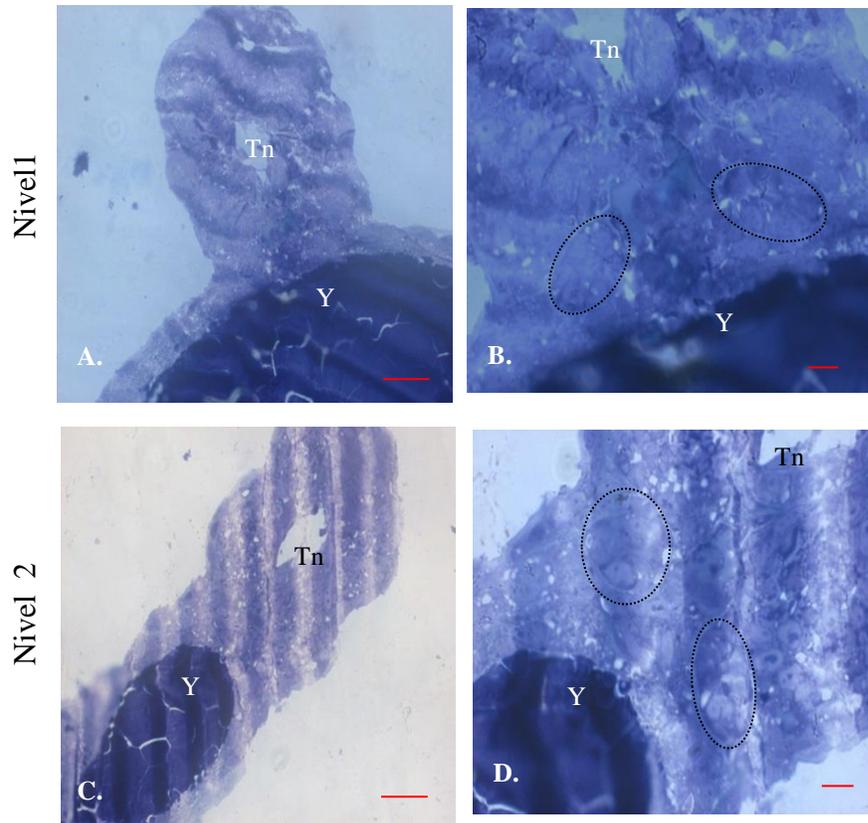
Cortes transversales de embriones silvestres a 36 hpf en niveles 1 y 2. **A y C.** 40x. Barra equivale a 20 μ m. **B y D.** 100x. Barra equivale a 10 μ m. Se puede apreciar la estructura tubular resaltada con las líneas punteadas. Y: yema. Tn: tubo neural.

ANEXO 2. Figuras de niveles 1 y 2 para individuos mutantes de 36 hpf



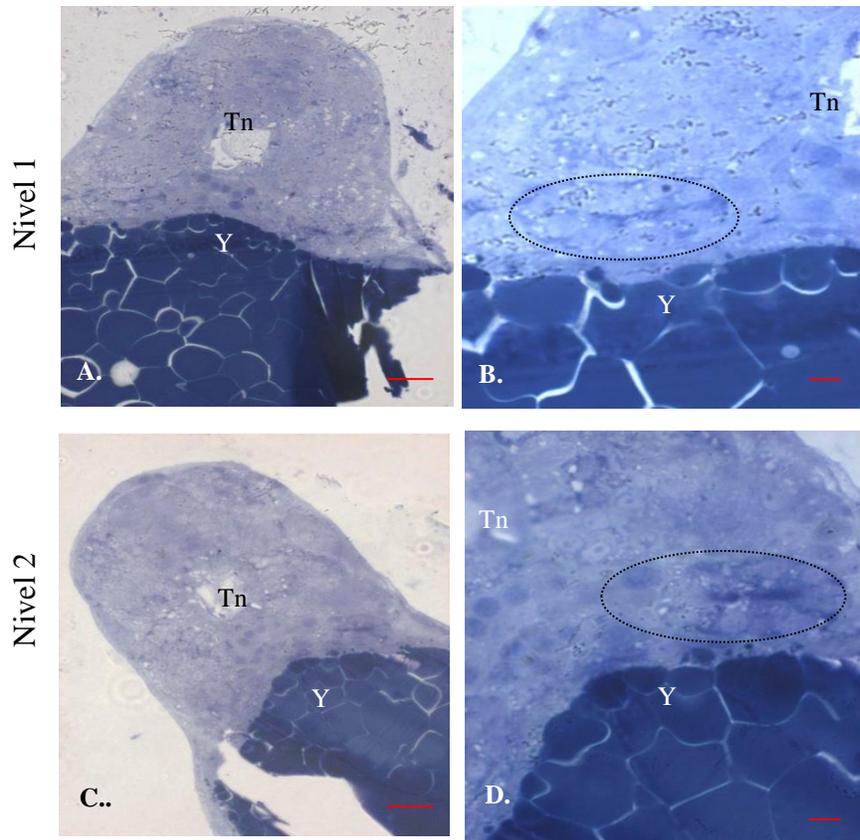
Cortes transversales de embriones mutantes a 36 hpf en niveles 1 y 2.. **A y C.** 40x. Barra equivale a 20 μ m. **B y D.** 100x. Barra equivale a 10 μ m. Se puede apreciar la estructura tubular resaltada con las líneas punteadas. Y: yema. Tn: tubo neural.

ANEXO 3. Figuras de niveles 1 y 2 para individuos silvestres de 24 hpf



Cortes transversales de embriones silvestres a 24 hpf en niveles 1 y 2.. **A y C.** 40x. Barra equivale a 20 μ m. **B y D.** 100x. Barra equivale a 10 μ m. Se puede apreciar la estructura tubular resaltada con las líneas punteadas. Y: yema. Tn: tubo neural.

ANEXO 4. Figuras de niveles 1 y 2 para individuos mutantes de 24 hpf



Cortes transversales de embriones mutantes a 24 hpf de los niveles 1 y 2 **A y C.** 40x. Barra equivale a 20 μ m **B Y D.** 100x. Barra equivale a 10 μ m. Se puede apreciar la estructura tubular resaltada con las líneas punteadas. Y: yema. Tn: tubo neural.

