



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE COMPLEJOS
NOX DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE *Danio rerio***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Alissa Anahí López Lomas

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Salas Vidal
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leonor Pérez Martínez
[Instituto de Biotecnología](#)

Dr. Luis Cárdenas
[Instituto de Biotecnología](#)

Cuernavaca, Morelos, México. Marzo, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi mundo, Elva y Felipe, quienes dan absolutamente todo por asegurar mi éxito en todos los ámbitos, inclusive cuando desconozco mi camino. Por su comprensión y paciencia siempre estaré agradecida.

A mis tres hermanas, mis otras madres.

Soy reflejo de ustedes, mis éxitos son los suyos. Pertenecerles es mi fortuna. Los amo a todos.

AGRADECIMIENTOS

A Guille, inigualable compañero, contigo obtuve lo mejor del viaje.

A mis amigos, en los que encuentro conocimiento, calma y un segundo hogar: Ceci R, Sarahí G, Alfredo S, Lucero R, Zuri X, Carlos R, Irene C, Ivan C, Den A, Ana Karen G Javier M, Arturo Ras, Chichí y Copal. Con el mismo sentimiento, a los amigos me guiaron en mi primer laboratorio, Andrea T y José Luis. Un agradecimiento especial a mi amigo, Gustavo R, por su cariño y ayuda en los análisis bioinformáticos. Ustedes son parte invaluable de mi formación humana y estabilidad.

Al Dr. Enrique Salas, por aceptarme como su alumna a la mitad de mi posgrado y hacerlo sin prejuicios.

A la Dra. Hilda Lomelí y M.C. Laura Ramírez por su invaluable orientación en mis experimentos.

A mi comité tutorial y a mi jurado: Dra. Leonor Pérez, Dr. Luis Cárdenas, Dr. Enrique salas, Dra. Claudia Treviño, Dra. Verónica Narváez, Dr. Omar Pantoja, Dr. Gustavo Pedraza, Dr. Mario Zurita, su orientación y observaciones me formaron en la ciencia.

CONACYT beca número 406531.

Al PAEP por un apoyo para asistencia al congreso.

Este proyecto fue financiado por el apoyo de PAPIIT-UNAM con número IN210316.

RESUMEN

Durante las primeras horas del desarrollo embrionario del pez cebra se forma un grupo de células a partir de divisiones sincrónicas en el polo animal del embrión. Estas células dan origen al blastodermo el cual posteriormente se extiende sobre el polo vegetal mediante un movimiento celular llamado epibolia. Después, el blastodermo inicia un proceso morfogénico llamado gastrulación, en el cual se forman las capas germinales por medio de movimientos celulares como la epibolia, ingresión y extensión convergente. Previamente en el grupo de investigación de la Dra. Hilda Lomelí se encontró que las células que participan en la epibolia producen especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO son moléculas reactivas derivadas de la reducción parcial del oxígeno, pueden interactuar con macromoléculas produciendo cambios relevantes mediante la oxidación de lípidos, proteínas y ADN. Se ha observado que las ERO participan en la señalización celular en vías involucradas con la muerte celular, la migración, la diferenciación y la proliferación. Existe una familia de complejos enzimáticos involucrados en la producción de ERO llamados complejos Nox que están altamente conservados entre los organismos eucariotas. Existen siete complejos NOX en humanos: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2. En el pez cebra se han descrito los genes homólogos Nox1, Nox2, Nox4, Nox5 y Duox1. Los complejos Nox consisten en un componente catalítico y subunidades accesorias que pueden ser organizadoras o activadoras. Algunas Nox son activadas por subunidades y otras por calcio. Este proyecto se enfocó principalmente en caracterizar el patrón de expresión de los genes de las subunidades accesorias de los complejos Nox (las organizadoras: *cyba*, *p47*, *noxo1a*, *noxo1b*; y las activadoras *p67* y *nox1*) en pez cebra durante el desarrollo temprano con el fin de conocer la expresión de estos genes durante las etapas de movimientos morfogénicos. En este proyecto se realizaron ensayos de PCR, ISH e inmunotinción. En este trabajo se encontró que *cyba*, *p47* y *nox1* se expresan de manera estable durante el desarrollo temprano, mientras que el resto de las subunidades accesorias de las Nox tienen un patrón de expresión dinámico. Los resultados de los patrones de expresión de las subunidades de este trabajo combinados con los antecedentes inmediatos sobre el patrón de expresión de los componentes catalíticos (Mendieta-Serrano, et al., 2018, Mendez-Cruz, resultados sin publicar), indican que los componentes de los complejos de Nox1 y Duox1 se expresan desde el inicio de la epibolia. Mientras que Nox5 se expresa durante el periodo de gastrulación. El componente catalítico de Nox2 se expresa durante el desarrollo temprano, sin embargo, la subunidad activadora se expresa al final de la gastrulación. En futuros proyectos se desea conocer cuales complejos están contribuyendo a la formación de ERO durante el desarrollo temprano y que papel tienen durante la epibolia y gastrulación.

Contenido

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	6
INTRODUCCION	7
Danio rerio: modelo del desarrollo embrionario	7
Especies reactivas de oxígeno	9
NADPH oxidasas	10
Activación del complejo NOX2	13
Antecedentes inmediatos	16
Dinámica de localización de las ERO durante la epibolia	16
Patrón de expresión de los componentes catalíticos de los complejos nox	19
Pérdida de función parcial de Nox.	19
HIPOTESIS	21
OBJETIVO	21
METODOLOGÍA	22
Análisis bioinformático	22
Mantenimiento de cepas de D. rerio	22
Obtención y cultivo in vitro de embriones de D. rerio	22
PCR de punto final	23
Hibridaciones in situ e inmunotinciones de los embriones	23
Adquisición de imágenes	24
RESULTADOS	24
Análisis bioinformático	24
<i>Alineamiento de las secuencias de Cyba de D. rerio y H. sapiens</i>	24
<i>Esquema de la organización genómica de los genes cyba</i>	25
<i>Alineamiento múltiple y cladograma de las secuencias de Cyba de diferentes especies de animales representativas</i>	26
Patrón de expresión temporal de las subunidades accesorias de los complejos Nox mediante PCR	27
.....	29

Patrón de expresión espacial de las subunidades accesorias de los complejos Nox mediante hibridación in situ (ISH).....	30
Patrón de expresión de la proteína Cyba	35
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	48
Bibliografía	49
APENDICE A	57
APENDICE B	76
Recetas	76
Extracción de RNA	76
Síntesis de cDNA.....	77
Patrón de expresión temporal mediante PCR.....	79
Inmunotinción en embriones completos.....	81
Hibridación in situ (ISH)	83

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

HPF – horas post fertilización

DPF – días post fertilización

DCF – diclorofluoresceína

MO – morfolinos

DCL – células de la capa profunda

EVL – células de la capa envolvente

EOR – especies de oxígeno reactivas

CGD – enfermedad crónico-granulomatosa

SH3 – Src homology 3

PCR – reacción en cadena de la polimerasa

qPCR – reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa

ISH – hibridación *in situ*

KO – *knockout*

KD – *knockdown*

INTRODUCCION

Danio rerio: modelo del desarrollo embrionario

Danio rerio, es un organismo que se ha establecido como modelo para estudiar la genética de los vertebrados. Los científicos Jane Marion Oppenheimer y George Streisinger fueron pioneros en el uso de *D. rerio* en las áreas de la biología del desarrollo y genética de vertebrados, sus trabajos ayudaron a establecer a esta especie como un modelo animal (Clark & Ekker, 2015). Entre los motivos por los cuales se adoptó a este organismo como modelo entre la comunidad científica se encuentra que el costo de mantenimiento de los peces es comparativamente menor al de otros organismos modelo, resulta fácil la crianza de peces, alcanzan la madurez sexual a los tres meses de vida (Fig. 1) y por cruce individual las hembras en óptimas condiciones logran ovopositar decenas de huevos (Nasiadka & Clark, 2012). Otra característica conveniente es que la fertilización y desarrollo embrionario ocurren fuera de la hembra, eso permite la manipulación experimental desde el inicio del desarrollo. Hasta las primeras 24 h de desarrollo el embrión es casi transparente, por ello se puede visualizar la morfogénesis de sus diferentes estructuras bajo el microscopio. Por los motivos mencionados anteriormente el pez cebra es uno de los modelos preferidos para hacer tamizajes genéticos a gran escala (Zon & Patton, 2001). Otra ventaja de este modelo es que su genoma está secuenciado, esa información sirve para agilizar el progreso de cualquier proyecto científico donde se involucre al pez cebra y la genética (Howe, et al., 2013).

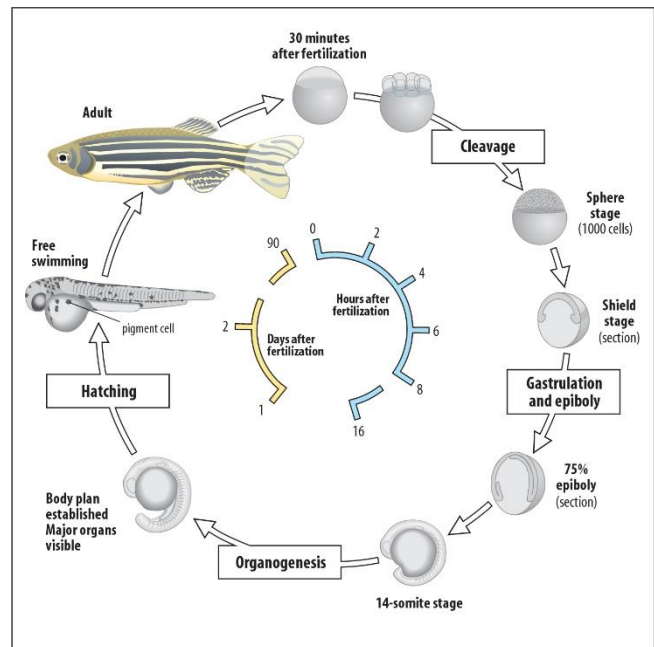


Figura 1. Ciclo de vida de *D. rerio*. El organismo comienza como una célula que se divide (0-2 hpf) para posteriormente gástrular (5.25-10 hpf), formar órganos (10-42 hpf), eclosionar (~2 días dpf) y madurar sexualmente a los 90 dpf. Dpf = días post fertilización; hpf = horas post fertilización. (Wolpert, et al., 2011)

Posterior a la fertilización, corrientes del citoplasma del vitelo forman a la primera célula en lo que se conoce como el polo animal (Fuentes & Fernández, 2010). Cuarenta minutos (min) después de la fertilización, inicia la división de la primera célula o blastómero que se formó. Posterior a la primera división los blastómeros se dividen cada 15 min aprox. de manera sincrónica para formar el blastodermo en el polo animal. Cuando el embrión alcanza 1000 células ocurre el proceso conocido como transición de la blástula media (TBM). Durante la TMB el genoma del embrión inicia la transcripción, las divisiones celulares pierden su sincronía, se alarga el ciclo de división, las células presentan los primeros signos de motilidad y algunas células del margen del blastodermo se fusionan con el vitelo liberando su citoplasma y núcleo para formar la capa sincicial del vitelo (YSL por sus siglas en inglés, *yolk syncytial layer*). A partir de esta etapa del desarrollo los embriones están constituidos por tres linajes de células, a) las células de la capa envolvente (EVL, *enveloping layer*) que es la capa de células más externa, b) las células de la capa profunda (DCL, *deep cell layer*) que están recubiertas por la EVL y c) la célula del vitelo. Aproximadamente una hora después de que ocurre la TBM inicia el movimiento morfogénico conocido como **epibolia**, donde las DCL se intercalan y el blastodermo se extiende sobre el vitelo en dirección al polo vegetal (Bruce, 2016). Cuando el embrión alcanza el 50% de epibolia inicia el periodo de **gastrulación**. Durante este proceso, la epibolia continúa y de forma simultánea, ocurren otros tipos de movimientos celulares, como la ingresión y la involución, en donde las células del margen del blastodermo se internalizan formando dos capas de células, la capa más externa se llama epiblasto y la interna el hipoblasto. Durante el movimiento morfogénico conocido como extensión convergente, las células del blastodermo se mueven hacia lo que será el futuro dorso del embrión donde convergen y se intercalan para extender el eje anteroposterior, al finalizar este periodo estarán definidas las capas embrionarias primarias, epiblasto e hipoblasto y se podrán distinguir los ejes embrionarios anterior-posterior, dorsal-ventral, izquierda-derecha (Rodhe & Heisenberg, 2007). Después de la gastrulación comienzan a desarrollarse las somitas y los rudimentos de órganos, el embrión comienza a extender la cola; hacia las 24 h después de la fertilización (hpf), aparece pigmentación en la retina y la piel, se observa circulación sanguínea; a las 48 hpf la larva eclosiona del huevo y a las 72 hpf ésta ya puede nadar en busca de alimento (Kimmel, et al., 1995).

El desarrollo de cualquier organismo requiere de la interpretación de señales y ejecución de respuestas por parte de las células desde los primeros instantes de vida, las células deben dividirse, especializarse, morir o migrar. Las señales necesarias para el desarrollo de un organismo multicelular deben estar finamente reguladas en el tiempo y el espacio, ya que más adelante en el desarrollo, su interpretación fijará la identidad de células y tejidos (Gurdon & Bourillot, 2001). En este proyecto nos interesa conocer el papel que puedan jugar las especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas por los complejos Nox durante el desarrollo temprano de *D. rerio*.

Especies reactivas de oxígeno

Las ERO son un grupo amplio de moléculas derivadas de la reducción parcial del oxígeno (Fig. 2). Estas moléculas son capaces de hacer modificaciones redox a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Winterbourne, 2008; Halliwell & Gutteride, 1984). La producción de ERO puede ser endógena por medio de la actividad de diferentes enzimas como: los complejos mitocondriales I, II y III (Murphy, 2009; Venditti, et al., 2013), la citocromo p450, las ciclooxigenasas o las lipooxigenasas; así como también puede ser exógena y resultar a partir de insultos ambientales como la radiación ionizante (Leach, et al., 2001), luz ultravioleta (Heck, et al., 2003), y contaminantes químicos ambientales que promueven su formación. A este trabajo no le compete detallar los diversos orígenes metabólicos o ambientales de las ERO, para ello se refiere al lector a otras fuentes (Xu & Fisher, 2005; Leach, et al., 2001; Abdollahi, et al., 2004; Zangar, et al., 2004).

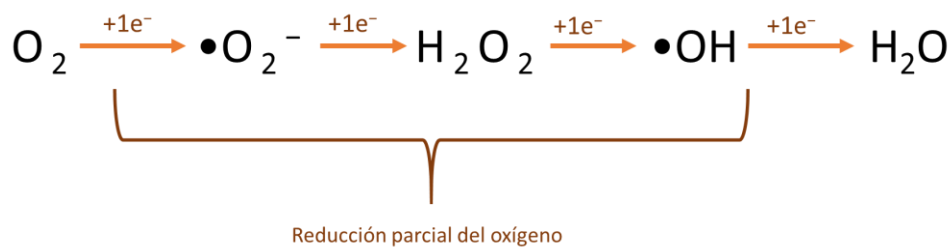


Figura 2. Reducción del oxígeno. El superóxido, peróxido de hidrogeno y el ion hidroxilo son especies reactivas de oxígeno producidas por la reducción en secuencia del oxígeno, la reducción completa del oxígeno produce agua.

En el grupo de la Dra. Hilda Lomelí el objetivo global de este proyecto es hacer una relación entre las ERO y procesos biológicos normales. En un sistema biológico la cantidad de ERO es uno de los factores importantes para dictar el estado redox el cual puede encontrarse en niveles de homeostasis o de estrés oxidativo. Se considera que ocurre estrés oxidativo cuando la producción de compuestos oxidantes rebasa la capacidad del sistema antioxidante (Lushchak, 2014). Durante muchos años el estrés oxidativo fue el enfoque de los estudios de las ERO (Gladyshev, 2014), sin embargo, en años recientes se ha comenzado a estudiar el papel de las ERO en condiciones fisiológicas. Ahora se sabe que participan en procesos importantes tanto en la homeostasis como en la señalización celular (Ray, et al., 2012), o en la regulación de la expresión de genes (Al-Mehdi, et al., 2012); esto es porque las ERO son moléculas capaces de provocar modificaciones redox en residuos de aminoácidos oxidables de proteínas como las fosfatasa de tirosina (Denu & Tanner, 1998), cinasas de proteínas (Gopalakrishna & Jaken, 2000; Yong, et al., 2011) o factores de transcripción (Brigelius-Flohé & Flohé, 2011). Esas modificaciones tienen un impacto en la regulación de distintos comportamientos celulares como: la diferenciación, la migración, la proliferación y la muerte celular, que son procesos fundamentales para el desarrollo embrionario (Covarrubias, et al., 2008; García-Hernandez, et al., 2010). Estudios *in vitro* e *in vivo* en distintos modelos biológicos demuestran la participación de las ERO en los procesos celulares mencionados (Moloney & Cotter, 2018; Diwanji & Bergmann, 2018; Fogarty, et al., 2016; Owusu-Ansah & Banerjee, 2009; Hurd, et al., 2012; Niethammer, et al., 2009; Salas-Vidal, et al., 1998; Wilson, et al., 2018; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016). Existen complejos proteicos encargados de la producción de ERO llamados NADPH oxidasas, que se detallan a continuación.

NADPH oxidasas

Las NADPH oxidasas (NOX) son una familia de complejos proteicos dedicados a la producción de ERO. Los complejos consisten en un componente catalítico (usualmente llamado NOX) y subunidades accesorias, que pueden ser organizadoras o activadoras. El componente catalítico es una proteína que transporta electrones a través de una membrana para reducir oxígeno (Donkó, et al., 2005). Cuando el complejo proteico se

activa, se utilizan electrones donados por el dinucleótido nicotinamida adenina fosfato reducido (NADPH) para reducir parcialmente al oxígeno. Las distintas isoformas NOX pueden regularse por subunidades organizadoras y activadoras o por calcio (Tabla 1). En el humano se han descrito siete isoformas NOX: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 Y DUOX2 (Bedard & Krauze, 2007), mientras que el pez cebra presenta cinco: Nox1, Nox2, Nox4, Nox5 y Duox1 (Fig. 3) (Weaver, et al., 2016). Las ERO producidas por estos complejos tienen diversas funciones. Se sabe que participan en la respuesta inmune (Segal, 1996), respuesta al daño físico (Niethammer, et al., 2009), reacciones biosintéticas (Dupuy, et al., 1999) y en transducción de señales (Mahadev, et al., 2004; Lassègue, et al., 2001) por mencionar algunos ejemplos. Estas proteínas están altamente conservadas entre los organismos (Kawahara, et al., 2007).

Las subunidades accesorias de los complejos Nox sirven para organizar o activar al componente catalítico (Tabla 1). En la tabla 2 se muestra la nomenclatura, así como la función de las subunidades accesorias. Distintos autores utilizan los nombres alternativos de las subunidades, mientras que otros utilizan los nombres oficiales. En esta tesis se empleará el símbolo oficial de cyba, noxo1a, noxo1b y noxa1; y el alternativo de *ncf1* y *ncf2* (*p47* y *p67* respectivamente). Cuando se refiere a genes humanos se escribe en mayúsculas itálicas, las proteínas humanas se escriben en mayúsculas y en tipo normal. En cambio, los genes del pez cebra o de otros organismos se escriben en minúscula itálicas y para las proteínas se escribe la primera letra del símbolo en mayúscula y tipo normal.

TABLA 1. ORGANIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS NADPH OXIDASA DEL PEZ CEBRA (Aguirre & Lamberth, 2010)

ISOFORMA	REGULADA POR
NOX1	CYBA + NOXO1 + NOXA1 + Rac1
NOX2	CYBA + p47 + p67 + Rac
NOX3	CYBA + NOXO1
NOX4	CYBA
NOX5	Calcio + fosforilación
DUOX1	Calcio

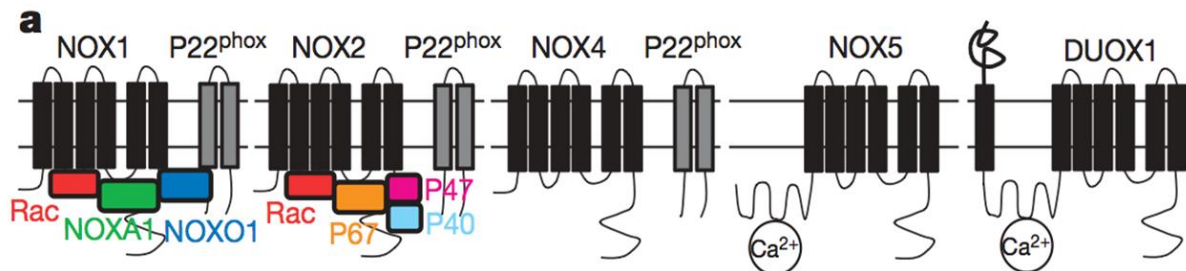


Figura 3. NADPH oxidasas presentes en el pez cebra. Los complejos Nox1, Nox2 y Nox4 requieren subunidades para su regulación y activación, en cambio Nox5 y Duox1 se regulan por calcio (Niethammer, et al., 2009).

Tabla 2. Nomenclatura de las subunidades accesorias de los complejos Nox

Nombre	Símbolo oficial gen	Símbolo alternativo	tipo de subunidad
cytochrome b-245 alpha chain	<i>cyba</i>	<i>p22</i>	organizadora
neutrophil cytosolic factor 1	<i>ncf1</i>	<i>p47</i>	
NADPH oxidase organizer 1a	<i>noxo1a</i>		
NADPH oxidase organizer 1b	<i>noxo1b</i>		
neutrophil cytosolic factor 2	<i>ncf2</i>	<i>p67</i>	activadora
NADPH oxidase activator 1	<i>nox1</i>		

Activación del complejo NOX2

El complejo NOX2 es el miembro de la familia NOX humana mejor caracterizado, por ello en esta sección lo utilizaré para explicar el mecanismo de activación de las NOX.

El complejo NOX2 se compone de una subunidad catalítica (NOX2), dos subunidades organizadoras (CYBA y p47), una subunidad activadora (p67) y una Rac-GTPasa. NOX2 y CYBA forman un heterodímero membranal inactivo. Para que NOX2 se active, necesita entrar en contacto con la subunidad activadora p67 (Dang, et al., 2002); para sostener la interacción NOX2-CYBA-p67, se necesita de la subunidad organizadora p47 (El-Benna, et al., 2009). p47 tiene dominios SH3 y sitios ricos en prolina (PRR) que le permiten interactuar con CYBA y p67; en condiciones de reposo p47 se encuentra en el citosol y tiene los dominios de interacción ocultos gracias a su región autoinhibitoria (AIR) (Fig.4A). Cuando inicia el proceso de activación, p47 es fosforilada y expone los dominios de interacción (Fig. 4B), la fosforilación puede llevarse a cabo por diferentes cinasas, dependiendo del tejido donde se encuentre NOX2. En el caso de NOX2 en neutrófilos, la fosforilación es debida a la acción de la cinasa K (Fontayne, et al., 2002). Después de la fosforilación, p47 se une a p67 y se trasladan hasta el heterodímero NOX2-CYBA para anclarse a la membrana con el dominio PX de p47 y formar el complejo NOX2-CYBA-p47-p67. Además, es necesario que p67 interactúe con la GTPasa Rac. El papel de esta interacción de GTPasa Rac es controversial, sin embargo, su participación se asocia al reclutamiento de p67 hacia el heterodímero NOX2-p22 y la regulación de la actividad del complejo Nox (Werner, 2004) (Pick, 2014). Finalmente, la activación del complejo ocurre mediante la interacción del dominio de activación de la subunidad p67 con el sitio de activación de NOX2. (Fig. 4C) (Brandes, et al., 2014). Para formar superóxido, los electrones del NADPH se transfieren a través de una membrana mediante una cadena de cofactores con potencial de reducción ascendente donde el ultimo aceptor de electrones es el oxígeno.

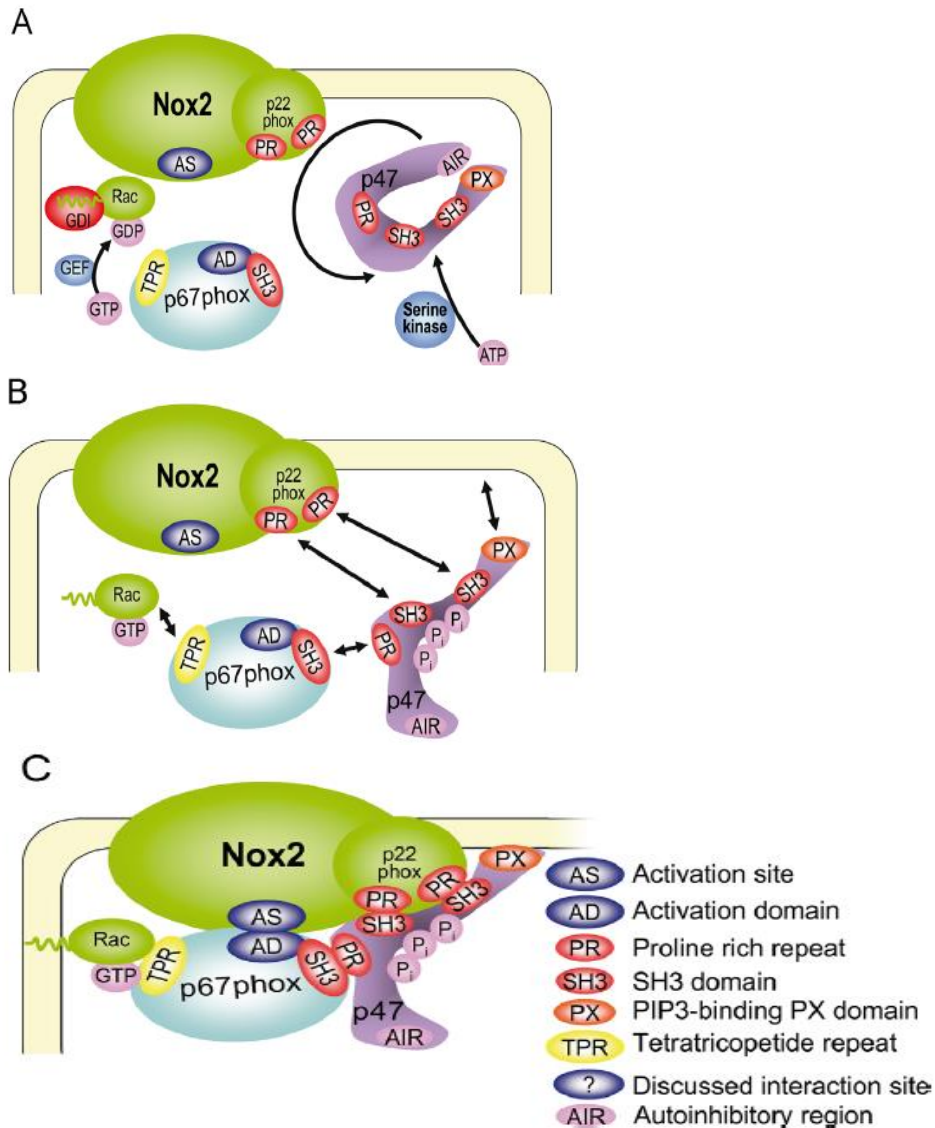


Figura 4. Activación de NOX2. **A)** La subunidad organizadora p47 se encuentra en el citosol plegada con ayuda de su región autoinhibitoria (AIR) cuando el complejo NOX2 está en reposo. **B)** Cuando p47 se ancla a la membrana con su región PX, se une a CYBA y a p67 con sitios ricos en prolina y dominios SH3. p67 se une con Rac GTPasa con su repetición de tetratricopeptidos. **C)** p67 activa a NOX2 al unirse establemente con la ayuda de las interacciones generadas en A) y B) (Brandes, et al., 2014).

Antecedentes inmediatos

Los antecedentes que se muestran en esta sección fueron experimentos realizados para conocer el papel que las ERO tienen durante el desarrollo embrionario temprano, en particular las ERO producidas por los complejos Nox del pez cebra (Mendieta-Serrano, et al., 2018; Mendez-Cruz, resultados sin publicar).

Dinámica de localización de las ERO durante la epibolia

Se realizó microscopía de lapso de tiempo en conjunto con una tinción con diclorofluoresceína (DCF) para conocer el patrón de localización de ERO. La DCF es un compuesto que fluoresce al oxidarse, de esa manera se pueden visualizar de manera indirecta sitios donde las ERO son producidas durante la epibolia. Se observó que la epibolia va acompañada de la producción de ERO en el blastodermo, pero especialmente en el frente de migración donde se aprecia aparentemente una mayor acumulación (Fig. 5 B,C) (Mendieta-Serrano, et al., 2018).

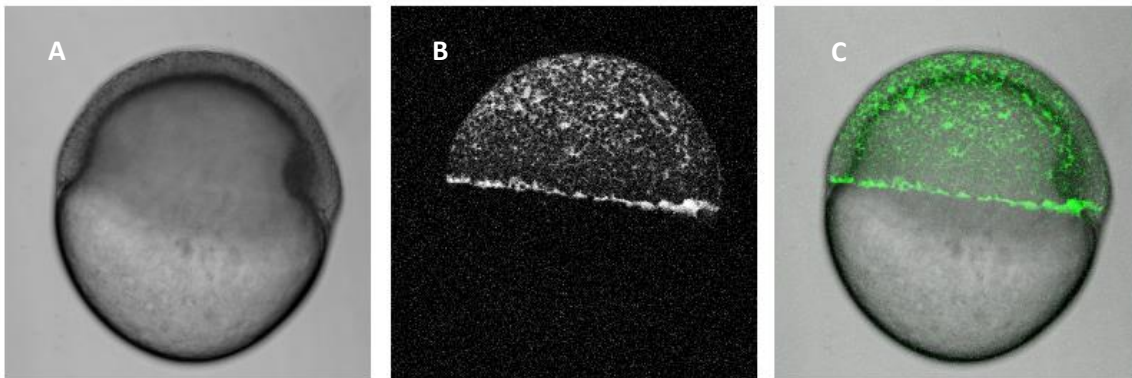


Figura 5. Patrón de localización de ERO durante la epibolia. Se muestra al embrión en etapa de escudo en campo claro (A), señal producida por el colorante DCF (B), y la superposición (C) de las imágenes de campo claro y de la señal del DCF que permite visualizar el sitio donde se están acumulando las ERO en el blastodermo (Mendieta-Serrano, et al., 2018)

Para conocer si las ERO observadas eran producidas por los complejos, se empleó un inhibidor farmacológico general de los complejos Nox llamado VAS2870 (Wingler, et al., 2012) y se visualizó la producción de ERO usando DCF. Se observó que la señal fluorescente disminuyó en los embriones tratados con el fármaco de manera dosis

dependiente (Fig. 6 v-vi), y que la disminución de la producción de ERO afecta la motilidad de las células de la capa profunda durante la epibolia (Fig. 7).

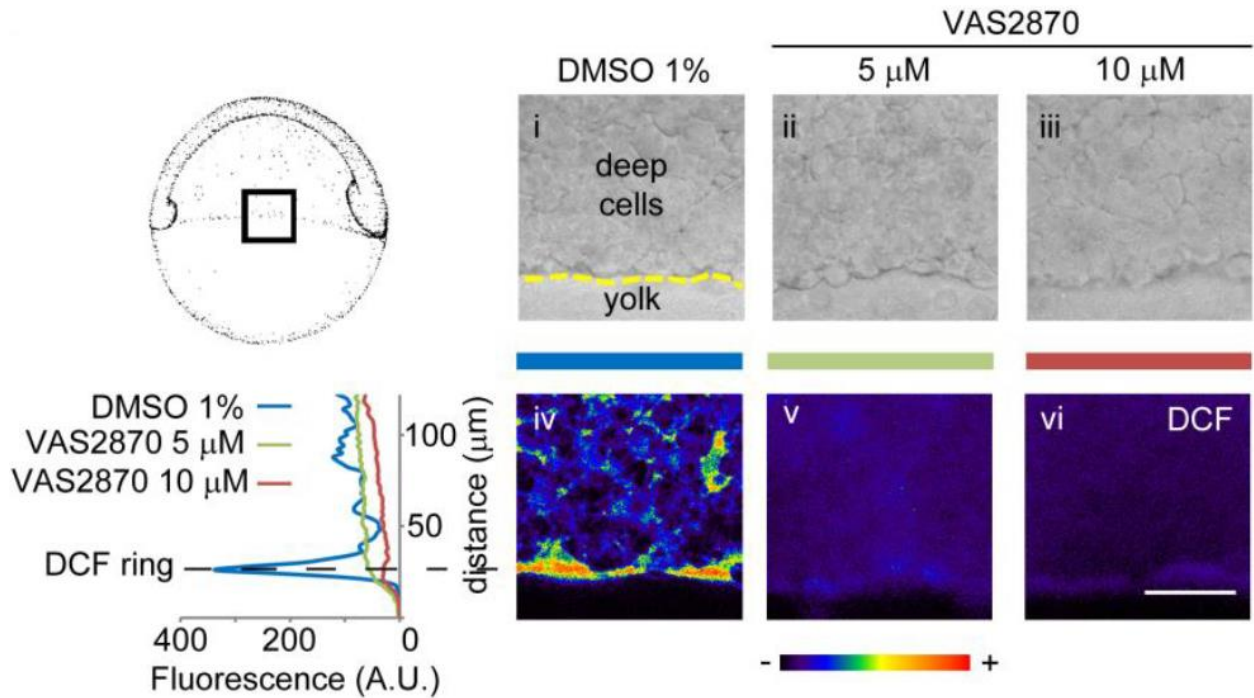


Figura 6. Inhibición general de las Nox. Esquema de embrión mostrando en un marco negro el margen del blastodermo y en una gráfica la intensidad de fluorescencia del DCF con respecto al borde en embriones control (DMSO 1%), donde se encuentran enriquecidas las ERO; y en embriones tratados con 5 y 10 μM de VAS2870, donde se aprecia la disminución de la señal de DCF (Mendieta-Serrano, et al., 2018).

Estos experimentos indican que hay una relación entre las ERO producidas por la actividad de las Nox durante la epibolia y el progreso del desarrollo embrionario, sin embargo, se desconocía el patrón de expresión de las unidades catalíticas Nox. Cualquiera de las cinco isoformas Nox que expresa el pez cebra podría ser la responsable de la respuesta. Por lo tanto, para determinar cuales están presentes durante la epibolia se analizó su patrón de expresión durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario.

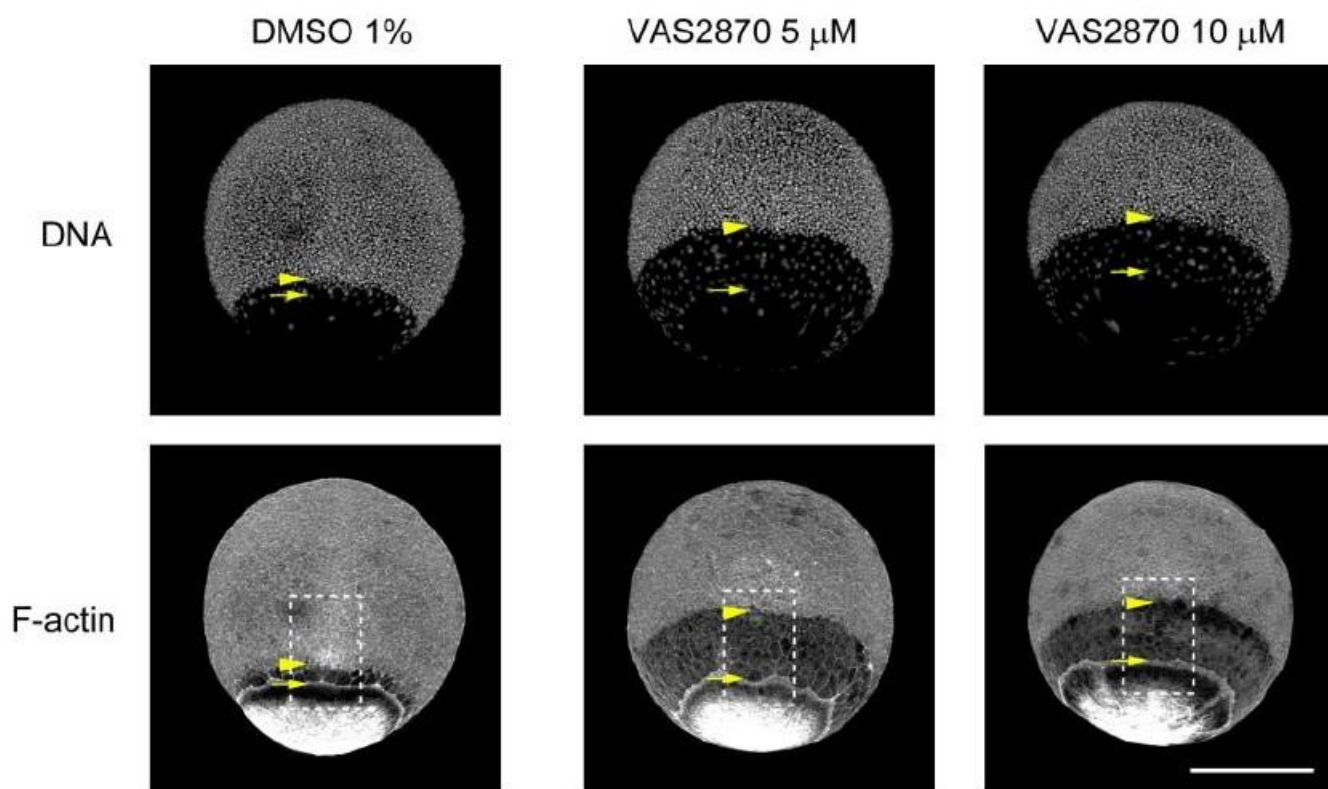


Figura 7. Retraso de la capa de células profundas mediante inhibición general de las Nox. El desarrollo de los embriones control (DMSO 1%) es normal. La capa de células profundas se retrasa durante la epibolia en los embriones tratados con VAS2870. Las capas envolvente y profunda están señaladas con cabeza de flechas y flechas amarillas respectivamente (Mendieta-Serrano, et al., 2018).

Patrón de expresión de los componentes catalíticos de los complejos nox

Mediante PCR se analizó la expresión de los RNAs mensajeros de las subunidades catalíticas *nox* desde etapa de esfera (por ser una etapa previa a la epibolia) hasta las 24 hpf. Durante la etapa de esfera (Fig. 8 ESF) solo se expresa el mRNA de *nox1* y *duox1*; posteriormente, desde la etapa escudo (Fig. 8 ESC) hasta las 24 hpf se observa la presencia del mRNA de *nox1* (597 bp), *nox2* (637 bp), *nox5* (690bp) y *duox1* (791 bp) (Fig. 8). La expresión de *nox4* no se verificó porque la anotación del gen en la base de datos ZFIN no era de buena calidad al momento de desarrollar este experimento. Posterior a identificar los patrones de expresión de los componentes catalíticos de Nox se determinó cuál(es) Nox participan en la producción de ERO durante el desarrollo temprano mediante experimentos de pérdida de función (Fig. 9).

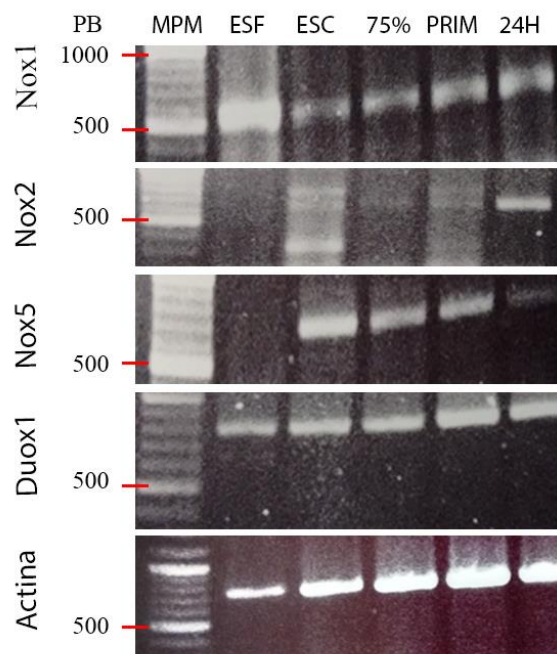


Figura 8. PCR para detectar la expresión de las distintas isoformas Nox en el pez cebra en distintas etapas del desarrollo. Esf: Esfera, Esc: Escudo, 75%: 75% de epibolia, PRIM: Primordio de la cola, 24H: 24 h de desarrollo. Crédito: Mendez-Cruz y Schnabel-Peraza

Pérdida de función parcial de Nox.

Con el fin de conocer el papel de la actividad de los complejos Nox durante la epibolia fueron utilizados morfolinós (MO), oligonucleótidos anti-sentido para regular a la baja la

expresión de *Cyba* y *Duox1*. Para inhibir la actividad de Nox1, Nox2 y Nox4 se eligió un MO contra el gen *cyba* que codifica una subunidad compartida por esas Nox. También se empleó un MO contra *duox1*. Los MO utilizados impiden el splicing de los mRNA del gen *cyba* y de *duox1* (Niethamer et al., 2009). Al inyectar individualmente cada MO no se observaron efectos en el desarrollo (Fig. 9 A,B). Sin embargo, al realizar una inyección con ambos morfolinós se observó retraso de la migración celular durante la epibolia comparado con embriones control (Fig. 9 C,D) similar a lo observado en los experimentos con el uso del inhibidor farmacológico de las Nox (Mendieta-Serrano, et al., 2018).

A partir de estos antecedentes inmediatos se piensa que principalmente Nox1 y Duox1 contribuyen a la producción de especies reactivas de oxígeno durante la epibolia, sin embargo, se desconoce el patrón de expresión de las subunidades accesorias Nox1 las cuales son requeridas para su activación. Este proyecto se enfoca en caracterizar los patrones de expresión de las subunidades de las Nox.

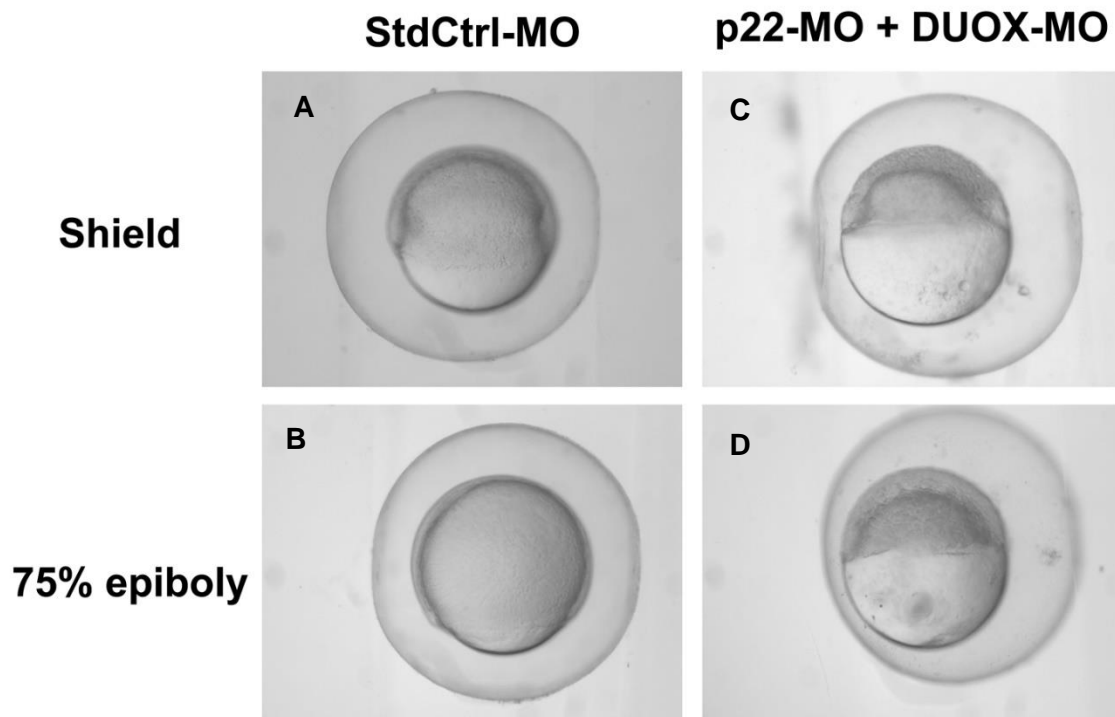


Figura 9 Knockdown de p22(*cyba*) y *duox1*. La regulación a la baja de p22(*Cyba*) y *Duox1* (C,D) resulta en el retraso de la epibolia. La inyección de morfolin estándar (A,B) no afecta el desarrollo embrionario (Mendieta-Serrano, et al., 2018).

HIPOTESIS

Las subunidades accesorias presentan patrones de expresión diferencial que participan en la regulación de la conformación de los complejos Nox requeridos para la formación de ERO en el desarrollo embrionario temprano del pez cebra.

OBJETIVO

Obtener el patrón de expresión de las subunidades accesorias de los complejos Nox (*cyba*, *noxa1*, *noxo1*, *ncf1*, *ncf2*) durante el desarrollo temprano del pez cebra mediante: PCR, hibridación *in situ* e inmunofluorescencia.

METODOLOGÍA

Análisis bioinformático

Las secuencias de los genes de *C. intestinalis* (ascidia) se obtuvieron de la base de datos Echinobase (Cameron, et al., 2009), las secuencias de *B. floridae* (pez lanceta) (Putnam et al., 2008) se obtuvieron de JGI genome portal, las secuencias del resto de los organismos (*D. rerio*, pez cebra; *H. sapiens*, humano; *M. musculus*, ratón; *X. tropicalis*, rana; *A. Carolinensis*, lagartija y *G. gallus*, pollo) se obtuvieron de Ensembl (Aken, et al., 2016). Se realizaron alineamientos globales en Clustal Omega (Sievers, et al., 2011), la visualización de los alineamientos y la generación de la topología de los cladogramas se hizo en Jalview (Waterhouse, et al., 2009). Para generar los cladogramas se empleó el método de *clustering* conocido como *neighbor joining* sobre los alineamientos realizado en Clustal Omega. La visualización y edición de los cladogramas se hizo en Figtree (versión 1.4.3) (Rambaut, 2007).

Mantenimiento de cepas de *D. rerio*

La colonia de peces se encuentra en un sistema de acuicultura recirculante donde se realizaron cambios de agua al sistema de peceras de una tercera parte al día (agua desionizada por osmosis inversa mezclada con sales NaHCO_3 0.1 g/l, e instant ocean® 0.1 g/l), se mantuvieron con un fotoperiodo de 14 h de luz con 10 de oscuridad y se alimentaron cuatro veces al día con una mezcla de alimento vivo y en polvo. Las conductividad del agua se mantuvo en un rango de 400 a 600 μS (ideal 500 μS) y pH entre 7 y 7.8 (pH ideal 7.6) (Westerfield, 2007).

Obtención y cultivo *in vitro* de embriones de *D. rerio*

Los embriones utilizados se obtuvieron por cruzas entre peces de cepa silvestre AB o cruzas de una cepa silvestre generada en el laboratorio a partir de peces de un acuario local. Los peces adultos se colocaron en una relación de dos hembras por cada macho en una caja de 1.5 L con una rendija en el fondo, ambos sexos separados por una barrera transparente. La mañana siguiente al inicio del fotoperiodo se retiró el separador para permitir el cortejo. Los huevos fertilizados cayeron al fondo. Los embriones se

colectaron mediante filtrado del agua de la caja y se lavaron con agua limpia. Los embriones se incubaron en cajas Petri de 100 mm con agua del sistema a 28 °C (Westerfield, 2007), a una densidad máxima de 10 embriones por mililitro de medio, permitiendo el desarrollo embrionario hasta las etapas deseadas según la descripción hecha por Kimmel (1995).

PCR de punto final

RNA total fue aislado con Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo del producto. Se obtuvo cDNA utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) siguiendo el protocolo del producto. Se utilizaron los oligos: Cyba 5'- GCG AAG ATT GAG TGG GCG ATG TGG GC, 3'- TTA TTC GTT GAT GGT GAC AGA CAT AGG ATT GTC; p47 5'- GAG TCC AGG AGA GGA TGG GT, 3'- AGT GGG ATG CTT CAG TCA GC; p67 5'- ATG TGT TCA CTG CTC ACC GT, 3'- CCT TTT CTC CAG CTC TGC CA; Noxo1a 5'- AAC AGC GCA ACA ACA CAA CA, 3'- CCA CCA ACC TTT CTG GTC CT; Noxo1b 5'- GTG CTG TTG TGG AGC TGT TG, 3'- TTT ACG GGT GTA GGT GGT GC; Noxa1 5'- GAG TCC AGG AGA GGA TGG GT, 3'- AGT GGG ATG CTT CAG TCA GC.

Hibridaciones in situ e inmunotinciones de los embriones

El amplicón de las PCR de cada gen fue clonado en plasmidos pCR™II-TOPO siguiendo el protocolo anexo en TOPO®TA cloning® kit (Cat. 452640) para generar las sondas. Hibridación in situ y montados para visualización de los embriones fue realizada como descritas (Thisse & Thisse, 2008) con modificaciones principalmente en el método de purificación de la sonda de RNA y durante la deshidratación de los embriones fijados. El protocolo de la hibridación in situ se encuentra descrito con detalle en el apéndice B, los pasos modificados se encuentran resaltados en esa sección. Los experimentos de inmunofluorescencia fueron realizados como descrito (Mendieta-Serrano, et al., 2013; Mendieta-Serrano, et al., 2015). Se utilizó DAPI (D3571, Invitrogen) para detectar los núcleos. Alexa Fluor® 488 faloidina (A12379, Molecular Probes) para marcar filamentos de actina. Anticuerpo primario igG de conejo p22-phox (sc-20781, Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo secundario (A-21244, Molecular Probes).

Adquisición de imágenes

Los embriones marcados en la inmunofluorescencia fueron excitados simultáneamente a 488 nm (faloidina) y 633 nm (anticuerpo secundario) y posteriormente excitados con luz de 405 nm (DAPI) para evitar el sangrado entre canales. Los embriones fueron visualizados en el microscopio confocal FluoView FV1000. La apertura del diafragma se mantuvo en 200. La sensibilidad del fotomultiplicador se mantuvo igual en la mayoría de los embriones a excepción de los que se encontraban en etapa de 24 hpf en el canal de actina. Fue necesario reducir la sensibilidad ya que la imagen se satura con la señal que proviene de los precursores musculares. Los cortes ópticos seriales en el plano Z fueron obtenidos cada 1 u 8 μM . Los embriones teñidos en las hibridaciones *in situ* fueron fotografiados con una cámara Zeiss AxioCam mrc5 en un estereoscopio Leica mz125 con objetivo planapo 1.0x.

RESULTADOS

Análisis bioinformático

Alineamiento de las secuencias de Cyba de D. rerio y H. sapiens

Se realizaron análisis bioinformáticos para cada gen con la intención de confirmar que los genes identificados en el pez cebra corresponden a los homólogos en el humano. Para verificar que la secuencia de las subunidades accesorias de los complejos Nox en pez cebra que se encuentran reportadas en NCBI correspondiera a la de humano, y además conocer el nivel de conservación, se realizó un alineamiento de las secuencias proteicas entre ambas especies (Fig. 10). Para cada gen se buscó la secuencia en humano reportada en la base de datos NCBI. Al hallarse los genes de interés *CYBA*, *P47*, *P67*, *NOXO1* y *NOXA1* se realizó un blast en el genoma del pez cebra para hallar a los genes homólogos y se realizó un alineamiento global para cada proteína.

Es apropiado mostrar los resultados de cyba como ejemplo ya que los antecedentes (resultados no publicados) se han enfocado a provocar el KD del gen. Además de ello, este proyecto inicialmente estaba enfocado a Cyba y en el futuro se planea realizar un KO de este gen. La información del análisis del resto de los genes se encuentra en el apéndice A .

La figura 10 muestra el alineamiento de las proteínas Cyba entre humano y pez cebra, los aminoácidos indicados en tonos azul son idénticos. El alto nivel de conservación entre la proteína de pez cebra y humana puede ser un indicador de que tienen el mismo papel en ambos organismos. El alineamiento del resto de las proteínas se encuentra en el apéndice 1.

```

[Drer-Cyba] /1-185 1 MAKIEWAMWANEQALAAGLIYLTGGIVGVAGQFRGWQFAAFGLAAGVVFVCLLEYPRSKRG 60
[Hsap-CYBA] /1-195 1 MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVVFVCLLEYPRGKPK 60

[Drer-Cyba] /1-185 61 KGTSIERSGQYCFIVCVKSFGLTRNYYVRAFLHAALCVFGGFMLATVLCVCLGMASLI 120
[Hsap-CYBA] /1-195 61 KGSTMERWGQKYMIAVVKLFGFTRNYYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGI 120

[Drer-Cyba] /1-185 121 YLSAAIHGEHWEPI LHIE-TKKRLGESIKEPPQNPPPRPPELPRKADNLDAAAYDNPM 179
[Hsap-CYBA] /1-195 121 YLLAAVRGEQWTPLEPKPRERPQIGGTIKQPPSNPPRPPAEARKKPSSEEAAVAAGGPP 180

[Drer-Cyba] /1-185 180 SV-TINE----- 185
[Hsap-CYBA] /1-195 181 GGPQVNPPIPVTDEVV 195

```

Figura 10. Alineamiento global Cyba. Se muestra el alineamiento de la secuencia de la proteína de Cyba de *Danio rerio* (*Drer*) y CYBA de *Homo sapiens* (*Hsap*). Las columnas del alineamiento están resaltadas en color azul donde los aminoácidos de ambas secuencias son idénticos. Identidad: 57.3%.

Esquema de la organización genómica de los genes cyba

Se comparó la organización genómica del gen de *CYBA* de *H. sapiens* y *D. rerio* para brindar información adicional sobre el grado de conservación (Fig. 11). Para el esquema que se presenta, se consideró la longitud de los exónes, pero no la de los intrones manteniéndolos como una longitud fija debido a que las secuencias intrónicas son más variables por estar sujetos a presiones selectivas evolutivas menores. La comparación se realizó usando datos reportados en Ensembl de las isoformas codificantes principales. Se observa que todos los exones mantienen regiones codificantes con el mismo número de pares de bases a excepción del último, la similitud de la organización sugiere que ambas secuencias son homologas. Los esquemas de organización genómica del resto de los genes se encuentran en el apéndice A (Fig. 21).

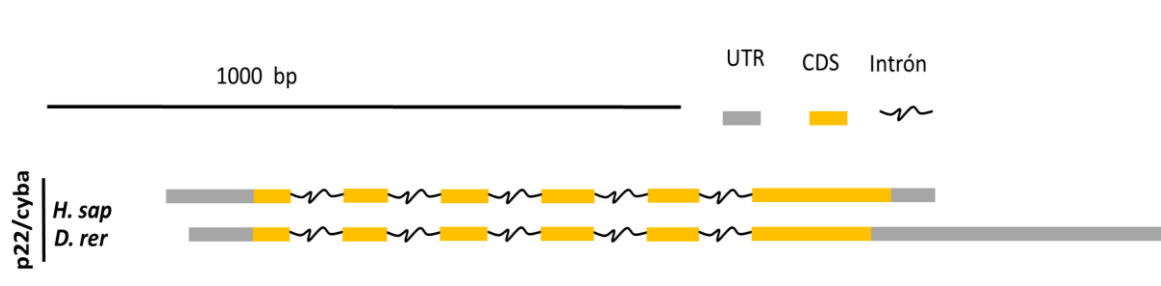


Figura 11. Representación esquemática de la organización intrón-exón del gen *cyba* (p22) de humano y pez cebra. Región no traducida (UTR) en gris, secuencia codificante (CDS) en amarillo y regiones intrónicas como líneas negras onduladas. Las UTR y CDS están representadas a escala como un píxel por cada par de bases. Las CDS son equivalentes a excepción del último exón.

Alineamiento múltiple y cladograma de las secuencias de Cyba de diferentes especies de animales representativas

Para visualizar la cantidad de cambios entre las proteínas Cyba de diferentes especies se realizó un cladograma generado a partir del alineamiento global de las secuencias proteicas de organismos modelo (Fig. 12). Se eligieron especies representativas de distintos grupos de animales incluyendo a *H. sapiens* y *D. rerio*, *M. musculus*, *G. gallus* y *X. tropicalis* por ser organismos modelo bien establecidos. Adicionalmente se incluyeron: *A. carolinensis*, como representante de reptiles; *C. intestinalis* y *B. floridae* por considerarse organismos más primitivos en el filum de los cordados. Los alineamientos múltiple de las secuencias globales y los cladogramas generados de los genes Cyba, p47, p67, Noxa1, Noxo1a y Noxo1b se encuentran anexos en el apéndice A (Fig. 22 – 34).

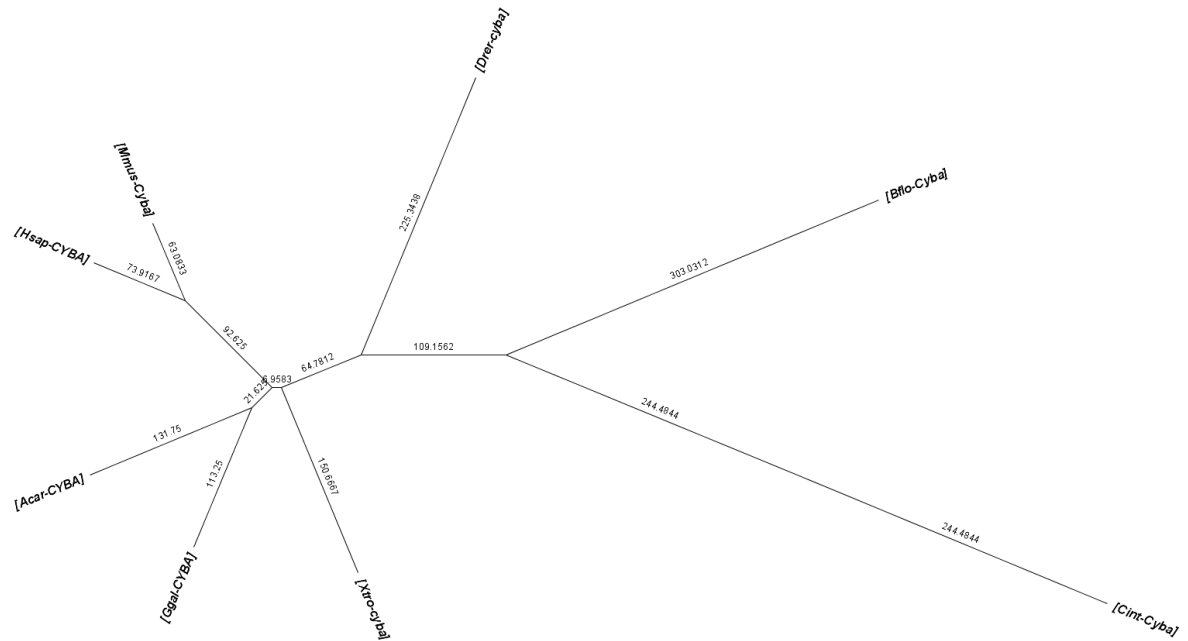


Figura 12. Cladograma de Cyba. Cladograma generado con el método de clustering “*neighbor joining*”, las ramas indican la cantidad de cambios entre las secuencias de las proteínas Cyba de los organismos *H. sapiens* (*Hsap*), *M. musculus* (*Mmus*), *D. rerio* (*Drer*), *B. floridae* (*Bflo*), *C. intestinalis* (*Cint*), *X. tropicalis* (*Xtro*), *G. gallus* (*Ggal*) y *A. carolinensis* (*Acar*).

Patrón de expresión temporal de las subunidades accesorias de los complejos Nox mediante PCR

Las PCR de punto final para todos los genes se realizaron al menos por duplicado. El RNA que se usó en cada experimento se extrajo de grupos distintos de embriones con el fin de verificar que los resultados fuesen reproducibles tanto en la presencia de las bandas como en la intensidad de estas. Se analizaron los patrones de expresión de los genes de las subunidades organizadoras: *cyba* (p22) (555 bp), *p47* (ncf1) (644 bp), *noxo1a* (654 bp) y *noxo1b* (566 bp); y de las subunidades activadoras: *p67* (ncf2) (602 bp) y *nox1a* (662 bp) (Fig. 13). La amplificación del gen de actina se usó como control positivo en todos los experimentos. Las etapas elegidas para las PCR fueron: 8-16 células, esfera, escudo, 75% epibolia, primordio y 24 hpf. Eso con el fin de abarcar distintos momentos del desarrollo temprano: etapas de herencia materna (8-16 células),

previo a la epibolia (esfera), durante la epibolia y gastrulación (escudo y 75%), al final de la epibolia y gastrulación (primordio) y etapas de desarrollo avanzado (24 h). Todos los genes amplificados en las reacciones de PCR fueron clonados en la etapa de 24 hpf y secuenciados confirmando la identidad de los productos. El mRNA de *cyba* se pudo detectar en todas las etapas analizadas. En el patrón de expresión del gen *cyba* aparecen dos bandas menores a 555 bp en las etapas de escudo, 75% epibolia y primordio cuya secuencia no fue posible clonar debido a que se dificultó aislar las bandas a partir del gel. El mRNA de *p47* se detectó en casi todas las etapas a excepción a la etapa de 24 hpf. *noxo1a* se detectó en todas las etapas, pero la intensidad de la banda aumentó hacia las últimas etapas. La intensidad variante de las bandas se repitió de la misma manera en ambos experimentos con distintos juegos de RNA. En el caso de *noxo1b* ocurrió lo contrario, la intensidad de la banda fue mayor en las primeras etapas y luego disminuyó la señal. *p67 (ncf2)* se detectó hasta las 24 hpf. El mRNA de *noxa1* se detectó en todas las etapas analizadas, en las etapas escudo, 75% epibolia y primordio aparecieron bandas adicionales de alrededor de 600 bp que debido a complicaciones metodológicas no fue posible clonar. La intensidad variante de las bandas podría estar relacionado con la cantidad de mRNA que existe de los genes en las etapas estudiadas. Para confirmar esta observación sería necesaria realizar una PCR cuantitativa.

En resumen, los resultados de los patrones de expresión de las subunidades de los complejos Nox indican que durante el desarrollo temprano del pez cebra (8-16 células hasta 24 hpf) se expresan todas las subunidades organizadoras (*cyba*, *p47*, *noxo1a* y *noxo1b*) y también se expresa una de las subunidades activadoras (*noxa1*) que corresponde al componente catalítico Nox1.

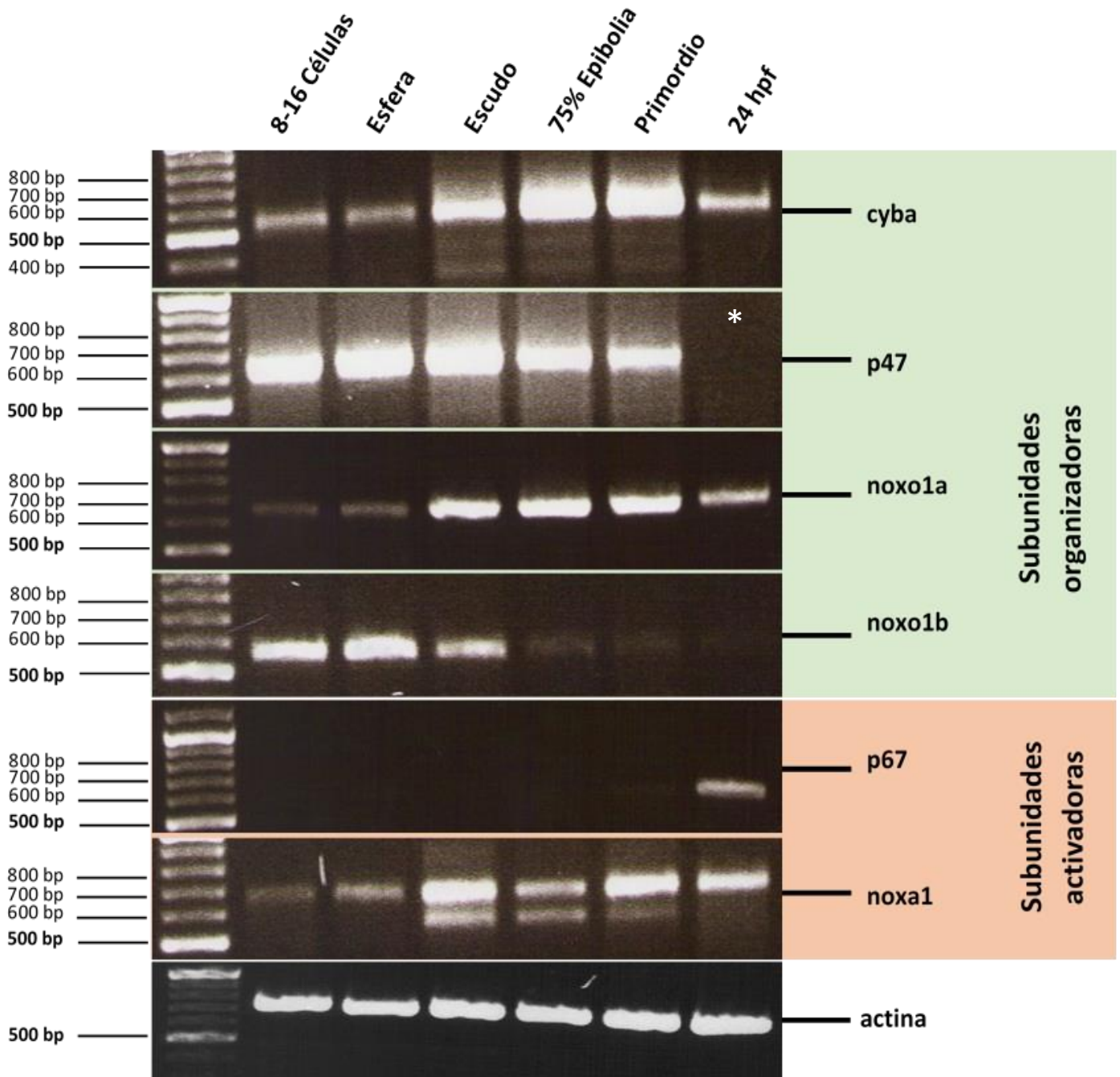


Figura 13. Patrón de expresión de las subunidades de los complejos Nox. El mRNA de embriones en las etapas de 8-16 células, esfera, escudo, 75% epibolia, primordio y 24 hpf fue extraído para realizar PCR de punto final de los genes *cyba*, *p47*, *noxo1a*, *noxo1b*, *p67* y *noxa1*. las subunidades organizadoras (*cyba*, *p47*, *noxo1a* y *noxo1b*) se encuentran presente desde las 8-16 células hasta las 24 hpf. La subunidad activadora *noxa1* se expresa desde las 8-16 células hasta las 24 hpf. El mRNA de la subunidad activadora *p67* se expresa a las 24 hpf. Se usó actina como control positivo.

*A las 24 hpf *p47* aparece como una banda tenue. La banda no se percibe en la imagen, sin embargo, se clonó el gen a partir de cDNA de esa etapa.

Patrón de expresión espacial de las subunidades accesorias de los complejos Nox mediante hibridación in situ (ISH)

Para conocer la ubicación de los mRNA se realizaron ensayos de ISH. Nos interesaba conocer en qué región del embrión se expresaba el mRNA correspondiente a cada una de las subunidades accesorias de los complejos Nox, así que se clonaron los productos de PCR de las subunidades accesorias a las 24 hpf, pero por cuestión de tiempo solo fue posible realizar las ISH de *cyba*, *p47* y *noxo1a*. Para cada gen se generó una sonda anti-sentido que sirvió para detectar el mRNA, como control negativo se sintetizó una sonda sentido que no hibrida con el gen. Para reducir el volumen de muestras y aun estudiar la epibolia y gastrulación, se eligieron tres etapas del desarrollo temprano, momentos antes (esfera), durante (escudo) y al final (primordio) de la epibolia y gastrulación. En cada experimento se tomaron diez embriones para marcar con la sonda anti-sentido y otro grupo de diez para incubar con la sonda sentido. Adicionalmente, como control positivo se tomaron diez embriones para marcar con una sonda anti-sentido para el gen *no tail* (*ntl*) cuyo patrón está reportado. La expresión de *ntl* durante las etapas tempranas ocurre en el margen del blastodermo y en el sitio donde surgirá la notocorda (el mesodermo axial) (Schulte-Merker, et al., 1994). El patrón obtenido en los embriones marcados con la sonda anti-sentido del gen *ntl* (Fig. 14) coincidió con el patrón reportado en la literatura indicando que la metodología fue realizada de manera adecuada.

Se realizaron dos experimentos con la sonda de *cyba*. Los embriones marcados con la sonda anti-sentido mostraron señal ubicua sobre el blastodermo (Fig. 15). Los embriones de etapa de esfera mostraron señal ubicua de baja intensidad sobre el blastodermo. Los embriones en etapa de escudo mostraron señal ubicua de intensidad media a alta sobre el blastodermo. En uno de los experimentos, la mitad de los embriones de etapa de escudo y primordio mostraron enriquecimientos de la señal en forma de puntos o círculos sobre el blastodermo. La localización del enriquecimiento es heterogéneo entre los embriones, es decir que el patrón de círculos se aprecia distinto entre los embriones del mismo experimento. Para verificar si la señal corresponde a regiones subcelulares es necesario realizar ISH sobre cortes del embrión. Los embriones control negativo de *cyba*

en etapa de esfera y escudo (Fig. 15, sentido, esfera y escudo) no mostraron señal. En etapa de primordio (Fig. 15, sentido, primordio) muestran una ligera señal.

Se realizó un experimento con la sonda de *p47*. Los embriones marcados con la sonda anti-sentido en etapa de esfera, escudo y primordio mostraron fuerte señal ubicua sobre el blastodermo. Los embriones control marcados con la sonda sentido en etapa de esfera, escudo y primordio mostraron señal ubicua (Fig. 16). La señal en embriones control puede ser debido a excesivo tiempo de revelado o hibridación inespecífica. Reducir el tiempo de revelado o generar sondas a partir de una región distinta del mRNA de *p47* podría resolver este problema.

Se realizó un experimento con la sonda *nox1*. Los embriones marcados con la sonda anti-sentido (Fig. 17) en etapa de esfera, escudo y primordio mostraron señal de intensidad media a alta, distribuida de manera ubicua en el blastodermo. Los embriones control marcados con la sonda sentido no mostraron señal en etapa de esfera, escudo y primordio.

En general todos los experimentos muestran señal de manera ubicua sobre el blastodermo, lo cual indica la presencia del transcrito de los genes *cyba*, *p47* y *nox1a*. Los resultados de las hibridaciones *in situ* se consideran preliminares, por cuestión de tiempo no fue posible realizar al menos tres experimentos de cada gen. Para evaluar la reproducibilidad experimental también es necesario generar sondas para los mismos genes con secuencias distintas a las utilizadas en estos experimentos.

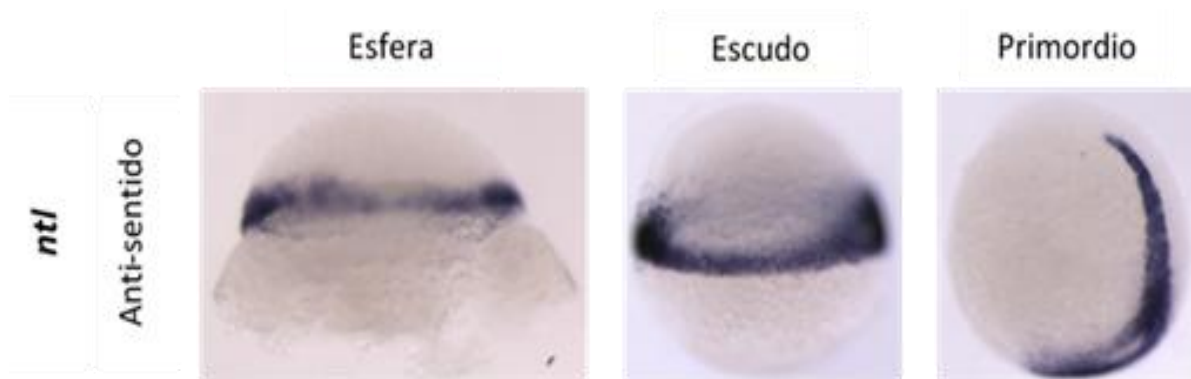


Figura 14. Gen *no tail (ntl)* como control positivo. Marcaje mediante hibridaciones *in situ* de embriones completos de pez cebra para detectar RNA de *ntl*. Embriones de pez cebra en etapa de esfera, escudo y primordio. La expresión de este gen ocurre en el margen del blastodermo y en sitios donde surgirá la notocorda (mesodermo axial). El vitelo de los embriones en etapa de esfera se desprendió parcialmente durante el experimento. Vista lateral de embriones orientados con el polo animal hacia arriba y con el dorso hacia la derecha.

..

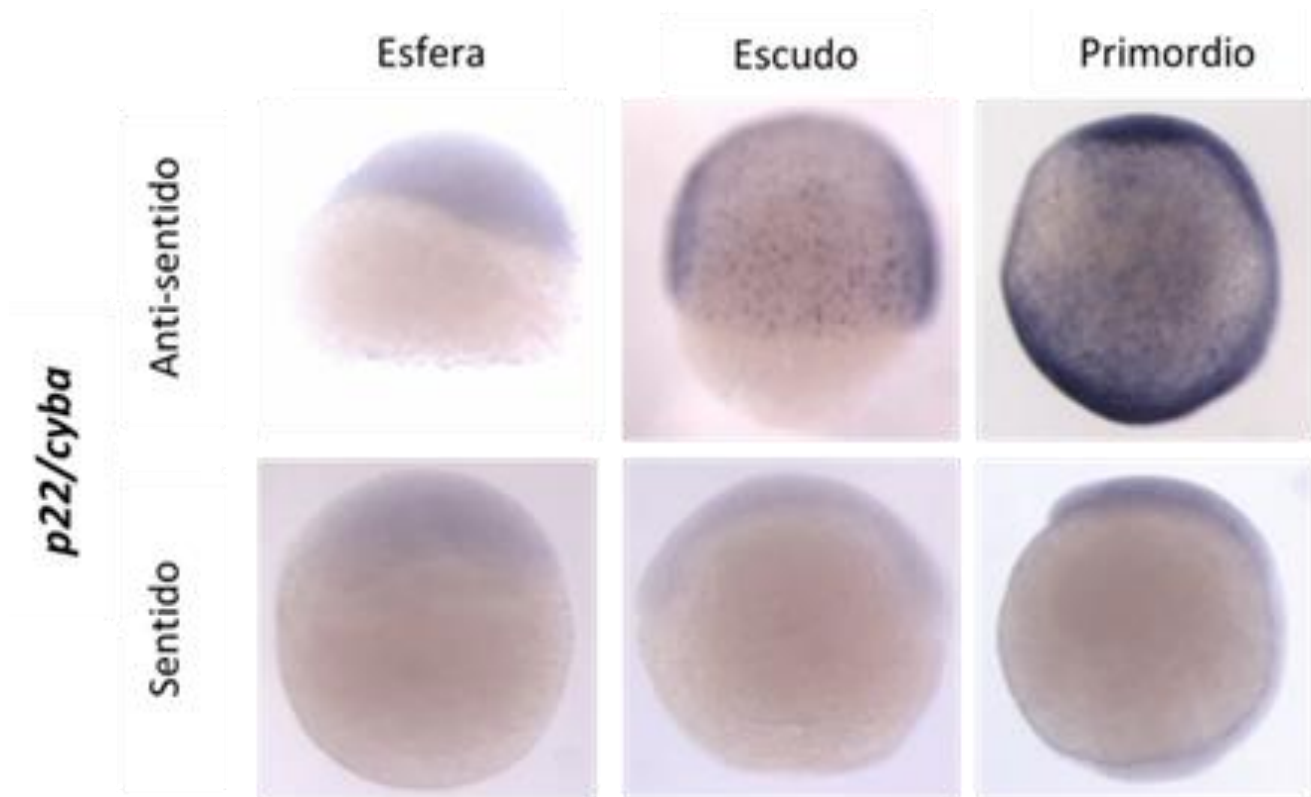


Figura 15. Marcaje mediante hibridación *in situ* de embriones completos de pez cebra para detectar RNA de *cyba*. Embriones en etapa de esfera, escudo y primordio. Se aprecia señal de manera ubicua en el blastodermo de todas las etapas (anti-sentido). En etapa de escudo y primordio (anti-sentido) existe enriquecimiento de la señal en forma de círculos o puntos en el blastodermo. Los embriones marcados con la sonda de control negativo (sentido) muestran ligera señal (primordio) o no muestran señal (esfera, escudo). El vitelo de los embriones anti-sentido en etapa de esfera se desprendió parcialmente durante el experimento. Vista lateral de embriones orientados con el polo animal hacia arriba y con el dorso hacia la derecha.

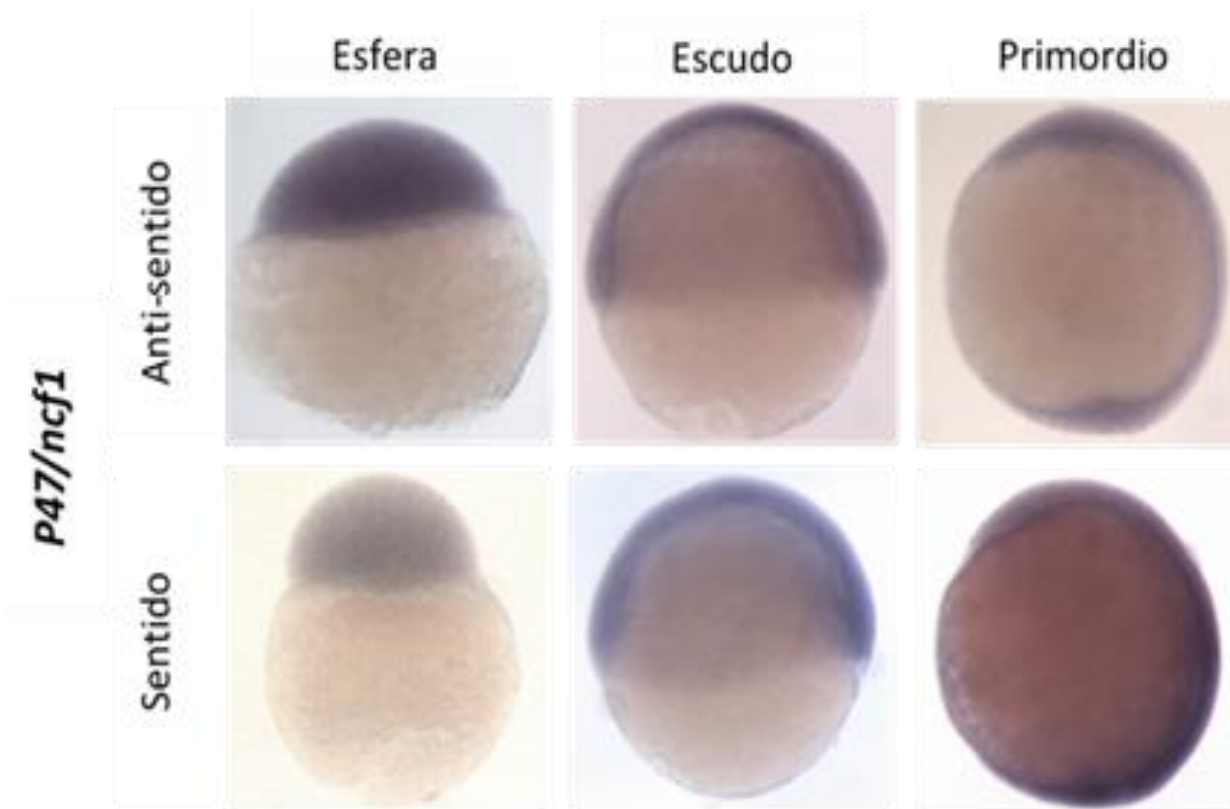


Figura 16. Marcaje mediante hibridación *in situ* de embriones completos de pez cebra para detectar RNA de p47. Embriones en etapa de esfera, escudo y primordio. Se aprecia señal de manera ubicua en el blastodermo en embriones de todas las etapas marcados con sonda anti-sentido y también en embriones marcados con la sonda de control negativo (sentido). Vista lateral de embriones orientados con el polo animal hacia arriba y con el dorso hacia la derecha.

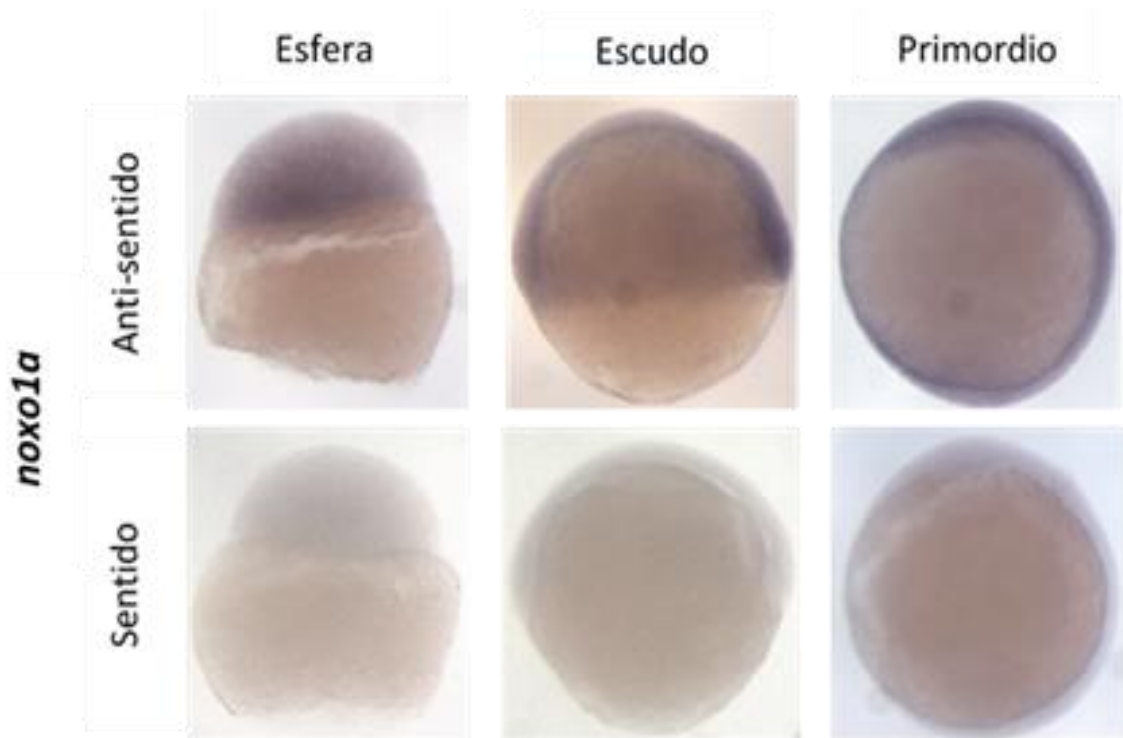


Figura 17. Marcaje mediante hibridación *in situ* de embriones completos de pez cebra para detectar RNA de *noxo1a*. Marcaje mediante hibridación *in situ* de embriones completos de pez cebra para detectar RNA de *noxo1a*. Embriones en etapa de esfera, escudo y primordio. Se aprecia señal de manera ubicua en el blastodermo (anti-sentido) en todas las etapas. Los embriones marcados con la sonda de control negativo no muestran señal en ninguna etapa. El vitelo de los embriones marcados con la sonda anti-sentido y sentido en etapa de esfera se desprendió parcialmente durante el experimento. Vista lateral de embriones orientados con el polo animal hacia arriba y con el dorso hacia la derecha.

Patrón de expresión de la proteína Cyba

Al proyecto se le agregaron experimentos del patrón de expresión de la proteína Cyba mediante inmunofluorescencia ya que el laboratorio disponía de un anticuerpo anti-Cyba. La motivación principal para conocer la ubicación de Cyba, es que la localización de una proteína puede estar relacionada con su actividad. En el futuro se desean hacer experimentos similares para conocer el patrón de expresión de las subunidades p47, p67, Noxa1, Noxo1a y Noxo1b.

Se realizó un experimento donde se fijaron veinte embriones por cada etapa del desarrollo, diez embriones de cada etapa se usaron como control negativo (embriones sin anticuerpo primario, apéndice A, Fig. 35). Las etapas elegidas abarcaron las

primeras horas post fertilización, incluyendo las primeras células, la epibolia, la gastrulación y el desarrollo tardío. Los embriones que se muestran en los resultados (Fig. 18a, 18b y Fig. 19) se encuentran dentro de los mismos periodos del desarrollo que las etapas elegidas en el experimento de patrón de expresión de PCR, sin embargo, se muestran algunas etapas distintas a las de las PCR porque las diferencias de señal se aprecian con facilidad en esas imágenes (Fig. 18a, 18b y Fig. 19). Se realizó una triple inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-Cyba, tinción para núcleos con DAPI y tinción para detectar los filamentos de actina con faloidina. La triple tinción nos permite observar con mayor claridad la ubicación celular de Cyba en las diferentes etapas del desarrollo de los embriones. Se muestra únicamente la sobreposición de los canales de actina y Cyba para apreciar con mayor facilidad la ubicación de la señal en los embriones (Fig. 18a y 18b). En el caso de la fig. 19 se muestra la sobreposición de los canales de Cyba/núcleos y Cyba/actina para localizar el enriquecimiento de Cyba que se observa en núcleos.

En los embriones de 4 células los filamentos de actina se encuentran principalmente en los surcos de división. En la misma etapa la señal de Cyba se encuentra distribuida en todas las células de manera homogénea, en los surcos de división no se aprecia señal de Cyba. En etapas menores a 1000 células (4 células – 128 - 256 células, Fig. 18a) se observa que la señal está distribuida de manera homogénea en las células del polo animal. Alrededor de las 1000 células los embriones (Fig. 19) muestran un enriquecimiento de la señal de Cyba en las células más superficiales del polo animal, que corresponden a la capa envolvente (Fig. 19, EVL Cyba). La señal de Cyba en los núcleos de la capa envolvente se disminuye en las células que se encuentran en mitosis (Fig. 19, EVL núcleos). Estudios de colocalización son necesarios para determinar si la señal de la proteína se encuentra enriquecida en los núcleos de las células de la capa envolvente. A simple vista se considera que el enriquecimiento de Cyba es nuclear ya que la señal de la proteína presenta tamaño y forma similar a la señal de DAPI (Fig. 19, EVL núcleos). En la misma etapa, las células en los cortes ópticos más profundos, que corresponden a la capa de células profundas (Fig. 19, DCL), muestran una distribución homogénea de la señal de Cyba.

El enriquecimiento de la señal de Cyba en la capa de células envolventes (EVL) se mantiene durante la epibolia y gastrulación (Fig. 18, 75% epibolia). La señal se vuelve a homogenizar en el embrión hacia el final de la gastrulación y el desarrollo avanzado (Fig. 18, Primordio y 24 hpf).

En la etapa de 75% las células del blastodermo envuelven la mayor parte del vitelo (Fig. 18b 75% epibolia). En esa etapa la actina que se observa en el vitelo corresponde a la banda marginal de actina y a la actina cortical del vitelo, redes que están involucradas en progresión de la epibolia (Bruce, 2016).

Durante la gastrulación el blastodermo envuelve al vitelo mediante la epibolia y las células se reorganizan hacia el futuro dorso del embrión (movimiento llamado extensión convergente), por ello en la etapa de primordio el vitelo no se aprecia, y además, se genera una zona donde disminuye la densidad de las células de la capa profunda (conocida como zona de evacuación) (Fig. 18b, primordio, núcleos). En la misma etapa la señal de Cyba en el vitelo se enriquece a manera de gránulos distribuidos de manera heterogénea, es probable que sean artefactos. Lo mismo ocurre en el vitelo de los embriones de 24 hpf.

A las 24 hpf la señal de Cyba es ubicua, sin embargo, se enriquece la señal a manera de gránulos en algunas estructuras del sistema nervioso. Para verificar la ubicación de la señal es necesario realizar inmunotinciones en cortes histológicos.

Estos resultados son observaciones preliminares ya que el anticuerpo primario (anti-Cyba) no ha sido validado.

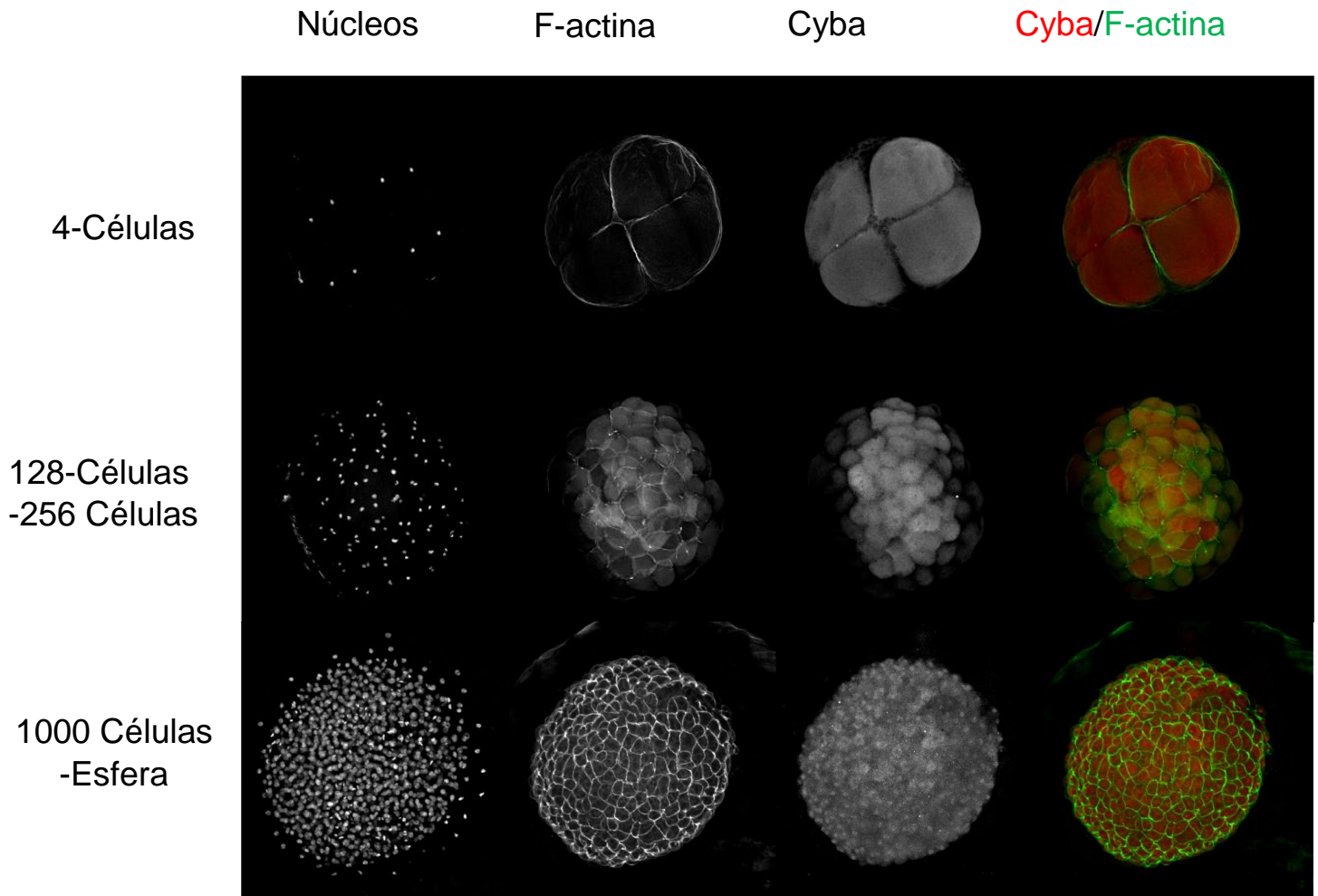


Figura 18a. Localización de Cyba durante el desarrollo temprano del de pez cebra. Embriones teñidos para visualizar núcleos, filamentos de actina y Cyba en etapa de: 4 células, 128 – 256 células, 1000 células - esfera. La sobreposición del canal de actina y Cyba permite observar la localización intracelular de la señal. La señal se encuentra distribuida de manera homogénea en el polo animal (4-células, 128-células). Previo a la epibolia (1000 células - esfera) se observan puntos de enriquecimiento de la señal de Cyba en los núcleos. Embriones de 4 células, 128 células y esfera se muestran con el polo animal hacia el frente. Embriones de 75% epibolia y primordio se muestran con el polo animal hacia arriba y el dorso a la derecha. Los embriones de 24 hpf se muestran incompletos con la cabeza hacia arriba con el dorso a la izquierda. Como control negativo (no mostrado) se usaron embriones sin anticuerpo primario anti-Cyba. Las condiciones de adquisición de imagen se modificaron en los embriones de 24 hpf en el canal de f-actina para permitir la observación de las estructuras de actina.

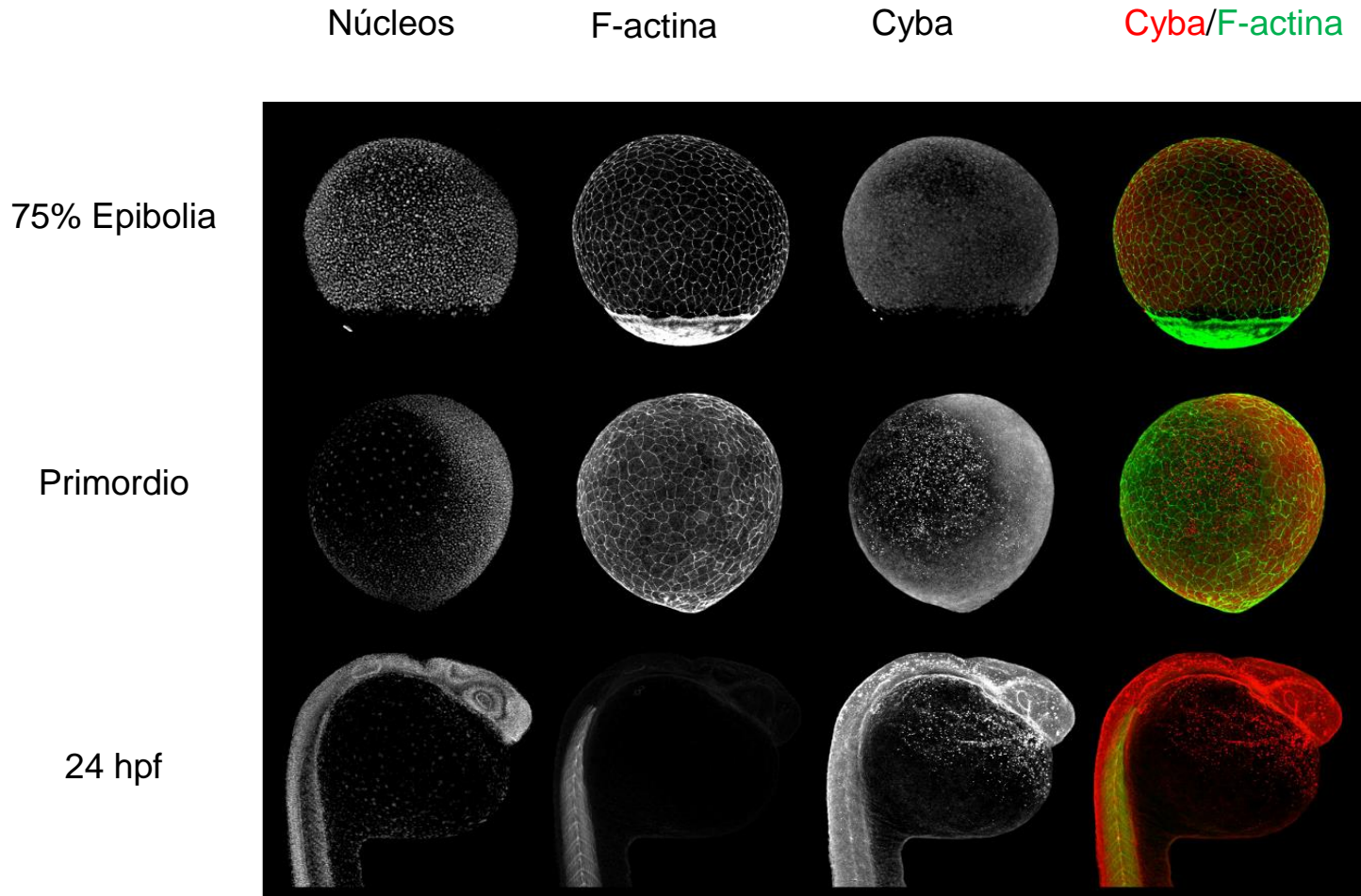
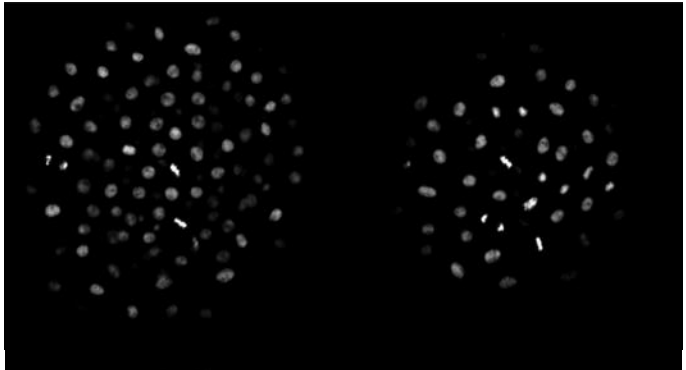


Figura 18b. Localización de Cyba durante el desarrollo temprano del de pez cebra. Embriones teñidos para visualizar núcleos, filamentos de actina y Cyba en etapa de: 75% de epibolia, primordio, 24h de desarrollo. La sobreposición del canal de actina y Cyba permite observar la localización intracelular de la señal. Durante la epibolia (75% epibolia) la señal de Cyba continúa enriquecida en algunos de los núcleos y se homogeniza hacia el final de la gastrulación (primordio) y el desarrollo tardío (24 hpf). Embriones de 75% epibolia y primordio se muestran con el polo animal hacia arriba y el dorso a la derecha. Los embriones de 24 hpf se muestran incompletos con la cabeza hacia arriba con el dorso a la izquierda. Se redujo la sensibilidad del fotomultiplicador en los embriones de 24 hpf en el canal de actina para evitar la saturación de la imagen con la señal que proviene de los precursores musculares.

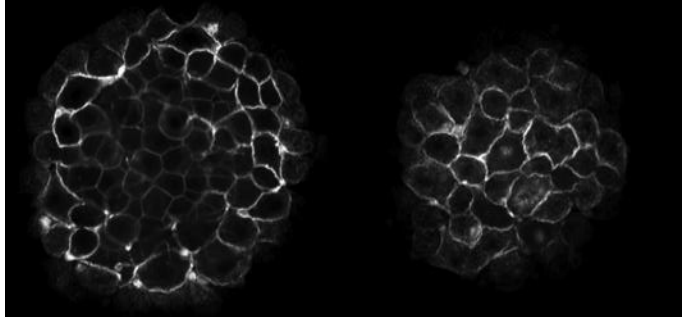
DCL

EVL

Núcleos

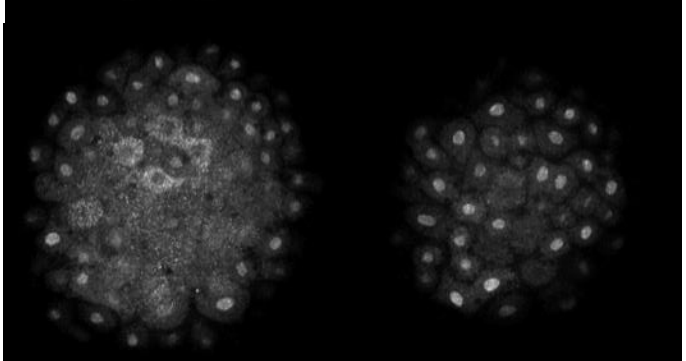


F-actina

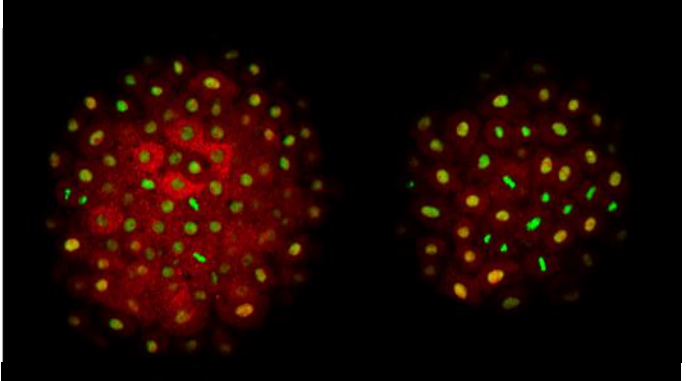


1000
Células -
Esfera

Cyba



Cyba/Núcleos



Cyba/F-actina

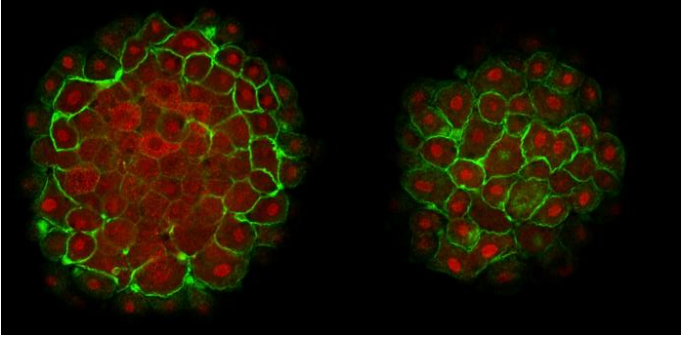


Figura 19. Inmunotinción de Cyba en etapa de 1000 células - esfera. Embriones teñidos para visualizar núcleos, filamentos de actina y Cyba en 1000 células - esfera. La sobreposición del canal de núcleos, actina y Cyba permite observar la localización intracelular de la señal. Se muestra en la columna izquierda las células de la DCL, las células más profundas del embrión, donde la señal está distribuida de manera homogénea entre las células. En la columna derecha se muestra un corte óptico superficial (EVL) donde se observan las células de la capa envolvente. Ahí la señal se encuentra enriquecida en los núcleos. La señal de Cyba nuclear disminuye en las células que se encuentran en mitosis. Los embriones se encuentran orientados con el polo animal orientado hacia el frente.

DISCUSIÓN

De manera breve, la hipótesis de trabajo era que las subunidades accesorias de los complejos Nox se expresan durante el desarrollo temprano del pez cebra. La evidencia obtenida en este trabajo muestra que la mayoría de las subunidades accesorias de los complejos Nox se expresan durante el desarrollo temprano.

Este trabajo extiende los resultados del proyecto (no publicado) sobre el patrón de expresión de los componentes catalíticos de los complejos Nox. Otros grupos de trabajo previamente han reportado el patrón de expresión de las Nox en el pez cebra (Weaver, et al., 2016), sin embargo, reportan los patrones a partir de las 12 hpf y no incluyen el patrón de las subunidades accesorias de los complejos. En la tabla 3 y la fig. 20 se muestra el resumen de los resultados de los patrones de expresión mediante PCR de los componentes catalíticos y las subunidades accesorias de los complejos Nox. En la tabla 3 se da detalle de la dinámica de la expresión temporal de los componentes de los complejos. Mientras que en la fig. 20 se muestra el resumen de los complejos ensamblados por completo. Aun es necesario realizar el análisis de todos los componentes catalíticos en la etapa de 8-16 y el análisis de Nox4 en todas las etapas. Sin embargo, es evidente que el complejo Nox1 y Duox1 se encuentran presentes desde etapas de herencia materna (8-16 células), hasta el desarrollo tardío.

Previo a realizar los experimentos de este proyecto se esperaba que los patrones de expresión de todas las subunidades accesorias coincidiesen exactamente con los patrones de los componentes catalíticos. Sin embargo, no fue el caso para todos los complejos Nox. En el caso del componente catalítico Nox2 su mRNA comienza a ser expresado desde la etapa de escudo, mientras que su subunidad activadora p67, se expresa hacia el final de la gastrulación en la etapa de primordio. Aun en la ausencia de su activador canónico, se ha demostrado en un sistema reconstituido libre de células que Nox2 tiene actividad moderada con la subunidad activadora Noxa1 (Kawano, et al., 2012). Además, es posible que la activación de Nox2 por Noxa1 ocurra en condiciones fisiológicas ya que se ha observado en células vasculares de músculo liso de ratón que Nox2 es coexpresada con Noxa1, y además, que la atenuación de la expresión de la

proteína Noxa1 disminuye la producción de ERO en esas células (Ambasta, et al., 2006).

Es posible que las dos bandas menores a 555 bp observadas en las PCR de *cyba* en las etapas de escudo, 75% epibolia y primordio correspondan a transcritos de mRNA alternativos ya que los oligos se posicionan en el exón 1 y 6; y la resta de uno o dos de los exones intermedios daría como resultado a secuencias con una longitud similar a la que se observa en las PCR de *cyba*. Lo mismo es posible para la banda de alrededor de 600 bp que aparece en los PCR de *nox1* en las etapas de escudo, 75% epibolia y primordio, donde el sitio de hibridación del oligo *forward* de *nox1* está sobre el exón 2 y el oligo *reverse* se encuentra en el exón 6, los exones intermedios 3, 4 y 5 tienen una longitud entre 83, 109 y 135 bp. La resta de alguno de los exones intermedios resultaría en una secuencia con longitud similar a la que se observa en las PCR de *nox1*. Es necesario clonar y secuenciar las bandas para confirmar si son formas alternativas de maduración de los mRNA. La demanda de formas alternativas de *cyba* o *nox1* en esas etapas, que coinciden con las etapas de gastrulación, puede ser relevante para cumplir funciones importantes en distintos compartimentos celulares, como es el caso de la subunidad organizadora *nox1* cuyas formas alternativas de maduración de los mRNA muestran preferencia por distintos compartimentos celulares en líneas celulares HEK293 y COS-7 (Ueyama, et al., 2007). En otros organismos se ha visto que durante el desarrollo embrionario aumenta la transcripción de formas alternativas de la maduración de los mRNAs de genes relacionados con procesos del desarrollo (Revil, et al., 2010).

En cuanto a los genes duplicados de la subunidad organizadora, *nox1a* y *nox1b*, es posible que cumplan la misma función. Por lo tanto, los cambios en la intensidad de las bandas en los patrones de expresión podrían significar que la mayor expresión de *nox1a* compensa por la baja expresión de *nox1b*. Otra posibilidad es que el recambio entre *nox1b* por *nox1a* sea debido a que cumplen funciones especializadas en distintos compartimentos celulares, o incluso podrían cumplir una función en regular la cantidad de ERO producidas por los complejos Nox. De manera alternativa, estas proteínas podrían estar teniendo funciones no relacionadas con los complejos Nox que aún se desconocen. Se sabe que la duplicación de genes sirve para crear nuevo

material genético que ayuda a regular la cantidad de un producto, a subespecializar funciones de una proteína o incluso es posible que función de la secuencia duplicada se aleje de la función de la secuencia original (Zhang, 2003). Para verificar cual es el motivo del cambio en la expresión de *noxo1b* y *noxo1a* en el futuro serán necesarios estudios de colocalización y función en complejo con Nox1.

Previo a realizar las ISH se consideró conveniente iniciar con genes para los cuales ya se hubiesen realizado patrones de expresión. Existe en la base de datos ZFIN un antecedente no publicado (Thisse & Thisse, 2004) (Thisse, et al., 2001) sobre el patrón de expresión de los genes *cyba*, *p47* y *noxo1a* en embrión completo de pez cebra de la cepa AB/TU. En el caso de los genes *p67*, *noxo1b* y *noxo1a* no existen ISH o los embriones no muestran señal.

Los resultados obtenidos aquí sobre el patrón de expresión de *cyba* mediante ISH coinciden con los presentados por (Thisse & Thisse, 2004), el cual es un patrón sin restricción espacial en todas las etapas analizadas. No es posible hacer una comparación directa con la señal de *p47* de este proyecto y la presentada en ZFIN ya que los embriones presentados ahí son de etapas más avanzadas, 14-19 somitas (16 hpf), donde la señal parece restringida a los macrófagos. Mientras que el presunto patrón de *noxo1a* presentado en ZFIN no coincide con lo obtenido en este proyecto, ahí la señal en los embriones en etapas de epibolia y primordio aparece como anillos.

En los experimentos de inmunofluorescencia (Fig. 18a, 18b y 19) se observa señal del anticuerpo en todas las etapas del desarrollo estudiadas, desde los primeros minutos de fertilización hasta las 24 hpf, la señal de *Cyba* es ubicua. Existen reportes de experimentos de inmunofluorescencia donde se observa señal de *Cyba* con localización nuclear (Weyemi, et al., 2012), eso sugiere que la señal enriquecida que fue observada en experimentos de este proyecto en las etapas de 1000 células – esfera y hasta el final de la epibolia es verdadera. Sin embargo, aún es necesario realizar la validación del anticuerpo. Además, se ha reportado que una de las isoformas de la subunidad Nox1 tiene localización nuclear (Ueyama, et al., 2007). De manera similar, se sabe de algunos componentes catalíticos de los complejos Nox que han sido reportados cerca del núcleo (Gordillo, et al., 2010). Creemos que la señal enriquecida de *Cyba* en la EVL durante la etapa de 1000 células – esfera está relacionada con la transición de la

blástula media, cuando el embrión inicia la transcripción de su genoma, genera recursos para los procesos que ocurren en los siguientes periodos del desarrollo, entre ellos la epibolia y la gastrulación.

En general, con los estudios realizados en este proyecto se puede concluir que durante el desarrollo temprano del pez cebra se expresa la mayoría de las subunidades de los complejos Nox. Los resultados de este trabajo junto con los antecedentes de nuestro laboratorio (experimentos realizados por Mendez-Cruz y Mendieta-Serrano) implican que **previo a la gastrulación** se expresan los componentes suficientes para formar el complejo Nox1 y el complejo Duox1. También implican que **durante la gastrulación** se expresan los componentes para formar el complejo Nox2 y Nox5. En teoría, la expresión de los genes de varios integrantes de la familia NADPH oxidasa, desde etapas de herencia materna hasta etapas adultas, sugiere que tienen una función relevante en el organismo. La expresión de los genes indica que es posible que ocurra la traducción a proteína. A largo plazo se desea conocer si efectivamente están presentes las proteínas de los componentes de los complejos. En su caso, conocer si se están formando los complejos de las Nox, cuales son, en donde se ubican y conocer si son funcionales durante los movimientos morfogénicos de la gastrulación y posteriormente investigar qué papel tienen las ERO durante el desarrollo.

Entre los pasos específicos a seguir en esta línea de investigación se encuentran: validar el anticuerpo anti-Cyba mediante western blot o embriones KO. Realizar ISH para conocer el patrón de expresión del mRNA de *p67*, *noxo1b* y *noxa1*. Realizar inmunofluorescencias para conocer la expresión de las proteínas de p47, p67, Noxa1, Noxo1b y Noxa1.

Tabla 3. Resumen de los patrones de expresión de los componentes de los complejos Nox en el pez cebra durante el desarrollo temprano.

Familia NADPH oxidasa del pez cebra	Componentes de los complejos	Etapas del desarrollo embrionario					
		8-16 células	Esfera	Escudo	75% epibolia	Primordio	24 hpf

NADPH oxidasa 1	Componente catalítico	Nox1	AP	+	+	+	+	+
	Subunidades organizadoras	Cyba	+	+	+	+	+	+
		Noxo1a	+	+	+	+	+	+
		Noxo1b	+	+	+	+	+	+
Subunidad activadora	Noxa1	+	+	+	+	+	+	
NADPH oxidasa 2	Componente catalítico	Nox2	AP	-	+	+	+	+
	Subunidades organizadoras	Cyba	+	+	+	+	+	+
		p47	+	+	+	+	+	+
Subunidad activadora	p67	-	-	-	-	+	+	
NADPH oxidasa 4	Componente catalítico	Nox4	AP	AP	AP	AP	AP	AP
	Subunidad organizadora	Cyba	+	+	+	+	+	+
NADPH oxidasa 5	Componente catalítico	Nox5	AP	-	+	+	+	+
Oxidasa dual 1	Componente catalítico	Duox1	AP	+	+	+	+	+

La tabla fue realizada tomando en cuenta los antecedentes no publicados de Mendieta-Serrano y Mendez-Cruz del patrón de expresión de los componentes catalíticos. Análisis pendiente (AP), gen amplificado mediante PCR de punto final (+), gen no detectado mediante amplificación con PCR de punto final (-).

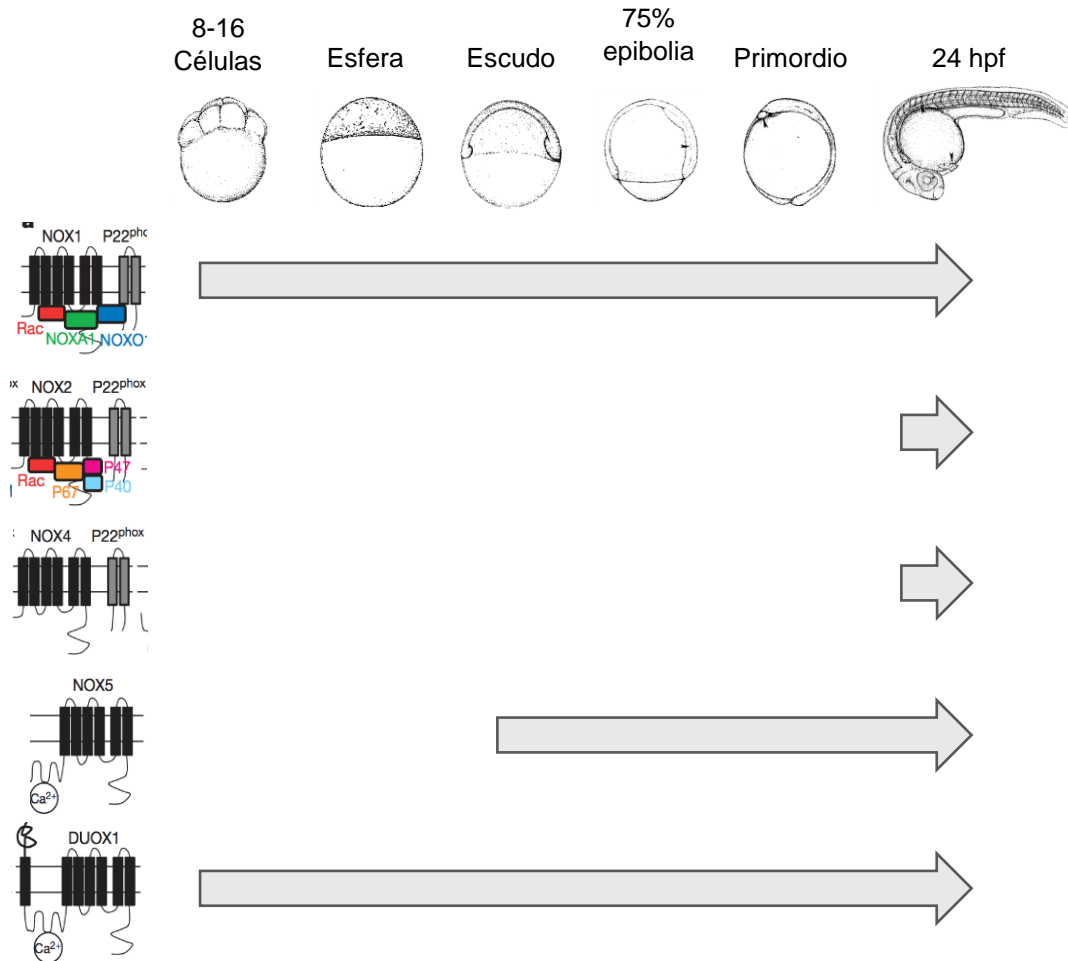


Figura 20. Resumen de los complejos Nox expresados durante el desarrollo embrionario. Duox1 y el componente catalítico Nox1 y sus subunidades se expresan desde las 8-16 hasta las 24 hpf. El complejo Nox2 se completa con sus subunidades canónicas a las 24 hpf. Se desconoce el patrón de expresión completo de Nox4. Nox5 comienza a ser expresado durante la gastrulación (Escudo). La figura toma en cuenta los antecedentes no publicados de Mendieta-Serrano y Mendez-Cruz del patrón de expresión de los componentes catalíticos.

CONCLUSIONES

- Las subunidades accesorias de los complejos Nox (*cyba*, *p47*, *p67*, *noxo1a*, *noxo1b* y *noxa1*) se expresan durante el desarrollo temprano del pez cebra (8-16 células hasta las 24 hpf).
- Considerando los antecedentes inmediatos (Fig. 8), los complejos Nox1 y Duox1 podrían estar participando en la producción de ERO desde etapas de herencia materna y es posible que Nox2 y Nox5 contribuyan para aumentar el ambiente oxidativo a partir de la gastrulación (etapa escudo) (Fig. 20).

Bibliografía

Abdollahi, M. y otros, 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, 10(6), pp. RA141-147.

Howe, K. y otros, 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, Volumen 496, pp. 498-503.

Aguirre, J. & Lamberth, D., 2010. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free radical biology & medicine*, 49(9), pp. 1342-1353.

Aken, B. L. y otros, 2016. *The Ensembl gene annotation system*. [En línea]
Available at: <https://www.ensembl.org/index.html>
[Último acceso: 2017].

Al-Mehdi, A.-B. y otros, 2012. Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription. *Science Signaling*, 5(231).

Ambasta, R. K. y otros, 2004. Direct Interaction of the Novel Nox Proteins with p22phox Is Required for the Formation of a Functionally Active NADPH Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), pp. 45935-45941.

Ambasta, R. K. y otros, 2006. Noxa1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(2), pp. 193-201.

Bedard, K. & Krauze, K.-H., 2007. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological reviews*, pp. 87: 245-313.

Bedell, V. M., Westcot, S. E. & Ekker, S. C., 2011. Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. *Briefings in Functional Genomics*, 10(4), pp. 181-188.

Birben, E. y otros, 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), pp. 9-19.

Brandes, R. P., Weissmann, N. & Schröder, K., 2014. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 208-226.

Brigelius-Flohé, R. & Flohé, L., 2011. Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(8), pp. 2335-2381.

Brigelius-Flohé, R. & Flohé, L., 2011. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors.. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(8), pp. 2335-2381.

Bruce, A. E. E., 2016. Zebrafish Epiboly: Spreading Thin Over the Yolk. *Developmental Dynamics*, Volumen 245, pp. 244-258.

Cameron, R. A. y otros, 2009. *SpBase: the sea urchin genome database and web site*. [En línea]
Available at: <http://www.echinobase.org>
[Último acceso: 2017].

Clark, K. J. & Ekker, S. C., 2015. How Zebrafish Genetics Informs Human Biology. *Nature Education*, 8(4).

- Covarrubias, L. y otros, 2008. Function of Reactive Oxygen Species During Animal Development: Passive or Active?. *Developmental Biology*, 320(1), pp. 1-11.
- Dang, P. M.-C., Cross, A., Quinn, M. T. & Babior, B. M., 2002. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: A direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558 II. *PNAS*, 99(7), pp. 4262-4265.
- Denu, J. M. & Tanner, K. G., 1998. Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation. *Biochemistry*, Volumen 37, pp. 5633-5642.
- Diwanji, N. & Bergmann, A., 2018. An unexpected friend – ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation: Implications for regeneration and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volumen 80, pp. 72-82.
- Donkó, Á. y otros, 2005. Dual Oxidases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 360(1464), pp. 2301-2308.
- Dupuy, C. y otros, 1999. Purification of a Novel Flavoprotein Involved in the Thyroid NADPH Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(62), pp. 37265-37269.
- Eisen, J. S. & Smith, J. C., 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development*, Volumen 135, pp. 1735-1743.
- El Benna, J., Faust, L. R., Johnson, J. L. & Babior, B. M., 1996. Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p47phox as Determined by Two-dimensional Phosphopeptide Mapping. *Journal of Biological Chemistry*, Volumen 271, pp. 6374-6378.
- El-Benna, J. y otros, 2009. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer:. *Experimental and Molecular Medicine*, 41(4), pp. 217-225.
- Finkel, T., 2003. Oxidant Signals and Oxidative Stress. *Current Opinion in Cell Biology*, Volumen 15, pp. 247-254.
- Fogarty, C. E. y otros, 2016. Extracellular Reactive Oxygen Species Drive Apoptosis-Induced Proliferation via Drosophila Macrophages. *Current Biology*, 26(5), pp. 575-584.
- Fontayne, A., Dang, P., Gougerot-Pocidaló, M. & El-Benna, J., 2002. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*, 41(24), pp. 7743-7750.
- Fontayne, A., Dang, P. M.-C., Gougerot-Pocidaló, M. A. & El Benna, J., 2002. Phosphorylation of p47phox Sites by PKC α , β II, δ , and ζ : Effect on Binding to p22phox and on NADPH Oxidase Activation. *Biochemistry*, 41(24), pp. 7743-7750.
- Fuentes, R. & Fernández, J., 2010. Ooplasmic segregation in the zebrafish zygote and early embryo: pattern of ooplasmic movements and transport pathways. *Developmental Dynamics*, Volumen 239, pp. 2172-2189.
- García-Hernandez, D., Wood, C. D., Castro-Obregón, S. & Covarrubias, L., 2010. Reactive oxygen species: A radical role in development?. *Free Radical Biology and Medicine*, Volumen 49, pp. 130-143.

- Gauron, C. y otros, 2016. Hydrogen peroxide (H₂O₂) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Developmental Biology*, 414(2), pp. 133-141.
- Gauron, C. y otros, 2013. Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed.. *Scientific reports*, Volumen 3.
- Gauron, C. y otros, 2013. Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Scientific Reports*, Volumen 3.
- Gladyshev, V. M., 2014. The Free Radical Theory of Aging Is Dead. Long Live the Damage Theory!. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(4), pp. 727-731.
- Gopalakrishna, R. & Jaken, S., 2000. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(9), pp. 1349-1361.
- Gordillo, G., Fang, H., Park, H. & Roy, S., 2010. Nox-4-Dependent Nuclear H₂O₂ Drives DNA Oxidation Resulting in 8-OHdG as Urinary Biomarker and Hemangioendothelioma Formation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 12(8), pp. 933-943.
- Green, M. R. & Sambrook, J., 2017. Concentrating Nucleic Acids by Extraction with Butanol. En: M. R. Green & S. Joseph , edits. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. s.l.:Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Grogan, A. y otros, 1997. Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils. *Journal of Cell Science*, Volumen 110, pp. 3071-3081.
- Guo, Q. & Li, J. Y., 2007. Distinct functions of the major Fgf8 spliceform, Fgf8b, before and during mouse gastrulation. *Development*, Volumen 134, pp. 2251-2260.
- Gurdon, J. B. & Bourillot, P. -Y., 2001. Morphogen Gradient Interpretation. *Nature*, Volumen 413, pp. 797-803.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, Volumen 219, pp. 1-14.
- Heck, D., Vetrano, A. M., Mariano, T. M. & Laskin, J., 2003. UVB Light Stimulates Production of Reactive Oxygen Species. *The Journal of Biological Chemistry*, Volumen 278, pp. 22432-22436.
- Hordijk, P., 2006. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circulation Research*, 98(4), pp. 453-462.
- Hurd, T. R., DeGennaro, M. & Lehmann, R., 2012. Redox Regulation of Cell Migration and Adhesion. *Cell Press*, 22(2), pp. 107-115.
- Jensen, E., 2014. Technical review: in situ hybridization. *The Anatomical Record*, Volumen 297, pp. 1349-1353.
- Kawahara, T., Quinn, M. T. & Lamberth, D., 2007. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evolutionary Biology*, 7(109).
- Kawano, M. y otros, 2012. Noxa1 as a moderate activator of Nox2-based NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volumen 519, pp. 1-7.

- Kease, M. y otros, 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), pp. 1647-1649.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R. & Ullmann, B., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), pp. 253-310.
- Korbie, D. J. & Mattick, J. S., 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), pp. 1452-1456.
- Krumova, K. & Cosa, G., 2016. Overview of Reactive Oxygen Species. En: S. Nonell & C. Flors, edits. *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 1*. s.l.:Royal Society of Chemistry, pp. 1-21.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), pp. 1870-1874.
- Lan, C.-C., Tang, R., San Leong, I. U. & Love, D. R., 2009. Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) of Zebrafish Transcripts: Optimization of RNA Extraction, Quality Control Considerations, and Data Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(10), pp. 1-12.
- Lapouge, K. y otros, 2000. Structure of the TPR Domain of p67phox in Complex with Rac·GTP. *Molecular Cell*, 6(4), pp. 899-907.
- Lassègue, B. y otros, 2001. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circulation Research*, 88(9), pp. 888-894.
- Leach, J. K. y otros, 2001. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Research*, Volumen 61, pp. 3894-3901.
- Leach, K. y otros, 2001. Ionizing Radiation-induced, Mitochondria-dependent Generation of Reactive Oxygen/Nitrogen. *Cancer Research*, 61(10), pp. 3894-3901.
- Liochev, S. I., 2013. Reactive Oxygen Species and the Free Radical Theory of Aging. *Free Radical Biology and Medicine*, Volumen 60, pp. 1-4.
- Love, N. y otros, 2013. Amputation-induced reactive oxygen species (ROS) are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nature cell biology*, pp. 222-228.
- Lushchak, V. I., 2014. Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and its Classification. *Chemico-Biological Interactions*, Volumen 224, pp. 164-175.
- Mahadev, K. y otros, 2004. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Molecular and Cellular Biology*, 24(5), pp. 1844-1854.
- Martyn, K. D. y otros, 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cellular Signalling*, 18(1), pp. 69-82.
- Marzaioli, V. y otros, 2017. NOX5 and p22phox are 2 novel regulators of human monocytic differentiation into dendritic cells. *Blood*, 130(15), pp. 1734-1745.

- Matute, J. D., Arias, A. A., Dinauer, M. C. & Patiño, P. J., 2005. p40phox: the last NADPH oxidase subunit. *Blood cells, Molecules and Diseases*, 35(2), pp. 291-302.
- Mendieta-Serrano, M. A. y otros, 2018. NADPH-Oxidase-derived reactive oxygen species are required for cytoskeletal organization, proper localization of E-cadherin and cell motility during zebrafish epiboly. *Free Radical Biology and Medicine*, Volumen In Press.
- Mendieta-Serrano, M. A., Schnabel, D., Lomelí, H. & Salas-Vidal, E., 2015. Spatial and temporal expression of zebrafish glutathione peroxidase 4 a and b genes during early embryo development. *Gene Expression Patterns*, Volumen 19, pp. 98-107.
- Mendieta-Serrano, M., Schnabel, D., Lomelí, H. & Salas-Vidal, E., 2013. Cell Proliferation Patterns in Early Zebrafish Development. *The Anatomical Record*, Volumen 296, pp. 759-773.
- Mironczuk-Chodakowska, I., Witowska, A. M. & Zujko, M., 2018. Endogenous Non-enzymatic Antioxidants in the Human Body. *Advances in Medical Science*, Volumen 63, pp. 68-78.
- Moloney, J. N. & Cotter, T. C., 2018. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volumen 80, pp. 50-64.
- Murphy, M. P., 2009. How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. *Biochemistry Journal*, Volumen 417, pp. 1-13.
- Nakano, Y. y otros, 2008. Mutation of the Cyba gene encoding p22phox causes vestibular and immune defects in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118(3), pp. 1176-1185.
- Nasiadka, A. & Clark, M. D., 2012. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR journal*, 59(2), pp. 161-168.
- Nielsen, H., 2011. *Working with RNA*. s.l.:Humana press.
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A. T. & Mitchison, T. J., 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*, Volumen 459, pp. 996-999.
- O'Neill, S., Brault, J., Stasia, M.-J. & Knaus, U. G., 2015. Genetic Disorders Couples to ROS Deficiency. *Redox Biology*, Volumen 6, pp. 135-156.
- Owusu-Ansah, E. & Banerjee, U., 2009. Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature Letters*, Volumen 461, pp. 537-540.
- Pham-Huy, L. A., He, H. & Pham-Huy, C., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Health and Disease. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), pp. 89-96.
- Pick, E., 2014. Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Small GTPases*.
- Pirotte, N. y otros, 2015. Reactive Oxygen Species in Planarian Regeneration: An Upstream Necessity for Correct Patterning and Brain Formation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Pomposiello, P. J. & Demple, B., 2011. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR Transcription Factors. *Trends in Biotechnology*, 19(3), pp. 109-114.

Porter, C. y otros, 1994. p22-phox-deficient chronic granulomatous disease: reconstitution by retrovirus-mediated expression and identification of a biosynthetic intermediate of gp91-phox. *Blood*, Volumen 84, pp. 2767-2775.

Rambaut, A., 2007. *molecular evolution, phylogenetics and epidemiology*. [En línea]
Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
[Último acceso: 26 Octubre 2018].

Ray, P. D., Bo-Wen, H. & Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), pp. 981-990.

Redza-Dutordoir, M. & Averill-Bates, D. A., 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), pp. 2977-2992.

Revil, T. y otros, 2010. Alternative splicing is frequent during early embryonic development in mouse. *BMC Genomics*, 11(399).

Rodhe, L. A. & Heisenberg, C. P., 2007. Zebrafish Gastrulation: Cell Movements, Signals, and Mechanisms. *International Review of Cytology*, Volumen 261, pp. 159-192.

Roos, D. y otros, 2010. Hematologically important mutations: The autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 44(4), pp. 291-299.

RStudio Team, 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio.

Salas-Vidal, E. y otros, 1998. Reactive Oxygen Species Participate in the Control of Mouse Embryonic Cell Death. *Experimental Cell Research*, Volumen 238, pp. 136-147.

Sambrook, J. & Russell, D., 2001. The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent E. Coli: "Ultra-Competent" Cells. En: *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1.112-1.115.

Schindelin, J. y otros, s.f. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *nature Methods*, Volumen 9, pp. 676-682.

Schulte-Merker, S. & Stainier, D. Y. R., 2014. Out with the old, in with the new: reassessing morpholino knockdowns in light of genome editing technology. *Development*, 141(16), pp. 3103-3104.

Schulte-Merker, S. y otros, 1994. no tail (ntl) is the zebrafish homologue of the mouse T (Brachyury) gene. *Development*, Volumen 120, pp. 1009-1015.

Segal, A. W., 1996. The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Molecular Medicine Today*, 2(3), pp. 129-135.

Sievers, F. y otros, 2011. *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. [En línea]
Available at: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
[Último acceso: 2017].

Sirokmány, G., Donkó, Á. & Geiszt, M., 2016. Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(4), pp. 318-327.

- Slack, J. M. W., 2013. *Essential Developmental Biology*. Minneapolis, USA: Wiley-Blackwell.
- Stasia, M. J., 2016. CYBA encoding p22phox, the cytochrome b558 alpha polypeptide: gene structure, expression, role and physiopathology. *Gene*, pp. 27-35.
- Streisinger, G. y otros, 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291(5813), pp. 293-296.
- Tauzin, S. y otros, 2014. Redox and Src family kinase signaling control leukocyte wound attraction and neutrophil reverse migration. *The Journal of Cell Biology*, 207(5), pp. 589-598.
- Thisse, B. y otros, 2001. *Expression of the zebrafish genome during embryogenesis*, s.l.: ZFIN Direct Data Submission.
- Thisse, B. & Thisse, C., 2004. *Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis*, s.l.: ZFIN Direct Data Submission.
- Thisse, C. & Thisse, B., 2008. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature Protocols*, 3(1), pp. 59-69.
- Ueyama, T. y otros, 2007. Subcellular localization and function of alternatively spliced Noxo1 isoforms. *Free Radical Biology and Medicine*, Volumen 42, pp. 180-190.
- Venditti, P., Di Stefano, L. & Di Meo, S., 2013. Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Mitochondrion*, 13(2), pp. 71-82.
- Viña, J. y otros, 2013. The Free Radical Theory of Aging Revisited: The Cell Signaling Disruption Theory of Aging. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(8), pp. 779-787.
- Walker, S. E. & Lorsch, J., 2013. RNA Purification – Precipitation Methods. En: J. N. Abelson & M. I. Simon, edits. *Laboratory Methods in Enzymology: RNA*. Baltimore: s.n., pp. 337-343.
- Waterhouse, A. M. y otros, 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), pp. 1189-1191.
- Weaver, C. J., Leung, Y. F. & Suter, D. M., 2016. Expression Dynamics of NADPH Oxidases During Early Zebrafish Development. *The Journal of Comparative Neurology*, 524(10), pp. 2130-2141.
- Werner, E., 2004. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *Journal of Cell Science*, Volumen 117, pp. 143-153.
- Westerfield, M., 2007. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 5th ed. Oregon: University of Oregon Press.
- Weyemi, U. y otros, 2012. ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene*, Volumen 31, pp. 1117-1129.
- Wientjes, F. B. y otros, 2001. The NADPH Oxidase Components p47phox and p40phox Bind to Moesin through Their PX Domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(2), pp. 382-388.
- Wilson, C., Muñoz-Palma, E. & González-Billault, C., 2018. From birth to death: A role for reactive oxygen species in neuronal development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volumen 80, pp. 43-49.

- Wingler, K. y otros, 2012. VAS2870 is a pan-NADPH oxidase inhibitor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(18), pp. 3159-3160.
- Winterbourne , C. C., 2008. Reconciling the Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species. *Nature Chemical Biology*, 4(5), pp. 278-286.
- Wolpert, L. y otros, 2011. Vertebrate life cycles and outlines of development. En: *Principles of development*. New York: Oxford university press, p. 101.
- Wong, J. L. & Wessel, G. L., 2005. Reactive Oxygen Species and Udx1 During Early Sea Urchin Development. *Developmental Biology*, Volumen 288, pp. 317-333.
- Xu, Y. & Fisher, G. J., 2005. Ultraviolet (UV) Light Irradiation Induced Signal Transduction in Skin Photoaging. *Journal of Dermatological Science Supplement*, Volumen 1, pp. S1-8.
- Yong, S. y otros, 2011. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?. *Journal of Signal Transduction*.
- Zangar, R. C., Davydov, D. R. & Verma, S., 2004. Mechanisms that Regulate Production of Reactive Oxygen Species by Cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199(3), pp. 316-331.
- Zhang, J., 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(6), pp. 292-298.
- Zhu, Y. y otros, 2006. Deletion Mutagenesis of p22phox Subunit of Flavocytochrome b558: IDENTIFICATION OF REGIONS CRITICAL FOR gp91phox MATURATION AND NADPH OXIDASE ACTIVITY. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), pp. 30336-30346.
- Zon, L. I. & Patton, E. E., 2001. The art and design of genetic screens: zebrafish. *Nature Reviews Genetics*, 2(12), pp. 956-966.

APENDICE A

Tabla 4. Número de referencia en NCBI de las secuencias de los genes de las subunidades de los complejos Nox para cada organismo considerado en los alineamientos.	
p47 (ncf1)	<p><i>D. rerio</i> NP_001025242.1</p> <p><i>H. sapiens</i> NP_000256.4</p> <p><i>X. tropicalis</i> NP_001106375.1</p> <p><i>M. musculus</i> NP_001272966.1</p> <p><i>B. floridae</i> XP_002605875.1</p> <p><i>G. gallus</i> NP_001025880.1</p> <p><i>A. carolinensis</i> XP_003230801.2</p> <p><i>C. intestinalis</i> NP_001029000.1</p>
p67(ncf2)	<p><i>D. rerio</i> NP_001103932.1</p> <p><i>H. sapiens</i> NP_000424.2</p> <p><i>X. tropicalis</i> NP_001029119.1</p> <p><i>M. musculus</i> NP_035007.1</p> <p><i>B. floridae</i> XP_002600343.1</p> <p><i>G. gallus</i> XP_004943334.1</p> <p><i>A. carolinensis</i> XP_008112920.1</p> <p><i>C. intestinalis</i> XP_002123694.2</p>
cyba(p22)	<p><i>D. rerio</i> NP_956873.1</p> <p><i>H. sapiens</i> NP_000092.2</p> <p><i>X. tropicalis</i> NP_001016480.1</p> <p><i>M. musculus</i> NP_031832.2</p> <p><i>B. floridae</i> XP_002604933.1</p> <p><i>G. gallus</i> XP_015148149.1</p> <p><i>A. carolinensis</i> XP_016853551.1</p> <p><i>C. intestinalis</i> XP_002119312.1</p>
noxo1	<p><i>D. rerio noxo1a</i> NP_001071052.1</p> <p><i>D. rerio noxo1b</i> NP_001313627.1</p>

	<p><i>H. sapiens</i> isoform a NP_653204.1 <i>H. sapiens</i> isoform b NP_751907.1 <i>H. sapiens</i> isoform c NP_751908.1 <i>H. sapiens</i> isoform d NP_001254650.1 <i>X. tropicalis</i> NP_001106457.1 <i>M. musculus</i> NP_082264.2 <i>B. floridae</i> XP_002608245.1 <i>G. gallus</i> NP_001025880.1 <i>A. carolinensis</i> XP_008122454.1 <i>C. intestinalis</i> NP_001029000.1</p>
noxa1	<p><i>D. rerio</i> NP_001025271.1 <i>H. sapiens</i> NP_001242996.1 <i>X. tropicalis</i> NP_001005801.1 <i>M. musculus</i> NP_001157098.1 <i>B. floridae</i> XP_002600343.1 <i>G. gallus</i> XP_004945813.2 <i>A. carolinensis</i> XP_008112920.1 <i>C. intestinalis</i> NP_001028999.1</p>

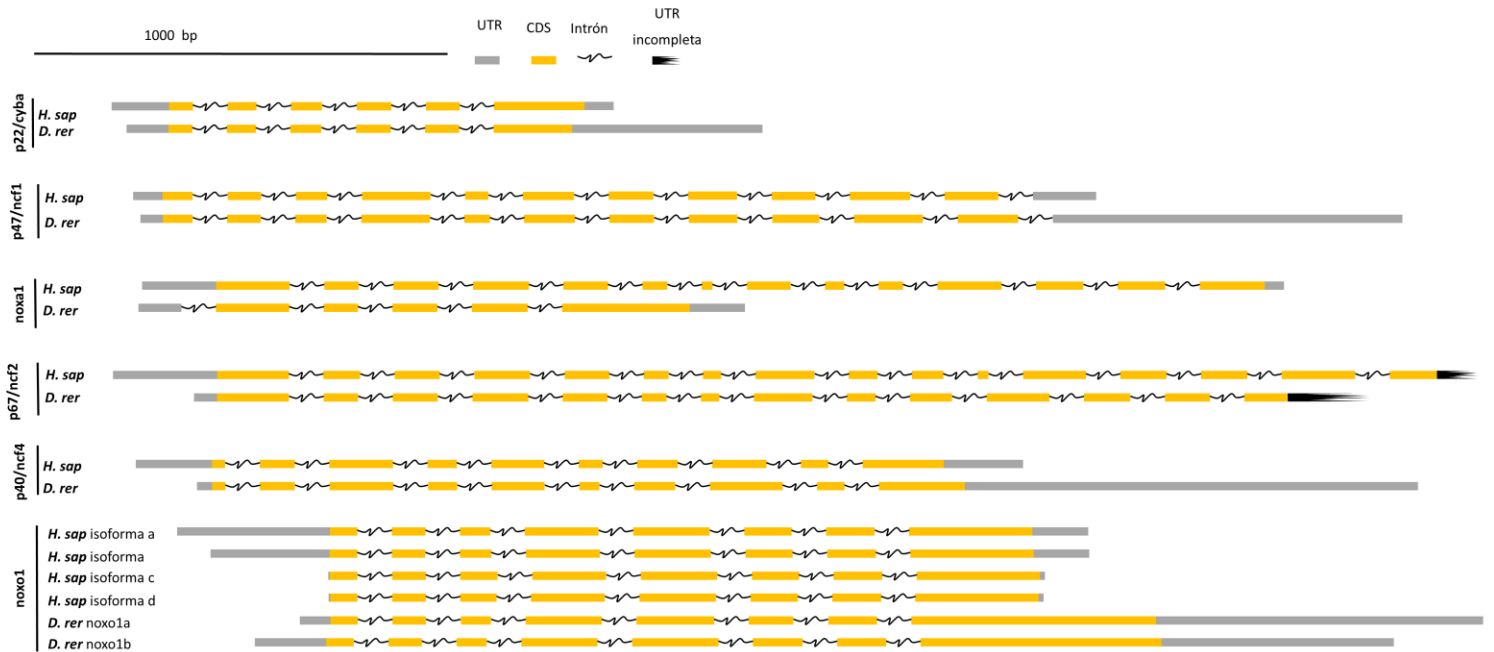


Figura 21. Representación esquemática de la organización intrón-exón de los genes de las subunidades accesorias de Nox de humano y pez cebra. Región no traducida (UTR) en gris, secuencia codificante (CDS) en amarillo y regiones intrónicas como líneas negras. Las UTR y CDS están representadas a escala como un píxel por cada par de bases. Se muestra las secuencias de los transcritos principales de *D. rerio* y *H. sapiens*. *noxo1* en pez cebra es un gen duplicado, *noxo1a* y *noxo1b* así que se incluyeron las isoformas a, b, c y d de *H. sapiens*.

```

[Bflo-Cyba]/1-180 1 -----MGQIEWAMWANEQAIISAWVMLTGGIIGLTG--FN----RW-EIAAYSVAAGIFIIILLEYPRGKRRK 60
[Drer-cyba]/1-185 1 -----MAKIEWAMWANEQALAAAGLIYLTGGIVGVAGQFR----GW-QFAAFGIAAGVFCLEYPKSKRGRK 61
[Mmus-Cyba]/1-192 1 -----MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFT----QW-YFGAYSIAAGVLIICLLEYPRGKRRK 61
[Hsap-CYBA]/1-195 1 -----MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFT----QW-YFGAYSIVAGVFCLEYPKSKRGRK 61
[Acar-CYBA]/1-186 1 -----MGRIEWAMWANEQALASGLILVAGGIVAVSQGFK----RW-EFAAYAIAAGVFCLEYPKSKRGRK 61
[Ggal-CYBA]/1-183 1 -----MGQIEWAMWANEQALAAAGLIMLTGGVVAVAGQFK----GW-YFAAYAIAAGAFVFCLEYPKSKRGRK 61
[Xtro-cyba]/1-187 1 -----MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVAVAGQFK----GW-QFGAYGVAAGVFCLEYPKSKRGRK 61
[Cint-Cyba]/1-175 1 MPSSSNIRSIQWGMWANETALLGSYVLTGGIIGIVGGLLKNFMFLPIGIVGVVFGILVGLLEYPRGKRRK 73

[Bflo-Cyba]/1-180 61 GHTIERRYQJYLTRVIHACGTITSNYYIFVLLHLLLCVPAGFQLPTILGALGLFIASIIYFVAAFHGEKWQPI 133
[Drer-cyba]/1-185 62 GTSIERSGQYCFVVCVKSFGPLTRNYYVRAFLHAALCVPGGFMLATVLCVCLGMASLIYLSAAIHGEHWEPI 134
[Mmus-Cyba]/1-192 62 GSTMERCQQKYLTSVVKLFGPLTRNYYVPAALHFLLSVPAGFLLATILGTVCIAIASVIYLLAAIRGEQWTPI 134
[Hsap-CYBA]/1-195 62 GSTMERWQKYMATAVVKLFGPFTRNYYVRAVLHLLSVPAAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPI 134
[Acar-CYBA]/1-186 62 GSTMQRCCGQYFTPVVVKVFGPLTRNYYVPSILHACLAVPAGFLLATILGTVCIAIASGIYLLAAVRGEWQPI 134
[Ggal-CYBA]/1-183 62 GSTMERCQQRYMTAVLKVFGPLTRNYYVPAALHAAALVPAGFLLSTILGTVCIAIASGIYLLAAVRGEWRPI 134
[Xtro-cyba]/1-187 62 GSTMERCQQRYLAAVVKLFGPLTRNYYVPAALHAGLAVPAGFLLSTILGTVCIAIASIYFLAAIRGEWRPI 134
[Cint-Cyba]/1-175 74 GNTLLRSGQSCFSTMVKNKL--PFVSSYYFRAIAYFIVCIPGIIISVPTFLGSVCVIVGSGIYLGAAALHKEWNPPI 145

[Bflo-Cyba]/1-180 134 GIDTRGAPSSSNQTVITQPPSQPPRAPAHVPRKPAQVVEGDPT-----I----L----- 180
[Drer-cyba]/1-185 135 LHI-ETKKR--LGESIKEPPQNPPRPPPELRRKADNLDAAY-----DNPMSVTINE- 185
[Mmus-Cyba]/1-192 135 EPKPKERPQ--VGGTIKQPTNPPRPPAEVRKRPSEGEAAA---SAGGPQVNPMPVTDVV 192
[Hsap-CYBA]/1-195 135 EPKPRERPQ--IGGTIKQPPSNPPRPPAEARKPSEEEAAVAAGPPGGPQVNPVTDVV 195
[Acar-CYBA]/1-186 135 ESKPKERPQ--VGGTIKHPPTNPPRPPDARKKPPED-----G--AGGQENPIAVEVEAE 186
[Ggal-CYBA]/1-183 135 EQKPRERPH--MGDTIKQPPSNPPRPPADARRKQPAE-----VGGQVNPVPEVEAE-- 183
[Xtro-cyba]/1-187 135 EKQAEPKPR--AGETIKRPPENPPRPPAEVRKQADE-----VSVGGGHVNPVPTDNV- 187
[Cint-Cyba]/1-175 146 ESRPQVPS---TSNDITQPPSQPPRLEQNKQI----- 175

```

Figura 22. Alineamiento múltiple de la secuencia global de Cyba. Se muestra el alineamiento de la secuencia de la proteína de Cyba de *Danio rerio* (*Drer*), *Homo sapiens* (*Hsap*), *Branchiostoma floridae* (*Bflo*), *Mus musculus* (*Mmus*), *Anolis carolinensis* (*Acar*), *Gallus gallus* (*Ggal*), *Xenopus tropicalis* (*Xtro*) y *Ciona intestinalis* (*Cint*). Las columnas del alineamiento están resaltadas en color azul fuerte donde el 100% de las secuencias son idénticas. En azul claro se encuentran resaltadas las columnas donde al menos el 50% de las secuencias son idénticas.

522	-----	[Cnt-p47]/1-461
	519 SAW	[F10-p47]/1-522
	-----	[Xr0-p47]/1-410
	-----	[Xr0-p47]/1-391
	-----	[Xr0-p47]/1-404
	-----	[Hsd-p47]/1-390
	-----	[Gd1-p47]/1-388
	-----	[Acar-p47]/1-394
385	SESTKPKK-----	[Acar-p47]/1-394
379	LESTPKIM-----	[Gd1-p47]/1-388
378	SESTKRLASAV-----	[Hsd-p47]/1-390
392	LESTKRLTSAV-----	[Xr0-p47]/1-404
379	SENTKSKIRTLN-----	[Xr0-p47]/1-391
396	LENTKSMQMD-----	[Xr0-p47]/1-410
452	HVYINDVVSQGNASSGVVWMEISLTQAVGKNNRFPADWVLPALVSPKSKAAAGPMSNSNVA	[F10-p47]/1-522
420	LEITGAGRSYDPEGAKRKL--I--GSPILKRLTEGKRNTPF-----OLAK	[Cnt-p47]/1-461
349	-----NMGG-----	[Acar-p47]/1-394
346	-----K-----	[Gd1-p47]/1-388
345	-----SPG-----	[Hsd-p47]/1-390
346	-----STDGTKE-RGGPG-----	[Xr0-p47]/1-404
345	-----KS-----	[Xr0-p47]/1-391
350	-----GTRSPLOE-RFTME-----	[Xr0-p47]/1-410
386	TEEBEGAYMD-MEGDTSAATDGYISPPNVAKQHPHVAEISAAEIAAGKAKSSGPRGTGDI	[F10-p47]/1-522
371	EQSDNGWVLTALNG-----AGVPS-----SYLESKLTAEFAPNSN---GFAKMWLPK	[Cnt-p47]/1-461
297	-----LBNKAAFPRESTITNIMKSIHSQSRKQ-----ISOETFPNSWKVMQNSKRLPBNMLL	[Acar-p47]/1-394
294	-----LBNHNIIPRESTITNIAKSIHMKRQQ-----ISOETFPNSKVMQNSKRLPBNMLN	[Gd1-p47]/1-388
294	-----IR-RGAPPRESTIPNNAHSIHQSRKQ-----ISOETFPNSVPLQDPRPARGPG	[Hsd-p47]/1-390
294	-----IR-RGAPPRESTIPNNAHSIHQSRKQ-----ISOETFPNSVPLQDPRPARGPG	[Xr0-p47]/1-404
296	-----SKRGLPRESTIPNNAHSIHQSRKQ-----ISOETFPNSKVMQNSKRLPBNMLN	[Xr0-p47]/1-391
297	-----VWRPAPPRESTIPNNAHSIHQSRKQ-----ISOETFPNSVPLQDPRPARGPG	[Xr0-p47]/1-410
325	TGSFKRLPRESTIPNNAHSIHQSRKQ-----ISOETFPNSVPLQDPRPARGPG	[F10-p47]/1-522
308	STLAVKPRESTIPNNAHSIHQSRKQ-----ISOETFPNSVPLQDPRPARGPG	[Cnt-p47]/1-461
244	EDLTLKEGDTLREAVIHKRLDGVVIRPDELTGYISMTLQKSAEKAPENN-----HQ	[Acar-p47]/1-394
242	EDLTLKEGDTLREAVIHKRLDGVVIRPDELTGYISMTLQKSAEKAPENN-----SG	[Gd1-p47]/1-388
242	EDLTLKEGDTLREAVIHKRLDGVVIRPDELTGYISMTLQKSAEKAPENN-----HQ	[Hsd-p47]/1-390
242	EDLTLKEGDTLREAVIHKRLDGVVIRPDELTGYISMTLQKSAEKAPENN-----HQ	[Xr0-p47]/1-404
244	EDLTLKEGDTLREAVIHKRLDGVVIRPDELTGYISMTLQKSAEKAPENN-----HQ	[Xr0-p47]/1-391
244	EDLTLKEGDTLREAVIHKRLDGVVIRPDELTGYISMTLQKSAEKAPENN-----HQ	[Xr0-p47]/1-410
264	DDLTLKEGDTLREAVIHKRLDGVVIRPDELTGYISMTLQKSAEKAPENN-----HQ	[F10-p47]/1-522
241	NDLISFPMGALELTONVEGELVAFYNSNEGVVGSYLESRPTYSWATDPAFTSVPAAESYK	[Cnt-p47]/1-461
180	KADAVDVEKSESQWV-CQKTRGVVPAAYALEPMDGDESEQ--E-PNVAAGELHVVPRKGLTAQ	[Acar-p47]/1-394
178	KADAVDVEKSESQWV-CQKTRGVVPAAYALEPMDGDESEQ--E-PNVAAGELHVVPRKGLTAQ	[Gd1-p47]/1-388
178	KADAVDVEKSESQWV-CQKTRGVVPAAYALEPMDGDESEQ--E-PNVAAGELHVVPRKGLTAQ	[Hsd-p47]/1-390
178	KADAVDVEKSESQWV-CQKTRGVVPAAYALEPMDGDESEQ--E-PNVAAGELHVVPRKGLTAQ	[Xr0-p47]/1-404
180	KADAVDVEKSESQWV-CQKTRGVVPAAYALEPMDGDESEQ--E-PNVAAGELHVVPRKGLTAQ	[Xr0-p47]/1-391
180	KADAVDVEKSESQWV-CQKTRGVVPAAYALEPMDGDESEQ--E-PNVAAGELHVVPRKGLTAQ	[Xr0-p47]/1-410
200	EADAVDVEKSESQWV-CQKTRGVVPAAYALEPMDGDESEQ--E-PNVAAGELHVVPRKGLTAQ	[F10-p47]/1-522
174	HSELEVEKSESQWV-CQKTRGVVPAAYALEPMDGDESEQ--E-PNVAAGELHVVPRKGLTAQ	[Cnt-p47]/1-461
127	IMPNTG-HLKKPELTPMD--S-----KIMADITGPIILQTRAIADTEKSSITMGV	[Acar-p47]/1-394
125	MPVLD-QIKPEVFLPMD--A-----KANTSDITGPIILQTRAIADTEKSSIMAV	[Gd1-p47]/1-388
125	KLPLDM-QIKPELTPMD--G-----KSTADITGPIILQTRAIADTEKSSIMAV	[Hsd-p47]/1-390
125	KLPLDM-QIKPELTPMD--G-----KSTADITGPIILQTRAIADTEKSSIMAV	[Xr0-p47]/1-404
125	VNVAANNNGRKPETFLKVDL-A-----KAVSDITGPIILQTRAIADTEKSSITAA	[Xr0-p47]/1-391
125	ETPAPH-PKPMETFLMSTNVR-----SNTTSETGPIILQTRAIADTEKSSITAA	[Xr0-p47]/1-410
134	TAPPD-PKPMETFLMSTNVR-----SNTTSETGPIILQTRAIADTEKSSITAA	[F10-p47]/1-522
128	IADTFE-----KTSYAVS011DITGPIILQTRAIADTEKSSITAA	[Cnt-p47]/1-461
63	SDINEMNIIHLPAPKIDSG----S1QNBQNTLSEFSAIINLPKISRPBELGFKVPPD	[Acar-p47]/1-394
61	SDINEMNIIHLPAPKIDSG----S1QNBQNTLSEFSAIINLPKISRPBELGFKVPPD	[Gd1-p47]/1-388
61	SDINEMNIIHLPAPKIDSG----S1QNBQNTLSEFSAIINLPKISRPBELGFKVPPD	[Hsd-p47]/1-390
61	SDINEMNIIHLPAPKIDSG----S1QNBQNTLSEFSAIINLPKISRPBELGFKVPPD	[Xr0-p47]/1-404
61	SDINEMNIIHLPAPKIDSG----S1QNBQNTLSEFSAIINLPKISRPBELGFKVPPD	[Xr0-p47]/1-391
61	SDINEMNIIHLPAPKIDSG----S1QNBQNTLSEFSAIINLPKISRPBELGFKVPPD	[Xr0-p47]/1-410
68	AVSKDQTLPLKPKRIFGNET-RVADENLHIDEYKVAALAEKISEHEVLSFETLPE	[F10-p47]/1-522
61	GGKDPSPRILPLKPKRIFGNET-RVADENLHIDEYKVAALAEKISEHEVLSFETLPE	[Cnt-p47]/1-461
62	-----MGDRGAYPHIELGFKRFLPSOHVYVWMLVKHDLTKMVAHKKFTEIEFHKALKMFP	[Acar-p47]/1-394
60	-----MGDRGAYPHIELGFKRFLPSOHVYVWMLVKHDLTKMVAHKKFTEIEFHKALKMFP	[Gd1-p47]/1-388
60	-----MGDRGAYPHIELGFKRFLPSOHVYVWMLVKHDLTKMVAHKKFTEIEFHKALKMFP	[Hsd-p47]/1-390
60	-----MGDRGAYPHIELGFKRFLPSOHVYVWMLVKHDLTKMVAHKKFTEIEFHKALKMFP	[Xr0-p47]/1-404
60	-----MGDRGAYPHIELGFKRFLPSOHVYVWMLVKHDLTKMVAHKKFTEIEFHKALKMFP	[Xr0-p47]/1-391
60	-----MGDRGAYPHIELGFKRFLPSOHVYVWMLVKHDLTKMVAHKKFTEIEFHKALKMFP	[Xr0-p47]/1-410
67	MAETLQNSRQVTLGKRLGKRVVWMLVKHDLTKMVAHKKFTEIEFHKALKMFP	[F10-p47]/1-522
60	-----MNRTLKSKVAVDIEKRLPLSKRVVWMLVKHDLTKMVAHKKFTEIEFHKALKMFP	[Cnt-p47]/1-461

Figura 23. Alineamiento múltiple de la secuencia global de p47. Se muestra el alineamiento de la secuencia de la proteína de p47 de *Danio rerio* (*Drer*), *Homo sapiens* (*Hsap*), *Branchiostoma floridae* (*Bflo*), *Mus musculus* (*Mmus*), *Anolis carolinensis* (*Acar*), *Gallus gallus* (*Ggal*), *Xenopus tropicalis* (*Xtro*) y *Ciona intestinalis* (*Cint*). Las columnas del alineamiento están resaltadas en color azul fuerte donde el 100% de las secuencias son idénticas. En azul claro se encuentran resaltadas las columnas donde al menos el 50% de las secuencias son idénticas. Se truncó la secuencia de *Branchiostoma floridae* a partir del aminoácido número 523 ya que no ocurre alineamiento en el resto de la proteína.

```

[Hsap-p47]/1-390      1 MGDTFIPHIALLGFEKRFVPSQHVVYMFVLVKWQDLSEKVVYRRFTEIYEFHKTLKEMFPI 60
[Drer-p47]/1-410    1 MAETVVRHVELLGFVKRFVPSQHVVYMLLVKWSQSEKLVYRRYPEVHTLHKTLKEMFPI 60

[Hsap-p47]/1-390    61 EAGAINPENRIIPHLPAKWFDFGAPAAENRQGLTEYCSLMSLPTKISRCPHLLDFFKV 120
[Drer-p47]/1-410    61 EAGDIDEKDRIIPTLPAPKWLDNQKTTETRCATLAEYCRSLNLPANISRCQLIRDFFKM 120

[Hsap-p47]/1-390    121 RPDDLKLPFDNQTKRPETYLMPKDG--KSTATDITGPIILQTYRAIANYEKTSGSEMALS 178
[Drer-p47]/1-410    121 RPEDETPPEAPHPYKRNFTFIMSTNRVRSNITSEITGPIIMLETYRVIADYSKSSKYELTLK 180

[Hsap-p47]/1-390    179 TGDVVEVVEKSESQWVFCQMKAKRGWIPASFLEPLDSPDETEPEPNYAGEPTVAIKAYT 238
[Drer-p47]/1-410    181 MGDMDIVEKSPNGWVFCQCESPRGWPASYLEPLDGADESEEPEPNYAGELYKTRGYK 240

[Hsap-p47]/1-390    239 AVEGDEVSLLEGEAVEVIHKLLDGWVVIKDDVTGYFPSMYLQKSGQDVSQA-QR-Q-IK 295
[Drer-p47]/1-410    241 AVEQDEMTLEAGVIEVIHKLLDGWVVRKGEETGFYPSMFLCRTGEKKEVDAERDVVPR 300

[Hsap-p47]/1-390    296 RGAPPPRSSIRNAHSIHQRSEKLSQDAYRNSVRFLLQQRPRQARPGPQSPGSPLEEEERQ 355
[Drer-p47]/1-410    301 ATPPPRRSTIPNAQSIHSTVRRRISQDSYRQSPRFLQQRGLNSHSRIGTRSPLEERPT 360

[Hsap-p47]/1-390    356 -----TQRSKPQFAVPPRPSADLILNRCSESTKPKLASAV-- 390
[Drer-p47]/1-410    361 NRENIEKSSAPQAEDEDKSVFVPPRPSPLILERCENTSKRMSMQEAD 410

```

Figura 24. Alineamiento global de p47. Se muestra el alineamiento de la secuencia de la proteína de p47 de *Danio rerio* (*Drer*) y *Homo sapiens* (*Hsap*). Las columnas del alineamiento están resaltadas en color azul donde los aminoácidos de ambas secuencias son idénticos. Identidad: 55.38%.

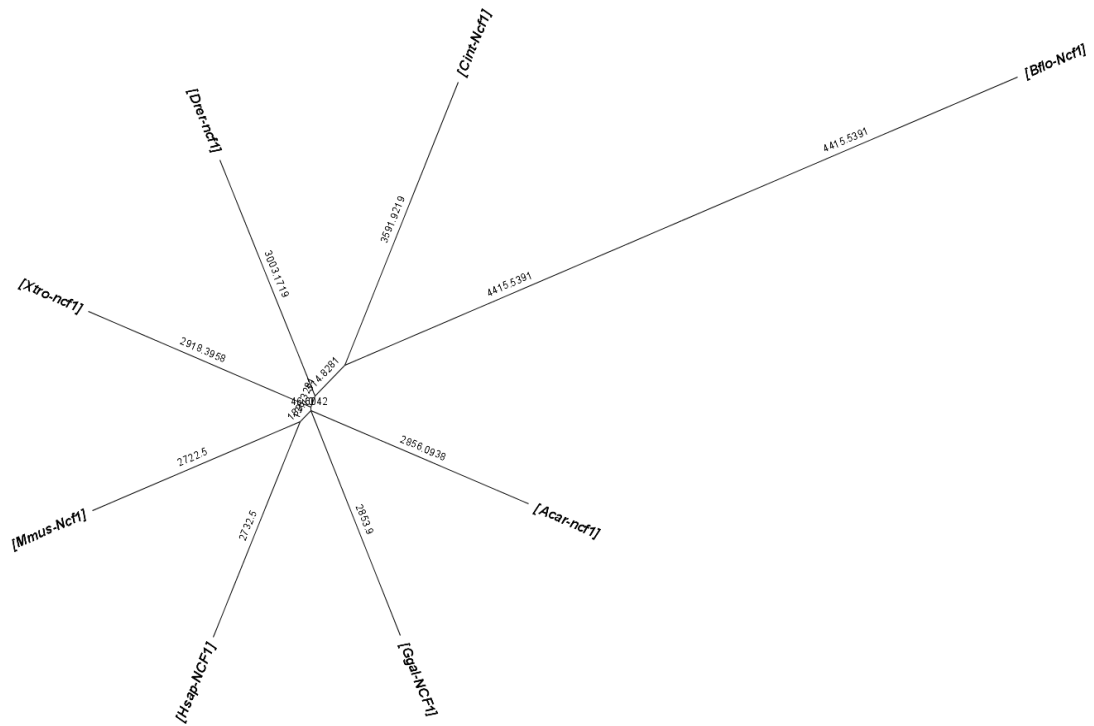


Figura 25. Cladograma de p47 (Ncf1). Cladograma generado con el método de clustering “neighbor joining” muestra la cantidad de cambios entre las secuencias de la proteína Ncf1 de los organismos *H. sapiens* (*Hsap*), *M. musculus* (*Mmus*), *D. rerio* (*Drer*), *B. floridae* (*Bflo*), *C. intestinalis* (*Cint*), *X. tropicalis* (*Xtro*), *G. gallus* (*Ggal*) y *A. carolinensis* (*Acar*).


```

[Cint-p67]/1-621 -----
[Bflo-p67]/1-515 1 -----MATLKENLRLEDEGVAACDRGEFRTALEKFTGIQDPSAKILFNIGTVQMALGQVQPAAKS 60
[Drex-p67]/1-500 1 -----MSFVSTLRQVDEAVACVEQRDPDAALRIPLSIEEKNSKIAFNI GCLCLMNSDLDEAEKA 59
[Xtro-p67]/1-523 1 -----MALVEIMRLWSEGVAAAEENEDWGAALKSFTSITDPRSKICFNI GCGHLVLDLEKA 59
[Hsap-p67]/1-526 1 -----MSLVEAISLWNEGVLAADKKDWKGALEAFSAVQDPHSRI CFNIGCMYTI LKNMTEAEKA 59
[Mmus-p67]/1-525 1 -----MSLAEAIRLWNEGVLAADKKDWKGALEAFSEVQDPHSRI CFNIGCVVTI LEMLAQAEQA 59
[Ggal-p67]/1-516 1 -----MSLVEITRLWQEGVCAADGKEWGAALKATTA VQNPFAKICFNIGCTHLVGLQLAEEEA 59
[Acara-p67]/1-545 1 MPECTRGACLANCESSLLAPELSDSSLAMALVETIRLWSEGVSAADPKDWPAALSAFTSVPNSSKICFNIGCTHLVMGNLDEAQA 86

[Cint-p67]/1-621 1 -----MNSEFINDLLEC-----SVCLKPLDQQNVLPQHTFCKSCLSFIVRSHKELRCRPEC 52
[Bflo-p67]/1-515 61 FSSSTLEKDEHLSVAYFQGLANFKCGPDRQEGLDQFQESYQRLRRNALIDYKQLGRYKLCACEVLYNTALVHFRLGQ--TAQCREM 144
[Drex-p67]/1-500 60 FDGSLGKDEHLAVAFQPGVTFYKKEKFEESLLDQQAFKQLRGNQLIDYTPGLGRYKLYACEVLYNTALVHFRLGQ--WEKAQEN 143
[Xtro-p67]/1-523 64 FLLTIERMHLAVGYFQRFVFFQGRKYSLALKQWTRATTEMGNQLIDYKILGLIFKHYSCILHNIALTHAREGK--WAKAEES 143
[Hsap-p67]/1-526 60 FTFSINRDKHLAVAYFQGMLYYQTEKYDLAIKDLKEALIQLRGNQLIDYKILGLQFKLFACEVLYNIAFMYAKKEE--WPKAEEQ 143
[Mmus-p67]/1-525 60 FTFSINRDKHSAYVAYFQGMLYYPMKYDLAIKDLKEALTQLRGNQLIDYKILGLQFKLFACEVLYNIALMHAKKEE--WPKAEEQ 143
[Ggal-p67]/1-516 60 FTQISCDKHLAVAYFQRTVTFYKRNHMEALKQFEALQLRGNQLIDYKILGLRYRFAFACEVLYNIALVYATMEN--WPKAEEH 143
[Acara-p67]/1-545 87 FIRSTNMRHLAVAYFQRTVAVQMENYESCINDLKEALQLRGNQLIDYKILGLQFKLFACEVLYNIALAYAKLDD--WPKAEEH 170

[Cint-p67]/1-621 53 RVLVVKQKVDL PANILLRLLDGLKSDSNKQPPAKERTEPRHS--V-----EGILTSSIPASGGAKGGNVEGGRISTRPNMR 130
[Bflo-p67]/1-515 145 LLEAQKRIEPPHN-VIDRALESDRHQTFFQIEMFSNVLPFPATSI IQNLEKKDYLGKAKVSSITDRDDFSGFE---PIR--- 222
[Drex-p67]/1-500 144 LLTALSLPADAKFS-HIDHALDAI LKHLLFPLVEVPAGLLKPKNKYVAELEPDLGKAKVVASVVPADFSGFA---PLQ--- 221
[Xtro-p67]/1-523 144 ILLALSQVVELRHHTKLEKAMEDILKEVFAAKVIKGRIFQPNERLWEQLEKDYLGKALVVASVVDKDSFGFA---PLQ--- 222
[Hsap-p67]/1-526 144 LALATSMKSEPRHS-KIDKAMECVVQKLYEPVVI PVGKLRPNRQVAQLAKDYLGKATVVASVVDQDSFGFA---PLQ--- 221
[Mmus-p67]/1-525 144 LALATNMKSEPRHS-KIDKAMESIWRQKLFEPVVI PVGKLRPNRQVAQLAKDYLGKATVVASVVDQDSFGFA---PLQ--- 221
[Ggal-p67]/1-516 144 LTLMSKSEPOHN-KIDRAMEAILKQKLEFPIETGLFRPNEKQVAQLEKDYLGKAVVASVVDKDSFGFA---PLQ--- 221
[Acara-p67]/1-545 171 MTKLEKLTGPRHS-KIDKAMASILKQRFEPVIVPEGLKLRPNEKQVAQLEKDYLGKATVVASITDRDEAFGA---PLQ--- 248

[Cint-p67]/1-621 131 HTVHERSGSEHTTSGLQIPTQSRPHARA IHNYSQVPSDFSRKGLIMLIKIDENWTSGECHKMVFVFTNYVEI IHPLPTER 216
[Bflo-p67]/1-515 223 -RPHPKTFLFSCIPKGTMIQLEGTPH-KVVRDHI NSAEELVHVGNMVFVAAQ-EEGNCVSNFNKVLVFLCMEVHVGNMVFV 305
[Drex-p67]/1-500 222 -PQIDNVFSPKVP-EVLRVLEGEPEH-TVLYEFVPEKLELAVLPGNIVFVLPHTGDNWASVFNKRLVFLVFLFPLD--IVTM 302
[Xtro-p67]/1-523 223 -PQASNPPRRPKTP-EILRTIQGEPEH-RVLFEFNPETAEMQVLPGNIVFVLPKGDNDWATVFNKGGKIVFCNYLEPVE--LRFH 303
[Hsap-p67]/1-526 222 -PQAAEPPRRPKTP-EIFRALEGEAH-RVLFGVFPETKEELQVMPGNIVFVLPKGDNDWATVFNKGGKIVFCNYLEPVE--LRFH 302
[Mmus-p67]/1-525 222 -PQSAEPPRRPKTP-EIFRALEGEAH-RVLFGVFPETPEELQVMPGNIVFVLPKGDNDWATVFNKGGKIVFCNYLEPVE--LRFH 302
[Ggal-p67]/1-516 222 -PQASGPPRRPKTP-EILRALEGGPH-RVLYEFIPETAELQVLPGNIVFVLPKKEKDNWATVFNKGGKIVFCNYLEPVE--LQHK 302
[Acara-p67]/1-545 249 -PQASDPPRRPKTP-ETLRMLQGGPH-RVLYEFIPETAELQVLPGNIVFVLPKKEKDNWATVFNKGGKIVFCNYLEPVE--MLNQ 329

[Cint-p67]/1-621 217 PYCFALYDFESSDAEKDRDCLTFSKNEKILVIRRVDENWVEGMLRDKIGIFPLSFVKLSEEARLKFEDLHISDPHPSKNDGD--- 299
[Bflo-p67]/1-515 306 A-----AQE-----E-----G--WCSVDSKVFEPF-RSKPPQPPEA 333
[Drex-p67]/1-500 303 T-----SKPVE-----T-----E--ALNEMDDIPAPP-PPAAFSRPA 332
[Xtro-p67]/1-523 304 S-----AQQTGVQSEELDSP-----T--NRPQSDVFPAPP-DATFPQLLKN 341
[Hsap-p67]/1-526 303 P-----QQPQ-----E--ESSPQSDIPAPP-SSKAFGRPQL 331
[Mmus-p67]/1-525 303 P-----QSQQ-----E--DTSPESDIPAPP-NSSPGRQL 331
[Ggal-p67]/1-516 303 L-----HVQ-----D--EAPLEPDIPEFP-SSTAFRRP 329
[Acara-p67]/1-545 330 S-----TIW-----K--ENDDDLDFEFP-SIAAFRRP 356

[Cint-p67]/1-621 300 GKDKGTLGAAARK-----ILSSKPGYKSNKPRHSFPTFQAAKASGEAVPPTVHRSMELGASASIPTSKHGTTSNINPTVDSDFQ 379
[Bflo-p67]/1-515 334 PISP-----PARPPPPPPSLSDMPVV--VVRHHTDSTVAIRSKT---GASLRDLTV-----MVANKFE 389
[Drex-p67]/1-500 333 PEGKLVNA-----KIVNTRFSGCV--VKVHF--QFTIAIAIAH--GQPYGVILQ-----MISSEK 384
[Xtro-p67]/1-523 342 TKDKQDFSA-SSKQKQETEAVAVASYL--VKVYV--KTTVAIQISS--KLPFADLLT-----LISSEK 394
[Hsap-p67]/1-526 332 SPGQ-----KQKEPEKVLVMPMYT--LKVHY--KYTVVMKTQP--GLPYSQVRD-----MVSKLE 384
[Mmus-p67]/1-525 332 SPGH-----KQK-EPKELKLSVMPMYT--LKVHY--KYTVVMKTRL--GLPYSQLRN-----MVSKLA 383
[Ggal-p67]/1-516 330 APDCVPVTSTQQREASKESEPDIPKPYV--LKVHY--KYTVAMQVTP--DLSYKELG-----LWCDKLE 388
[Acara-p67]/1-545 357 RP-----PGKVPPEPSSAPYI--IKVHY--KYTVVALQVSP--ELSYSSLLD-----KVKKLE 405

[Cint-p67]/1-621 380 NPTNPSQTSRVDNTRVGGGGEINI-ASSPTS IKMPMRSVSNVHIIQRTGNGDHGKPT-----ERSPRASIFLPSGSKI VAS 456
[Bflo-p67]/1-515 390 MSDE---VVTLWYKKE-GDEDMEITKDDDMREASTVPEGQLTLWLDKRVKQSLISKYLEDDEK-----GVSPMQFSKVVAL 464
[Drex-p67]/1-500 385 LPAS---TLTLYAKE-GSAEPVI-IEDSEMEAVNSAKDGLTLWC SVTEGKSA-----SHAKVVAL 442
[Xtro-p67]/1-523 400 LLFS---RMKLSFKED-Q--DDVL-LNEENTKAWSLATDNCCLKLCTEVQVEEPIKVE----EVQVQOEIPASDKAETYVIAL 473
[Hsap-p67]/1-526 400 LRLE---HTKLSYRPR-DSNELVP-LSEDSMDANGQVKNVCLTLWCENTVGDQGFPEPKSEKADANNQTTPEQLKKGQNEAL 465
[Mmus-p67]/1-525 384 LSPE---HTKLSYRPR-DSHELLL-LSEESMDANGQVKNVCLTLWCENTVGDQGLIDEPIQRENSASKQTTPEQPKEGTQVVAI 464
[Ggal-p67]/1-516 389 LQPE---HTMLRYKSA-ASGELVP-LSAQNLEEAWSKNDQCLTLVWDCITEGEG-FL-PDSKPEEPQQ-----AAATGPTQVVAQ 462
[Acara-p67]/1-545 406 LSPQ---HTTLRYLRT-DNAELVP-LSEDKMETLWNAENMCLTLWSSQEMGKDDLSTENGEAEPEK-----TEKDMAQNQVVAR 481

[Cint-p67]/1-621 457 YSTHAEKDELELLKCESYQITEICNDGCRPVHIKSCKSVVFGNYVASNISQPTQSTKPDNSTPNPTMTQDQGGSSKHPPR 542
[Bflo-p67]/1-515 465 HDYEAASEPGDLGFMEDVITIMSQVNDWLEGR--SRNMGVIFPASYKPWDK----- 515
[Drex-p67]/1-500 443 YSEYSSPTEDLEFKQGNVITVLSKVNDEWLEGG--CNGKIGIFPSSFVEPLNGDPHTSAE----- 500
[Xtro-p67]/1-523 474 FEYATQPEDLFPCKGDIKILSHVSEDWVEGE--CQGRMGIFPKVFTIEIQ----- 523
[Hsap-p67]/1-526 466 FSYEATQPEDLFPQEGDIILVLSKVNDEWLEGE--CKKRVGIFPKVFEVCATTDLSTPREV----- 526
[Mmus-p67]/1-525 465 FSYEAAQPEDLFEVQGDVILVLSKVNDEWLEGE--CKKRVGIFPKAFVEGCAAKNLEGI PREV----- 525
[Ggal-p67]/1-516 463 YSYEATQPEDLFEQAGDVILVLSKVNDEWLEGG--CNGKIGIFPFAFVDCNKTDP----- 516
[Acara-p67]/1-545 462 YSYEASQPEDLFEQKGETILVLAEVNAEWLEGE--CNGKIGIFPKSYVEEYNSQDPPCEEQQTQTQ----- 545

[Cint-p67]/1-621 543 PKVPIKIPTSNGGSRAESSSSSSEPSRRGIRSPSTRQHPMKVVPVQKDKSSNLLKMI GGGKRSRSSLPTTPAR 621
[Bflo-p67]/1-515 -----
[Drex-p67]/1-500 -----
[Xtro-p67]/1-523 -----
[Hsap-p67]/1-526 -----
[Mmus-p67]/1-525 -----
[Ggal-p67]/1-516 -----
[Acara-p67]/1-545 -----

```

Figura 26. Alineamiento múltiple de la secuencia global de p67. Se muestra el alineamiento de la secuencia de la proteína de p67 de *Danio rerio* (*Drer*), *Homo sapiens* (*Hsap*), *Branchiostoma floridae* (*Bflo*), *Mus musculus* (*Mmus*), *Anolis carolinensis* (*Acar*), *Gallus gallus* (*Ggal*), *Xenopus tropicalis* (*Xtro*) y *Ciona intestinalis* (*Cint*). Las columnas del alineamiento están resaltadas en color azul fuerte donde el 100% de las secuencias son idénticas. En azul claro se encuentran resaltadas las columnas donde al menos el 50% de las secuencias son idénticas.

```

[Drer-p67]/1-500      1 MSFVSTLRQWDEAVACVEQRDPDAALRIFLSIEEKNSKIAFNIGCLCLNNSDLLDEAEKAF 60
[Hsap-p67]/1-526    1 MSLVEATSLWNEGVLAAADKKDWKGDALDAFSAVQDPHSRI CFNIGCMYTTILKNMTEAEKAF 60

[Drer-p67]/1-500    61 DGSIGKDEHLAVAFFQRGVTFYKKEKFEESLLDFQQAFKQLRGNQLIDYTPLGLRYKLYA 120
[Hsap-p67]/1-526    61 TRSINRDKHLAVAYFQRMGLYVQTEKYDLAIKDLKEALIQLRGNQLIDYKILGLQFKLFA 120

[Drer-p67]/1-500    121 CEVLHNTGLAQAQLGKWEKAQENLLTALSLRADAKFSHIDHALDAILKHKLFPLVEVRAG 180
[Hsap-p67]/1-526    121 CEVLYNIAFMYAKKEEWKAEQLALATSMKSEPRHSKIDKAMECVWVKQKLYEPVVI PVG 180

[Drer-p67]/1-500    181 LLFKPNKKYVAELEKRDYLGKAKVVASVVPADDFSGFAPLQPDIDNVPSIPKVPEVLRVL 240
[Hsap-p67]/1-526    181 KLFRPNERQVAQLAKKDYLGKATVVASVVDQDSFSGFAPLQQAAPPPRPKTPPIFRAL 240

[Drer-p67]/1-500    241 EGEPTIVLYEFVFPETKEELAVLPGNIVFVLRHGTDNWASVVFNEKRGLVPPYIFLEPLDIV 300
[Hsap-p67]/1-526    241 EGEAHRVLFQFVFPETKEELQVMPGNIVFVLRKGNWATVMFNGQKGLVPCNYLEPVELR 300

[Drer-p67]/1-500    301 TMTSKPVETEALNEMDDIPAPPRRAAPSRPVAPEGLITVN-AKTVNTREFSGCVVKVHFQ 359
[Hsap-p67]/1-526    301 IHPQQQ-PQEESSPQSDIPAPSSKAPGREQLSPGQKQKEEPKENVLSVPMPTTLKVHYK 359

[Drer-p67]/1-500    360 FTIAIAIAHGQPYGVILQMISSKLLKPASTLTLRVYAKEGSAERVI IEDSEMEAVVNSAKD 419
[Hsap-p67]/1-526    360 YIVVMKTQPGLPYSQVRDMVSKLELRLEHTKLSYRPRDSNELVPLSEDSMKDAWGQVKN 419

[Drer-p67]/1-500    420 GRLLTLWCSVTEGKSA-----SHAKVVALYSYESSTPEDLEFK 456
[Hsap-p67]/1-526    420 YCLTLWCENTVGDQGFDPDEPKSEKADANNQTTEPQLKKGSGVEALFSYEATQPEDLEFQ 479

[Drer-p67]/1-500    457 QGNVITVLSKVNDWLEGGCNGHIGIFPSSFVEPLNGDPHTSAE--- 500
[Hsap-p67]/1-526    480 EGDILLVLSKVNEEWLEGECKGKVGIFPKVVEDCATTDLSTREV 526

```

Figura 27. Alineamiento p67. Se muestra el alineamiento de la secuencia de la proteína de p67(ncf2) de *Danio rerio* (*Drer*) y *Homo sapiens* (*Hsap*). Las columnas del alineamiento están resaltadas donde los aminoácidos de ambas secuencias son idénticos. Identidad: 47.09%.

[Cint-Noxal]/1-515 1 -----MASHKHAALLQQEAGVAAEENDWFKALSIFFQQVPMSSVIVFNIHCCHLQIQYQLKAEAF 60

[Hsap-NOXA1]/1-476 1 -----MASLGLDVAHHLGAQAVDRGDWAPALHLSFGVPAFPARLCPNAGCVHLLADPEAALRAF 61

[Mmus-Noxal]/1-436 1 -----MSSLGDQIDWHRGVLAVAREDDSDALCFEFDVREPLARMYFNRGCVHLMAGDPEAALRAF 61

[Drex-noxal]/1-269 1 -----MLYIELIPLWDEAVKADIRDWQGALSKLNQITDHCNFTMFVAVSTHIALGQVDLAIKAL 60

[Ggal-NOXA1]/1-509 1 -----MAYRELLRWHQAALADGGDWDAALETLCGIEEIPARICFNVGCMHLRAGRLPDALRAF 60

[Xtro-noxal]/1-580 1 -----MHYKEVVRWHEGVVAAEGKDYDAALRSFTAIEDPSRIWVNVGGIYLLRGLDLPRALEY 60

[Bflo-Noxal]/1-515 1 -----MATLKENLRLWDEGVAAACDRGEFRTALEKFTGLQDPKAKILFNIITVQMALGQVQPAKSF 61

[Acar-noxal]/1-545 1 MPECTRGAFLANCESSLLAPELSDSSLAMALVETIILWSEGVSAADRFDPALISATTSVPMSSKICFNICTHLMVGNLDEAQQAF 87

[Cint-Noxal]/1-515 61 SQSIADKYLVAGYFLAVSQTHLGNVYEAIDNFSSALSSLRGPFIDYKQLNMLCKISACDIRLNLALHHSFGDVPKAREILNEA 147

[Hsap-NOXA1]/1-476 62 DQAVTKDTCMAVGFQFQGVANFQLARFQEALESDFWLALQLRGHAAIDYTLGLRFLKQAEVLEHNVASAOCCQLGLWTEASSLREA 148

[Mmus-Noxal]/1-436 62 DQAVTKDTCMAVGFQFQGVANFQLARFQEALESDFWLALQLRGHAAIDYTLGLRFLKQAEVLEHNVASAOCCQLGLWTEASSLREA 148

[Drex-noxal]/1-269 61 DRVIAKDSCLAVGFFQFSAVHMMANRLEEALSDCIWAQKYPENPVIDYKQLGLRYKLYSQVLYMAAAVHSRLQQWDKARDILAA 147

[Ggal-NOXA1]/1-509 61 DETVMKDNSLAVGYFQFQGVFLQLEMVEEALSDYHMAFSLRKPFPIDYKQLGLRHILYAEVLYSTAAATQCRLLQQQWEARDTLEK 147

[Xtro-noxal]/1-580 61 DKSLAQDPLAVGYFQFQGVFLQLEMVEEALSDYHMAFSLRKPFPIDYKQLGLRHILYAEVLYSTAAATQCRLLQQQWEARDTLEK 147

[Bflo-Noxal]/1-515 62 SSTLEKDEHLSVAYFQFGLANFKCGEDQEGEQFQESYQRLRNALIDYKQLGLRYKLYCACEVLYNTALVHFKLGQTAQCREMLLEA 148

[Acar-noxal]/1-545 88 IRSTNNDPHLAVAYFQFQGVFLQLEMVEEALSDYHMAFSLRKPFPIDYKQLGLRHILYAEVLYSTAAATQCRLLQQQWEARDTLEK 174

[Cint-Noxal]/1-515 148 MSMPHDEDKMKNKSAIDALVNVNWFYFGEASALEPLVRLSSSCLFPPSKTKMEGLKSGTKFMNTATVVSATNDEYSFVGVGPKKMQ 234

[Hsap-NOXA1]/1-476 149 MSKWPEGS-LNGLDSALDQVQRG-----SLPPRQVREGEVFRPHRWHLKHLEP-VDFLGRKARVVASAIPDDQGWGVPPQPPG 225

[Mmus-Noxal]/1-436 149 ISKWPEGA-QDILDIAADKVVQKQV-----PLQLQVQVPEGEVFPFRRYLKHLEP-MDFLGRKARVVASAIPDDHNAQPPQRS-QA 224

[Drex-noxal]/1-269 148 SQERGAGR-SNLIDTALDAISRKID-----VLEPLLPEGEVFRPKLEVDQLEP-RDFLGEAKVIQIFTL---YCSFNACSSAE 221

[Ggal-NOXA1]/1-509 148 VVWRPEGR-SATLALALERVQNHQ-----FLEPMQVPPGEFFRPRKKEVEQLDS-KDFLGRKPVISSIIPNDEYIGPEPLRPOK 224

[Xtro-noxal]/1-580 148 --LQDGR-NAKLDWALDQVQRG-----LLQPMVPEGEFFRPRKKEVEQLDS-VDFLGRKPVISSIIPNDEYIGPEPLRPOK 222

[Bflo-Noxal]/1-515 149 QKIKLEPR-HNVIDRALESIDRHQ-----TFQIEMPSNVFLRPAATSIIQNLEK-KDYLGRKAVSSITDRDDFSGVEPLRPH 225

[Acar-noxal]/1-545 175 EKLKTGPR-HSKIDKAMASILKQR-----FFEPVIVPEGLFRNEKHVAQLEK-KDYLGRKATVVASIDKDFAGFAPLQQA 251

[Cint-Noxal]/1-515 235 QQPE-----K-----EELFFINAG-----QS-----SHSIVPPPL 259

[Hsap-NOXA1]/1-476 226 PGANHDA-----RSLIMDSPRAGTHQG-----PLDAE-----TEVGADRCTSTAY 265

[Mmus-Noxal]/1-436 225 EHAGHQ-----S-----SSMCGH--- 238

[Drex-noxal]/1-269 222 FEYWININVQNLQTLQTIYDKKGNAPSKGVSFPCALCTFFFSNYLKI----- 269

[Ggal-NOXA1]/1-509 225 QGF-----YEPS-----ADSVDPRESGYRVLSHYYPGTEKLAVKASSLVFVLRGANGWATAIHDGQKLIPTSL 291

[Xtro-noxal]/1-580 223 PGF-----YEP-----RDAMQCREAGYRNVVHYYPENSNEVAVKANSVLVFLNK-DGDWATAIHDGQKLIPTSL 288

[Bflo-Noxal]/1-515 226 PKTPLFSC-----TPKGTMIQLEGTPHKVRDHIENSAAELEVHVGMVFAAAQ-EEGCVSVSFYMKVCLFVCLC 294

[Acar-noxal]/1-545 252 SDPPPRPK-----TP-ETLRLMLGQPHRMLYEFTPETANELQVLPGNIVFVLKKEKDNWATVVFNGKKGIVPCNY 320

[Cint-Noxal]/1-515 260 PSV-----APPR-----TRSNPPTLPPFVPPGNSSPKPKPEVKDLT-----KLPKPKPLPLD----- 307

[Hsap-NOXA1]/1-476 266 QEQ-----RPQVEQVGK-----QALSPGLPAM----- 288

[Mmus-Noxal]/1-436 239 -----T-----SPGLYDSSLAS----- 250

[Drex-noxal]/1-269 ----- 269

[Ggal-NOXA1]/1-509 292 LEPAS-----KMDKWKIGD-----GILPPLPAQVPPSRLHVKQTPDSPGEEVNSANDSGSQV----- 342

[Xtro-noxal]/1-580 289 LEPTNPP-----KADIKKMN-----GILPPLPKMTPPTPRPNVPRGMEP-----LTGVQAGAVPPQAGGAAEPYKIKALPVGMEPIV 361

[Bflo-Noxal]/1-515 295 MEVHVGNMVFVAAQEEGWCSDV--SKVPEPPRSKPPQPEAPIS----- 336

[Acar-noxal]/1-545 321 LEPME-----MLNQSTIWKENDDDLIDPEPSSIAAPERPTR--R----- 357

[Cint-Noxal]/1-515 308 -KKLAMPKP-----IPKPKANKALSSPTMSPKSSPKGRSPPVPRPAK-----SVNSYLQCSLSLSLSL 364

[Hsap-NOXA1]/1-476 289 -----G-GPGPGPCE--DPAGAGG--AGAGGSEPLVTVVQC--AFTVAL 326

[Mmus-Noxal]/1-436 251 -----R-RPQPGPSE--VSSGSEG--AATKDEPSLTVTVQC--HFTVPL 288

[Drex-noxal]/1-269 ----- 269

[Ggal-NOXA1]/1-509 343 DFES-----PLTHREA-----SSSTRPAVLRVRC--ECTVVV 373

[Xtro-noxal]/1-580 362 EVAVPVQRSVPTKRETGNVPLGNDASLVEDAGPTIKPKGES-APEPGFPPTRTGPDNGMATPVPTDDDKLVLSVHA--EFTVM 445

[Bflo-Noxal]/1-515 337 -----PPARPPPPRPPSLADMPVVKVHTDSTYVAI 369

[Acar-noxal]/1-545 358 -----PPGQKQV--PEPDSSAPYIIRVHY--KYTVL 385

[Cint-Noxal]/1-515 365 PKMKIAPHDNFLIELSSKLDHLVKALVAPNFSNDNYQMTLATIGAAQE---I-TSSTWRETYLDAVRSK-KLSI--NITPLRSKELPK 444

[Hsap-NOXA1]/1-476 327 RARRGADLSSIRALLGQALPHQA-----QLGQLSYLAPGEDGHVWPVPEEESLQAWQDAAACPRGLQLQCR--GAG-- 396

[Mmus-Noxal]/1-436 289 KVPRGTGLSSFTLLAQAALHQT-----QTGQLSYKAPGEERSWIPISTEESLQSIWRNVVPGGGLQLQCR--GVW-- 358

[Drex-noxal]/1-269 ----- 269

[Ggal-NOXA1]/1-509 374 RAGEVPSVPAIRALLRERFQQA-----ERGLSYRHLDG-KELGAVSGEEDLEKMQQLTDGR--ITLCCQDSDSHS-- 443

[Xtro-noxal]/1-580 446 TVSKAITYPELQALREELRKHG-----EQMANHLSTRDPES-RGLTPTVGTGSKDWQEVLLKSRANQ--VTLCKECKTLLCA-- 517

[Bflo-Noxal]/1-515 370 RSKTGAISRLITVMVANKFEMSE-----DVVTWLYKKEGD-EDMTEITKDDMDREAWSTVREGQ--LTLWLKDRKVGQSLISK 444

[Acar-noxal]/1-545 386 QVSPELSYSLLDKVCKKLELSP-----QHTTLYSRLTDN-AELVPL-SEDKMETLWQAEENNCC--LTLWCSQSEMGKDDLST 459

[Cint-Noxal]/1-515 445 TPKPTEPNGSNIQRPAITEAALKPAWAKKPNQWPPAPPEADADIVYDANNAASLIPEANEDNIYAEAVFGV----- 515

[Hsap-NOXA1]/1-476 397 -----GRPVLY-----QVY-----AQHSYSAQGPED--LGFRRQDGTVDVLCVVDQAWLEGHCDGRIGIFPKCFVVPAGPRMS 461

[Mmus-Noxal]/1-436 359 -----GRPVLY-----QVY-----AQYNYRAQRPED--LDFHQDGTVDVLCVVDQAWLEGHCDGRIGIFPKCFVVPAGAYYE 423

[Drex-noxal]/1-269 ----- 269

[Ggal-NOXA1]/1-509 444 -----GRPILY-----RML-----AQHSYSAQGPED--LEFSKGDVLDLISEVNEVDWLEGHCDGRIGIFPKCFATQTSAAAF 508

[Xtro-noxal]/1-580 518 -----GRPVLY-----RMR-----AQYDYLQGPAD--LSFQQGLLISLSEVNGEWELEGHCDGRIGIFPKCFVVPAGPRMS 580

[Bflo-Noxal]/1-515 445 Y-LEDD--KEGVSPMQFS-----KVV-----ALHDEYASEPGD--LGFMEGDVITIMSQVNEVDWLEGRSRGNVIGIPASYSYVWPKD-- 515

[Acar-noxal]/1-545 460 E-NGEEAPEKTEKDMEAN-----QVY-----ARYSYEASQPEE--LEFQKGETILVLAEVNAEWELEKCNKGIIPKSYVEEYMSQDP 535

[Cint-Noxal]/1-515 ----- 515

[Hsap-NOXA1]/1-476 462 GAPGRLPPRSQQGDQP----- 476

[Mmus-Noxal]/1-436 424 AMLVLGPQ--PGDQN----- 436

[Drex-noxal]/1-269 ----- 269

[Ggal-NOXA1]/1-509 509 P----- 509

[Xtro-noxal]/1-580 ----- 580

[Bflo-Noxal]/1-515 ----- 515

[Acar-noxal]/1-545 536 PCEEQQTQTQ----- 545

Figura 29. Alineamiento múltiple de la secuencia global de Noxa1. Se muestra el alineamiento de la secuencia de la proteína de Noxa1 de *Danio rerio* (*Drer*), *Homo sapiens* (*Hsap*), *Branchiostoma floridae* (*Bflo*), *Mus musculus* (*Mmus*), *Anolis carolinensis* (*Acar*), *Gallus gallus* (*Ggal*), *Xenopus tropicalis* (*Xtro*) y *Ciona intestinalis* (*Cint*). Las columnas del alineamiento están resaltadas en color azul fuerte donde el 100% de las secuencias son idénticas. En azul claro se encuentran resaltadas las columnas donde al menos el 50% de las secuencias son idénticas.

```

[Drer-Noxa1]/1-269  1 -MLYIELIPLRLEDAVKAIDIRDWQGALSKLNQITDHNCFITMFFVASTHIALGQVDLAIKAL  60
[Hsap-NOXA1]/1-476  1 MASLGDIVPAWHLGAQAVDRGDWAPALHLFSGVPAPPARLCFENAGCVHLLAGDPEAALRAF  61

[Drer-Noxa1]/1-269  61 DRVIAKDSCLAVGFFORSAVHMMANRLEEALSDCIWAQKYMRENPVIDYKQLGLFYKLYSW  121
[Hsap-NOXA1]/1-476  62 DQAVTKDTCMAVGFFQRGVANFQLARFQEALSDFWLALQLRGHAAIDYTLGLRFLKQAW  122

[Drer-Noxa1]/1-269  122 QVLYNAAAVHSRLQQWDKARDILLAASQERGAGRSNLIDTALEAISEKDVLEPLLLPEGEV  182
[Hsap-NOXA1]/1-476  123 EVLHNVAASAQCQLGLWTEAASSIREAMSKWPEGSLNGLDSALDQVQFRGSLPPRQVPRGEV  183

[Drer-Noxa1]/1-269  183 FRSRKLEVDQLKPRDFLGEAKVIQIFTLYCSFNACSSAEFEYWININVQNL-----LQ  236
[Hsap-NOXA1]/1-476  184 FRPHRWHLKHLEFVDFLGKAKVVASAIPD-----DQGWGVRPQQPQPGGANHDARS  234

[Drer-Noxa1]/1-269  237 TIYDKKGN----APSKGV----SMFCPS-----  256
[Hsap-NOXA1]/1-476  235 LIMDSPRAGTHQGLDAETEVGADRCTSTAYQEQRPPQVEQVQKQAPLSPGLPAMGGPGPGP  295

[Drer-Noxa1]/1-269  257 -----ALCTFVFSNYLKI-----  269
[Hsap-NOXA1]/1-476  296 CEDPAGAGGAGAGGSEPLVTVTVQCARTVALPARRGADLSSLRALGQALPHQAQLGQLSY  356

[Drer-Noxa1]/1-269  -----  417
[Hsap-NOXA1]/1-476  357 LAPGEDGHWVPIPEEESLQRAWQDAAACPRGLQLQCRGAGGRPVLYQVVAQHSYSAQGPED  417

[Drer-Noxa1]/1-269  -----  476
[Hsap-NOXA1]/1-476  418 LGFRQGDVTVDVLCFVDQAWLEGHCDGRIGIFPKCFVVPAGPRMSGAPGRLPRSQQGDQP  476

```

Figura 30. Alineamiento Noxa1. Se muestra el alineamiento de la secuencia de la proteína de Noxa1 de *Danio rerio* (*Drer*) y *Homo sapiens* (*Hsap*). Las columnas del alineamiento están resaltadas donde los aminoácidos de ambas secuencias son idénticos. Identidad: 33.59%.

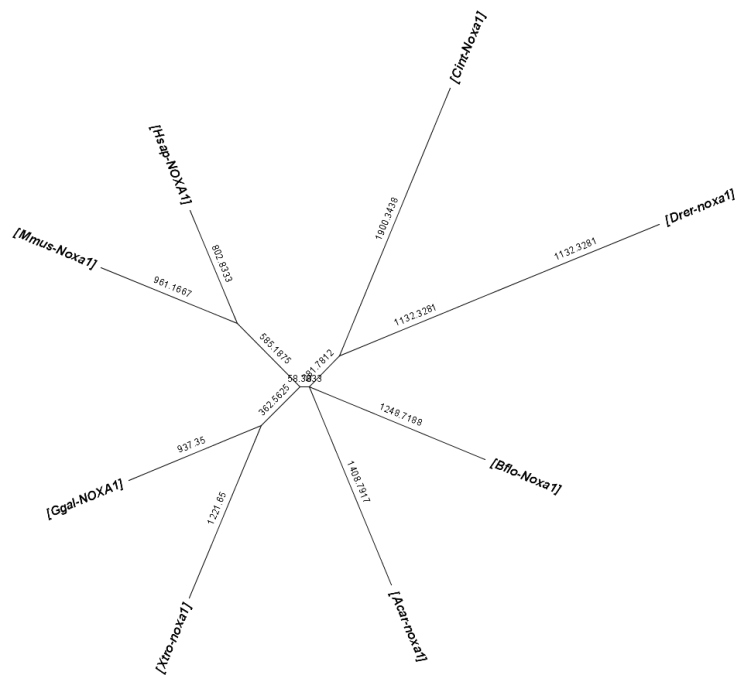


Figura 31. Cladograma de Noxa1. Cladograma generado con el método de clustering “*neighbor joining*” muestra la cantidad de cambios entre las secuencias de la proteína Noxa1 de los organismos *H. sapiens* (*Hsap*), *M. musculus* (*Mmus*), *D. rerio* (*Drer*), *B. floridae* (*Bflo*), *C. intestinalis* (*Cint*), *X. tropicalis* (*Xtro*), *G. gallus* (*Ggal*) y *A. carolinensis* (*Acar*).

```

[Ggal-NOX01]/1-388      1 -----MGD--TF-- 5
[Cint-Nox01]/1-461     1 -----MVM--ET-- 5
[Bflor-Nox01]/1-665   1 MAEARTNSVREAMDTLQEISRLNLTGLDSETLSICVRLIEQGVNPEALASVIKELRPRETA 60
[Mmus-Nox01]/1-349     1 -----MASP-FH-- 6
[Hsap-NOX01 isofa]/1-370 1 -----MAGP-RY-- 6
[Hsap-NOX01 isofb]/1-371 1 -----MAGP-RY-- 6
[Hsap-NOX01 isofc]/1-376 1 -----MAGP-RY-- 6
[Hsap-NOX01 isofd]/1-375 1 -----MAGP-RY-- 6
[Drer-noxola]/1-469    1 -----MEEQ-FH-- 6
[Drer-noxolb]/1-477    1 -----MSDP-EF-- 6
[Xtro-nox01]/1-448     -----
[Acar-nox01]/1-274     -----

[Ggal-NOX01]/1-388      6 ----IRHIELLGYEKRFPPSQHYVYMFVKMNDLSEKLI-----YRFTDIY 48
[Cint-Nox01]/1-461     6 ----LKSVKVIDIEKPRRLPSKHVYVYLIEIKWSDGSLCTV-----GRRFSAFF 48
[Bflor-Nox01]/1-665   61 ALKHVSLSPKWMGR---L---QVQADMGGSSWSLRSDVSDSGRRRLVDVQVGVVEKRYSPF 114
[Mmus-Nox01]/1-349     7 ----PVSAAHVAL---VQMDRLQTFAFSVCWSDNSDTFV-----PRSWDEF 46
[Hsap-NOX01 isofa]/1-370 7 ----PVSVQGAAL---VQIKRLQTFAFSVMWSDGSDTFV-----PRSWDEF 46
[Hsap-NOX01 isofb]/1-371 7 ----PVSVQGAAL---VQIKRLQTFAFSVMWSDGSDTFV-----PRSWDEF 46
[Hsap-NOX01 isofc]/1-376 7 ----PVSVQGAAL---VQIKRLQTFAFSVMWSDGSDTFV-----PRSWDEF 46
[Hsap-NOX01 isofd]/1-375 7 ----PVSVQGAAL---VQIKRLQTFAFSVMWSDGSDTFV-----PRSWDEF 46
[Drer-noxola]/1-469    7 ----PVNIQLLGV---MQKEMTKLYMTITVLSWSDGMEITV-----YRSLEDFK 46
[Drer-noxolb]/1-477    7 ----PVDVHLIGV---MKKKEKDKYMTSVLWSDQSELIY-----YRSLPDF 46
[Xtro-nox01]/1-448     1 -----MFSILWSDHNEILI-----YPTFEDEF 22
[Acar-nox01]/1-274     1 -----MAL---LKHGKERICMFSVSWSDHNVILI-----YRTEEF 34

[Ggal-NOX01]/1-388      49 EFHKALKEMFPFIESGDINAENRIIPHLPAKWF----DGQR---STQSRQGTLAETCYT 100
[Cint-Nox01]/1-461     49 MMHMTLEKFFLEGGQKDPSPRILPFLPGKILF----KRSHTRDVTTLKRLGSISETCES 103
[Bflor-Nox01]/1-665   115 RHHKQLKEMFPVEAGQFVVEEVLKPKFNPKP---SSPGLGRKFSVGRFACVQKDLQGGVQD 172
[Mmus-Nox01]/1-349     47 QLQKTLKHTFFVEAGLLRSEQVLPKLP----DAPLLTRGHTGRGLVRLRLDITVQCA 101
[Hsap-NOX01 isofa]/1-370 47 QLK-TLKETFFVEAGLLRSDRVLKPL----DAPLLGRVGRTRSGLARLQLETSRR 100
[Hsap-NOX01 isofb]/1-371 47 QLK-TLKETFFVEAGLLRSDRVLKPL----DAPLLGRVGRTRSGLARLQLETSRR 101
[Hsap-NOX01 isofc]/1-376 47 QLK-TLKETFFVEAGLLRSDRVLKPLGQASLDAPLLGRVGRTRSGLARLQLETSRR 106
[Hsap-NOX01 isofd]/1-375 47 QLK-TLKETFFVEAGLLRSDRVLKPLGQASLDAPLLGRVGRTRSGLARLQLETSRR 105
[Drer-noxola]/1-469    47 KMRQLTKKFFPSN-PFKRSARIVPEFKEVRVQK---SLQKWSGSKSVLRPMKALEETCGQ 102
[Drer-noxolb]/1-477    47 TLHRQLKHKFFVEK-PYRKEDVLRFRGAQVMKS---TFQLKGLDKSVSRRLNLEKTCSS 102
[Xtro-nox01]/1-448     23 KLNRLKTKFFLEAGLFRKSDNLLPKLKDVP-I---FRKRTTNRFFIERLRLLEKTSQE 77
[Acar-nox01]/1-274     35 KLHETLKRKFFIDRGLLRNSDETIKFKPGIHGI---LWKNQKGSRYLKNLQMEVVCQQ 90

[Ggal-NOX01]/1-388      101 LVNLPHKISRCRHVVSFEVPRDDMNEVTDSEQIRKPEVFLPKDAK-----K---- 147
[Cint-Nox01]/1-461     104 LLLLEPHISQCDTILRPFETSSSDIADTKERTQST AVS Q 143
[Bflor-Nox01]/1-665   173 LLRLDSKIVLSPLFGQFFAPSDDDGRSSQNSEKRQKVTMIIPTEAA-----EPEQRSP 226
[Mmus-Nox01]/1-349     102 LLATSEHILRSSLALHGFFVFKPLDCEPM---LPPGSLVILPTPEE-----PLSQ 147
[Hsap-NOX01 isofa]/1-370 101 LLATAERVARSPITITGFFAPQPLDGEPA---LPPGSRVILPTPEE-----QPLSR 147
[Hsap-NOX01 isofb]/1-371 102 LLATAERVARSPITITGFFAPQPLDGEPA---LPPGSRVILPTPEE-----QPLSR 148
[Hsap-NOX01 isofc]/1-376 107 LLATAERVARSPITITGFFAPQPLDGEPA---LPPGSRVILPTPEE-----QPLSR 153
[Hsap-NOX01 isofd]/1-375 106 LLATAERVARSPITITGFFAPQPLDGEPA---LPPGSRVILPTPEE-----QPLSR 152
[Drer-noxola]/1-469    103 LKSDPQVCRSSELIQFLPKAHDGNAD---FAKNCIVIMPSDVTLG-----SSKAE 151
[Drer-noxolb]/1-477    103 LLQCDTTVSNSEVIQFLPTEQELPE---YTQNSVMILQSDNIPTAHGGPDLQKSL 158
[Xtro-nox01]/1-448     78 LLRTDGTKISQCDLVLFKFFTPSNNDGNPK---FPENSLVMMTSDSK---DQKEQKPL 128
[Acar-nox01]/1-274     91 MLKTKPQISRGEDVVFHFEARSQDLDD---FPQNSSITFFSETG-----GKKGGL-- 139

[Ggal-NOX01]/1-388      148 -NTSDITGPIVLQTYRAIADYEKS--SKSEMAVKAGDAVDVEKSETGWWF-CQLKTKRG 203
[Cint-Nox01]/1-461     144 -IIQDITGPIELETYIAIADYKAE--AKTQISLHSGETVEVEKSESGWLVNCTYGSNG 200
[Bflor-Nox01]/1-665   227 CDVEISAPLFDLDSYRAVDYKAV--SKGELSLTAGEVCDVIHTTSLGWWLVENASCERG 284
[Mmus-Nox01]/1-349     148 PRGSLDIHSLEAQSIPCVQPFHTLDIRDRPFHTKAQELDILLRHPSGWLVENKQDQVA 207
[Hsap-NOX01 isofa]/1-370 148 AAGRLSIHSLEAQSRLCLQPFCQTRDRPFFQAQAQESLDVLLRHPSGWLVENEDRQTA 207
[Hsap-NOX01 isofb]/1-371 149 AAGRLSIHSLEAQSRLCLQPFCQTRDRPFFQAQAQESLDVLLRHPSGWLVENEDRQTA 208
[Hsap-NOX01 isofc]/1-376 154 AAGRLSIHSLEAQSRLCLQPFCQTRDRPFFQAQAQESLDVLLRHPSGWLVENEDRQTA 213
[Hsap-NOX01 isofd]/1-375 153 AAGRLSIHSLEAQSRLCLQPFCQTRDRPFFQAQAQESLDVLLRHPSGWLVENEDRQTA 212
[Drer-noxola]/1-469    152 SNS-GVTQPFVTETRYCIANYETKTKNRPKVEVDETVDVLIKDKQKWWLVENESKHLA 210
[Drer-noxolb]/1-477    159 SNG-NVTQPFVSKAYQCVAPYETKTKNPKPKVAIGERLDVLIKDRAGWLVENEDKHLA 217
[Xtro-nox01]/1-448     129 PEA-PAIHPIVSQQYICMEDYETKTKNRPKVKRHELGVLIKENTGWWLVENEEKHLA 187
[Acar-nox01]/1-274     140 -AL-GITEPIVCPFTFCVAPFETIDLKDGAERALRGEGLVLLKDKTGWLVENENCKQLA 197

```

```

[Ggal-NOXO1]/1-388      204 WVPAAAYLEPMDGPDSE-----EQE--PNYAGELYMVQKSYTAVEE 242
[Cint-Noxol]/1-461     201 WVPAGAYLEKEDGSEEDL-----VTEKAAVGGQGTWVATSHYDATSN 241
[Bflor-Noxol]/1-665    285 WVPASHLEADTHTTTTKLGTQSVGSPATQPDHEAGSMSESQGEAPIQLYVTTTPYTATED 344
[Mmus-Noxol]/1-349     208 WFPAPYLEEVATCQGQ-----ES----GLALQSGGRQFCTTQAYEGSRS 247
[Hsap-NOXO1 isofa]/1-370 208 WFPAPYLEEAAPGQGR-----EG----GPSLGSSTGPFQFCASRAYESSRA 247
[Hsap-NOXO1 isofb]/1-371 209 WFPAPYLEEAAPGQGR-----EG----GPSLGSSTGPFQFCASRAYESSRA 248
[Hsap-NOXO1 isofc]/1-376 214 WFPAPYLEEAAPGQGR-----EG----GPSLGSSTGPFQFCASRAYESSRA 253
[Hsap-NOXO1 isofd]/1-375 213 WFPAPYLEEAAPGQGR-----EG----GPSLGSSTGPFQFCASRAYESSRA 252
[Drer-noxola]/1-469    211 WFPAPYLEEAEMADG-----PDEMDSVTFVATKAYKAMNS 248
[Drer-noxolb]/1-477    218 WFPAPFLELCDGEEEE-----DE--DEYNSVTCMSLYCATRCYTSKKE 259
[Xtro-noxol]/1-448     188 WFPAPYLKVDNSETL-----DS----GTSEDEGVLYYAAKAYEAMNS 226
[Acar-noxol]/1-274     198 WFPASFLEETED---E-----SS----TEESKGLLYLTSVEAQEE 233

[Ggal-NOXO1]/1-388      243 DELTLKEGDTIEVIEKLLDWWWVIRKDETTGYYP SMYLQKSGEVNSPE----- 290
[Cint-Noxol]/1-461     242 DEISFPMGAALEVLCVNLEGWLLAPYNSMEGWVFGSYLEKSRRTYSWATDTPATESV--P 299
[Bflor-Noxol]/1-665    345 DELSFCAGAVLQVLCRTDDGWLLARYSGQDGFV FAMFLRPYNTPYVHMVAATSKLSM--V 402
[Mmus-Noxol]/1-349     248 DELSVPSGARVHVLETSDRGWWLCRYNGRTGLLPAMS LQPEGLGSLGPRPGF---PD--- 301
[Hsap-NOXO1 isofa]/1-370 248 DELSVPAGARVRVLETSDRGWWLCRYGDRAGLLPAVL RPEGLGALLSGTGF---RG--- 301
[Hsap-NOXO1 isofb]/1-371 249 DELSVPAGARVRVLETSDRGWWLCRYGDRAGLLPAVL RPEGLGALLSGTGF---RG--- 302
[Hsap-NOXO1 isofc]/1-376 254 DELSVPAGARVRVLETSDRGWWLCRYGDRAGLLPAVL RPEGLGALLSGTGF---RG--- 307
[Hsap-NOXO1 isofd]/1-375 253 DELSVPAGARVRVLETSDRGWWLCRYGDRAGLLPAVL RPEGLGALLSGTGF---RG--- 306
[Drer-noxola]/1-469    249 DELSVELGSVLEVLCKSDNGWLVRYNPKAGYVFSMYL QPHNNPRIILKSTQKEISRSTL 308
[Drer-noxolb]/1-477    260 DELSLSIGAVVELLCRSNDGWWLVRYNNTAGYVFSMYL KLYSSPSFGLQTLQRKLHSSSTI 319
[Xtro-noxol]/1-448     227 DEVSITVGLVLEVIKSNNGWLLIRYNGKAGYVFSMYL KPYRTYQQQLQMSIQGKFTS--TP 285
[Acar-noxol]/1-274     234 DELSVKSEVLVEALEKPDGWWLVWYNGERGIRVGLPPAV----- 274

[Ggal-NOXO1]/1-388      291 -----KSG-----LRNHNI PPRSTIPNAKSIHNKPKQISQE-----T 324
[Cint-Noxol]/1-461     300 GAESVVKKST-----LALVKPPPKRATIRRTLKVTR-GQDSIKEK-----H 339
[Bflor-Noxol]/1-665    403 NLLTAEK-----QQRSMNNSRKGSCSDVSR---MSLLGE-----ELSPGK 439
[Mmus-Noxol]/1-349     -----
[Hsap-NOXO1 isofa]/1-370 -----
[Hsap-NOXO1 isofb]/1-371 -----
[Hsap-NOXO1 isofc]/1-376 -----
[Hsap-NOXO1 isofd]/1-375 -----
[Drer-noxola]/1-469    309 DLAQ-----LRHPQTLQ-DSRLPELSRSQG---NLLLQPAETDIMDKQKRSRL 352
[Drer-noxolb]/1-477    320 NLST-----SNSPKPEPQNRINRFLKSSS---LEILSEPQSHFTDQVQRQES 364
[Xtro-noxol]/1-448     286 NLFKAASNLSLNRVTVGRPPQQSPDM-----GSNG---D--QASRTPMLLDRPKRSRL 333
[Acar-noxol]/1-274     -----

[Ggal-NOXO1]/1-388      325 YRPNRSKK-----YMQ-----N---PRNMRGNLQ--MKDIISEKNEQ---- 355
[Cint-Noxol]/1-461     340 DE--DNL-----YIT-----LFDSDSSIEDGLSFKAGQIVK-VIEQSDNG 376
[Bflor-Noxol]/1-665    440 GR-----AGSDISSIGLTDGVS--EVKNSIERDT-MRKGDNFERADILSKR-E----- 484
[Mmus-Noxol]/1-349     302 -----SAGA-----DKV----- 308
[Hsap-NOXO1 isofa]/1-370 302 -----GDDP-AGEARGFPEP----- 315
[Hsap-NOXO1 isofb]/1-371 303 -----GDDP-AGEARGFPEP----- 316
[Hsap-NOXO1 isofc]/1-376 308 -----GDDP-AGEARGFPEP----- 321
[Hsap-NOXO1 isofd]/1-375 307 -----GDDP-AGEARGFPEP----- 320
[Drer-noxola]/1-469    353 GRLPDAARANPPSIRVEFAESGKQSSQSDDEEF-S-DDSS--FSCSDSLDRS-D--A-E 404
[Drer-noxolb]/1-477    365 GS-----FSDDGTDG-S-FSSSDTSMSPSMSSS-EEDE-G 396
[Xtro-noxol]/1-448     334 YGLPSNIQRALPSLASGLNGQKG-----L-G-GGSNQTLLST-DWFKDKP-KQNTTE 380
[Acar-noxol]/1-274     -----

[Ggal-NOXO1]/1-388      356 -----EENKSKAQFAVPPPP--SKDLIMNRCCTES 382
[Cint-Noxol]/1-461     377 WWLA-----TLN-GAEGWVP--SSYLESKITTEAE PARNSNPFGFSAKMVLPKIET 423
[Bflor-Noxol]/1-665    485 --FQPSSKFDLPKITISI-ADSAADCQAHSQDTRQDTPNSPRI PPRP--SEQEIQRCISPL 539
[Mmus-Noxol]/1-349     309 -----AEDRTIPPVVVTRP--CMSAQSRCCSI 334
[Hsap-NOXO1 isofa]/1-370 316 -----SQATAPPPTVTRP--SPGAIQSRCCTV 341
[Hsap-NOXO1 isofb]/1-371 317 -----SQATAPPPTVTRP--SPGAIQSRCCTV 342
[Hsap-NOXO1 isofc]/1-376 322 -----SQATAPPPTVTRP--SPGAIQSRCCTV 347
[Hsap-NOXO1 isofd]/1-375 321 -----SQATAPPPTVTRP--SPGAIQSRCCTV 346
[Drer-noxola]/1-469    405 ECFRRSRTPTA--ETLTPESAGGITASRSDPCLNKM PSTKVPVPPR--AVQDLTRCTTV 460
[Drer-noxolb]/1-477    397 PLIRQDKHEADSSDALSSGSSPVNSD--TGHPMKGVGAPKVP PPRP--QTRQLQRCTTY 452
[Xtro-noxol]/1-448     381 LDFFGQE-----QPNSPTTMPEPPAISYKPHTE LMPQRP--KHHEILHRCITV 426
[Acar-noxol]/1-274     -----

```



```

[Ggal-NOXO1]/1-388      383 TR-----RK---IM----- 388
[Cint-Noxol]/1-461     424 GAGRSYDPGQAKQK---LIGS-P-LKLEKGERNTPFQLQAK--- 461
[Bflor-Noxol]/1-665    540 TQRRLLSTPSTATSDDDY-----TSVEGEALGAVWTGRQKDSGLGIVNLSFEPDY 591
[Mmus-Noxol]/1-349     335 TRRALGQEQGTRV-PR----- 349
[Hsap-NOXO1 isofa]/1-370 342 TRRALERRPRRQGRPRGCVDSVPHTTEQ----- 370
[Hsap-NOXO1 isofb]/1-371 343 TRRALERRPRRQGRPRGCVDSVPHTTEQ----- 371
[Hsap-NOXO1 isofc]/1-376 348 TRRALERRPRRQGRPRGCVDSVPHTTEQ----- 376
[Hsap-NOXO1 isofd]/1-375 347 TRRALERRPRRQGRPRGCVDSVPHTTEQ----- 375
[Drer-noxola]/1-469    461 TRKMMQRNS----- 469
[Drer-noxolb]/1-477    453 TRKAALATSVRLAP-----E---RQVMVDGGRA----- 477
[Xtro-noxol]/1-448     427 TKNALQKTSELIDN-----SVPAPQIS----- 448
[Acar-noxol]/1-274     -----

[Ggal-NOXO1]/1-388      -----
[Cint-Noxol]/1-461     -----
[Bflor-Noxol]/1-665    592 DHNEVCLDRGDNFTFSSITSVQSAFSAFSKSTCWLDQEKQTQGEPSNTVAATSNGREGAKF 651
[Mmus-Noxol]/1-349     -----
[Hsap-NOXO1 isofa]/1-370 -----
[Hsap-NOXO1 isofb]/1-371 -----
[Hsap-NOXO1 isofc]/1-376 -----
[Hsap-NOXO1 isofd]/1-375 -----
[Drer-noxola]/1-469    -----
[Drer-noxolb]/1-477    -----
[Xtro-noxol]/1-448     -----
[Acar-noxol]/1-274     -----

[Ggal-NOXO1]/1-388      -----
[Cint-Noxol]/1-461     -----
[Bflor-Noxol]/1-665    652 VRNNRLWMTLKLKR----- 665
[Mmus-Noxol]/1-349     -----
[Hsap-NOXO1 isofa]/1-370 -----
[Hsap-NOXO1 isofb]/1-371 -----
[Hsap-NOXO1 isofc]/1-376 -----
[Hsap-NOXO1 isofd]/1-375 -----
[Drer-noxola]/1-469    -----
[Drer-noxolb]/1-477    -----
[Xtro-noxol]/1-448     -----
[Acar-noxol]/1-274     -----

```

Figura 32. Alineamiento múltiple de la secuencia global de Noxo1. Se muestra el alineamiento de la secuencia de la proteína de Noxo1 de *Danio rerio* (*Drer*), *Homo sapiens* (*Hsap*), *Branchiostoma floridae* (*Bflo*), *Mus musculus* (*Mmus*), *Anolis carolinensis* (*Acar*), *Gallus gallus* (*Ggal*), *Xenopus tropicalis* (*Xtro*) y *Ciona intestinalis* (*Cint*). Las columnas del alineamiento están resaltadas en color azul fuerte donde el 100% de las secuencias son idénticas. En azul claro se encuentran resaltadas las columnas donde al menos el 50% de las secuencias son idénticas. Se incluyeron todas las secuencias reportadas de *Homo sapiens* para compararlas con las secuencias proteicas de los genes duplicados Noxo1a y Noxo1b de *Danio rerio*.

[Hsap-NOX01 iso fa]/1-370 1 MAGPRYPVSVQGAALVQIKRLQTFASFVWSDGSDTFVRRSWDEFRLQK-TLKETFFVEAG 60
[Hsap-NOX01 iso fb]/1-371 1 MAGPRYPVSVQGAALVQIKRLQTFASFVWSDGSDTFVRRSWDEFRLQKTKLTKETFFVEAG 61
[Hsap-NOX01 iso fc]/1-376 1 MAGPRYPVSVQGAALVQIKRLQTFASFVWSDGSDTFVRRSWDEFRLQKTKLTKETFFVEAG 61
[Hsap-NOX01 iso fd]/1-375 1 MAGPRYPVSVQGAALVQIKRLQTFASFVWSDGSDTFVRRSWDEFRLQK-TLKETFFVEAG 60
[Drer-Nox01a]/1-469 1 MEEQPHFVNIQLLVGMQKEMTKLYMTTFLWSDGNEITVYRSLDFKKMHRQLKKKFFPSNP 61
[Drer-Nox01b]/1-477 1 MSDPRFPVDVHLIGVMKKEKDKKYMSTLWSDQSELIYVRSLRDFTLHRQLKKKFFVEKP 61

[Hsap-NOX01 iso fa]/1-370 61 LLRRSDRVLKLL----DAPLLGRVGRTSRGLARLQLLETYSRLLATAERVARSPPTITG 116
[Hsap-NOX01 iso fb]/1-371 62 LLRRSDRVLKLL----DAPLLGRVGRTSRGLARLQLLETYSRLLATAERVARSPPTITG 117
[Hsap-NOX01 iso fc]/1-376 62 LLRRSDRVLKLLGQASLDAPLLGRVGRTSRGLARLQLLETYSRLLATAERVARSPPTITG 122
[Hsap-NOX01 iso fd]/1-375 61 LLRRSDRVLKLLGQASLDAPLLGRVGRTSRGLARLQLLETYSRLLATAERVARSPPTITG 121
[Drer-Nox01a]/1-469 62 -FKRSARIVVEFKVEVRVQKSL---QKWSGSKSVLRMKALEEYCGQLLKSDPQVCRSSELIQ 118
[Drer-Nox01b]/1-477 62 -YRKEDVLERFQAQVMKSTF---QLKGLDKSVSLRNLEKYCSSLLQCDTTVSNPREVIQ 118

[Hsap-NOX01 iso fa]/1-370 117 FFAPQLDLEPALPPGSRVILPTPEEQPLSRA-----AGRLSIHSLEAQSRLRCLQFFC 169
[Hsap-NOX01 iso fb]/1-371 118 FFAPQLDLEPALPPGSRVILPTPEEQPLSRA-----AGRLSIHSLEAQSRLRCLQFFC 170
[Hsap-NOX01 iso fc]/1-376 123 FFAPQLDLEPALPPGSRVILPTPEEQPLSRA-----AGRLSIHSLEAQSRLRCLQFFC 175
[Hsap-NOX01 iso fd]/1-375 122 FFAPQLDLEPALPPGSRVILPTPEEQPLSRA-----AGRLSIHSLEAQSRLRCLQFFC 174
[Drer-Nox01a]/1-469 119 FLLEKAHDLNADFAMKNCIVIMP SDVTLG-----SSKAESNSGVTPFPVTEYRCIAMYE 172
[Drer-Nox01b]/1-477 119 FFLTEQEILPEYTONSVMILQSDNIPTAHGGPDLQKKSLSNGNVTQPFVSKAYQCVAPYE 179

[Hsap-NOX01 iso fa]/1-370 170 TQDTRDRPFQAQAQESLDVLLRHPSGWWLVENEDRQTAWFPAPYLEEAAPGQGR--EGGPS 228
[Hsap-NOX01 iso fb]/1-371 171 TQDTRDRPFQAQAQESLDVLLRHPSGWWLVENEDRQTAWFPAPYLEEAAPGQGR--EGGPS 229
[Hsap-NOX01 iso fc]/1-376 176 TQDTRDRPFQAQAQESLDVLLRHPSGWWLVENEDRQTAWFPAPYLEEAAPGQGR--EGGPS 234
[Hsap-NOX01 iso fd]/1-375 175 TQDTRDRPFQAQAQESLDVLLRHPSGWWLVENEDRQTAWFPAPYLEEAAPGQGR--EGGPS 233
[Drer-Nox01a]/1-469 173 TKDTKNRPFKVEVDETVDVLIKDKQKQWLVENESKHLAWFPAPYLEAEMADDG---PDE 229
[Drer-Nox01b]/1-477 180 TKDTKNRPFKVAIGERLDVLIKDRAGWLVENEDKHLAWFPAPYLELDCGEEEEEDEDEYNS 240

[Hsap-NOX01 iso fa]/1-370 229 LGSSGPQFCASRAVESSRADELSVPA GARVRVLETSDRGWLLCRVGDRAGLLPAVLRPEG 289
[Hsap-NOX01 iso fb]/1-371 230 LGSSGPQFCASRAVESSRADELSVPA GARVRVLETSDRGWLLCRVGDRAGLLPAVLRPEG 290
[Hsap-NOX01 iso fc]/1-376 235 LGSSGPQFCASRAVESSRADELSVPA GARVRVLETSDRGWLLCRVGDRAGLLPAVLRPEG 295
[Hsap-NOX01 iso fd]/1-375 234 LGSSGPQFCASRAVESSRADELSVPA GARVRVLETSDRGWLLCRVGDRAGLLPAVLRPEG 294
[Drer-Nox01a]/1-469 230 MDNESVFFYATKAMKAMNSDELSVELGSVLEVLQKSDNGWIVRVMRKAQYVFSMYLQPHN 290
[Drer-Nox01b]/1-477 241 VTCEMSLYCATRCTSKKEDLSLSI GAVVELQPSDNGWLVLRVMNTAGYVFSMYLKLYS 301

[Hsap-NOX01 iso fa]/1-370 290 LGALLSGTGFRGGDDPAGEAR--GFPEPSQ----- 317
[Hsap-NOX01 iso fb]/1-371 291 LGALLSGTGFRGGDDPAGEAR--GFPEPSQ----- 318
[Hsap-NOX01 iso fc]/1-376 296 LGALLSGTGFRGGDDPAGEAR--GFPEPSQ----- 323
[Hsap-NOX01 iso fd]/1-375 295 LGALLSGTGFRGGDDPAGEAR--GFPEPSQ----- 322
[Drer-Nox01a]/1-469 291 NPRILLKSTQKESRSTLDLAQLRHFQTLQ-DSRLPELSRSQGNLLQPAETDIMDKQSR 350
[Drer-Nox01b]/1-477 302 SPSFGLQTLQRKLHSSSTINLSTSNSEKPEPQRNRINRFLKSSSLEILSEPQSHFTDQVQRQ 362

[Hsap-NOX01 iso fa]/1-370 -----
[Hsap-NOX01 iso fb]/1-371 -----
[Hsap-NOX01 iso fc]/1-376 -----
[Hsap-NOX01 iso fd]/1-375 -----
[Drer-Nox01a]/1-469 351 SLGRLPDAARANPPSIRVEFAESGKQSSQSDDEEFSDSS--FSCSDSLDRSD--AEECF 407
[Drer-Nox01b]/1-477 363 ESGS-----FSDDGTFDFSSSDTTSMSPSMSSSEEDGLI 399

[Hsap-NOX01 iso fa]/1-370 318 -----ATAPPPTVTRPSPGAIQSRCTVTRPALE 347
[Hsap-NOX01 iso fb]/1-371 319 -----ATAPPPTVTRPSPGAIQSRCTVTRPALE 348
[Hsap-NOX01 iso fc]/1-376 324 -----ATAPPPTVTRPSPGAIQSRCTVTRPALE 353
[Hsap-NOX01 iso fd]/1-375 323 -----ATAPPPTVTRPSPGAIQSRCTVTRPALE 352
[Drer-Nox01a]/1-469 408 RRSRTPTA--ETLTPESAGGITASRSDPCLNKMPSTPKVPRPAVQDILTRCTVTRKMNQ 466
[Drer-Nox01b]/1-477 400 RQDKEADSSDSALSSGQSSPVNSD--TGHPMKGVGAKVPRPQTRILQRCTVTRKAAAL 458

[Hsap-NOX01 iso fa]/1-370 348 RRPRRQGRPRGCVDSVPHPTTEQ 370
[Hsap-NOX01 iso fb]/1-371 349 RRPRRQGRPRGCVDSVPHPTTEQ 371
[Hsap-NOX01 iso fc]/1-376 354 RRPRRQGRPRGCVDSVPHPTTEQ 376
[Hsap-NOX01 iso fd]/1-375 353 RRPRRQGRPRGCVDSVPHPTTEQ 375
[Drer-Nox01a]/1-469 467 RNS----- 469
[Drer-Nox01b]/1-477 459 ATSVRLAPERQVMVDGGRA---- 477

Figura 33. Alineamiento noxo1. Se muestra el alineamiento de la secuencia de las proteínas Noxo1a y Noxo1b de *Danio rerio* (*Drer*) y las isoformas reportadas en NCBI de NOXO1 de *Homo sapiens* (*Hsap*). Las columnas del alineamiento están resaltadas donde los aminoácidos son idénticos. Se muestran el alineamiento secuencias de cuatro isoformas reportadas de *H. sapiens* (isofa, isofb, isofc, isofd) y los dos genes duplicados de Noxo1 de *D. rerio* (Noxo1a y Noxo1b).

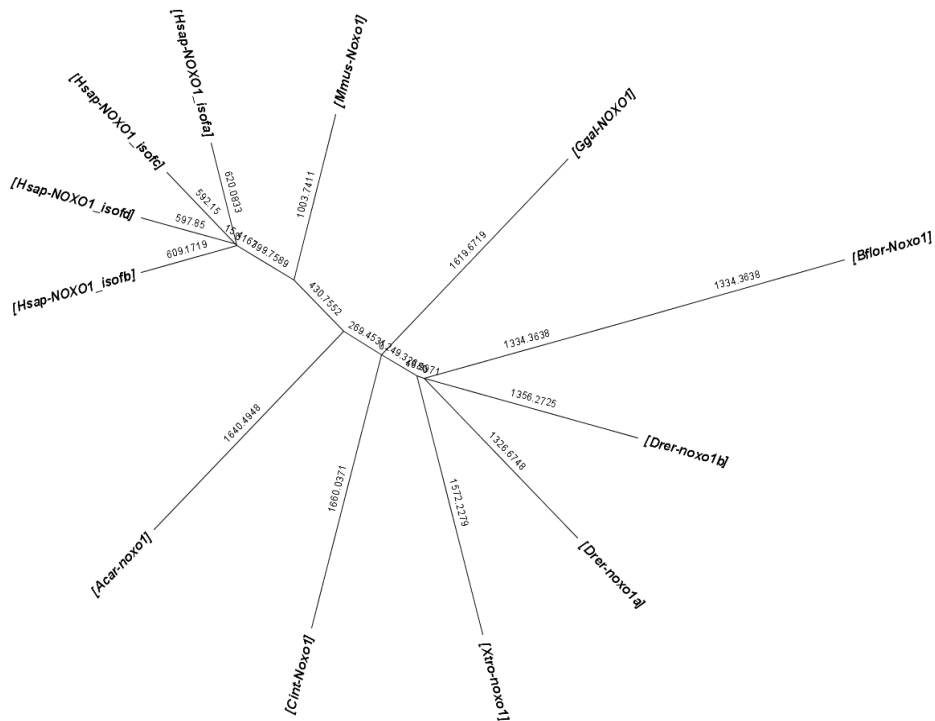


Figura 34. Cladograma de Noxo1. Cladograma generado con el método de clustering “neighbor joining” muestra la cantidad de cambios entre las secuencias de la proteína Noxo1 de los organismos *H. sapiens* (*Hsap*), *M. musculus* (*Mmus*), *D. rerio* (*Drer*), *B. floridae* (*Bflo*), *C. intestinalis* (*Cint*), *X. tropicalis* (*Xtro*), *G. gallus* (*Ggal*) y *A. carolinensis* (*Acar*).

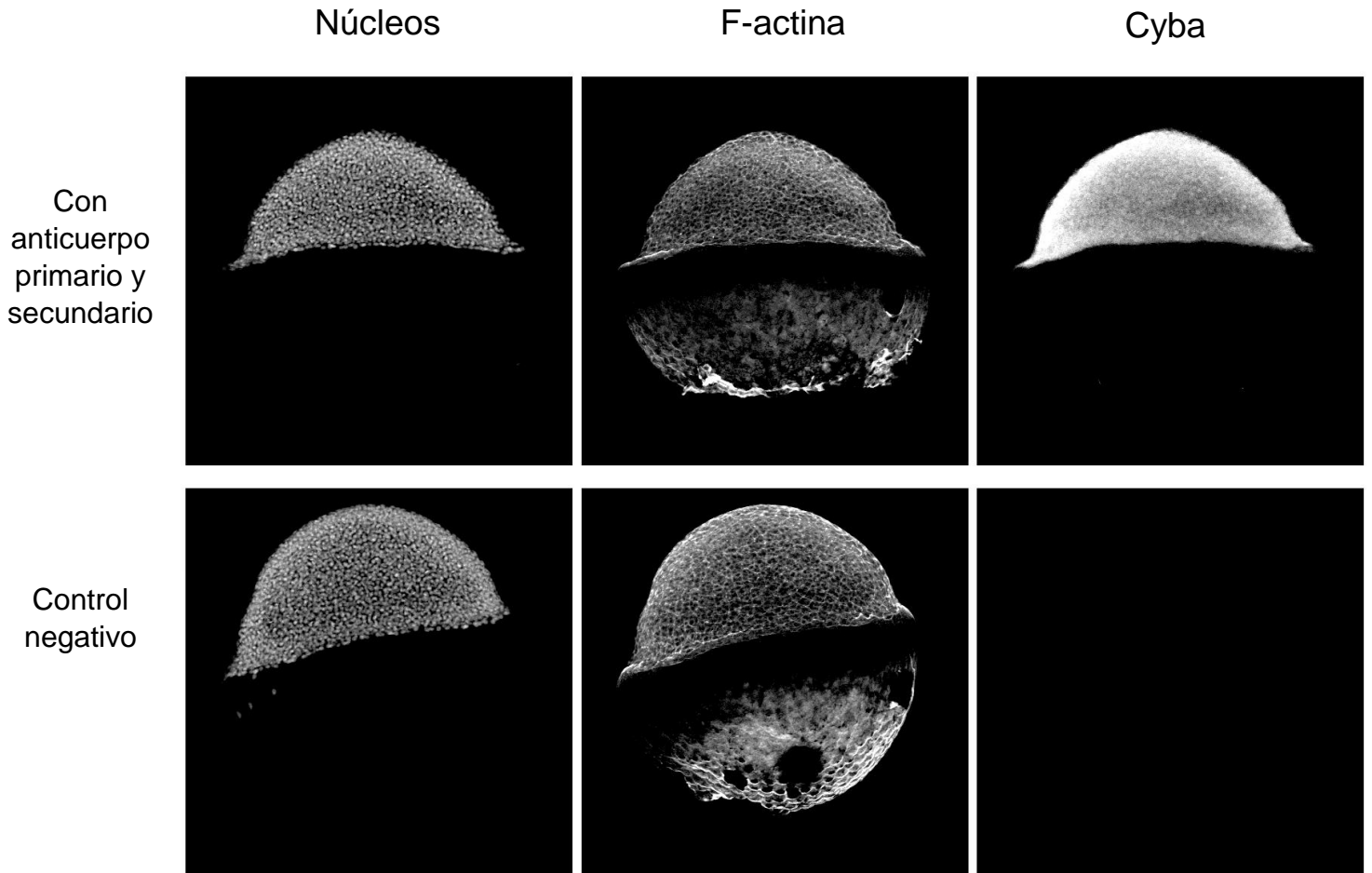


Figura 35. Control negativo de inmunotinción en etapa de escudo. Se muestran embriones con triple tinción, para observar núcleos, filamentos de actina (f-actina) y Cyba. El embrión de la línea superior fue incubado con anticuerpo primario (anti-Cyba) y anticuerpo secundario. Se observa señal en los tres canales. El embrión control negativo de la línea inferior fue incubado únicamente con el anticuerpo secundario. Se observa señal en el canal de núcleos y filamentos de actina. No se observó señal del anticuerpo secundario.

APENDICE B

Recetas

Buffer Salino fosfatos – PBS 2x

Cuando esta diluido 1:1 con agua destilada, las concentraciones finales son: 0.8% NaCl, 0.02% KCl and 0.02 M PO₄.

- 8.0 g NaCl
- 0.2 g KCl
- 200 ml 0.1 M PO₄ Buffer, pH 7.3
- 300 ml dH₂O

Primero ajustar el pH a 7.3 y después aforar a 500 ml.

PO₄ buffer (0.1 M, pH 7.3):

- 77 ml 0.1 M NaH₂PO₄ (13.8 g NaH₂PO₄xH₂O/liter dH₂O)
- 23 ml 0.1 M Na₂HPO₄ (14.2 g Na₂HPO₄/liter dH₂O)

(Westerfield 2007)

Medio para huevos

Sales stock: 40 g sal “Instant Ocean” en 1 L de agua destilada

Agua de huevos = 1.5 ml de sales stock a 1 L de agua destilada = 60 µg/ml concentración final. (Westerfield, 2007).

Extracción de RNA

Este protocolo es modificado de Lan et al., (2009).

1. Sesenta embriones seleccionados en la etapa deseada se colocan en un tubo eppendorf, se les retira el agua de acuario y se utiliza una solución de estabilización de RNA siguiendo el protocolo indicado por el proveedor (RNAlater™ Life Technologies, AM7020).
2. Al tubo se agregan 1000 µl de TRIzol® (Cat. 15596026). Se disgregan y homogenizan los embriones con una jeringa.
3. Incubar a temperatura ambiente 5 min.
4. Se agregan 200 µl de cloroformo, se agita en vortex en intensidad media-alta 15 segundos, debe alcanzar un color rosado crema. Se permite reposar 3 min a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 10,000 g durante 15 min a 4°C
6. Transferir 550 µL de la fase acuosa a un tubo limpio de 1.5 o 2.0 mL
7. Agregar 550 µL de isopropanol. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 10 min a 12,000 g a 4°C (centrifugar 10 min adicionales si no se forma un pellet).
9. Retirar el sobrenadante. Agregar 1000 µL de etanol al 70% para lavar el pellet.
10. Centrifugar a 10,000 g por 5 min a 4°C.
11. Decantar el sobrenadante en tubos limpios.
12. Centrifugar el pellet a 10,000 g durante 5 min a 4°C
13. Retirar el pequeño volumen sobrenadante utilizando una punta de 20 µL.
14. Resuspender el pellet en 55 µL de agua DEPC. Dividir 10 µL entre cinco tubos (eppendorf de 0.6 mL) y usar los 5 µL restantes para cuantificar y verificar la calidad de la extracción.

Síntesis de cDNA

Se usó la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen Ref. 28025-13) y se siguió el protocolo del fabricante.

- 1) En un tubo se mezclan los reactivos de la tabla 5:

Tabla 5. Reactivos para síntesis de cDNA.

Oligo (dT) (500 µg/mL)	0.5 µL
Random primers	0.5 µL
Mezcla de dNTP (10 mM de cada uno: dATP, dGTP, dCTP y dTTP)	1 µL
RNA total	2000 ng
Agua estéril destilada	Suficiente para alcanzar 12 µL total

- 2) Se calienta la mezcla a 65°C durante 5 min y después de ello rápidamente se pasó a hielo por dos min adicionales. Se adicionó a la mezcla indicada en la tabla 6:

Tabla 6. Reactivos para síntesis de cDNA.

Buffer first strand 5X	4 µl
DTT 0.1 M	2 µl
RNaseOUT inhibidor recombinante de ribonucleasa (40 unidades/µl)	1 µl

- 3) Se incuba a 37°C durante 2 min
- 4) Se agrega 1 µl (200 unidades) de M-MLV RT y se mezcla cuidadosamente. Se incuba a 25°C durante 10 min.
- 5) Se incuba 50 min a 37°C
- 6) Se inactiva la reacción calentándola a 70°C durante 15 min.

Patrón de expresión temporal mediante PCR

Los oligonucleótidos para las subunidades (Tabla 7) se diseñaron con la herramienta “primer blast” de NCBI para cada uno de los genes.

Tabla 7. Oligonucleótidos diseñados en NCBI para amplificar los genes de las subunidades de los complejos Nox.

Nombre de subunidad	Oligo Forward	Oligo reverse	Tm °C	Tamaño de amplicón	Referencia de secuencia NCBI
cyba/p22phox/ cytochrome b-245, alpha polypeptide	GCG AAG ATT GAG TGG GCG ATG TGG GCC	TTA TTC GTT GAT GGT GAC AGA CAT AGG ATT GTC	68.4 °C	555 bp	NM_200579.1
P47/NCF1/ neutrophil cytosolic factor 1	GAG TCC AGG AGA GGA TGG GT	AGT GGG ATG CTT CAG TCA GC	64.8 °C	644 bp	NM_001030071.2
Noxo1a/NADPH oxidase organizer 1a	AAC AGC GCA ACA ACA CAA CA	CCA CCA ACC TTT CTG GTC CT	60.8 °C	654 bp	NM_001077584.1
Noxo1b/NADPH oxidase organizer 1b	GTG CTG TTG TGG AGC TGT TG	TTT ACG GGT GTA GGT GGT GC	64.8 °C	566 bp	NM_001326698.1
P67/NCF2/neutrophil cytosolic factor 2	ATG TGT TCA CTG CTC ACC GT	CCT TTT CTC CAG CTC TGC CA	60.8 °C	621 bp	NM_001110462.1
Noxa1/NADPH oxidase activator 1	GTT TGT GGT TGC GTC CAC TC	AAG TGC AGA GAG CTG AAG GG	60.8 °C	662 bp	NM_001030100.2

Se utilizan las enzimas: Taq DNA polymerase (life technologies™) y Amplificasa® (BioTecMol), realizando modificaciones a los protocolos de los fabricantes como se indica en la tabla 8:

<p>Tabla 8. Reactivos para reacción de PCR para enzima de BioTecMol y Life Technologies.</p>

	Amplificasa (BioTecMol) x1	Taq DNA polymerase (life technologies™) X1
Amortiguador 10X	2 µl	2 µl
MgCl₂ 20X (1.5 mM final)	1 µl	1 µl
Deoxinucleotidos 10X (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 2mM c/u)	1 µl	1 µl
cDNA templado 250 ng/µl	3 µl	3 µl
Iniciadores 10X (10 µl c/u)	0.8 µl	2 µl
H₂O	12 µl	10.8 µl
Enzima	0.2 µl	0.2 µl

El cDNA de cada etapa del desarrollo se llevó a 250 ng/µl

En el caso de los genes Ncf4 y Noxa1 no pudieron amplificarse con la enzima Amplificasa® (BioTecMol), por lo que se amplificaron con la enzima Taq polymerase (Invitrogen).

En el caso del gen Noxa1 no pudo amplificarse con un programa convencional de PCR, fue necesario usar un touchdown PCR (Korbie & Mattick, 2008).

Programa convencional de PCR

- 1 ciclo a 94°C durante 3:00 min
- 39 ciclos a 94°C durante 0:32, T_m durante 0:30, 72°C durante 01:00 min.
- 1 ciclo a 72°C durante 10:00 min
- 1 ciclo a 12°C durante 5:00

Programa de PCR *touchdown*

- 1 ciclo a 94°C durante 3:00
- 15 ciclos a 94°C durante 0:32, 72 (-1 en cada ciclo) durante 0:30, 72 durante 1:10
- 24 ciclos a 94°C durante 0:32, Tm durante 0:30, 72 durante 1:10
- 1 ciclo a 72°C durante 10:00
- 1 ciclo a 12°C durante 5:00

Inmunotinción en embriones completos

(Mendieta-Serrano, et al., 2015).

1. Recolectar los embriones por la mañana y colocar en una incubadora a 28°C hasta que alcancen la etapa deseada.
2. Se eligen 20 embriones en buen estado de la etapa deseada y se colocan en un tubo *ependorf* de 2 mL, se les retira toda el agua posible. Se agrega 1-1.5 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% y se dejan los embriones a 4 °C durante la noche. Los tubos deben quedar horizontales para poder distribuir los embriones a lo largo del tubo. Si los embriones han extendido la cola hacia el corion de manera que se dobla, es necesario retirar el corion antes de fijarlos con PFA.
3. Al día siguiente: Retirar el PFA y lavar 3 veces con 1 mL de buffer de bloqueo (PBS 1x, BSA 0.1 %, Tritón X-100 1%).
4. Se transfieren los embriones de una sola etapa a una caja Petri de 100 mm con suficiente buffer de bloqueo para que queden cubiertos. Retirar el corion con pinzas de punta fina. Una vez decorionados los embriones siempre deben estar cubiertos en líquido para no secarse.
5. Los embriones se transfieren con una pipeta pasteur de vidrio (cuya punta fue curada con calor) a una caja de 48 pozos con 200 µl de buffer de bloqueo por pozo, con máximo 10 embriones por pozo.
6. Lavar los embriones tres veces con 200 µl de buffer de bloqueo por pozo.

7. Agregar 200 µl de buffer de bloqueo y dejar en incubación a temperatura ambiente durante un mínimo de 3 h.
8. Remover la mayor cantidad de buffer de bloqueo. Agregar al anticuerpo primario anti p22-phox diluido 1:200 en buffer de bloqueo (p22-phox sc-20781, Santa Cruz Biotechnology)
9. Incubar al anticuerpo primario a 4 °C durante la noche (8 a 12 h) en agitación ligera.
10. Al día siguiente: Se retira la solución con el anticuerpo primario y se lava 3 veces con 200 µl de buffer de bloqueo para retirar el anticuerpo no unido.
11. Se retira la mayor cantidad del buffer de bloqueo y se agrega una dilución de 200 µl de anticuerpo secundario (etiquetado con Alexa Fluor® 647 1:100, Molecular Probes, A2135), se deja incubando envuelta la caja en papel aluminio para impedir el paso de la luz a 4 °C con agitación ligera durante todo el día (8 h o 2 h si es para ver al microscopio de fluorescencia)
12. Retirar la mayor cantidad de la solución con el anticuerpo secundario y agregar 200 µl de faloidina Alexa 488 (Molecular Probes, A12379) diluida en buffer de bloqueo 1:100. Incubar durante todo el día a 4 °C con agitación ligera.
13. Al día siguiente: retirar la mayor cantidad de la solución de faloidina y se lava 3 veces con 200 µl de buffer de bloqueo. Agregar 200 µl de una dilución 1:3000 de DAPI (Invitrogen, D3571) por pozo.
14. Incubar a temperatura ambiente durante una hora y lavar 3 veces con 200 µl de buffer de bloqueo.

Los embriones se montaron en cassettes (Tissue-Tek® Process/Embedding Cassette No. Catalogo: 62520-W) para visualización de tejidos con un cubreobjetos adherido a la parte inferior. Los embriones son embebidos en los pozos con agarosa de bajo punto de fusión al 1% y orientados apropiadamente para su visualización al microscopio (Mendieta-Serrano, et al., 2018).

Es posible conservar los embriones ya montados a 4°C para su visualización posterior cubriendo los pozos con glicerol (aproximadamente 2 mL de glicerol por cassette). Los cassettes se deben de guardar protegidos de la luz en cajas Petri envueltas en aluminio.

*Recetas para soluciones en apéndice B

Hibridación in situ (ISH)

Las sondas para los genes: *cyba*, *p47*, *p67*, *noxo1a* y *noxo1b*, fueron sintetizadas utilizando el TOPO®TA cloning® kit (Cat. 452640) que contiene al plásmido pCR™II-TOPO® en el cual se insertó el producto de PCR de cada gen. El plásmido cuenta con dos promotores distintos para la transcripción del gen insertado, se aprovechó para generar una sonda sentido (sonda control) y otra antisentido.

La sonda para el gen *noxo1* se clonó en el plásmido pJET 1.2 que solo lleva un promotor para la transcripción.

Los pasos que se modificaron de (Thisse & Thisse, 2008) se encuentran resaltados en amarillo.

1. Clonación de producto de PCR. Se utilizó el kit TOPO® TA Cloning® Kit (Cat. 45-2640, Invitrogen Life Technologies) y el kit CloneJET PCR Cloning Kit (#K1232 Thermo Scientific), se siguió la metodología anexa con cada kit. Se verificó que las secuencias clonadas correspondieran a los genes de *D. rerio* mediante secuenciación realizada en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBt-UNAM).
2. Transformación de bacterias *E. coli* cepa DH5-Alpha ultracompetentes por el método Inoue para la preparación y transformación de bacterias *E. coli* (Sambrook & Russell, 2001)
3. Purificación de plásmido fue mediante GeneJET plasmid midiprep kit (Thermo Scientific Cat. K0481).

4. Linearización de plásmidos se realizó con EcoRV (New England Biolabs #R0195S) para transcribir con el promotor Sp6. BamHI (Thermo Scientific #ER0051) para transcribir con el promotor T7.

5. Purificación de plásmido linearizado con butanol

Protocolo modificado de Green y Sambrook (2017)

- a. Transferir todo el DNA linearizado a un tubo eppendorf de 2 mL y llenar completamente con butanol. Agitar vigorosamente hasta ver ambas fases homogenizarse.
- b. Centrifugar 7 min a máxima velocidad. La fase inferior debe reducir su volumen. Retirar la mayor parte de la fase superior de butanol.
- c. Llenar el tubo con butanol fresco. Centrifugar nuevamente. Repetir hasta ver un pellet bien formado. Decantar el líquido.
- d. Lavar pellet con etanol absoluto, centrifugar 10 min a máxima velocidad, se desecha el sobrenadante.
- e. Lavar pellet con etanol al 70% en agua DEPC, centrifugar 10 min a máxima velocidad, se desecha el sobrenadante y se deja evaporar.
- f. Resuspender el pellet en agua DEPC

6. Síntesis de sondas marcadas con digoxigenina (DIG)

Se utilizaron las RNA polimerasas T7(Roche #10881775001) y Sp6 (Roche #10810274001) siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes, se mezclan los reactivos indicados en la tabla 9:

Tabla 9. Reactivos para síntesis de sonda para ISH	
Agua DEPC	Aforar a 20
Buffer 10x de polimerasa	2 μ L
Plásmido linearizado	500-1 μ g
Enzima polimerasa	1 μ L
dNTP-DIG (Roche, 11277073910)	2 μ L

7. Purificación del transcrito con LiCl

Protocolo modificado de Walker y Lorsch (2013), (Nielsen, 2011).

- El volumen de la reacción anterior (20 μ L de la sonda marcada con DIG) se afora hasta 100 μ L con agua DEPC, 10 μ L de LiCl a 7.5 M, 300 μ L de etanol absoluto
- Se deja a -20°C durante 30 min y se centrifuga a 13,000 rpm durante 10 min hasta formar pellet.
- Se retira el sobrenadante y el pellet se deja secar brevemente a temperatura ambiente
- Se disuelve el pellet en 100 μ L de agua DEPC

8. Gel de RNA

- Preparar un gel de agarosa al 1.5% en 10 mL de MOPS (0.2M MOPS, 50 mM Acetato de sodio, 10mM EDTA, 7.0 pH) y 87 mL de agua DEPC.
- Disolver agarosa calentando en microondas y enfriar hasta 50-60 °C, agregar 5.1 mL de formaldehído al 37% y mezclar. Verter en molde con peine.
- Preparar buffer de corrida con MOPS 1X (1 mL de MOPS 10X por cada 9 mL de agua DEPC).
- Preparar las muestras: 2 μ L de RNA + 17 μ L de buffer de muestra para RNA (para una muestra: 2 μ L MOPS 10X, 10 μ L formamida (invitrogen), 4 μ L formaldehído al 37%, 1 μ L bromuro de etidio*).

- e. Calentar a 80 °C por 15 min. Pasar inmediatamente a hielo durante 10 min. Agregar 3 µl de buffer de carga 10X**, cargar y correr.

*200 µg/mL bromuro de etidio en agua DEPC

**50% de glicerol diluido en agua DEPC, 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.25% (peso sobre volumen) azul de bromofenol.

9. Transferencia del gel de RNA y comprobación de sonda marcada

- a. Transferir durante la noche el RNA del gel a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia con SSC 20X (175.3 g NaCl y 88.2 g ácido cítrico sal trisódica, disueltos en 1 L de agua DEPC).
- b. Fijar por *crosslinking* (stratalinker 2400® UV crosslinker) en modo *autocrosslink* por ambos lados de la membrana.
- c. Colocar la membrana en DIG1 (100 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) durante 15 min en agitación.
- d. Colocar membrana en DIG1 al 0.5% de *blocking reagent* (Roche®) durante 30 min en agitación. Calentar la solución DIG1 previo a disolver el *blocking reagent*.
- e. Colocar anticuerpo anti-DIG 1:5,000 durante 30 min
- f. Lavar dos veces con DIG1 10 min cada lavado
- g. Colocar DIG3 (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) durante 5 min.
- h. Revelar la membrana con BCIP/NBT en DIG3 (3.5 µl BCIP, 3.5 NBT, 1 mL DIG3) cubriendo de la luz y en agitación.

Recolección de embriones e hibridación

Se siguió el protocolo de Thisse y Thisse (2008). Los pasos se modificaron se encuentran resaltados en amarillo.

Soluciones

- Agua DEPC: 1000 mL de agua

- Paraformaldehído 4% (PFA 4%): 450 mL agua DEPC se calientan a 60°C en una campana de flujo. Se le agregan 20 g de paraformaldehido (Sigma-Aldrich, P6148-500G), se mantiene en agitación y a temperatura constante, el paraformaldehido se degrada a una temperatura superior a los 70°C. Se agregan 5 gotas de NaOH (1 gota por cada 100 mL). La solución debe volverse clara en unos min (algunas partículas finas permanecen). Retirar de la fuente de calor y agregar 50 mL de PBS 10x. Ajustar el pH a 7.2 en caso de ser necesario. Filtrar y almacenar en alícuotas de 1 a 2 mL a -20°C.
- PBS 10x (pH 5.5): Disolver 10.8 g Na₂HPO₄, 65 g NaH₂PO₄, 80 g NaCl y 2 g KCl en 1 L de agua DEPC.
- PBST: PBS 1X, 0.1% Tween ® 20 (vol/vol) (Sigma-Aldrich, P7949).
- Mezcla de hibridación (MH): 50% formamida, SSC 5X, 0.1% Tween ® 20, 50 µg/mL heparina, 50 µg/mL de tRNA libre de RNAsas (Sigma, R8508) 10 mM de ácido cítrico pH 6.0.
- SSC 20X: Disolver en 1 L de agua DEPC, 175.3 g de NaCl y 88.2 g ácido cítrico sal trisódica.
- Buffer de bloqueo: PBST 1X, 2% suero de oveja (vol/vol), 2 mg/mL BSA, 0.2% *blocking reagent* (*Roche 11096176001*).
- AP-: 100 mM Tris HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween ® 20.
- AP+: 50 mM MgCl₂ disuelto en AP-
- Solución de tinción: 225 µg NBT (*nitro blue tetrazolium chloride, Roche, 11383213001*) y 175 µg BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche, 11383221001*) en 50 mL de AP+
- Solución stop: PBS 1X, 1 mM EDTA, 0.1% Tween ® 20

1. Colecta de embriones

De 20 a 50 embriones del mismo estadio se colectan en un tubo *ependorf*, si los embriones extendieron la cola hacia el corion (24 hpf) se debe retirar el corion antes de fijar para evitar que la cola se quede en posición enroscada.

Al tubo *ependorf* se le retira toda el agua posible y se le agrega 1 mL de PFA 4% (preparado con agua tratada con DEPC). El tubo se guarda una noche a 4 °C.

2. Deshidratación y decorionado de embriones

- Se retira por completo el PFA 4%
- Se lava con 1 mL de PBST por 10 min, tres lavados a temperatura ambiente (TA)
- Se decorionan los embriones con pinzas estériles
- Se deshidratan los embriones con diluciones de metanol en PBST:
 - (1) 1 mL de metanol 25% durante 10 min a TA
 - (2) 1 mL de metanol 50% durante 10 min a TA
 - (3) 1 mL de metanol 75% durante 10 min a TA
 - (4) 1 mL de metanol 100% durante 10 min a TA, cuatro lavados.
- Los embriones deshidratados se pueden guardar en metanol durante varias semanas a -20 °C.

3. Día 1 de hibridación

- Se rehidratan los embriones con diluciones de metanol en PBST:
 - (1) 1 mL de metanol 75% durante 5 min a TA
 - (2) 1 mL de metanol 50% durante 5 min a TA
 - (3) 1 mL de metanol 25% durante 5 min a TA
 - (4) 1 mL de PBST durante 5 min, cuatro lavados.
- Permeabilizar los embriones con una solución de proteinasa K 10 ug/mL (Invitrogen, 25530015), el tiempo de incubación depende de la etapa de desarrollo de los embriones y de la actividad enzimática de cada lote de proteinasa K. Se consideraron los tiempos de permeabilización de la tabla 10:

Tabla 10. Tiempo de incubación con proteinasa K de acuerdo al estadio de desarrollo.

ESTADIO DEL DESARROLLO	DURACIÓN DEL TRATAMIENTO CON PROTEINASA K
1 CELULA – 1 SOMITA	30 seg
1 – 8 SOMITAS	1 min
9 – 18 SOMITAS	3 min
18 SOMITAS – 24 H	10 min
36 H – 5 DÍAS	30 min

- Se detiene la digestión incubando los embriones con 1 mL de PFA 4% durante 20 min a TA
- Se retira el PFA 4% y se lava con 1 mL de PBST durante 5 min, se hacen cuatro lavados. Se separan en tubos distintos los embriones que serán usados con la sonda *sense* de los que serán usados con la sonda *anti-sense*.
- Prehibridar los embriones con 1 mL de solución MH (previamente incubada a 70°C) de 2 a 5 h en un horno a 70°C.
- Retirar la solución MH y agregar 500 ng de la sonda marcada con DIG.
- Hibridar toda la noche a 70°C.

4. **Día 2 de hibridación**

- Se precalientan las soluciones que se usarán a 70°C.
- Reemplazar la solución MH con sonda por 1 mL de solución MH sin sonda, sin tRNA y sin heparina, durante 10 min a 70°C.
- Se reemplaza gradualmente la solución MH a SSC 2X por medio de lavados. Se lava con soluciones MH diluidas con SSC 2X:
 - (1) 1 mL de MH 75% durante 10 min a 70°C
 - (2) 1 mL de MH 50% durante 10 min a 70°C
 - (3) 1 mL de MH 25% durante 10 min a 70°C
 - (4) 1 mL de SSC 2X 100% durante 10 min a 70°C
- Lavar con 1 mL de SSC 0.2X durante 30 min a 70°C, dos lavados.
- Se reemplaza gradualmente el SSC 0.2X con PBST por medio de lavados. Se lava con soluciones SSC 0.2X diluidas con PBST:

- (1) 1 mL de SSC 0.2X al 75% durante 10 min a TA
 - (2) 1 mL de SSC 0.2X al 50% durante 10 min a TA
 - (3) 1 mL de SSC 0.2X al 25% durante 10 min a TA
 - (4) 1 mL de PBST al 100% durante 10 min a TA
- Incubar los embriones en 1 mL de buffer de bloqueo de 3 a 4 h a TA
 - Incubar los embriones en 0.5 mL de buffer de bloqueo con anticuerpo anti-DIG diluido 1/2,000 durante toda la noche a 4°C con agitación suave.

5. **Día 3 de hibridación**

- Desechar la solución con anticuerpo y lavar los embriones en 1 mL de PBST durante 15 min a TA, seis lavados con agitación suave.
- Lavar con 1 mL de solución AP- durante 5 min a TA, dos lavados.
- Lavar con 1 mL de solución AP+ durante 5 min a TA, tres lavados.
- Reemplazar con 0.5 mL de solución de tinción recién preparada y cubrir los embriones de la luz.
- Monitorear la reacción periódicamente exponiendo el menor tiempo posible los embriones a la luz.
- Al alcanzar el color deseado se retira la solución de tinción y se reemplaza con 1 mL de solución stop durante 15 min a TA, tres lavados con agitación suave.
- Los embriones en etapas tempranas, de 1 a 1000 células, se incuban en 1 mL de PBST pH 3.0 para prevenir la reacción fotosensible del vitelo.
- Los embriones lavados pueden guardarse en la oscuridad en solución stop durante varios meses a 4°C.

6. **Aclarado de embriones**

- Se retira la solución en la que están suspendidos los embriones y se lavan con con soluciones de metanol diluido con PBST en distintas concentraciones
 - (1) 1 mL de 25% metanol durante 5 min a TA
 - (2) 1 mL de 50% metanol durante 5 min a TA
 - (3) 1 mL de 75% metanol durante 5 min a TA
 - (4) 1 mL de 100% metanol durante 5 min a TA
 - (5) 1 mL de 75% metanol durante 5 min a TA
 - (6) 1 mL de 50% metanol durante 5 min a TA

(7) 1 mL de 25% metanol durante 5 min a TA

(8) 1 mL de 100% PBST durante 5 min a TA

7. Montaje de embriones

- Se reemplaza la solución stop de los embriones por glicerol.
- Se transfieren los embriones a una placa petri con glicerol.
- Los embriones se orientan en el glicerol usando pequeñas varillas de vidrio curadas en los extremos.