

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 434**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2010 PCT/IB2010/002156**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11007259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2010 E 10765660 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2454591**

54 Título: **Nueva herramienta para el estudio de los eventos asociados con la transición endotelial hematopoyética (EHT) y la transición epitelial mesenquimal (EMT)**

30 Prioridad:

14.07.2009 CA 2672014

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2019

73 Titular/es:

**AZELEAD (100.0%)
2 place Eugène Bataillon, Bat. 24, cc107
34095 Montpellier Cedex 5 , FR**

72 Inventor/es:

**KISSA-MARIN, KARIMA y
HERBOMEL, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 701 434 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nueva herramienta para el estudio de los eventos asociados con la transición endotelial hematopoyética (EHT) y la transición epitelial mesenquimal (EMT)

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la transición epitelial endotelial hematopoyética (EHT) y la transición epitelial mesenquimal (EMT) y, más particularmente, se refiere al uso de un embrión o larva de peces como modelo para el estudio de la EHT y EMT.

10

Breve descripción de la técnica anterior

La ontogenia de las células madre hematopoyéticas (HSC), que dan origen a todas las células sanguíneas e inmunitarias en el cuerpo, durante el desarrollo embrionario todavía es muy debatida, especialmente su posible relación de linaje con las células endoteliales vasculares^{1,2}.

15

El primer sitio anatómico a partir del cual se han aislado las células con potencial HSC a largo plazo es la aorta gónada mesonefros (AGM), más específicamente la proximidad del piso de la aórtica dorsal(DA)³. Pero mientras algunos autores han presentado evidencias de que las HSC pueden surgir directamente del piso ventral aórtico en el lumen aórtico dorsal (DA)⁴, otros apoyan la idea de que las HSC emergen primero dentro del mesénquima subyacente⁵. Una revisión de los orígenes embrionarios de la hematopoyesis humana sugiere que los grupos hematopoyéticos dentro de la AGM son células pluripotentes que se han separado de un precursor de tipo endotelial.⁶

20

La transición epitelial a mesenquimal (EMT) es un evento importante en el desarrollo embrionario, así como en la metástasis y la progresión tumoral. La EMT es una transición celular fenotípica donde, en el desarrollo de tejido normal o en la progresión y metástasis del tumor, las células epiteliales se dispersan por el debilitamiento del sistema de adhesión célula célula y muestran un comportamiento celular móvil y, a veces, invasivo, como las células mesenquimales. Para comprender los eventos dependientes de EMT (por ejemplo, la progresión del tumor y la metástasis) y eventos similares, se debe dilucidar el mecanismo de EMT.

25

30

Resumen

La presente invención proporciona una nueva herramienta para comprender el mecanismo de los eventos dependientes de EHT.

35

Más particularmente, un objeto de la invención se refiere al uso de un embrión o larva de peces como un modelo para el estudio de la transición endotelial hematopoyética (EHT).

40

Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el embrión o la larva comprenden células vasculares.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde las células vasculares consisten en células arteriales.

45

Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el pez consiste en pez cebra o Medaka.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el estudio de la EHT consiste en un estudio *in vivo* de la EHT.

50

Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el estudio de EHT consiste en un estudio *in vitro* de EHT, en donde los embriones o porciones de estos se han fijado en tejido fijado.

55

Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el embrión o la larva consisten en un embrión o larva transgénica.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el embrión o la larva comprenden un marcador de células vasculares, células HSC o células endoteliales.

60

Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el marcador se asocia con un gen reportero.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el gen reportero es la proteína verde fluorescente (GFP) o una proteína roja del discosoma (Dsred).

65

Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el marcador de células vasculares es CD41, runx1 o cmyb.

5 Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el marcador endotelial es KDR, kdrl, Fli, Fli-1, Lmo2, ephrinB2 o Tie-2.

10 Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el pez transgénico o la larva transgénica se selecciona del grupo que consiste en CD41-GFP de pez cebra, KDR-GFP de pez cebra, Lmo2-Dsred de pez de cebra, Lmo2-Dsred/CD41-GFP de pez cebra, Tie-2-GFP y Fli1-GFP.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el estudio de EHT consiste en un estudio inhibitorio de EHT.

15 Otro objeto de la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, en donde el estudio de EHT consiste en un estudio de inducción de EHT.

Otro objeto de la invención se refiere a un método para seleccionar un compuesto candidato que modula el mecanismo de transición endotelial hematopoyética (EHT), que comprende las etapas de:

- 20
- introducir un compuesto candidato en un embrión o larva de peces de acuerdo con la invención; y
 - evaluar la capacidad de dicho compuesto candidato para modular el mecanismo de EHT, siendo dicha modulación un efecto inhibitorio de EHT o un efecto inductor de EHT.

25 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Las células endoteliales del piso aórtico dorsal salen (o deslaminan) hacia el espacio subaórtico mediante un proceso de EMT para convertirse en células hematopoyéticas.

30 a, Vista global de un embrión KDR-GFP a las 26 horas después de la fecundación (h.p.f.); la fluorescencia de GFP resalta toda la vasculatura; el área en caja se visualizó mediante microscopía confocal de lapso de tiempo de 36 h.p.f. a 52 h.p.f. (b-v) en 14 planos de profundidad z (Z1 a Z14) espaciados por 2 μ m, cada 5 minutos. El tiempo se indica en horas y minutos desde T0= 36 h.p.f. (b). Los números blancos indican el tiempo de grabación en horas y minutos, las células aórticas sometidas a deslaminación o EHT se numeran en rojo, es decir, en el orden en que se deslaminan o salen del piso de DA. La célula 10 aún no es visible en b porque toda la vasculatura y los somitas se están moviendo lentamente rostral hacia adelante en esta fase de desarrollo. Las células 6a, 6b, 9a, 9b son hijas de las células 6 y 9, respectivamente. Cada imagen es de un solo plano confocal, en su mayoría Z10 (b-o); el recuadro en b es de Z4 para mostrar las células 1 y 2 ya salidas o deslaminadas; p, Z6, q, Z11, r-v, Z7. Las flechas en b muestran el sentido de la circulación en la vena aórtica dorsal (DA) y axial (AV). Las puntas de flecha en f e l muestran la línea delgada que evidencia la unión de los vecinos izquierdo y derecho (lateral) de la célula de deslaminación o de salida, mientras que las puntas de flecha en g, h y m, apuntan a sus sitios de unión focal restantes a los vecinos rostral y caudal. Una línea de puntos en s a v muestra la trayectoria de la célula 6b desde el espacio subaórtico hacia un pequeño nicho dentro del microstroma AV (punta de flecha en r,s) y su desaparición desde allí (v) a medida que se interna en el torrente sanguíneo. Barras de escala, 25 μ m (b), 10 μ m (c-o), 10 μ m (p-v). Vea además la Película 1 para la secuencia completa de lapso de tiempo en z10.

35

40

45

Figura 2: Las células hematopoyéticas que emergen por deslaminación de las células endoteliales del piso de la aorta son las HSPC que siembran los órganos hematopoyéticos sucesivos.

50 a-c, Embriones y larvas KDR-GFP vivos. a, Tres células hematopoyéticas KDR-GFP+ debajo de la AD, una a lo largo del piso de AD y dos dentro de la pared dorsal reticulada de la vena axial (AV), una de las cuales entrará pronto en el lumen de la vena. b, Las primeras HSPC que siembran el tejido hematopoyético caudal (CHT) a las 35 h.p.f. (punta de flecha negra en la imagen DIC con video mejorado a la izquierda), son KDR-GFP+ (punta de flecha blanca). c, Los progenitores hematopoyéticos que dispersan el rudimento del timo (t) a las 58 h.p.f. son KDR-GFP+; phs, cabeza del seno primario (vena cefálica); oc, cápsula ótica. d-j, embriones doble transgénicos [Lmo2-DsRed; CD41-GFP] vivos; d-f, una célula Dsred+ que se dobla del piso de DA ya expresa CD41-GFP de forma detectable (d), aunque menos que las HSPC ya existentes (asteriscos azules); 20 minutos más tarde (e,f), la unión de sus vecinos laterales endoteliales es visible (e, puntas de flecha negras en la imagen DIC), y el siguiente plano focal (f) revela que la célula comienza a redondearse. Consistentemente, antes de la unión (d), los eritrocitos circulantes en DA, que aparecen como franjas rojas debido al proceso de escaneo, todavía se ponen en contacto con la célula que se dobla (d, punta de flecha blanca), mientras que ya no lo hacen después de la unión (e). g-j, Aumento progresivo en la expresión de CD41-GFP en una célula del piso de DA Lmo2-Dsred+ (asterisco blanco) a medida que se deslaminan; asteriscos azules, HSPC CD41-GFP+, que se dividen entre los puntos de tiempo i y j. Barras de escala, 10 μ m (a,b), 50 μ m (c), 10 μ m (d-f), 25 μ m (g-j).

55

60

Figura 3: La fase de desarrollo de la deslaminación de las células del piso de DA (o EHT) y la transformación en las HSPC se correlacionan con una fase de contracción radial de DA, precedida por una fase de expansión radial de DA.

5 a-i, imágenes de fluorescencia de lapso de tiempo de GFP en un embrión/larva KDR-GFP de 28 h.p.f. a 100 h.p.f. Proyección máxima de 18 planos z espaciados por 3 μm , codificados por colores de manera que las células cambian de color a medida que se mueven de un plano z a otro. a-c. Entre 30 y 37 h.p.f., el diámetro de DA se expande rápidamente y sufre reordenamientos celulares; una punta de flecha blanca y una amarilla siguen dos células de DA que se mueven respectivamente desde la pared lateral (lado) de DA y el techo de la pared de DA para llegar a su piso antes del máximo de eventos de deslaminación o EHT. Los eventos de d-h, aumentan, alcanzan el máximo y después la disminución de deslaminación (o EHT) (asteriscos que muestran algunos) se correlaciona con una reducción gradual del diámetro de DA, que después permanece estable (i). j, La evolución temporal del diámetro de DA en este embrión (línea verde sólida), se mide cada 2 horas, y su correspondencia con los paneles a-i. El diámetro de DA en el intervalo 18-28 h.p.f. (línea de puntos azul) se midió a partir de otro embrión. Barra de escala, 25 μm (a-i). La secuencia de lapso de tiempo de 28 a 60 h.p.f. además puede visualizarse como Película 5.

15 Figura 4: La expresión *Runx1* es necesaria para la deslaminación (o EHT) exitosa y la transformación de las células de piso de DA en las HSPC.

20 Imágenes de lapso de tiempo entre 29 h.p.f. y 39 h.p.f. de un embrión KDR-GFP inyectado con un morfolino anti-*Runx1* en la etapa de una célula. Debido al movimiento rostral hacia adelante de toda la vasculatura, la célula # 3 aún no está presente en el campo visualizado en $t=0$ (29 h.p.f.), por lo que la vista global de este último (a) se muestra a 37,3 h.p.f. Los números en rojo indican el tiempo de grabación en horas y minutos. Las tres células del piso de DA numeradas inician la EHT, pero después se rompen en pedazos (puntas de flecha). Barras de escala, 20 μm (a), 10 μm (b-g). La secuencia completa de lapso de tiempo además es visible como Película 6. Se observó un resultado similar con eventos EHT abortivos raros en embriones morfantes *Runx1* 4/4 sometidos a análisis confocal de lapso de tiempo.

Figura 5: Las células endoteliales del piso aórtico se transforman en células hematopoyéticas *in vivo* por un nuevo tipo de comportamiento celular.

30 La figura representa en vistas transversales y sagitales las etapas sucesivas de la transición endotelial a hematopoyética (EHT) identificada en este trabajo por imágenes *in vivo* de embriones de pez cebra. DA, aórtica dorsal; AV, vena axial.

35 Figura 6: Imagen longitudinal y transversal de manera simultánea de la salida y transformación hematopoyética de una célula endotelial desde el suelo aórtico al espacio subaórtico.

40 a, Sección de fluorescencia confocal cercana al sagital (caudal a la parte superior) de un embrión KDR-GFP vivo a las 52 h.p.f, contrastado con Bodipy TR (rojo) para revelar el contexto histológico; nc, notocordo. Las flechas muestran el sentido de la circulación en DA y la vena axial (AV). La célula del piso de DA endotelial marcada con un asterisco se sigue después a través del tiempo en la sección longitudinal (b,d,f,h) y transversal (c,e,g,i) en el plano transversal marcado por la flecha doble en a. Las puntas de flecha en (c,e,g,i) apuntan a los límites izquierdo y derecho de la célula de salida, que terminan unidas en g; la célula ya no forma parte de la pared aórtica, pero aún retiene contactos focales con las células aórticas que eran sus vecinas rostral y caudal (es decir, corriente arriba y corriente abajo) (f). Noté que el ancho de DA evoluciona de 25 μm en (a-c) a 16 μm una vez que la célula endotelial ha salido (g,i). El tiempo se indica en horas y minutos después del inicio de la sesión de grabación en el lapso de tiempo. Barras de escala, 25 μm (a), 10 μm (b,d,f,h), 25 μm (c,e,g,i). Las secuencias de lapso de tiempo correspondientes, pero más largas, longitudinales y transversales además se muestran como Películas 2 y 3.

50 Figura 7: Las células hematopoyéticas que emergen por deslaminación (o EHT) de las células endoteliales del piso aórtico son las HSPC que siembran los órganos hematopoyéticos sucesivos.

55 a-c, embriones y larvas KDR-GFP vivos. a, Tres células hematopoyéticas KDR-GFP+ debajo de DA, una a lo largo del piso de DA y dos dentro de la pared dorsal reticulada de AV, una de las cuales entrará pronto en el lumen de la vena (ver además la Película 2). b, Las primeras HSPC que dispersan el CHT a las 35 h.p.f. (punta de flecha negra en la imagen DIC con video mejorado a la izquierda) son KDR-GFP+ (punta de flecha blanca). c, Las HSPC que dispersan el rudimento del timo (t) a las 58h.p.f. son KDR-GFP+; phs, cabeza del seno primario; oc, cápsula ótica. d-g, Larva CD41-GFP viva inyectada en el estadio de una célula con plásmido KDR-dTomato, se visualiza a los 7 d.p.f.; el área del riñón (k), en caja en d, se muestra ampliada en e-g; cuatro de las cinco células dTomato1 presentes en este campo (e, puntas de flecha) además son GFP1 (f, g); g, vesícula biliar (autofluorescente). h-n, embriones transgénicos dobles (Lmo2-Dsred; CD41-GFP) vivos. h-j, una célula Dsred1 que dobla del piso de DA ya expresa CD41-GFP de forma detectable (h), aunque menos que las ya existentes HSPC (asteriscos azules); 20 minutos más tarde (i, j), la unión de sus vecinos laterales endoteliales es visible (i, puntas de flecha negras), y el siguiente plano focal (j) revela que la célula comienza a redondearse. Consistentemente, antes de la unión (h), los eritrocitos circulantes en la DA, que aparecen como franjas rojas debido al proceso de escaneo, todavía entran en contacto con la célula que se dobla (h, punta de flecha blanca), mientras que ya no lo hacen después de la unión (i). k-n, Aumento progresivo en la expresión de CD41-GFP en una célula del piso de DA Lmo2-Dsred1 (asterisco blanco) a medida que sufre deslaminación o EHT; asteriscos azules,

HSPC CD41-GFP+, que se dividen entre los puntos de tiempo m y n. Barras de escala, 10 μm (a, b y h-j), 50 μm (c y e-g), 100 μm (d), 25 μm (k-n).

Breve descripción de las películas

5 Película 1. Esta película muestra la imagen de fluorescencia confocal de lapso de tiempo de la articulación aórtica dorsal (DA) / vena axial (AV) en la región del tronco superior de un embrión de pez cebra transgénico KDR-GFP, a partir de 36 a 52 horas después de la fecundación (1 fotograma / 5 minutos). Se observa que las células endoteliales del piso de DA se contraen, se doblan y después salen al espacio subaórtico para convertirse en células hematopoyéticas, de acuerdo con una secuencia estereotipada representada en la Figura 5, que los inventores han denominado transición endotelial hematopoyética (EHT). Después se mueven, pueden dividirse y entran en la circulación sanguínea a través de la vena axial. Pasada la primera imagen que muestra la posición de todas las células numeradas, el número de cada célula aparece en la película antes de que la célula inicie el proceso de EHT. Dado que el embrión se visualiza en una vista lateral, el doblaje de las células del piso de DA que inician la EHT se observa mejor para las células cuyo eje principal está cerca del plano sagital (por ejemplo, las células 7, 9). La película muestra solo un plano confocal; los fotogramas seleccionados se muestran en la Figura 1, que además muestra imágenes de otros planos z de la misma serie confocal del lapso de tiempo. El tiempo se indica en horas, minutos, segundos, en la esquina superior derecha de la imagen.

20 Película 2. Esta película va junto con la Figura 6 y la Película 3. Se muestra en un embrión KDR-GFP 2 d.p.f. la salida y la transformación hematopoyética de una célula endotelial del piso de DA (la más alta) en el espacio subaórtico, en vista sagital: la misma célula se sigue en vista transversal en la Película 3. Otra célula GFP+ brillante recién escapó del piso de DA al principio de la película, sufre mitosis en un plano transversal, y una de las células hijas se une rápidamente al microstroma del techo de la vena axial (a la izquierda).

25 Película 3. Esta película se muestra en una vista transversal en un embrión KDR-GFP 2 d.p.f. la salida del suelo de DA y la transformación hematopoyética de la misma célula endotelial seguida en vista longitudinal en la Película 2 (arriba) y la Figura 6. Los tiempos indicados en la esquina superior derecha de las Películas 2 y 3 coinciden entre sí, lo que permite comparar las vistas longitudinal y transversal de la célula en cada punto de tiempo (1 fotograma / 6 minutos). Las secciones ópticas transversales se obtuvieron por proyección ortogonal de una pila de 73 planos z confocales espaciados por 0,6 μm .

35 Película 4. Esta película muestra una imagimática confocal de lapso de tiempo de 40 minutos (1 fotograma / 2 min.) de un embrión [KDR-GFP; Lmo2-Dsred] en el área AGM. Las células hematopoyéticas KDR-GFP+ nacidas por la EHT de las células DA ahora evolucionan en el espacio subaórtico y dentro del microstroma formado por la reticulación del techo de la vena axial (AV). Dos de ellas, marcadas con asteriscos en la primera imagen, se ven entrando en la circulación sanguínea. Debido al proceso de escaneo, las franjas rojas reflejan las trayectorias de los eritrocitos Lmo2-dsred+ que circulan en la DA y AV. El tiempo se indica en horas, minutos, segundos, en la esquina superior derecha de la imagen. Cada imagen es la proyección máxima de tres planos z espaciados por 1 μm .

40 Película 5. Esta película muestra la imagimática confocal de lapso de tiempo de la fluorescencia de GFP en un embrión/larva KDR-GFP de 28 h.p.f. a 100 h.p.f. (1 fotograma / 5 minutos). Los primeros asteriscos que aparecen apuntan a dos células endoteliales de DA que migran al piso de DA. Los siguientes apuntan a las células del piso de DA que se someten a EHT para convertirse en células hematopoyéticas. La proyección máxima de 18 planos z espaciados por 3 μm , se codifica por colores de manera que las células cambian de color a medida que se mueven de un plano z a otro. Los fotogramas seleccionados de esta película se muestran en la Figura 3a-i. La película se cortó a las 60 h.p.f. (después de lo cual no se produjo deslaminación) para reducir el tamaño del archivo; la secuencia restante de 60 a 100 h.p.f. está disponible bajo petición.

50 Película 6. Esta película muestra la imagimática confocal de lapso de tiempo de la fluorescencia de GFP entre 29 y 39 h.p.f. (1 fotograma / 6 minutos) en el área AGM de un embrión KDR-GFP en el que la expresión de *runx1* se eliminó por un morfolino. Los números aparecen en la película para apuntar a las células del piso de DA que inician la EHT pero después se rompen en pedazos. Las imágenes son proyecciones máximas de 22 planos z espaciados por 2 μm . Los fotogramas seleccionados de esta película además se muestran en la Figura 4.

55 Las películas además están disponibles en la referencia 7 de los inventores.

Descripción detallada de la invención

60 Los presentes inventores han desarrollado una nueva herramienta para estudiar la transición endotelial hematopoyética (EHT). En el contexto de la presente invención, EHT y deslaminación son sinónimos.

65 Más particularmente, los inventores han demostrado que algunas células endoteliales que forman la aorta sufren un fuerte doblaje hacia el exterior, después se pliegan sobre sí mismas y se redondean para separarse de la pared vascular, mientras mantienen la integridad de la aorta. Cada célula endotelial se convierte después en una célula madre que viaja libremente.

La formación de células madre hematopoyéticas (HSC) (células móviles) en el pez cebra se produce después de la transición de células endoteliales aórticas (un tipo de célula epitelial) en células madre hematopoyéticas (un tipo de célula móvil migratoria). Este cambio idéntico se correlaciona con la pérdida de uniones estrechas entre las células endoteliales.

5

La formación de HSC no implica una división asimétrica, al contrario de lo que suele ser el caso en la génesis de la célula madre.

10

La célula endotelial aórtica que ha perdido sus uniones estrechas se desprende de la pared vascular sin afectar ni la integridad ni la permeabilidad de la aorta.

Este fenómeno es muy similar al fenómeno de la EMT (pérdida de unión cerrada y adquisición de propiedades de migración).

15

Por consiguiente, una herramienta de este tipo permite, ventajosamente, estudiar, *in vivo*, los eventos asociados con la EHT. Una lista no exhaustiva de eventos dependientes de EHT es la producción de las HSC, y el mecanismo de metástasis y progresión tumoral. La herramienta contemplada de la invención puede usarse además para observar el efecto de elementos (tales como calor, irradiación, tensión) sobre el mecanismo de EHT.

20

Por lo tanto, un objeto de la descripción es proporcionar como una nueva herramienta, un embrión o larva de pez, o una parte de este (como la cola del embrión o larva), que puede usarse como modelo para el estudio de la transición endotelial hematopoyética (EHT) o transición epitelial mesenquimal (EMT). Como puede apreciar un experto en la técnica, el embrión o la larva de un pez pueden derivarse de un pez cebra o Medaka. En otra modalidad particular, el embrión o larva de peces contemplado de la descripción comprende células vasculares fluorescentes, tales como células arteriales.

25

El embrión o larva de peces contemplado de la invención puede ser ventajosamente un embrión o larva de peces transgénicos que expresa un gen reportero bajo secuencias reguladoras de un marcador de células vasculares (por ejemplo, células específicas de la arteria) o células HSC. Un marcador de este tipo puede ser, por ejemplo, un marcador específico de precursores hematopoyéticos, un marcador de HSC. El marcador es CD41, runx1 o cmyb⁸, por ejemplo.

30

En otro aspecto de la descripción, el marcador es un marcador endotelial, conocido por el experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a KDR (denominado flk1 en mamíferos), kdrl, Fli, Fli-1, Lmo2, ephrinB2, y Tie-2. El marcador puede usarse como un control no tóxico, o un control positivo junto con un marcador de HSC que proporciona dos colores (por ejemplo, verde/rojo) en la región caudal una vez que se completa la EHT.

35

La ventaja de tener un embrión o larva de pez con células fluorescentemente marcadas es permitir el estudio de los eventos dependientes de EHT o EMT, por ejemplo, en porciones de embrión o en tiempo real con cualquiera de los métodos adecuados conocidos por un experto en la técnica, tales como imágenes de fluorescencia no invasivas (por ejemplo, como se describe en la sección Ejemplo).

40

Las células fluorescentes pueden obtenerse con cualquier colorante adecuado conocido por un experto en la técnica, o cualquier otro gen reportero⁹. Por ejemplo, el colorante puede ser la proteína fluorescente verde (GFP) o la proteína roja discosoma (Dsred) expresada por el promotor de un gen específico vascular (por ejemplo, el gen KDR o Tie-2 o Fli-1 o Lmo2), o de un gen expresado en las HSC (por ejemplo, CD41, runx1 o cmyb). En este sentido, la presente invención contempla usar embriones transgénicos tales como embriones transgénicos de pez cebra similares a los seleccionados del grupo que consiste en CD41-GFP de pez cebra, KDR-GFP de pez cebra, Tie2-GFP, Fli-1-GFP, Lmo2-GFP, Lmo2-Dsred de pez cebra y Lmo2-Dsred/CD41-GFP de pez cebra.

45

Como puede apreciarse por un experto en la técnica, se utiliza el embrión o larva de peces transgénicos de acuerdo con la presente descripción para el estudio de la modulación (por ejemplo, modulación *in vivo*) de EHT⁹ y después de EMT. Un experto en la técnica entenderá que la modulación consiste en inhibir o inducir el mecanismo de EHT o EMT.

50

En este sentido, otro objetivo de la descripción es proporcionar un método para tamizar un compuesto candidato que modula el mecanismo de transición endotelial hematopoyético (EHT) o de transición epitelial mesenquimatoso (EMT). El método comprende las etapas de:

55

- introducir un compuesto candidato en un embrión o larva de pez como se definió anteriormente y
- evaluar la capacidad de dicho compuesto candidato para modular el mecanismo EHT.

60

Este compuesto candidato es una molécula de ADN, una molécula de ARN, una proteína, un virus, un compuesto químico, un fármaco o cualquier otro compuesto adecuado. La evaluación se realiza a través del tamizaje, tamizaje de alto rendimiento, inyección intravenosa o cualquier otro método conocido por el experto en la técnica.

La etapa de evaluar la capacidad del compuesto candidato para modular el mecanismo de EHT o EMT puede lograrse mediante la observación de la modulación, por ejemplo, a nivel del vaso aórtico de dicho embrión o larva de pez o puede lograrse mediante la observación de la cantidad de células acumuladas en la cola del embrión o larva (por ejemplo, en el tejido hematopoyético caudal).

5 Como se mencionó anteriormente, la modulación de EHT o EMT puede ser la inhibición o el aumento de la actividad de EHT o EMT.

10 Como se usa en la presente descripción, los términos "inhibir", "inhibición", "inhibitorio" e "inhibidor" se refieren a la función de reducir una actividad o función biológica asociada con EHT o EMT. Como se usa en la presente descripción, el término "aumento de la actividad de EHT o EMT" se refiere a un nivel mejorado de actividad de EHT o EMT medible en un ensayo dado, por ejemplo, la emergencia de HSC, en presencia de un compuesto candidato en relación con el nivel medible de la actividad de EHT o EMT en ausencia de un compuesto candidato.

15 Ejemplo: Las células madre hematopoyéticas emergen *in vivo* del endotelio aórtico mediante un nuevo tipo de transición endotelial-hematopoyética

Introducción

20 En la presente los inventores muestran, mediante imágenes no invasivas y de alta resolución de los embriones vivos de pez cebra, que las HSC emergen directamente de la pared o piso aórtico, es decir, la arteria principal del embrión, a través de un proceso estereotipado que no implica división celular sino flexión fuerte después de la deslaminación o migración de células endoteliales únicas desde la pared ventral aórtica hacia el espacio subaórtico, y su transformación concomitante en células hematopoyéticas. El proceso de deslaminación está polarizado no solo en la dirección dorsoventral sino también en el rostrocaudal frente a mediolateral, y depende de la expresión de *runx1*: en embriones deficientes de *runx1*, los eventos de deslaminación o migración son inicialmente similares, pero mucho más raros, y terminan en muerte violenta de la célula que migra o que se deslaminación. Estos resultados demuestran que el piso o pared ventral aórtica ventral es homogénea y que las HSC emergen de la pared endotelial de la aorta hacia el espacio subaórtico, no por división celular asimétrica, sino a través de un nuevo tipo de comportamiento celular llamado transición endotelial hematopoyética (EHT).

Métodos

35 Cría de pez cebra y tratamientos embrionarios. Los embriones de pez cebra se obtuvieron del Centro Internacional de Recursos del pez cebra de la Universidad de Oregón y se criaron y clasificaron como se describió anteriormente¹⁰. Las líneas transgénicas KDR-GFP, Lmo2-Dsred y CD41-GFP utilizadas en la presente descripción se han descrito^{11,12,13}. La destrucción mediada por Runx1 morfolino se realizó como en un estudio anterior¹⁴ por los inventores. Para el experimento que se muestra en la Figura 2d-g, se inyectó un plásmido con un gen reportero KDR-dTomato^{15,16} y un sitio Scel-I junto con la meganucleasa de Scel-I en embriones CD41-GFP en la etapa celular I, como se describe¹⁷.

40 *Formación de imágenes in vivo.* Se anestesiaron los embriones y se montaron para microscopía confocal de fluorescencia de lapso de tiempo como se describió anteriormente¹⁴. La microscopía confocal se realizó a 26°C en dos microscopios Leica SPE, uno con configuración vertical (Figura 3 y películas 2, 3, 5), el otro con configuración invertida (Figuras 1, 2, 4, 5 y películas 1, 4, 6), con un objetivo de inmersión en aceite de 40x (Figura 1b-v, Figura 2a, df, Figura 4 y Figura 7h-j), en aceite de 16x (Figura 2c, gj, Figura 7k-n), o agua de 20x (Figura 3). La proyección máxima o codificada por colores de las pilas z, así como la superposición de la señal rojo/verde/DIC, las mediciones del diámetro aórtico y la exportación de series en lapso de tiempo como películas avi se realizaron con el programa Leica LAS que maneja el microscopio confocal. Las películas avi se recortaron y anotaron con el programa ImageJ, después se comprimieron y convirtieron en películas con el programa Quicktime Pro. El contraste de interferencia diferencial (DIC) mejorado en el video combinado y la imagen de campo amplio de fluorescencia (Figuras 1a y 2b) se realizó en un microscopio Nikon 90i como se describió anteriormente¹⁴.

Resultados y Discusión:

55 Los inventores^{10,14} y otros^{18,19} demostraron anteriormente en los embriones de pez cebra, que el espacio muy delgado que inicialmente separa la aórtica dorsal (DA) de la vena axial subyacente (AV) a lo largo del tronco era homóloga funcional y anatómicamente a la aorta-gónada-mesonefros (AGM) en mamíferos, es decir, contiene las células madre/progenitoras hematopoyéticas multipotentes (HSPC) que entrarán en circulación para colonizar, expandirse y diferenciarse en los órganos hematopoyéticos subsiguientes, primero el tejido hematopoyético caudal (CHT)¹⁰, que desempeña un papel hematopoyético similar al del hígado fetal en los mamíferos, y luego los órganos hematopoyéticos definitivos: el timo y la médula renal en los peces.

65 En ontogenia aviar y de mamíferos, el CD41 ha sido el marcador más temprano que distingue a los progenitores de sangre de las células endoteliales/progenitores, especialmente en la AGM⁵. En consecuencia, en los embriones de pez cebra transgénicos CD41-GFP (proteína verde fluorescente), los inventores informaron que las HSPC pueden detectarse por primera vez en la AGM de embriones de pez cebra vivos como células con bajo nivel de CD41-GFP que

aparecen asincrónicamente 33 horas después de la fertilización (h.p.f.) hasta pasado 54 h.p.f.¹⁴. Cada nueva célula con bajo nivel de CD41-GFP apareció en circulación a través de la vena axial subyacente en las siguientes 2-3 horas, para dispersarse casi inmediatamente en el tejido hematopoyético caudal (CHT), expandirse allí y luego dispersarse en el timo y riñón¹⁴.

5 En el presente trabajo, los inventores investigaron si estas HSPC podrían originarse a partir del endotelio aórtico. Los inventores aprovecharon la línea transgénica KDR-GFP, en la que el promotor del gen *kdr1*²⁰ controla la expresión de GFP específica del sistema vascular desde la etapa de angioblasto¹¹, y los inventores siguieron sistemáticamente el comportamiento de las células aórticas en embriones vivos mediante microscopía confocal de fluorescencia de lapso de tiempo, desde la etapa de formación aórtica (18 h.p.f.) hasta 100 h.p.f. (mucho más allá del pico de generación de HSPC en la AGM y la dispersión de la CHT). A partir de aproximadamente 30 h.p.f., las imágenes revelaron una alta frecuencia de células endoteliales del piso aórtico que sufrieron una contracción duradera que luego se inclinó hacia el espacio subaórtico, y permaneció en esta configuración fuertemente doblada durante 1 a 2 horas (Figuras 1d, e, k, Figuras 2d 6 y 7h). Después, otra contracción de la célula del piso DA doblada a lo largo del eje mediolateral puso a sus dos vecinos endoteliales laterales (izquierdo y derecho) en contacto entre sí (Figura 1f, l, Figura 2e, puntas de flecha, Figura 5, Figura 7e, 7g, 7i, película 3). La célula liberó después su contacto con sus vecinos de izquierda y derecha unidos, pero mantuvo todavía un fuerte contacto focal tanto con sus vecinos rostral como caudal (Figura 1g, h, m, n, 6), al redondear y ya manifestar motilidad, lo que conduce a su movimiento oscilatorio a lo largo del eje del vaso (ver, por ejemplo, la célula # 9 en la Figura 1m, n y la Película 1). Después los contactos distales se disolvieron también, y la célula ahora libre comenzó a moverse en el espacio subaórtico, con una morfología progenitora hematopoyética típica (Películas 1 a 4). Las etapas sucesivas que los inventores pudieron discernir en esta secuencia de deslaminación estereotipada se recapitulan en la Figura 5. Se revela cómo una célula endotelial que forma parte del piso vascular puede deslaminarse sin comprometer la integridad del vaso. Cada célula endotelial se convierte después en una célula madre "viajera libre" que se dividirá para dar lugar a todos los diferentes tipos de células sanguíneas. Los inventores denominan a este nuevo tipo de transición celular una transición hematopoyética endotelial o EHT.

En aproximadamente la mitad de los casos, la célula hematopoyética resultante experimentó una división aparentemente simétrica en las siguientes dos horas (Figura 1o, p-s y películas 1 y 2), luego entró en un "microstroma" creado por la reticulación del pared dorsal de la vena axial subyacente (Figura 1s, 1r-u, Figura 2a, Películas 1,2,4 y datos no mostrados), y desde allí ingresaron al lumen de la vena y la circulación sanguínea (Figura 1t-v, 1u-v y Películas 1 y 4), como los inventores documentaron previamente con los embriones CD41-GFP¹⁴.

En el segmento largo de dos somitas de DA observado y analizado en la Figura 1 y la Película 1, dos pares de células (# 1 a 4 en la Figura 1b) ya estaban redondeadas y fuera del piso de DA al inicio de la película, y seis se vieron sometidos a la deslaminación completa o secuencia de EHT durante la sesión de grabación, es decir, entre 36 y 52 h.p.f. (células # 5 a 10), que muestra que la mayoría, sino todas, las células que forman el piso de DA a las 35 h.p.f. eventualmente se deslaminan o someten a EHT. Cuatro embriones diferentes con imágenes similares durante 10 a 16 horas en el mismo período de 32 a 56 h.p.f. mostraron una frecuencia similar de eventos EHT: 0,19, 0,25, 0,27 y 0,36 por somita por hora). A medida que la AGM se extiende sobre aproximadamente 12 somitas de longitud (somitas 6 a 17¹⁰), esto puede significar aproximadamente 36 células (un promedio de 3 células sometidas a EHT por AGM por hora) que se deslaminan entre 36 y 52 h.p.f., aproximadamente la mitad de las cuales se dividirán antes de partir, por lo tanto, aproximadamente 3,4-4,5 células por hora entran en la sangre para diseminar el CHT - en muy buena concordancia con las estimaciones de los inventores sobre la velocidad de diseminación de CHT en las HSPC con bajo nivel de CD41-GFP a partir de AGM (2,5 y 5 células / horas a 35 y 48 h.p.f., respectivamente¹⁴).

Consistentemente, las primeras HSPC hematopoyéticas que diseminan el CHT a las 35 h.p.f.¹⁴, que se demostró anteriormente que se originan en el AGM¹⁴, son KDR-GFP+ (Figura 2b). A los 3 días p.f., las células KDR-GFP+ colonizan después fuertemente el timo (Figura 2c), al igual que las HSPC de bajo nivel de CD41-GFP lo hicieron en un estudio anterior¹⁴ de los inventores, pero la expresión de KDR-GFP parece perdurar más que la CD41-GFP, y aún ilumina muchos timocitos en el timo temprano hasta 6 d.p.f. (datos no mostrados). No fue posible obtener una imagen directa de las HSPC KPC-GFP+ potenciales en el riñón a los 5 d.p.f., debido a la ubicación profunda del tejido y la red vascular KDR-GFP+ muy densa. Por lo tanto, se inyecta un plásmido que porta el transgén KDR-dTomato en los embriones CD41-GFP, para obtener una expresión en mosaico del transgén KDR-dTomato en las células vasculares, y se busca después las células libres de KDR-dTomato+ en el área renal. La mayoría de las que se encontraron coincidieron con las HSPC CD41-GFP+ (Figura 2d-g, puntas de flecha).

Para visualizar la filiación entre las células endoteliales aórticas que se deslaminaron de la aorta, es decir, sometidas a EHT y la aparición inicial directamente de las HSPC de bajo nivel de CD41-GFP, los inventores utilizaron embriones doble transgénicos [Lmo2-Dsred¹², CD41-GFP]. Aunque la expresión de Lmo2-Dsred en las células vasculares es más débil que la KDR-GFP, los inventores pudieron detectar la deslaminación (egreso) de las células Lmo2-Dsred+ desde el piso de DA hasta el espacio subaórtico, acompañado de la aparición de la expresión detectable de CD41-GFP, después de un aumento en el último marcaje de las células hematopoyéticas resultantes, como se mostró anteriormente¹⁴ (Figura 2 d-j, 7h-n).

Los inventores abordaron después más detalladamente las circunstancias de los eventos de deslaminación o EHT. Los inventores notaron por primera vez una correlación temporal entre estos eventos individuales y las fases no descritas

anteriormente del desarrollo y el comportamiento de DA en su conjunto. La Figura 3 y la Película 5 muestran la evolución del área DA en un solo embrión seguido de 23 a 100 h.p.f.

Los inventores señalaron que entre la formación de DA (a las 18 h.p.f.) y las 37 h.p.f., el diámetro de DA aumenta constantemente, de 18 a 37 μm , con un aumento pronunciado entre 30 y 37 h.p.f. (Figura 3a-d, j). Durante este período, las células endoteliales de DA experimentan reordenamientos entre sí, algunos de los cuales son bastante extensos, llevando a algunas células endoteliales desde el lado lateral o incluso dorsal de DA al piso de DA (Figura 3a-c, puntas de flecha y Película 5). Las células comienzan a deslaminarse (sometidas a EHT) desde el piso de DA, después de 40 a 52 h.p.f., correspondientes al pico de deslaminaciones (eventos EHT) (Figura 3d-g y Película 5) y diseminación de CHT¹⁴, el diámetro de la aórtica disminuye constantemente de 37 a 20 μm (Figura 3j); luego, a medida que los eventos de deslaminación (EHT) se vuelven más raros, el diámetro de DA disminuye más lentamente (de 20 a 17,3 μm entre 52 h.p.f. y 65 h.p.f.; Figura 3h-j). No se detectaron más deslaminaciones (eventos EHT) en la AGM después de las 60 h.p.f. Se observó una evolución similar de DA en cuatro embriones diferentes, con un ancho de DA alcanza un máximo de 36-40 h.p.f. Esta correlación temporal entre la deslaminación de las células del piso de DA y la reducción gradual del diámetro de DA es probablemente significativa. De hecho, el proceso de deslaminación (EHT) como lo entienden los inventores a partir de la imagen implica la unión de los vecinos laterales (en lugar de rostrales y caudales) de la célula que se deslaminada (que se somete a EHT), la cual por sí misma tiende a reducir significativamente el diámetro del vaso (Figura 6) de la circunferencia DA que consiste en no más de cuatro células. Por lo tanto, los dos procesos, la deslaminación (egreso) de las células del piso de DA, que, sin ayuda, probablemente puede implicar considerables fuerzas biomecánicas a nivel local, y la reducción global del vaso, que puede implicar un esfuerzo biomecánico más distribuido entre todas las células DA, funcionan en la misma dirección y de este modo, pueden facilitarse unos a otros.

El proceso que los inventores mostraron en la presente es un nuevo tipo de transición epitelial a mesenquimatosa (EMT)²¹; se refiere a un epitelio escamoso, el endotelio arterial, por lo tanto, puede denominarse EndMT²². Si bien la transición endotelial a hematopoyética, o EHT, que se describe en la presente es completamente nueva, tiene algunas características comunes con el fenómeno de la transición epitelial a mesenquimatosa (EMT), que es fundamental para el desarrollo de los vertebrados²¹, y el cáncer. De acuerdo con el conocimiento de los inventores, hasta la fecha solo se ha descrito y analizado un EndMT fisiológico relacionado con un endotelio vascular: la formación de las válvulas cardíacas por la transformación de las células endocárdicas en una almohadilla mesenquimatosa²³. Sin embargo, en este caso, un parche de células endoteliales escamosas contiguas primero se convierte en un epitelio columnar, antes de la EMT clásica subyacente. En contraste, el EndMT descrito en la presente afecta a las células individuales, de forma asincrónica, que pasan directamente del endotelio escamoso a las células hematopoyéticas.

A los inventores les parece que las espectaculares etapas iniciales del proceso observado, la fuerte flexión de la célula endotelial hacia el espacio subaórtico, y después la unión de sus vecinos laterales, podría ser el equivalente biomecánico de un epitelio escamoso del proceso de constricción apical descrito para los epitelios columnares, especialmente, el que inicia la gastrulación en *Drosophila* para dar lugar después a través de un EMT a las células mesodérmicas²⁴. Recientemente se demostró que esta constricción apical no se produce de manera gradual, sino mediante contracciones discretas a nivel celular individual, seguidas de la estabilización de las etapas constrictas²⁴, no muy diferente de lo que los inventores observaron en la presente.

Mientras que otros han identificado células que emergen en el lumen de la aorta, que brotan directamente de la célula endotelial ventral^{9,25} los inventores mostraron de ese modo el mecanismo de EHT, un proceso que no incluye la división celular.

Finalmente, dado que se sabe que la aparición de las HSC en el embrión ya sea de amniotas o pez cebra requiere del factor de transcripción *runx1*^{14,18,26,27}, los inventores suprimieron específicamente su expresión en los embriones en desarrollo con un morfolino, ya que los inventores lo hicieron en su estudio anterior¹⁴. Los inventores encontraron que en estos morfantes *runx1*, una vez que se forma el DA, sus células expresan el transgén KDR-GFP como en los embriones de control (Figura 4a). Después de las 32 h.p.f. en adelante, se inician algunos eventos de deslaminación (EHT), pero mucho más raramente que en los embriones normales, y son abortivos: la célula endotelial se contrae, inicia la EHT (EMT), pero después se rompe en pedazos a medida que se redondea para convertirse en una célula hematopoyética (Figura 4b-g y Película 6). En consecuencia, el CHT y después el timo no se dispersan (Referencia 14 y datos no mostrados). Sobre la base de estos datos, los inventores proponen que la expresión *runx1* es necesaria en la célula endotelial²⁶ para lograr el EHT (EndMT) con éxito.

Es muy probable que el EndMT (EHT) descrito en la presente para el pez cebra también se aplique al AGM de los mamíferos^{6,28,29,30} y las aves, y más en generalmente a cualquier endotelio hemogénico.

A un nivel más general, el EHT es un nuevo tipo de transición celular mediante la cual una célula que pertenece a un epitelio escamoso, el vaso sanguíneo, puede dejar que se convierta en una célula libre sin comprometer la integridad del vaso. Hasta la fecha, solo se conocía un proceso de transición de células epiteliales a células libres, la transición mesenquimatosa epitelial (EMT), que en su mayoría concierne a los epitelios columnares, y es fundamental para el desarrollo de vertebrados y el cáncer.

Los experimentos descritos en la presente solicitud muestran que las células que ya están especializadas, como las que forman un vaso sanguíneo, pueden reprogramarse naturalmente para convertirse en células madre multipotentes.

Ejemplo: Ejemplo de tamizaje de moléculas.

5

En cada pocillo de una placa de 96 pocillos, se introducen tres embriones Cd41:GFP (tamizaje de células madre hematopoyéticas con un gen reportero de GFP) de 25 h.p.f.

10

Los compuestos candidatos se introducen automáticamente. Cada compuesto se agrega en el tanque de agua y su efecto se observa en el embrión vivo, de manera no invasiva.

Después de 24 horas de incubación, los embriones se procesan para obtener imágenes en su pozo, a 50 h.p.f.

15

A partir de las imágenes generadas, se realizan la cuantificación y la comparación con los embriones de control. Cada compuesto que se prueba para determinar su efecto en EHT, se asocia a un valor entre 0 y 100,0 para la inhibición total de EHT. Con un valor superior a 100, el compuesto se selecciona por su efecto inductor.

También se analiza la toxicidad de cada compuesto candidato en el desarrollo de embriones.

20

Referencias:

¹ I. Godin y A. Cumano, *Nat Rev Immunol* 2 (8), 593 (2002).

25

² M. Yoshimoto y M. C. Yoder, *Nature* 457 (7231), 801 (2009).

³ S. Taoudi y A. Medvinsky, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (22), 9399 (2007).

⁴ F. Dieterlen-Lievre, C. Pouget, K. Bollerot y otros, *Trends in cardiovascular medicine* 16 (4), 128 (2006).

30

⁵ J. Y. Bertrand, S. Giroux, R. Golub y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (1), 134 (2005).

⁶ C.J. Marshall y A.J. Thrasher, *British Journal of Haematology*, 112, 838-850 (2001)

35

⁷ K. Kissa y P. Herbomel, *Nature*, 464 112-115, (2010) doi:10.1038/nature08761

⁸ North T.E. y otros, *Nature*, 447, 1007, (2007) doi: 10.1038/nature05883

⁹ D. Baldessari y M. Mione, *Pharmacology & Therapeutics*, 118, 206-230 (2008)

40

¹⁰ E. Murayama, K. Kissa, A. Zapata y otros, *Immunity* 25 (6), 963 (2006).

¹¹ S. W. Jin, D. Beis, T. Mitchell y otros, *Development* 132 (23), 5199 (2005).

45

¹² H. Zhu, D. Traver, A. J. Davidson y otros, *Dev Biol* 281 (2), 256 (2005).

¹³ H. F. Lin, D. Traver, H. Zhu y otros, *Blood* 106 (12), 3803 (2005).

¹⁴ K. Kissa, E. Murayama, A. Zapata y otros, *Blood* 111 (3), 1147 (2008).

50

¹⁵ N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach y otros, *Nature biotechnology* 22 (12), 1567 (2004).

¹⁶ Y. Blum, H. G. Belting, E. Ellertsdottir y otros, *Developmental biology* 316 (2), 312 (2008).

55

¹⁷ D. Soroldoni, B. M. Hogan, and A. C. Oates, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J 546, 117 (2009).

¹⁸ M. Gering and R. Patient, *Dev Cell* 8 (3), 389 (2005).

¹⁹ H. Jin, J. Xu, and Z. Wen, *Blood* 109 (12), 5208 (2007).

60

²⁰ J. Bussmann, N. Lawson, L. Zon y otros, *PLoS Genet* 4 (5), e1000064 (2008).

²¹ E. D. Hay, *Dev Dyn* 233 (3), 706 (2005).

65

²² J. C. Kovacic and M. Boehm, *Stem Cell Res* 2 (1), 2 (2009).

²³ D. Beis, T. Bartman, S. W. Jin y otros, *Development* 132 (18), 4193 (2005).

²⁴ A. C. Martin, M. Kaschube, and E. F. Wieschaus, *Nature* **457**(7228), 495 (2009).

²⁵ Julien Y. Bertrand y otros, *Nature*, 464, págs. 108-112 (2010) doi:10.1038/nature08738

²⁶ M. J. Chen, T. Yokomizo, B. M. Zeigler y otros, *Nature* 457 (7231), 887 (2009).

²⁷ C. Lancrin, P. Sroczynska, C. Stephenson y otros, *Nature* 457 (7231), 892 (2009).

²⁸ Rachel David, *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, Vol. 11, 232-233 (2010) doi:10.1038/nrm2876

²⁹ J.-C. Boisset y otros, *Nature*, 464, págs. 116-121, (2010) doi:10.1038/nature08764

³⁰ H. M. Eilken, S. Nishikawa, y T. Schroeder, *Nature* 457 (7231), 896 (2009).

Reivindicaciones

- 5 1. El uso de un embrión o larva de pescado en un método para estudiar la transición de las células endoteliales aórticas a células madre hematopoyéticas, *es decir*, la transición hematopoyética endotelial (EHT), en donde dicha transición consiste en la aparición de células madre hematopoyéticas de la pared endotelial de la aorta en donde el pez consiste en pez cebra o Medaka.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el estudio de EHT consiste de un estudio *in vivo* de EHT.
- 15 3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde estudiar EHT consiste en un estudio *in vitro* de EHT, en donde los embriones o sus porciones se fijaron en el tejido fijo.
- 20 4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el embrión o la larva consiste en un embrión o larva transgénico.
- 25 5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el embrión o la larva comprende un marcador para las células vasculares, las células HSC o las células endoteliales.
- 30 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el marcador se asocia con un gen reportero.
- 35 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el gen reportero es una proteína verde fluorescente (GFP) o una proteína roja del discasoma (Dsred).
- 40 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el marcador para las células vasculares es CD41, runx1 o cmyb.
- 45 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el marcador endotelial es KDR, kdrl, Fli, Fli-1, Lmo2, ephrinB2 o Tie-2.
- 50 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el pez transgénico o larva transgénica se selecciona del grupo que consiste en CD41-GFP de pez cebra, KDR-GFP de pez cebra, Lmo2-Dsred de pez de cebra, Lmo2-Dsred/CD41-GFP de pez cebra, Tie-2-GFP de pez cebra y Fli1-GFP de pez de cebra.
- 55 11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el estudio de EHT consiste en un estudio inhibitorio de EHT.
- 60 12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el estudio de EHT consiste en un estudio de inducción de EHT.
- 65 13. Un método para tamizar un compuesto candidato que modula la transición hematopoyética endotelial (EHT) que comprende las etapas de:
 - introducir un compuesto candidato en un embrión o larva de pez como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; y
 - evaluar la capacidad de dicho compuesto candidato para modular el mecanismo EHT, siendo dicha modulación un efecto inhibitorio de EHT o un efecto inductor de EHT; y en donde dicha transición consiste en la aparición de células madre hematopoyéticas de la pared endotelial de la aorta.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el compuesto candidato es una molécula de ADN, una molécula de ARN, una proteína, un virus o un compuesto químico.

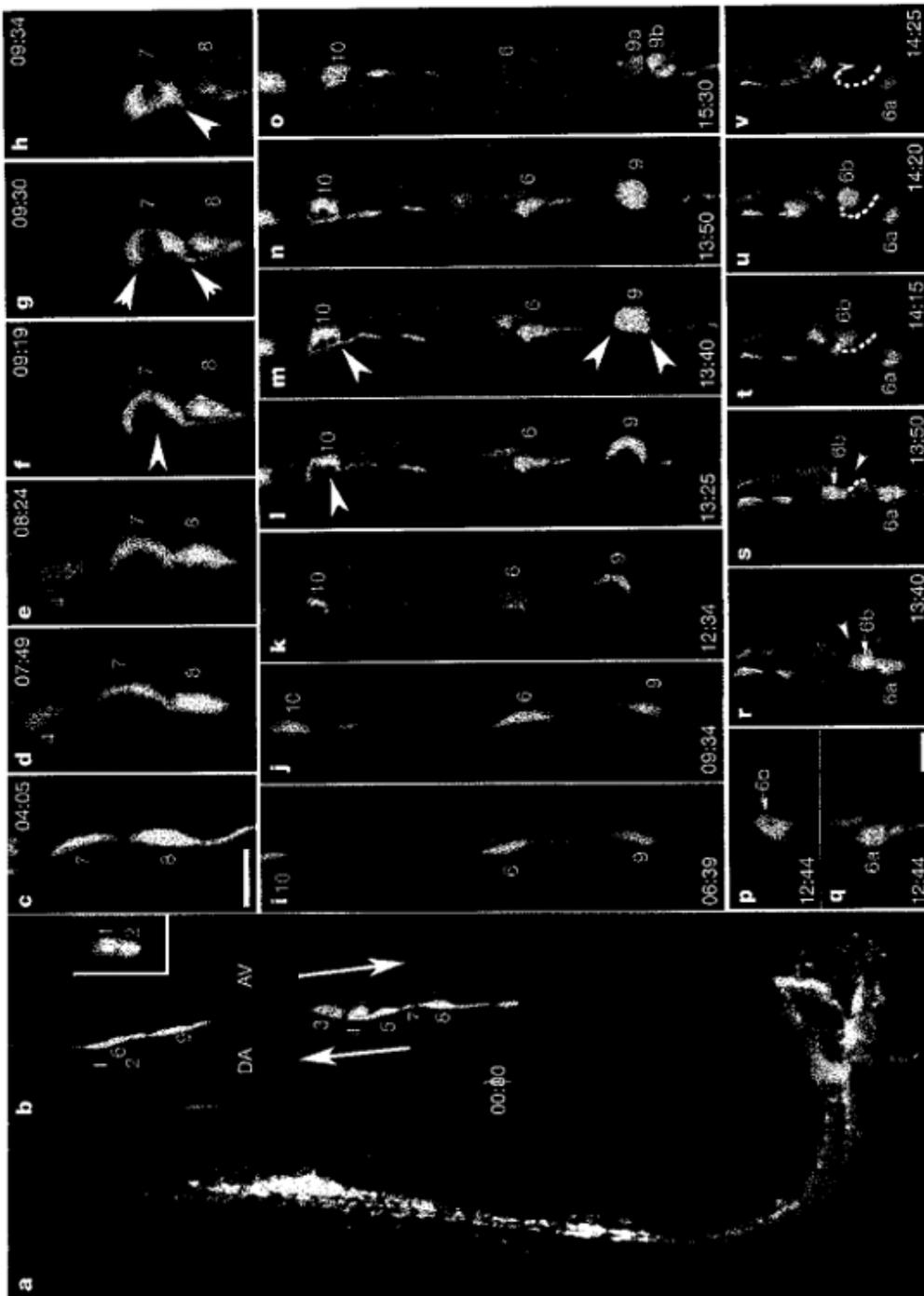


FIGURA 1

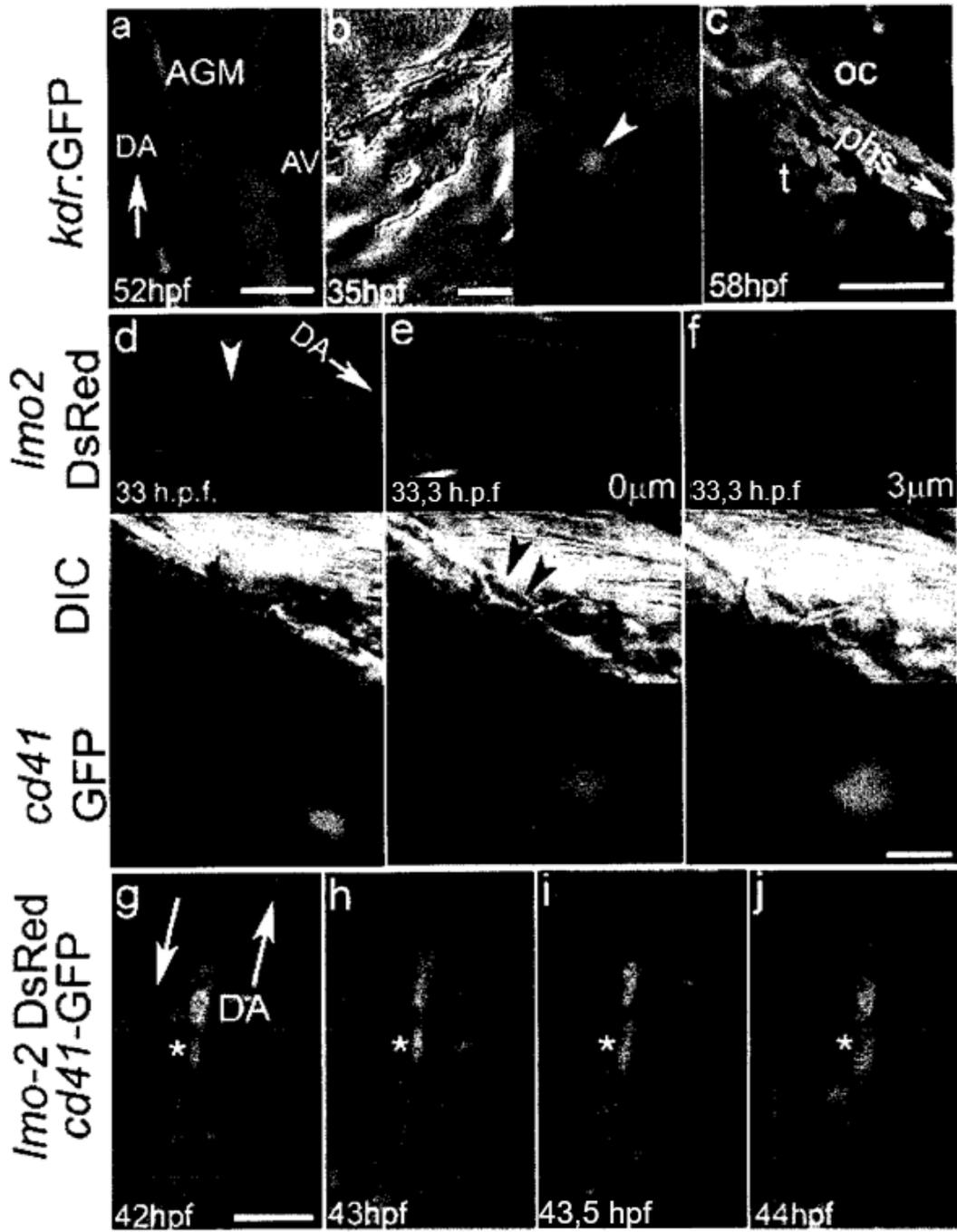


FIGURA 2

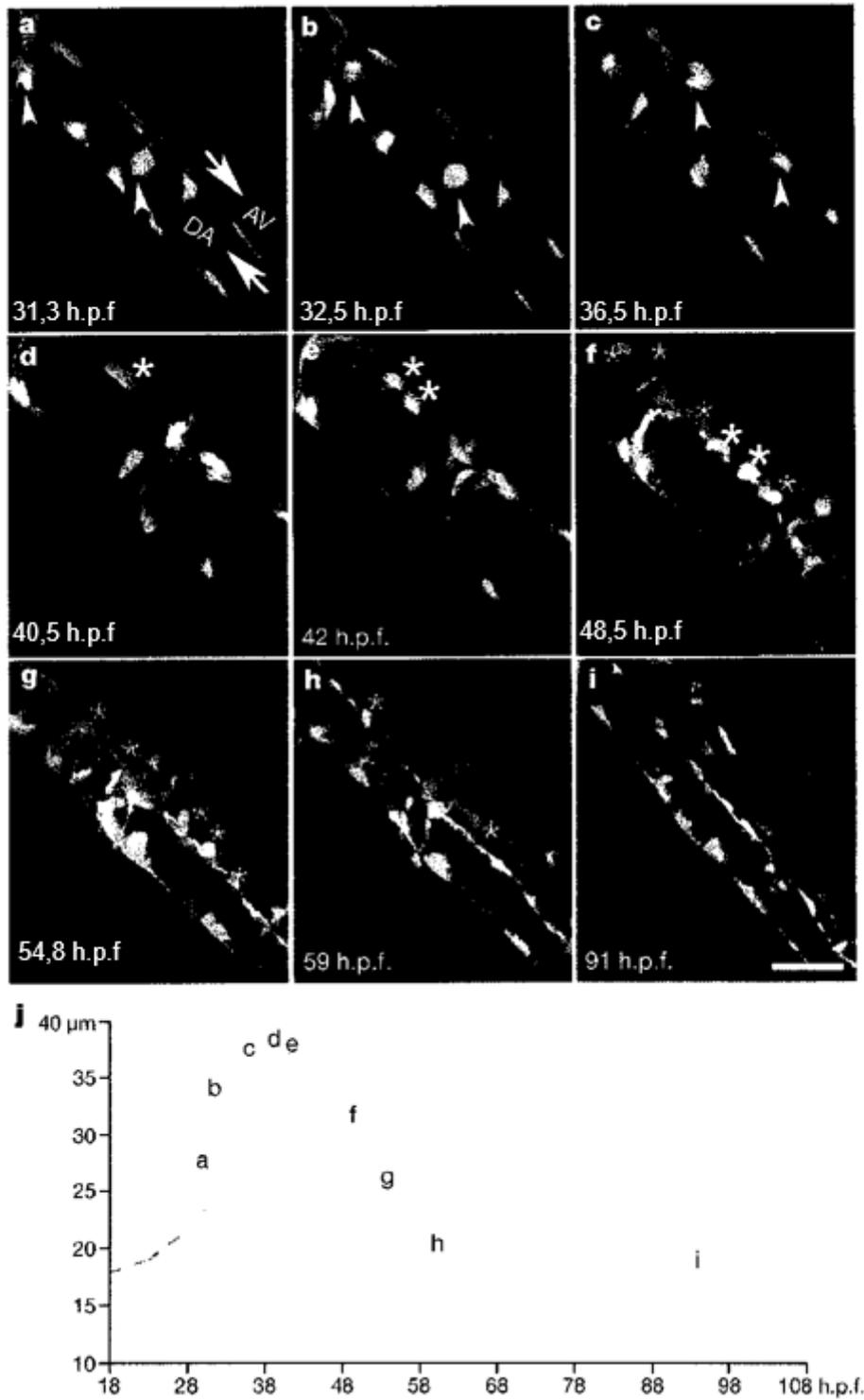


FIGURA 3

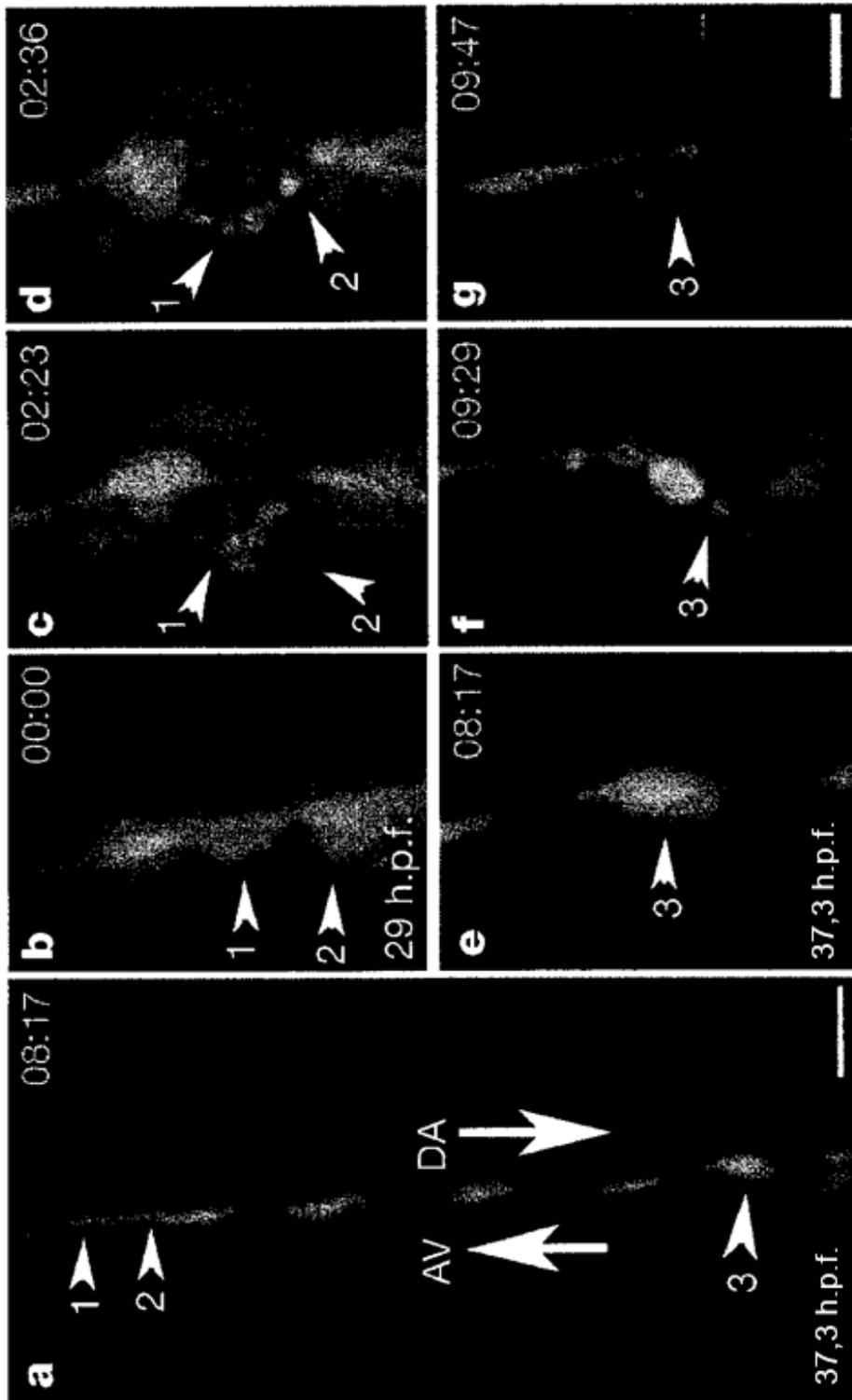


FIGURA 4

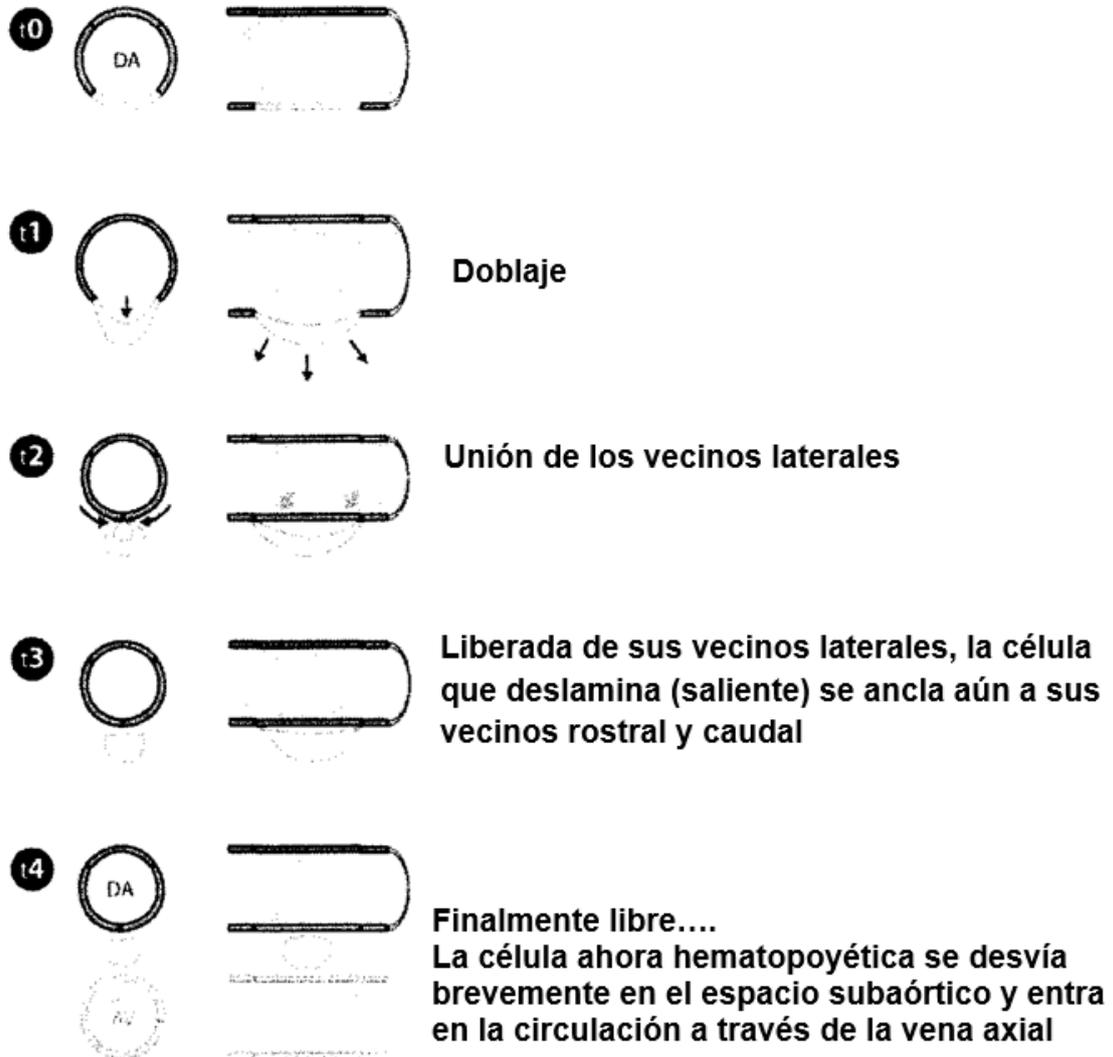


FIGURA 5

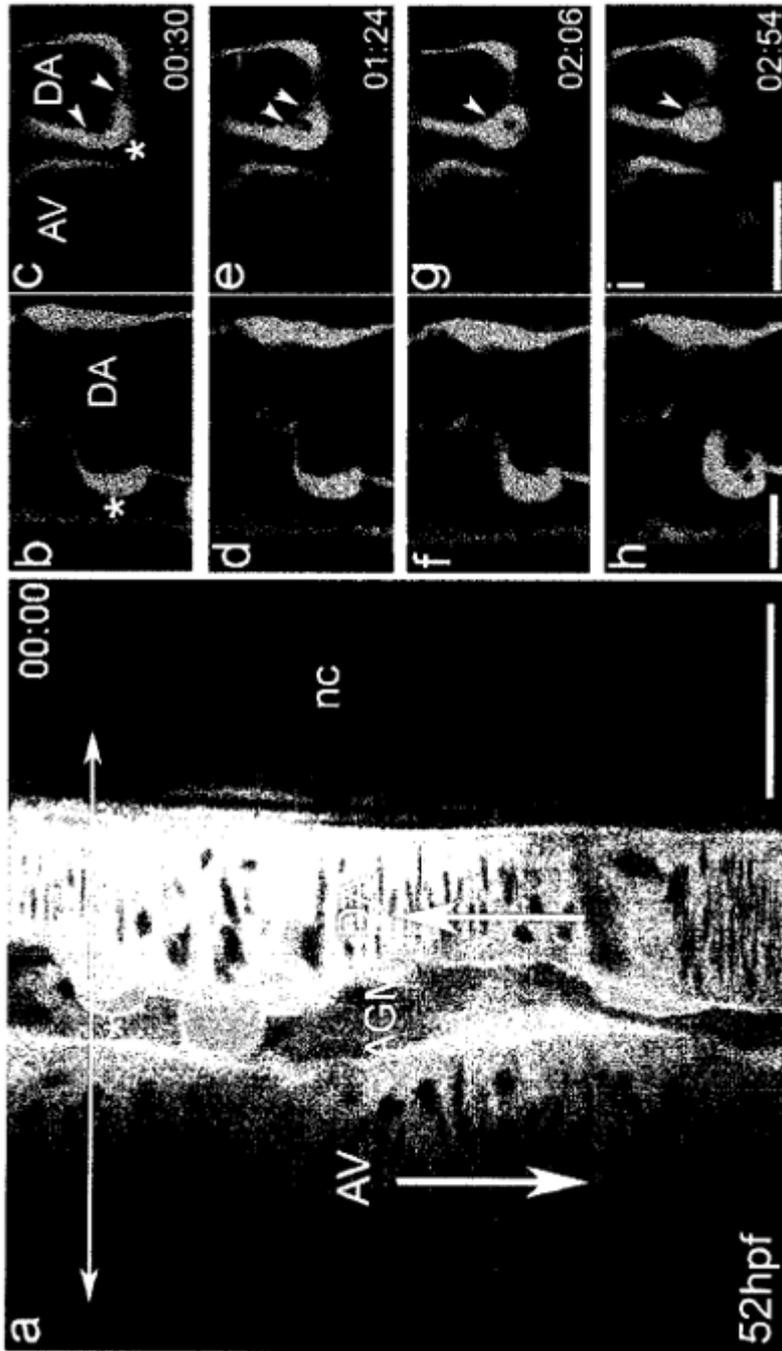


FIGURA 6

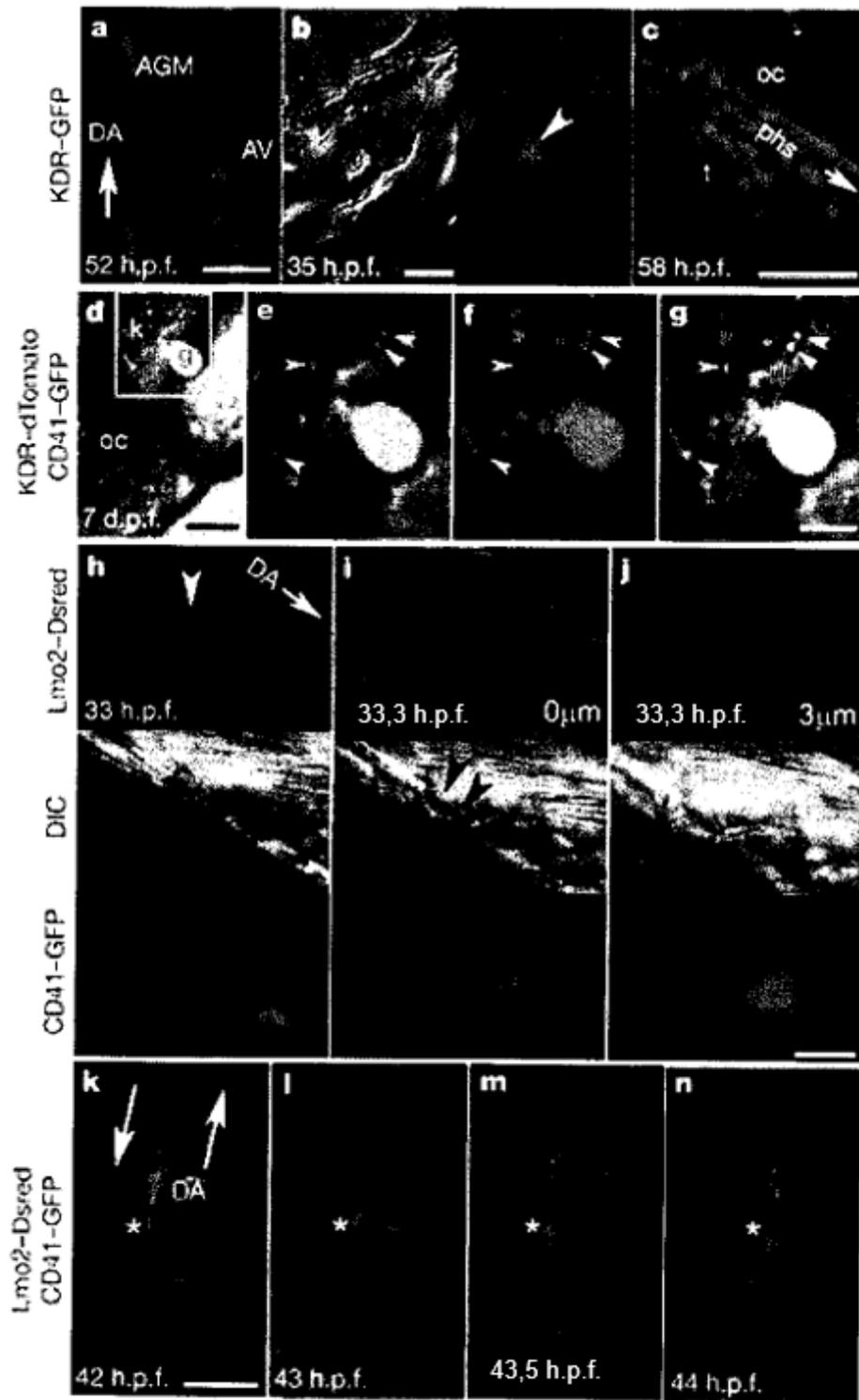


FIGURA 7