



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**Sobreexpresión del gen *mctp2b* de *Danio rerio* y su efecto  
en el desarrollo embrionario**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**FERNANDO PÉREZ CORTÉS**

**CO-TUTORÍA:**  
**DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES – INB, UNAM**  
**DR. LUIS ROBERTO RODRÍGUEZ ORTIZ – INB, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**  
**DR. CARLOS SALDAÑA GUTIÉRREZ – FCN, UAQ**  
**DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ – INB, UNAM**

**JURIQUILLA, QUERÉTARO, MÉXICO, ABRIL 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

El proyecto de investigación “Sobreexpresión del gen *mctp2b* de *Danio rerio* y su efecto en el desarrollo embrionario” se realizó en el laboratorio de Neurobiología molecular y celular en el instituto de neurobiología de la Universidad Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz y el Dr. Ataúlfo Martínez Torres.

### **Jurado**

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Fernando Pérez Cortés, cuyo título es: “Sobreexpresión del gen *mctp2b* de *Danio rerio* y su efecto en el desarrollo embrionario” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Ernesto Maldonado

Presidente

\_\_\_\_\_

Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz

Secretario

\_\_\_\_\_

Dra. Patricia Ornelas García

Vocal

\_\_\_\_\_

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Suplente

\_\_\_\_\_

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Suplente

\_\_\_\_\_

Aprobado por el Comité Académico

\_\_\_\_\_

Coordinador del Programa

## Resumen

Las MCTP (Multiple C2 Domains and Transmembrane Protein) son proteínas con tres dominios C2 y dos segmentos transmembrana, que son capaces de unir iones  $\text{Ca}^{2+}$  con gran afinidad. Pertenecen a la familia de proteínas con múltiples dominios C2 donde se encuentran las sinaptotagminas, que participan como sensores de calcio en la regulación de neurotransmisores, las ferlinas; que están involucradas en exocitosis y endocitosis, y las sinaptotagminas extendidas, que están involucradas en la síntesis de membrana. Sin embargo, de las MCTP se tiene muy poca información respecto a su función. En el pez cebra hay cuatro genes *mctp* (*mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a*, *mctp2b*), los cuales se expresan en peces adultos y en su estado embrionario. los cuales se expresan en peces en su estado adulto y embrionario.

En el presente trabajo, se realizó la sobreexpresión del gen *mctp2b* en embriones de *Danio rerio* con el objetivo de determinar su efecto. Se realizaron evaluaciones de supervivencia, y de detección de la sobreexpresión mediante microscopía de fluorescencia en diferentes etapas del desarrollo embrionario. Se encontró que la sobreexpresión del gen *mctp2b* genera un aumento en la mortalidad en los embriones en fases tempranas de su desarrollo, así como la colocación de la proteína con proteínas marcadoras de retículo endoplasmático, reforzando la hipótesis de la participación de Mctp2b en el tráfico vesicular.

## **Abstract**

MCTP (Multiple C2 Domains and Transmembrane Protein) are proteins with three C2 domains and two transmembrane segments, which are capable of binding  $\text{Ca}^{2+}$  ions with high affinity. They belong to the family of proteins with multiple C2 domains where synaptotagmins are found, which participate as calcium sensors in the regulation of neurotransmitters, ferlins, which are involved in exocytosis and endocytosis, and extended synaptotagmins, which are involved in membrane synthesis. However, we have very little information about MCTPs regarding its function. Zebrafish have four *mctp* genes (*mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a*, *mctp2b*), which are expressed in fish in their adult and embryonic state.

In the present work, the overexpression of the *mctp2b* gene in *Danio rerio* embryos was carried out to determine its effect in embryonic development. Survival assessments and overexpression detection by fluorescence microscopy were performed at different stages of embryonic development. It was found that the overexpression of the *mctp2b* gene generates an increase in mortality in embryos in early phases of their development, as well as the colocalization of the protein with endoplasmic reticulum marker proteins, this supports the hypothesis of the participation of Mctp2b in vesicular trafficking.

## **Agradecimientos**

Agradezco de la forma más sincera a:

Al Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz, por su confianza y guía durante el proyecto, me enseñó mucho, ha cuidado mi formación en la ciencia en los últimos años, dándome diversas formas de aproximarme a un problema y solventarlo, aprecio mucho su consejo.

Al Dr. Ataulfo Martínez Torres, por aceptarme en su equipo de trabajo, por el aprendizaje, por orientarme y por mostrarme siempre diferentes enfoques que pueden tener las cosas.

Al comité tutorial, el Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez y el Dr. Mauricio Díaz Muñoz, por sus observaciones y aportes en el desarrollo del proyecto.

Al jurado, por sus observaciones, sugerencias y correcciones, sus aportes me permiten crear un trabajo final más completo.

Al técnico académico la Dra. Edith Ángeles Espino Saldaña, por disponibilidad, paciencia y apoyo en el laboratorio.

A la auxiliar de laboratorio Marina Ramírez Romero por su apoyo en las actividades del laboratorio.

Al equipo de Zebrafish del laboratorio, Freya, Darel, Jacky, Ruby, Pablo, más de una vez nos acompañamos en el cuidado de nuestro trabajo, pero también estuvimos juntos en estrés buscando dar los mejores resultados.

A todo el equipo del laboratorio de neurobiología molecular y celular, Rodrigo, Denisse, Brenda, Marianne, Gaby, Ale, Fer, Joel, Vale, Padma, Ambey, José Luis, por sus ideas, palabras de motivación, pláticas durante la comida o los pasillos, su compañía fue muy valiosa para mí.

A mis amigos, Cheo, Ale, Itsue, David, Jen, Ana, Dina, Pepe, Cecy, Manuel, Lupita, Lau, Erika, Jonathan, junto con los mencionados anteriormente, que bello fue encontrarlos en este tiempo, me apoyaron de diferentes formas, gracias.

A la Dra. Nuri Aranda por su apoyo en todo el seguimiento y tramites realizados en la Unida de Enseñanza.

A la Lic. Ma. Lourdes Lara† por su apoyo en las videoconferencias y enlaces en exámenes y clases.

A la Dra. Alejandra Castilla, MVZ Martin García y la Dra. María Antonieta Carbajo por su apoyo en el bioterio.

A la Dra. Elsa Nydia Hernández, por su apoyo en la Unidad de Microcopia.

A la M.C. Adriana González por su apoyo en la Unidad de Proteogenómica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto CONACYT A1-S-10450 y A1-S-7659.

## **Dedicatoria**

A mis padres, Marcela Cortés Velázquez y Fernando Pérez Romero, siguen siendo mi fortaleza cuando hay duda o miedo, los quiero.

A mi hermana, Fefi, ya probamos ambos que si se podía, así que esto no suma mucho, pero sin ti no hubiera sido divertido, te quiero mucho.

A Andrea, me acompañaste al final de este proceso, me motivaste y me cuidaste, tienes todo mi amor y cariño.

A mi familia y amigos, con los años he sumado a muchos a esta lista, todos y cada uno de ustedes me enseñaron algo, siempre trato de utilizar ese conocimiento en mi vida.



## Lista de abreviaturas

ADN -	Ácido desoxirribonucleico.
ARN -	Ácido ribonucleico.
CL -	Fosfolípido mitocondrial cardiolipina.
CMV -	Citomegalovirus.
Dpf -	Días post-fertilización.
Hpf -	Horas post-fertilización.
ICQ -	Coeficiente de superposición.
IP <sub>3</sub> -	1,4,5-trisfosfato.
JACoP -	Just Another Colocalization Plugin.
LB -	Lysogeny Broth.
MCTPs -	Multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions.
PBS-	Phosphate buffered saline.
PC12 -	Línea celular derivada de una feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata.
PFA –	Paraformaldeído.
PI4,5P2 -	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
PI4P -	Fosfatidilinositol-4-fosfato.
PKC -	Proteínas quinasas dependientes de calcio.
RT-PCR -	Reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción.
SNP -	Single Nucleotide Polyphormism.
TIV -	Transcripción <i>in vitro</i> .

## Índice general

1. Introducción y antecedentes .....	11
a. Proteínas MCTP .....	11
b. MCTP en <i>Danio rerio</i> .....	15
c. <i>Danio rerio</i> .....	17
2. Justificación .....	19
3. Hipótesis .....	19
4. Objetivo.....	19
a. General.....	19
b. Particular.....	19
5. Materiales y métodos.....	20
a. Plásmidos .....	20
b. Amplificación de ADN por PCR.....	20
c. Reacciones de digestión enzimática de ADN, ligación y transformación de células competentes.....	22
d. Sistema Tol2 .....	24
e. Microinyección de embriones de pez cebra .....	24
f. Sobreexpresión por ARNm .....	25
h. Análisis de viabilidad de los embriones microinyectados .....	26
i. Análisis de la sobreexpresión de <i>mctp2b</i> por fluorescencia.....	27
j. Fijación de embriones con PFA (4%).....	27
k. Lapso de tiempo .....	28
l. Análisis de co-localización .....	29
6. Resultados.....	30
a. Plásmido pPC1 .....	30
b. Análisis de la viabilidad de los embriones post-inyección .....	31
c. Expresión de <i>mctp2b</i> -GFP .....	34
d. Caracterización fenotípica.....	39
e. Lapso de tiempo .....	42
f. Sobreexpresión con ARNm .....	47
g. Co-inyección pPC1 y ARNm Sec61b.....	49

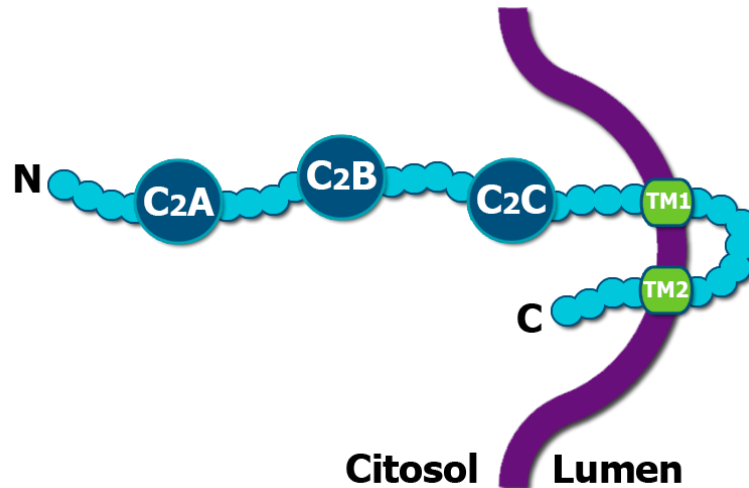
h. Análisis de localización.....	50
7. Discusión .....	52
8. Referencias.....	56

## 1. Introducción y antecedentes

### a. Proteínas MCTP

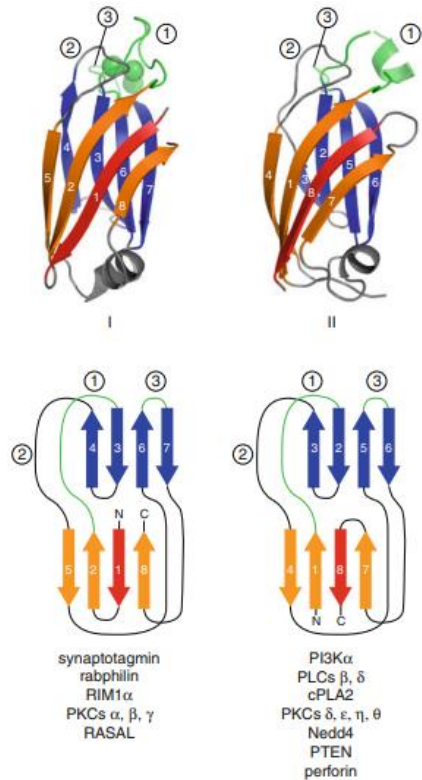
Las proteínas MCTP (*Multiple C2 domain and transmembrane region protein*) forman una familia de proteínas con tres dominios C2, dos regiones transmembrana, una región N-variable, y una región C-terminal corta (figura 1). Se sabe que dos de sus tres dominios C2 (C2A y C2C) unen a  $\text{Ca}^{2+}$  con gran afinidad (Shin et al., 2005) y según la investigación de Joshi et al. (2021) se encontró que los dominios C2 de MCTP1 y MCTP2 se pueden unir a lípidos específicos: fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P), fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI4,5P2) y el fosfolípido mitocondrial cardiolipina (CL).

Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son los segundos mensajeros intracelulares principales en las células eucariotas. La importancia de la regulación de este ion permite el funcionamiento adecuado de la célula, que de lo contrario generaría diversos problemas en la homeostasis como la activación irreversible de enzimas, acumulación excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondria, muerte celular e hiperestimulación de respuestas celulares (Di Virgilio et al., 1996). Las células manejan el  $\text{Ca}^{2+}$  de tres formas: 1) sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana, 2) almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en orgánulos celulares y 3) proteínas de unión de  $\text{Ca}^{2+}$ . La activación de receptores de señalización, como inositol 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) rianodina y canales iónicos da como resultado la apertura de canales que permiten que el  $\text{Ca}^{2+}$  cruce la membrana plasmática o la membrana del retículo endoplásmico (Martens & McMahon, 2011). La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma es detectada por proteínas que incluyen dominios de unión a este ion tal como EF hand, dominio C2 y el motif tipo 2 de las anexinas (Kramer, 2016).



**Figura 1.** Estructura general de las proteínas MCTP. Adaptado de Shin et al 2005. Tres dominios C2 se encuentran hacia el espacio del citosol (C2A, C2B y C2C), dos segmentos transmembrana anclan la proteína a organelos (TM1 y TM2) y un bucle se encuentra hacia el lumen.

El dominio C2 está compuesto por aproximadamente 130 aminoácidos (Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2014; Elies et al., 2020). Éste se identificó por primera vez como un dominio conservado de las proteínas quinasas dependientes de calcio (PKC) (Coussens et al., 1986). Se ha encontrado que este dominio puede o no, unir al  $\text{Ca}^{2+}$  en enzimas de transducción de señales lipídicas y proteínas de tráfico de membrana. Al detectar los lípidos en la célula, los dominios C2, junto con otros efectores, como sinaptotagmina, Munc-13, Rim, entre otros, regulan segundos mensajeros de señales lipídicas y eventos de fusión de membrana (Leonard, 2013; Südhof 2012). La cantidad de proteínas con dominio C2 en vertebrados sugiere que este sea el segundo *motif* más común de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , después de EF hand (Rizo y Südhof, 1998; Zhang y Aravind, 2010). La estructura de los dominios es un sándwich de dos láminas antiparalelas de cuatro filamentos (figura 2). Topológicamente estos dominios se clasifican en dos tipos; los que tienen la región N y C terminal orientados hacia la parte superior del dominio (tipo I) y los que los tienen orientados hacia la parte inferior (tipo II) (Leonard, 2013).



**Figura 2.** Estructura del dominio C2. Tipo I, extremos amino y carboxilo orientados hacia la parte superior del dominio y tipo II, los extremos orientados hacia la parte inferior. En la parte inferior de la figura se muestran ejemplos de los dos tipos de dominio. Tomado de Leonard, 2013.

La mayoría de las proteínas con un dominio C2 son enzimas de transducción de señales, como la PKC, o proteínas de tráfico de membrana, como la sinaptotagmina 1. Existen varias familias de proteínas con el dominio C2, sin embargo, se tienen identificadas cuatro familias con múltiples dominios C2 y regiones transmembrana: sinaptotagminas, ferlinas, sinaptotagminas extendidas y MCTP (DeBello et al., 1993; O'Connor et al., 1994; Peulen et al., 2019; Saheki y de Camilli, 2017). Los tres primeros grupos ya han sido extensamente caracterizados y se sabe sus funciones, pero de la familia MCTP se tiene muy poca información. En mamíferos, se han identificado dos genes que codifican para proteína MCTP (MCTP1 y MCTP2) con diferentes isoformas. En invertebrados como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* solo se ha identificado un gen. Su distribución en tejido se ha estudiado en rata, donde se encuentra que MCTP1 se expresa en músculo

cardíaco, músculo esquelético, testículos y en menor proporción en el cerebro. MCTP2 se encuentra en músculo cardíaco y testículos (Shin et al., 2005).

Se han realizado varias investigaciones relacionadas con MCTP y su presencia en el sistema nervioso. Se ha visto en *C. elegans* que los promotores de *mctp1* dirigen la expresión de un gen reportero fluorescente a las neuronas del nematodo (Tellez-Arreola, 2014). En *D. melanogaster* se ubicó la proteína MCTP en botones sinápticos, así como somas y procesos neuronales (Genc et al., 2017).

Se ha reportado que MCTP1 se localiza en el soma y en procesos de neuronas en hipocampo, giro dentado, núcleo habenular medial, amígdala y corteza. Por otro lado, la sobreexpresión de la variante MCTP1S de rata en células de feocromocitoma PC12 inhibe la endocitosis e induce un retraso en la recuperación de vesículas (Qiu et al., 2015). Estos datos sugieren que MCTP1 probablemente desempeña papeles esenciales en transporte vesicular y particularmente en endosomas. En este mismo estudio se analizaron otras posibles actividades biológicas de MCTP1S, entre ellos la regulación del estrés oxidativo neuronal. Se encontró que la sobreexpresión de MCTP1S y MCTP1L disminuye moderadamente el estrés oxidativo en las células PC12. Según los resultados, MCTP1 parece proteger a las neuronas de especies reactivas de oxígeno, especialmente bajo el estrés causado por la exposición a glutamato (Qiu et al., 2015).

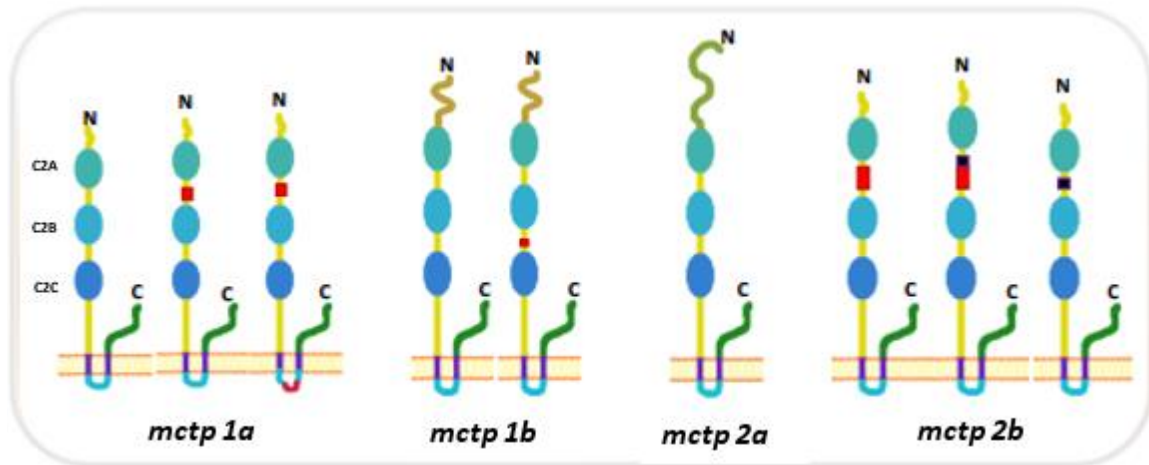
Se ha relacionado a las MCTP con varias enfermedades neuropsiquiátricas. Análisis genómicos mostraron asociación entre el SNP (Single Nucleotide Polymorphism) rs17418283 de MCTP1 y el desorden bipolar (Scott et al., 2009), mientras que otro estudio sugiere una relación entre un polimorfismo en el gen *mctp2b* y la susceptibilidad a esquizofrenia (Djurovic et al., 2009). Otro análisis genómico reveló una relación entre MCTP2 y otros ocho genes en la región cromosómica 15q25-26 con depresión mayor recurrente de inicio temprano (Verma et al., 2008). Se especula que el estrés oxidativo puede provocar daño neuronal y enfermedades neurodegenerativas, por lo que la función encontrada de MCTP1 en la protección

del daño por especies reactivas de oxígeno (Qiu et al., 2015), adquiere cierta significancia funcional.

b. MCTP en *Danio rerio*

El análisis del genoma de *D. rerio* permitió identificar cuatro genes que codifican para la proteína Mctp: *mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a* y *mctp2b*. La secuencia primaria predicha de las proteínas guarda aproximadamente un 85% de similitud entre ellas. Se obtuvieron y analizaron los ADNc de cada uno de los genes, y se encontró que tres de estos presentan diferentes isoformas generadas por splicing alternativo (figura 3). Se identificó el ARN mensajero de cada uno de los genes mediante RT-PCR desde el estadio embrionario, incluyendo gástrula, 14-16 somita y prim-5, hasta el estado larvario. También se analizó la distribución del ARN mensajero de cada gen mediante hibridación *in situ*, el cual indicó una mayor abundancia del mensajero en el sistema nervioso central y sistema muscular en embriones de 24 horas post-fertilización (hpf) (Espino-Saldaña et al., 2020). Al provocar mutaciones en *mctp2b* por medio de CRISPR/Cas9 se observó que estas afectan el desarrollo larvario del pez y provocan su muerte en la fase prim-5, exhibiendo falta de simetría y lateralidad, arritmia cardíaca, malformación de somita, malformación de cabeza y ojos (Espino-Saldaña et al., 2020). Este resultado destaca la importancia de Mctp2b en el desarrollo.





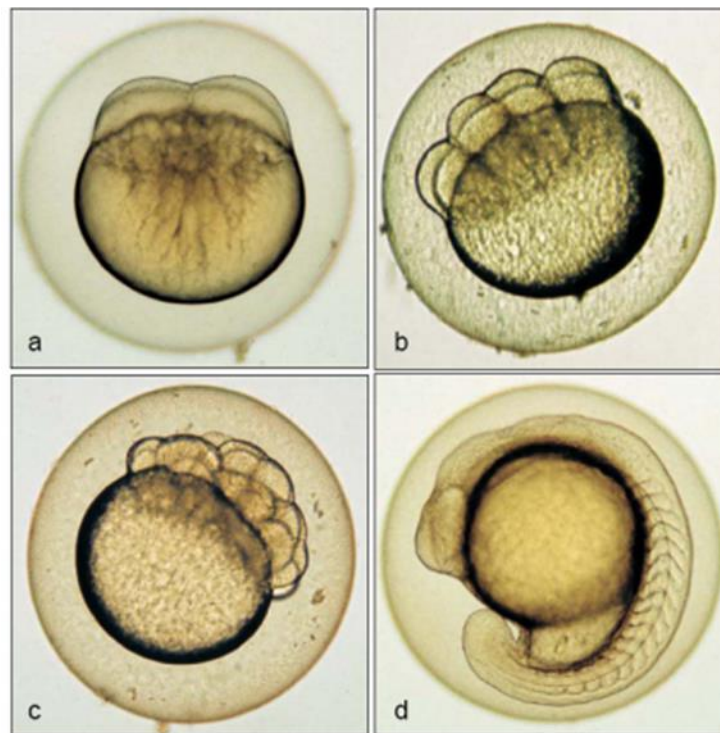
**Figura 3.** MCTP en *D. rerio*. Se muestra una representación con las diferentes isoformas que tiene Mctp. Tomado de *Patrón de expresión y evaluación de la función de los genes mctp del pez cebra Danio rerio, que codifican para proteínas transmembranales con múltiples dominios C2* tomado de Espino-Saldaña 2020 Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Querétaro.

Estudios de expresión heteróloga en células HEK293, muestran que las diferentes proteínas MCTP (1a, 1b, 2a, 2b) de *D. rerio* tienen una distribución similar en la célula. Utilizando proteínas fluorescentes fusionadas a Mctp1a y Mctp2b se localizaron en células HEK293 en varios organelos: endosomas de reciclaje, endosomas tardíos, lisosomas y retículo endoplásmico (Espino-Saldaña et al., 2020; Olivares-Hernández, 2018); lo cual podría sugerir que estas proteínas tienen funciones similares. También se determinó que las Mctp, no se encuentran en aparato de Golgi o membrana plasmática (Espino-Saldaña et al., 2020; Olivares-Hernández, 2018).

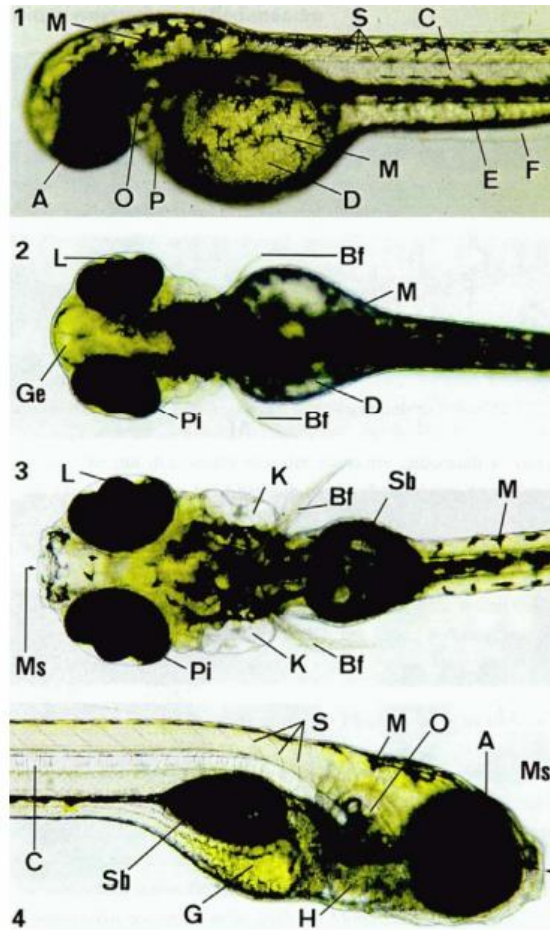
La electroporación *in vivo* de Mctp2b en fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) en neuronas de *D. rerio* confirmaron su localización en retículo endoplásmico, endosomas tardíos, endosomas de reciclaje y lisosomas, por lo que se sugiere la participación de MCTP en procesos de tráfico vesicular en neuronas del sistema nervioso central del pez (Duran-Ríos, 2019; Espino Saldaña et al., 2020).

c. *Danio rerio*

El pez cebra es un modelo biológico ampliamente utilizado para el estudio del desarrollo y del sistema nervioso (de Abreu et al., 2020; Holder y Xu, 1999; Key and Devine, 2003). Crece rápidamente a 26 °C y completa su ciclo de vida en tres meses. La especie es de fácil obtención, económica y en condiciones apropiadas, produce una gran cantidad de huevos transparentes (Laale, 1977). Debido a la transparencia de los embriones es posible seguir fácilmente el desarrollo; en la figura 4 se observan diferentes fases identificables en el embrión. En la figura 5 podemos observar diferentes órganos del pez cebra en su desarrollo, esto ilustra una de las ventajas del modelo donde es posible identificar cambios anatómicos durante el desarrollo del embrión.



**Figura 4.** Fases selectas del desarrollo de *D. rerio*. a) fase de cuatro células (1h). b) fase de 16 células (1.3 h). c) fase de 64 células (1.8 h). d) separación de cola (17.5 h). Tomado de Fish embryo toxicity assays, por T. Braunbeck y E. Lammer, 2006.



**Figura 5.** Desarrollo normal de larvas de pez cebra (*D. rerio*). Desarrollo normal de larvas de pez cebra (*D. rerio*) IV: (1) 48 h; (2) 72 h; (3) 144 h; (4) 144 h. A-anlage del ojo; Bf-aleta pectoral; Bz-células sanguíneas; C-cuerda; Ch-corion D-saco vitelino; E-intestino; F-aleta; Ge-cerebro; H-corazón; K-branquias; L-lente ocular; M-melanóforos; Ms-hendidura de la boca; O-oreja; P-pericardio; Pi-capa de pigmento ocular; S-somitas (segmentos musculares); Sb-vejiga natatoria; Sh-cola. Tomado de *Fish embryo toxicity assays*, por T. Braunbeck y E. Lammer, 2006.

## 2. Justificación

Estudios previos han mostrado que las proteínas MCTP posiblemente participan en procesos de tráfico vesicular y su sobreexpresión *in vitro* reduce el estrés oxidativo en neuronas, sin embargo, aún no ha sido posible determinar precisamente su función. *D. rerio* tiene cuatro genes diferentes que codifican para las proteínas MCTP: *mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a* y *mctp2b*. El ARNm de *mctp2b* se encuentra en mayor abundancia en embriones de 24 hpf. La delección de *mctp2b* provoca defectos en el desarrollo y la muerte del embrión, sugiriendo la relevancia de esta proteína para el desarrollo temprano del pez cebra. Cambios en los niveles de expresión, y en particular la sobreexpresión, del gen *mctp2b* en *D. rerio* podría permitir elucidar las funciones de esta familia de proteínas.

## 3. Hipótesis

La sobreexpresión del gen que codifica la proteína Mctp2b de *Danio rerio* altera el desarrollo embrionario y afectan el desarrollo de su sistema nervioso central.

## 4. Objetivo

### a. General

- Sobreexpresar el gen *mctp2b* de *Danio rerio* para determinar su función.

### b. Particular

- Generar un vector de sobreexpresión que porte *mctp2b* fusionado a una proteína fluorescente bajo el control de un promotor fuerte constitutivo.
- Generar las larvas que sobreexpresen *mctp2b* en las primeras etapas de su desarrollo y determinar su efecto en el desarrollo embrionario.

## 5. Materiales y métodos

### a. Plásmidos

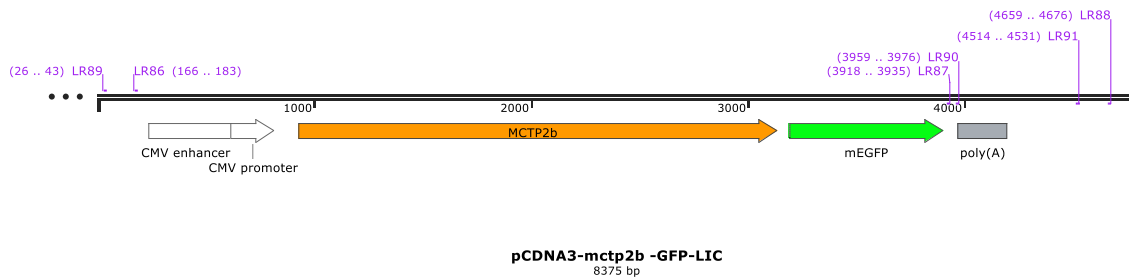
En la tabla 1 se muestran los plásmidos utilizados en este trabajo.

**Tabla 1.** Plásmidos utilizados.

<b>Plásmidos</b>	<b>Proteína codificada</b>	<b>Características</b>
DsRed-rab7 WT	DsRed-Rab7	CMV, DsRed, Rab7, KanR
mCherry-Sec61b	mCherry-Sec61b	CMV, mCherry, Sec61beta, KanR
pCDNA3-GFP-LIC	GFP	CMV, GFP, AmpR
pCDNA3-mctp2b -GFP-LIC	Mctp2b-GFP	CMV, MCTP, GFP, AmpR
pDestTol2pA2	Sistema tol2	Tol2, AmpR, CmR, ccdB
pPC1	Mctp2b-GFP	Tol2, CMV, MCTP, GFP, AmpR

### b. Amplificación de ADN por PCR

A partir de los plásmidos que portan las MCTP fusionadas a un marcador fluorescente (GFP o mCherry) bajo el control del promotor CMV, se diseñaron seis oligonucleótidos que permitieran amplificar la secuencia de interés y que tuvieran secuencias reconocidas por las enzimas *Sa*II y *Eco*RI en los extremos. Los diseños de los oligonucleótidos LR86 y LR91 fueron utilizados para obtener la secuencia de ADN con el promotor CMV, el gen *mctp2b* y el marcador fluorescente GFP.



**Figura 6.** Estrategia con oligonucleótidos. Esquema que muestra el arreglo de genes en el plásmido pCDNA3-mctp2b-GFP-LIC, junto con la posición de los oligonucleótidos diseñados para amplificar estos segmentos.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de fragmentos que codifican para las proteínas MCTP, marcadores de organelo y marcadores fluorescentes, utilizados en este proyecto.

#Primers	Secuencia	nt	<->	GC%	Tm °C	Corte	Función
LR086	GCATGAAGAATTCGCTTA	18	Fw	38.9	57	EcoR1	Generar pPC1
LR091	AGAACGTCGACTCCAACG	18	Rv	55.6	62.1	SalI	Generar pPC1 y control
LR121	GAAATTAAGTCGACTCACTATAGG	24	Fw	37.5	55	SalI	Generar control
LR122	CCACAGAATGAATTCGCGTTAA	22	Rv	40.9	58.4		Verificar control
LRII	CGTAATACGACTCACTATAGGGT CTATATAAGCAGAGC	38	Fw	42.1	63.8		Generar ARNm
LRIV	CGAATTAACCCTCACTAAAGGGTC TATATAAGCAGAGC	38	Fw	42.1	65.2		Generar ARNm
LRV	GTGGACTCTTGTTCCAAACTGG	22	Rv	50	61.3		Generar ARNm

La amplificación de los fragmentos se realizó con la enzima *Taq* ADN polimerasa y los componentes de reacción mostrados en la tabla 3, utilizando ADN de los plásmidos de la tabla 1 (pCDNA3-mctp2b-GFP-LIC) Las condiciones de tiempo y temperatura para las reacciones se muestran en la tabla 4.

**Tabla 3.** Componentes para la reacción de PCR.

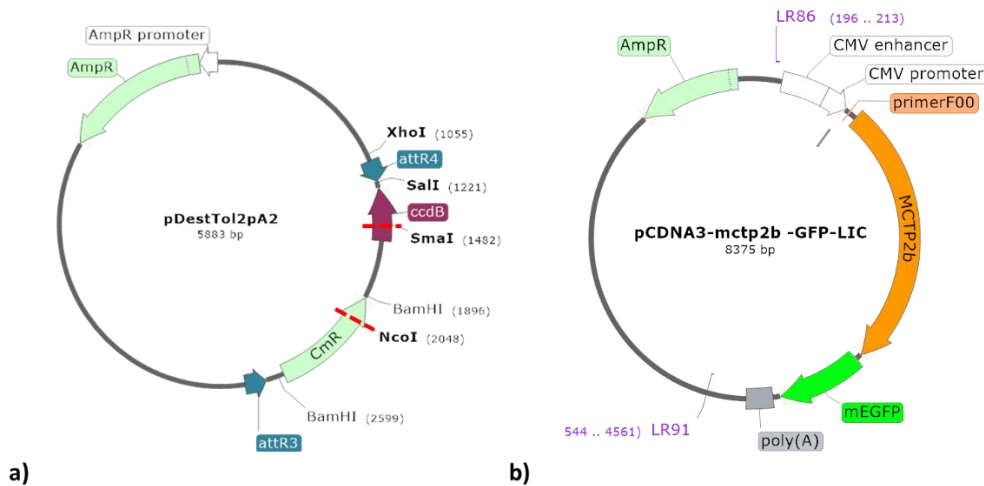
Polimerasa	Componentes de reacción
Taq DNA polimerasa	Agua piSA® estéril Buffer 10X para Taq DNA polimerasa MgCl <sub>2</sub> (50µM) Mix de dNTP's (10µM) Oligonucleótido delantero (10µM) Oligonucleótido reverso (10µM) DNA plasmídico (50µg) Enzima Taq DNA polimerasa.

**Tabla 4.** Condiciones de la reacción de PCR para la obtención de los fragmentos que contienen los genes que codifican MCTP.

pcDNA3-mctp2b-GFP-LIC p86-p91	Tm= 55.6°C 25µl			
H <sub>2</sub> O	18			
Buff	2.5	Desnaturalización	4 min	94°C
MgCl (1.5 µM)	0.75	○ Desnaturalización	30 seg	94°C
Dntp's	0.5	○ Alineación	30 seg	55.6°C
PrimerF 10 µM (LR86)	1	○ Elongación	3 min	72°C
PrimerR 10 µM (LR91)	1	Elongación	4 min	72°C
DNA (50ng)	1	Temp	∞	15°C
pTAQ	0.2			

c. Reacciones de digestión enzimática de ADN, ligación y transformación de células competentes

El ADN del plásmido pDestTol2pA2 se utilizó en una reacción con enzimas de restricción *EcoRI* (GAATTC) y *SaI* (GTCGAC), este plásmido tiene secuencias únicas para cada enzima, lo cual permitiría escindir el fragmento del plásmido con la secuencia *ccdB* y así obtener el vector para insertar el fragmento de la secuencia que contiene el gen *mctp*.



**Figura 7.** Mapa de plásmidos. **a)** Mapa del vector de clonación pDestTol2pA2. **b)** Mapa del plásmido pCDNA3-mctp2b-GFP-LIC, del cual se amplificó la secuencia por PCR para generar el fragmento con el promotor CMV y los genes *mctp2b* y *GFP*.

Los productos obtenidos de la amplificación con enzima *Taq* ADN polimerasa se ligaron al vector pDestTol2pA2 (figura 7a), digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI*. La reacción de ligación contenía 2  $\mu$ l de buffer T4 ligasa, 1  $\mu$ l (10U) de enzima T4-ADN ligasa, con una proporción de 1:3 entre vector e inserto. La reacción de ligación se llevó a cabo a una temperatura de 4°C durante toda la noche.

Posteriormente se llevó a cabo la transformación de la cepa XL1-Blue con 30  $\mu$ l de la mezcla de ligación en un volumen de 100  $\mu$ l de células competentes en frío durante 30 minutos y posterior choque térmico a 42°C durante 90 segundos. A la mezcla de transformación se agregaron 800  $\mu$ l de medio LB y se incubó durante una hora a 37°C para posteriormente sembrarse en condiciones selectivas.

Se sembraron las células en medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml), y se incubaron a 37°C por 16 horas. Los plásmidos extraídos de las colonias crecidas en el medio de selección se verifican mediante digestión enzimática con las enzimas *SacI* o *BamHI*.



#### d. Sistema Tol2

Para poder realizar la inserción de material genético en *D. rerio*, se utilizó el sistema Tol2. En este método se microinyecta en óvulos fertilizados una combinación del plásmido donador que incluye el casete que se quiere integrar al genoma flanqueado por los sitios de reconocimiento de la transposasa Tol2 (Ambion, 2012; Thermo Scientific, 2012) y el ARNm sintético que codifica la transposasa Tol2. La transposasa cataliza la escisión del casete de interés en el plásmido donador y su integración al azar en el ADN genómico (Kawakami, 2005, 2007). Para este proyecto se generó un plásmido con sitios reconocidos por la proteína transposasa, que flanquean la secuencia de interés (promotor CMV, gen *mctp2b* y marcador verde fluorescente GFP) para insertarlo en el genoma de *D. rerio* y generar sobreproducción de la proteína Mctp2b.

#### e. Microinyección de embriones de pez cebra

Se realizó el procedimiento microinyección de embriones de *D. rerio* (Rosen et al., 2009) que consiste en; (1) Producción y recolección de huevos. Una noche antes se colocaron dos hembras y un macho separados por una barrera física en peceras de apareamiento. En la mañana, se retira la división de las peceras y se deja aproximadamente 20 minutos de apareamiento. Se recolectaron los huevos de las peceras. Se vierten los huevos en una caja Petri con medio blue E3 (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y 1% azul de metileno) y se comprueba su fertilización. Con ayuda de una pipeta de transferencia se transfieren los embriones a una placa Petri con canales de agarosa. (2) Preparación de agujas. Con un puller de micropipetas, se obtiene un capilar de vidrio de 1.0 mm de diámetro externo. Se cargó la aguja con 3 µl de la mezcla de inyección. Se insertó la aguja en el microinyector y asegurando un sello hermético dentro de este. (3) Inyección. Se identifica que los embriones estén en la etapa de una célula. Se inyecta el contenido de la mezcla de microinyección (plásmido donador y ARNm de Tol2). Para establecer un control se apartan embriones que no serán microinyectados del

mismo grupo obtenido. Se realizan observaciones a diferentes tiempos para detectar embriones muertos y se cuantifica el total de embriones.

Las mezclas de microinyección contienen; pPC1 a diferentes concentraciones (25ng/μl, 50ng/μl y 100ng/μl), ARN Tol2 transposasa a 25ng/μl, rojo fenol a 0.05% y H<sub>2</sub>O.

#### f. Sobreexpresión por ARNm

Una de las herramientas utilizadas para el estudio de la sobreproducción de proteínas *in vivo*, es la microinyección de ARNm en un embrión en desarrollo de *D. rerio*, el cual provee una rápida exploración de la función del gen en el embrión (Lin et al., 2016; Rosen et al., 2009). Se generarán ARNm de las proteínas Mctp2b-GFP, Dsred-Rab7 (marcador de endosoma, Wang et al., 2011) y mCherry-Sec61beta (marcador de retículo endoplásmico, Kalies et al., 1998) para estudiar su efecto en el desarrollo del embrión y su localización celular. Para la generación de los ARNm se realiza una reacción de PCR donde se utiliza como molde a los plásmidos: pCDNA3-mctp2b-GFP-LIC, DsRed-rab7 WT y mCh-Sec61 beta. Se diseñaron juegos de primers que contienen los promotores reconocidos por la enzima ARN polimerasa T3 y T7 (tabla 2), para el primero de estos plásmidos se utilizó los primers LRIV y LR091, para el segundo y tercero la combinación de primers LR1I, LRIV y LRV para obtener fragmentos de 3770pb, 2616pb y 2255pb respectivamente, según las condiciones de la tabla 7. A partir de estos fragmentos que contienen el promotor T3 se realizó la transcripción *in vitro* (TIV) (Ambion, 2012; Thermo Scientific, 2012) para la obtención de ARNm que posteriormente será utilizado para microinyección a una concentración de 200 ng/μl.

**Tabla 5.** Condiciones de la reacción de PCR para la obtención de los fragmentos que contienen los genes que codifican para DsRed-Rab7, mCherry-Sec61b y el promotor T3.

mCh-Sec61 beta, DsRed-rab7 WT pLRIV-pLRV		Tm= 57°C 50µl		
H <sub>2</sub> O	38.5			
Buff	5	Desnaturalización	4 min	94°C
MgCl <sub>2</sub> (1.5 µM)	2	○ Desnaturalización	30 seg	94°C
Dntp's (10 µM)	1	○ Alineación	30 seg	57°C
PrimerF 10 µM (LRIV)	1	○ Elongación	4 min	72°C
PrimerR 10 µM (LRV)	1	Elongación	4 min	72°C
DNA (10ng/µl)	1	Temp	∞	4°C
pTAQ	0.5			

g. Análisis de viabilidad de embriones control.

Se obtuvieron grupos control para cada prueba. Se realizaron dos grupos diferentes de controles: (1) controles no microinyectados (control); estos se separan del grupo experimental y se comparan en las diferentes observaciones realizadas a los grupos experimentales, permiten observar la viabilidad de los embriones obtenidos en la puesta de una pareja de peces. (2) controles microinyectados (controlMI); estos controles son microinyectados con el material genético del experimento realizado en la misma concentración (pPC1) y en el caso de los experimentos con RNAm se microinyecta agua. Estos controles permiten descartar el estrés mecánico de la microinyección, así como la toxicidad del material genético, como causa del efecto en el desarrollo del embrión. Los controlesMI no se realizaron en cada prueba, sin embargo, se realiza una prueba estadística para determinar diferencias entre el control y el controlMI.

h. Análisis de viabilidad de los embriones microinyectados

Una vez obtenidos los grupos microinyectados y de control, se cuantifica el total de embriones de cada grupo. Se realizaron observaciones para determinar la mortalidad del embrión a las 6, 8, 24, 36 y 48 hpf. Al identificar un embrión no viable, se retira de la caja Petri de su grupo y se desecha. Para determinar que un embrión no es viable se evalúa el color del embrión y su morfología. Los embriones que

presentan alteraciones morfológicas no fueron retirados ya que representan un grupo de interés para el experimento. La mortalidad es calculada dividiendo el número de embriones muertos entre el número total de embriones del grupo. Se compararon las observaciones realizadas a las 24 hpf, al representar las diferencias de los diferentes embriones obtenidos.

i. Análisis de la sobreexpresión de *mctp2b* por fluorescencia

Se realizaron observaciones con el microscopio de epifluorescencia, Olympus CKX41 con el filtro de luz para GFP y el LED EXFO X-Cite 120 para determinar la presencia de fluorescencia en el embrión a las 6, 8, 24, 36 y 48 hpf. Se identificaron los embriones en el campo claro y posteriormente con el filtro de luz para GFP. Para descartar fluorescencia basal propia de los embriones de *D. rerio*, se realizan observaciones del grupo control. Los embriones con fluorescencia se seleccionan y se colocan en otra caja Petri para facilitar su seguimiento. La captura de imágenes se realiza en campo claro y con el filtro de luz para GFP, con aumentos de 4x, 10x y 20x. Se cuantifica el número de embriones que presentaron fluorescencia dentro de cada grupo.

j. Fijación de embriones con PFA (4%)

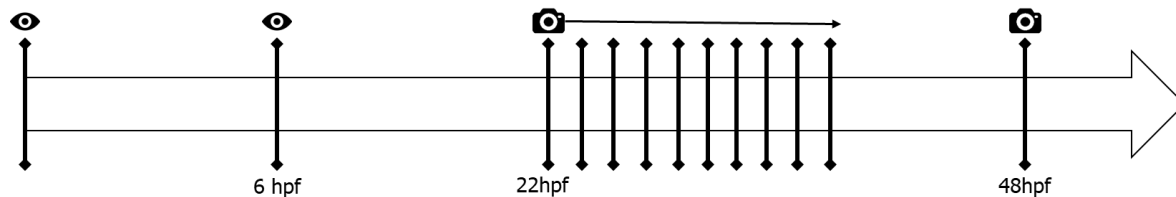
Se colocaron embriones de 24, 36, 48 y 60 hpf durante diez min en PFA 4%. Lavado con PBS-1x por 5 min 3 veces. Se realizan lavados durante 20 min con PBS con glicerol al 20%, 50% y 75%. Colocar la muestra en un tubo de microcentrífuga con glicerol 100%. Mantener en congelación a -20°C hasta montar embriones para captura de imágenes y análisis de fluorescencia (Baker, 2019). Para montar los embriones se utilizaron porta objetos con cinco capas de cinta de aislar perforada, generando cavidades de aproximadamente 0.5 cm de diámetro (figura 8). Con ayuda del microscopio estereoscópico Olympus SZX7, y utilizando una micropipeta de 1000 µl se recuperarán los embriones permitiendo montar cada uno en los portaobjetos con PBS con glicerol al 75%.

k. Lapso de tiempo

Se observaron los embriones microinyectados con pPC1 a diferentes tiempos (6, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 30, 32, 48 hpf). A partir de las 22 hpf los embriones que presentaban sobreproducción de la proteína Mctp2b se fijaron en agarosa de bajo punto de fusión al 1%, se realizó la captura de imagen en campo claro y filtro de luz de los embriones cada hora, durante diez horas con el microscopio de epifluorescencia Olympus CKX41y el filtro de luz para observar GFP, EXFO X-Cite 120.



**Figura 8.** Esquema de montaje. Montaje de embriones de *D. rerio* para realizar observaciones.



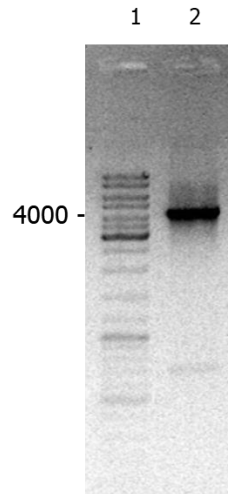
**Figura 9.** Lapso de tiempo. Resumen gráfico del experimento de lapso de tiempo con embriones microinyectados con pPC1.

## I. Análisis de co-localización

Los embriones de 24 y 48 hpf microinyectados con pPC1 (100 ng/μl) y ARNm Sec61b (200 ng/μl) se fijaron con PFA a 4% para capturar imágenes en el microscopio Confocal Zeiss LSM 780. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el plugin JACoP (Just Another Colocalization Plugin) en el programa ImageJ. Esta herramienta puede utilizar indicadores comunes de co-localización; coeficiente de Pearson's, coeficiente de superposición y coeficiente de Manders (Bolte & Cordelieres, 2006).

## 6. Resultados

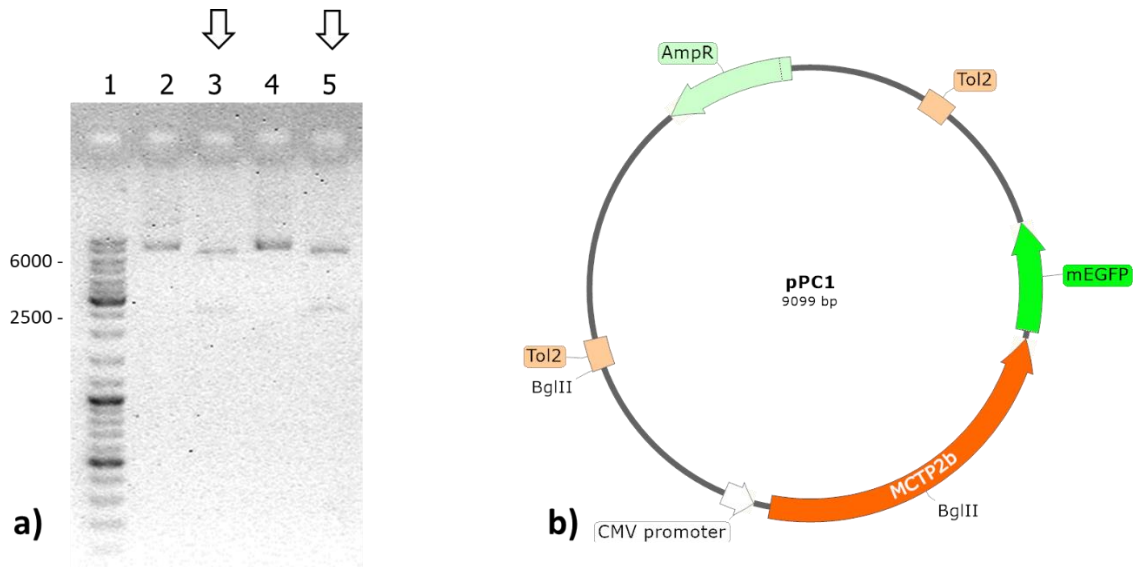
De acuerdo con las condiciones descritas previamente en la tabla 4, se logró obtener fragmentos específicos de ADN amplificados de los plásmidos con el gen *mctp2b*-GFP, utilizando los oligonucleótidos de la tabla 2, se obtuvo el tamaño de banda esperada 4561 pb (figura 10).



**Figura 10.** Productos de la amplificación de fragmentos de plásmido con la secuencia que codifica para proteínas Mctp2b. Carril 1: M.P.M.; carril 2: Mctp2b-GFP-8691, tamaño de banda esperado: 4561 pb.

### a. Plásmido pPC1

Este plásmido contiene el promotor CMV que regula la expresión de la fusión Mctp2b-GFP. Se comprobó la identidad del plásmido por medio de una reacción con enzimas de restricción (*Bgl*II, figura 11a).



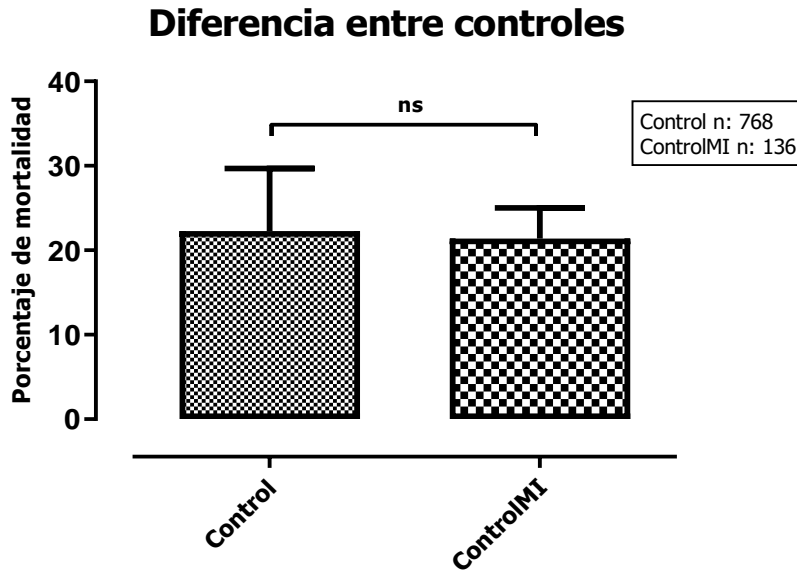
**Figura 11.** Caracterización del plásmido pPC1, resultado obtenido de la reacción con la enzima de restricción *BglII*. Bandas esperadas de 6600 y 2500 pb. **a)** Carril 1: M.P.M.; carril 2: pPC1; carril 3: pPC1 digerido con *BglII*; carril 4: pPC1; carril 5: pPC1 digerido con *BglII* **b)** Mapa del vector de clonación. Indica *BglII* en el mapa construido; pPC1.

#### b. Análisis de la viabilidad de los embriones post-inyección

Se analizaron cinco grupos diferentes. Control no microinyectado, control microinyectados (controlMI), microinyectados con pPC1 a 25 ng/μl, microinyectados con pPC1 a 50 ng/μl y microinyectados con pPC1 a 100 ng/μl. La media de estos grupos fue obtenida de eventos independientes de microinyección. Para comparar los datos entre los diferentes grupos se calculó el porcentaje de mortalidad a partir del número de embriones muertos entre el total de embriones microinyectados.

Para descartar la posibilidad de que los datos obtenidos fueran un falso positivo ocasionado por la microinyección, se incluyó un control microinyectado. Se realizó una prueba de  $\chi^2$  entre el control y el controlMI, obteniendo un p-value de 0.7871, un valor de z de 0.2701, esto nos indica, con un margen de confianza del 95%, que no hay diferencia significativa entre el control y control microinyectado. En la figura 12 se puede ver la representación gráfica de la comparación de porcentajes.



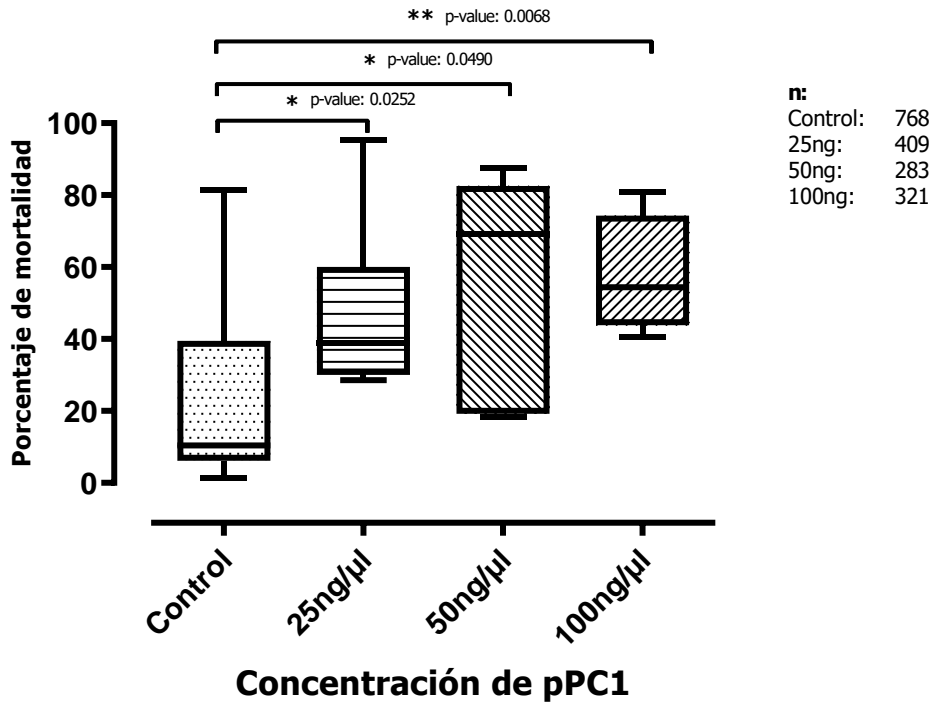


**Figura 12.** Diferencia entre controles. Gráfica de diferencia entre control y controlMI. Se muestra la diferencia de la media del porcentaje de mortalidad de cada grupo. Se realizó una prueba  $\chi^2$  entre el control y el controlMI, obteniendo un p-value de 0.7871, un valor de z de 0.2701. No hay una diferencia significativa.

Para determinar si la mortalidad es debida a la expresión de mctp2b-GFP se realizó un prueba ANOVA entre los grupos control contra los grupos microinyectados con pPC1, se obtuvo una p-value de 0.00197, esto nos muestra que hay una diferencia significativa entre estos dos grupos.

Para identificar la concentración de pPC1 que genera un efecto significativo en la mortalidad comparado con el control, se realizaron pruebas t Student independientes entre cada concentración contra el control. Se obtuvo de control vs 25ng/ $\mu$ l; p-value de 0.0252, control vs 50ng/ $\mu$ l; p-value de 0.0490, control vs 100ng/ $\mu$ l; p-value de 0.0068. Podemos interpretar que las tres concentraciones tienen un efecto significativo en la mortalidad de los embriones. La concentración que tiene una diferencia mayor con respecto al control es pPC1 100ng/ $\mu$ l.

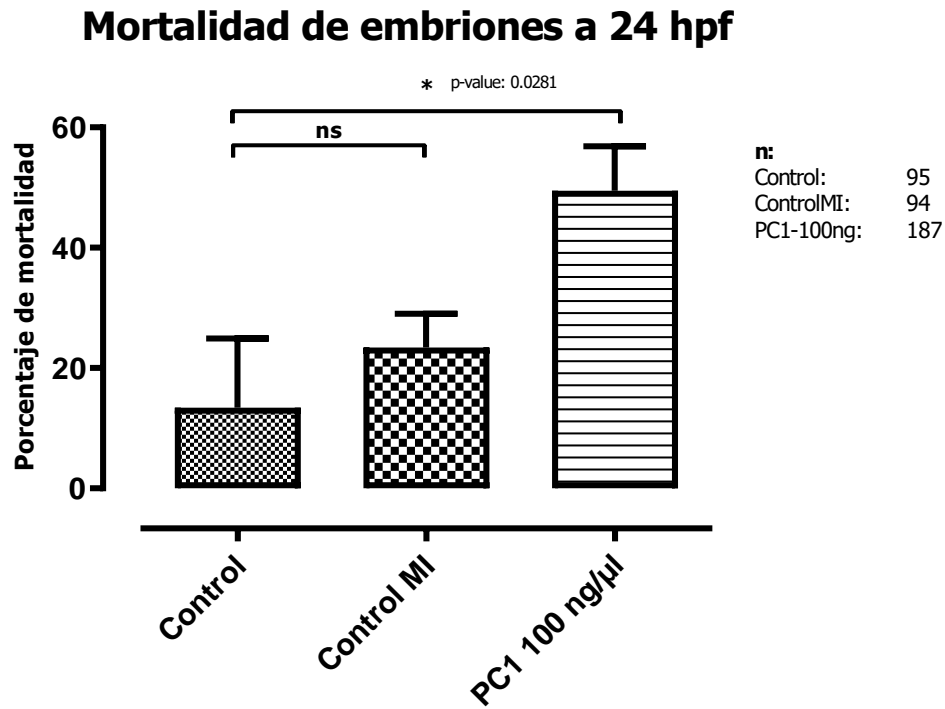
## Mortalidad de embriones a 24 hpf



**Figura 13.** Mortalidad de embriones a 24 hpf. Gráfica del porcentaje de mortalidad de embriones a 24 hpf. Se muestra la diferencia de la media del porcentaje de mortalidad de cada grupo.

Con la concentración de pPC1 100 ng/μl, identificada como óptima, se microinyectó un mayor número de embriones para observar el efecto provocado por la sobreproducción de la proteína Mctp2b-GFP. Se adicionó un grupo control microinyectado con el plásmido pPC1 a 100 ng/μl sin ARNm transposasa. Se realizó una prueba ANOVA entre los grupos microinyectados y un control no microinyectado. Se obtuvo una p-value de 0.0311, mostrando una diferencia significativa entre los grupos. Se realizó una prueba t Student independiente entre el grupo control microinyectado vs grupo pPC1 100 ng/μl, encontrado un p-value de 0.0281, diferencia significativa. Este valor muestra que el efecto de mortalidad presente en los embriones no es consecuencia del estrés de la microinyección, ni

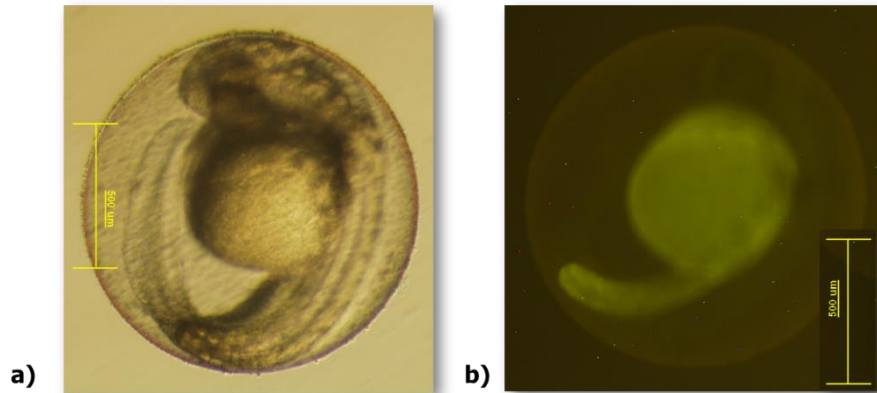
de la presencia del plásmido. También demuestra que la sobre producción de la proteína Mctp2b-GFP genera un aumento en la mortalidad.



**Figura 14.** Mortalidad de embriones a 24 hpf. Gráfica del porcentaje de mortalidad de embriones a 24 hpf. Se muestra la diferencia de la media del porcentaje de mortalidad de cada grupo.

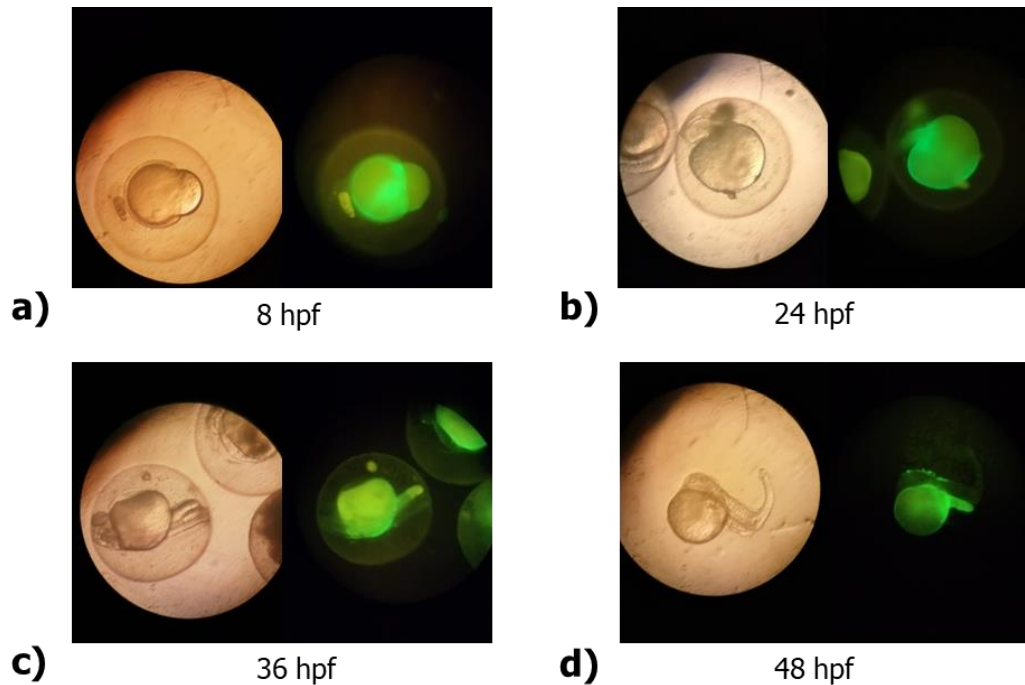
#### c. Expresión de mctp2b-GFP

El plásmido pPC1 contiene el promotor CMV que permitirá la sobreexpresión del gen de *mctp2b* y un gen reportero GFP. Para poder determinar que la sobreexpresión de *mctp2b* se lleva a cabo en los embriones microinyectados, se identifica la presencia de fluorescencia correspondiente a GFP. Para identificar la fluorescencia basal de *D. rerio* previo a las evaluaciones de los grupos microinyectados, se observaron los embriones control en campo claro y con el filtro de luz para GFP (figura 15).



**Figura 15.** Controles de *D. rerio* a 30 hpf. a) Se observa embriones en campo claro, en las imágenes b) se observa la autofluorescencia de los embriones.

Se realizaron observaciones a diferentes tiempos post inyección, donde se encontraron embriones que presentan puntos fluorescentes. La presencia de *mctp2b* se detecta mediante la señal verde fluorescente a las 24 hpf, sin embargo, en ocasiones se llegó a observar esta señal verde desde las 8 hpf. En la figura 16 se muestran embriones que presentan señal de la proteína verde fluorescente en diferentes tiempos de evaluación. Estos embriones presentan características morfológicas atípicas para su fase de desarrollo.

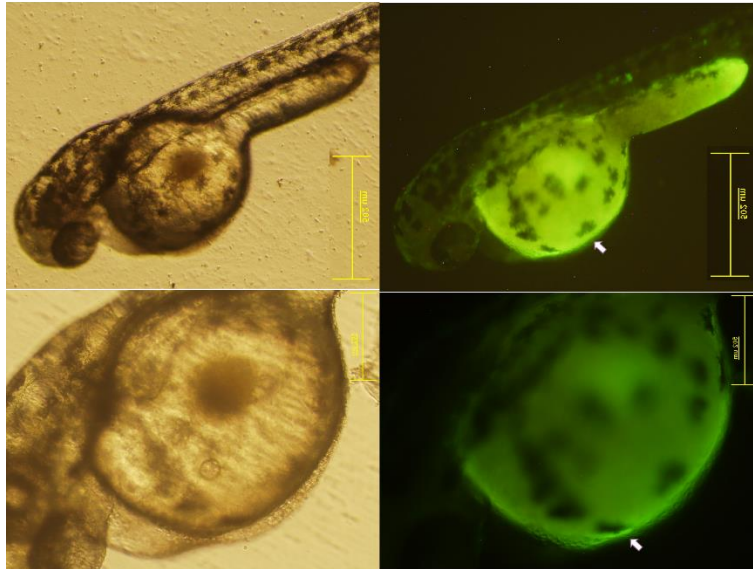


**Figura 16.** Evaluación preliminar de la expresión de Mctp2b-GFP. Del lado izquierdo de las imágenes se muestran embriones en campo claro, y del derecho la fluorescencia de GFP. a) Evaluación a las 8 hpf. b) Evaluación a las 24 hpf. c) Evaluación a las 36 hpf. d) Evaluación a las 48 hpf. Se observa la presencia de fluorescencia y deformidad en los embriones.

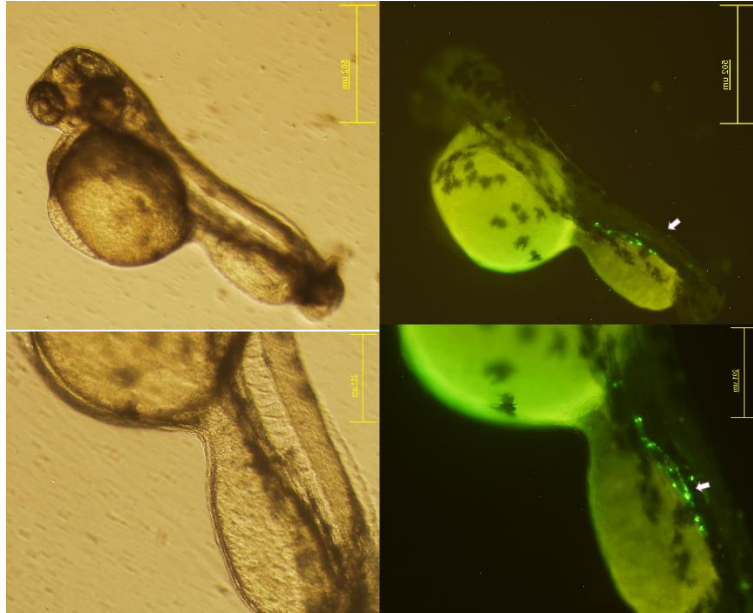
La sobreexpresión de *mctp2b* se localizó en diversas regiones anatómicas en los embriones (figuras 17, 18 y 19). De forma cualitativa se aprecian diferentes intensidades en la señal verde fluorescente de los embriones. Por ejemplo, se identificó señal verde fluorescente en el saco vitelino, aleta dorsal e intestinos.

Para las diferentes concentraciones de pPC1 microinyectadas (25 ng/μl, 50 ng/μl y 100 ng/μl) se encontraron embriones con sobreexpresión de *mctp2b*. Para determinar la diferencia del efecto de las concentraciones, se realizó una prueba ANOVA con los tres grupos. Se considero el número de embriones que presentan fluorescencia, a partir de este se calculó el porcentaje de embriones que presentan fluorescencia con respecto al total de embriones microinyectados de cada grupo. La prueba estadística obtuvo un p-value 0.0104, lo que indica que hay diferencia significativa entre los grupos. Con la prueba múltiple de Tukey se calculó las t's

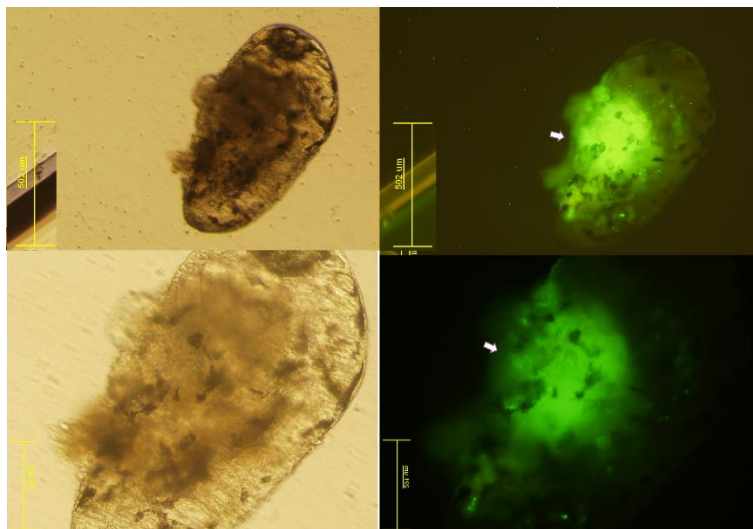
individuales entre todos los grupos. Con respecto al control se obtuvo: 25 ng/ $\mu$ l t= 1.699, 50 ng/ $\mu$ l t= 3.422, 100 ng/ $\mu$ l t= 6.098, obteniendo que la concentración de pPC1 a 100 ng/ $\mu$ l tiene una mayor diferencia con respecto al control. El gráfico generado por esta prueba se observa en la figura 20.



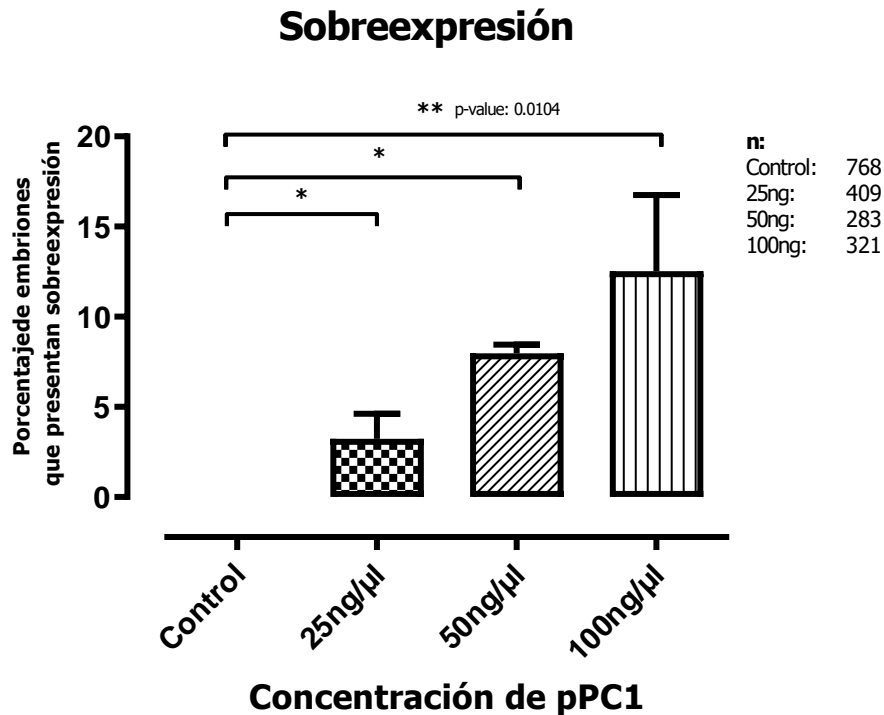
**Figura 17.** Evaluación de fluorescencia de embriones microinyectados con pPC1-100 ng/ $\mu$ l a 48 hpf. Evaluación de fluorescencia de embriones microinyectados con pPC1-100 ng/ $\mu$ l a 48 hpf. Las imágenes de la izquierda se muestran en campo claro, las de la derecha con el filtro verde. Se puede observar la presencia de puntos fluorescentes en el embrión.



**Figura 18.** Evaluación de fluorescencia de embriones microinyectados con pPC1-100ng/μl a 48 hpf. Las imágenes de la izquierda se muestran en campo claro, las de la derecha con el filtro verde. Se puede observar la presencia de puntos fluorescentes en el embrión. El embrión presenta una evidente deformación de la región caudal.



**Figura 19.** Evaluación de fluorescencia de embriones microinyectados con pPC1-100 ng/μl a 48 hpf. Las imágenes de la izquierda se muestran en campo claro, las de la derecha con el filtro verde. Se puede observar la presencia de puntos fluorescentes en el embrión. El embrión no presenta un desarrollo óptimo, al punto que no se puede reconocer el vitelo y se presenta una clara deformidad.



**Figura 20.** Gráfica de porcentaje de fluorescencia de los embriones microinyectados con diferentes concentraciones de pPC1. Se calculó el porcentaje de embriones que muestran fluorescencia a las 24 hpf con respecto a embriones vivos de cada grupo. Se realizó una prueba ANOVA para determinar si la diferencia de embriones fluorescentes entre los grupos era significativa. Se encontró que la concentración de pPC1 100 ng/μl es significativa con respecto al control.

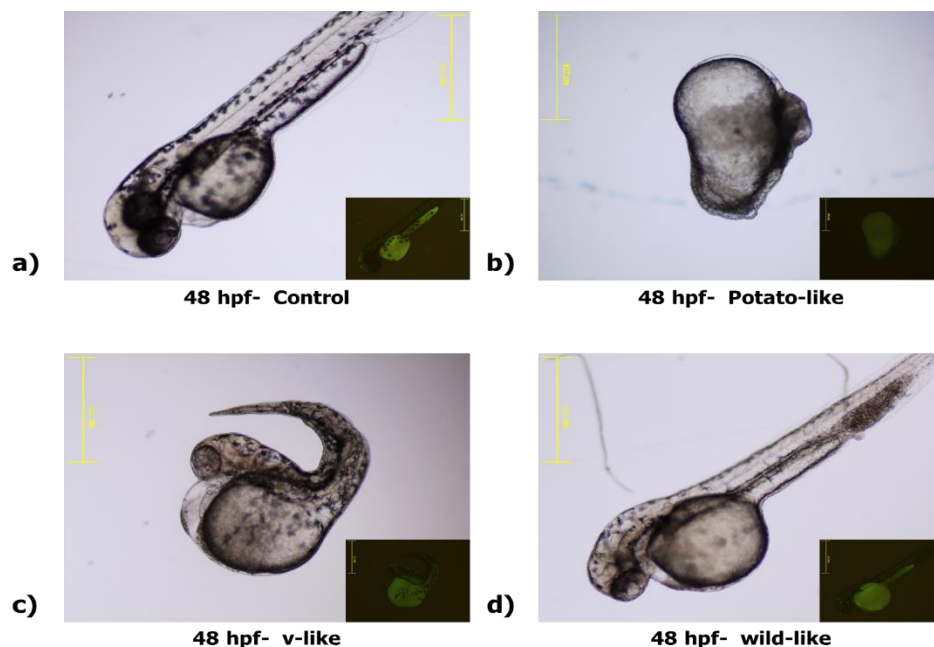
Con la concentración de pPC1 100 ng/μl, identificada como óptima, se microinyectó un mayor número de embriones para observar el efecto provocado por la sobreproducción de la proteína Mctp2b-GFP. Del total de embriones microinyectados con el plásmido pPC1 a 100 ng/μl, n= 712, se obtiene que 19.2% presenta sobreproducción de la proteína Mctp2b-GFP.

#### d. Caracterización fenotípica.

De los embriones que presentan la sobreproducción de la proteína Mctp2b-GFP, se identificaron morfologías diferentes, obteniendo así tres fenotipos distintos: 1) potato-like; los embriones presentan deformidad en la forma del vitelo, así como un desarrollo interrumpido en la formación del cuerpo de la larva, se puede observar



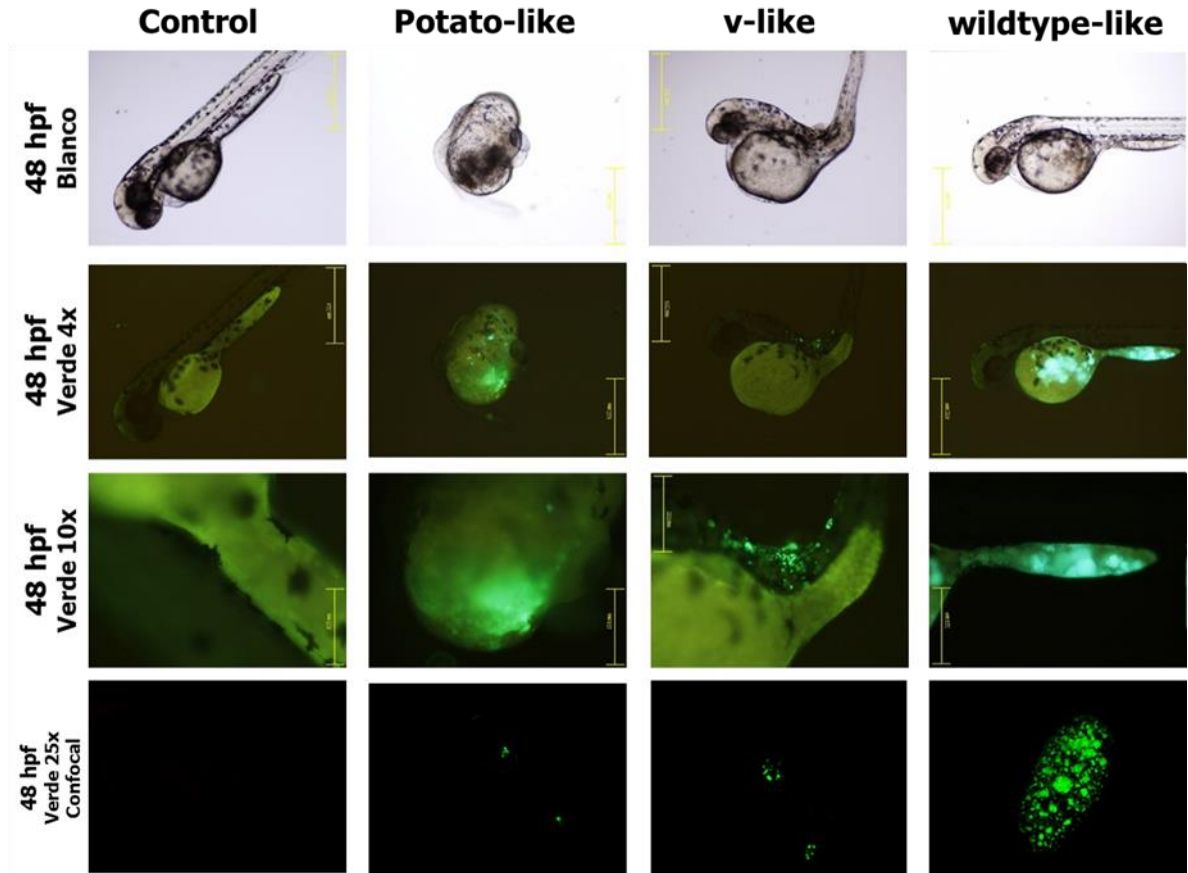
vestigios de la cabeza y la cola, la larva no puede sobrevivir después de 72 hpf, se encuentran diferentes puntos de la señal verde fluorescente en la región del vitelo. 2) v-like; el cuerpo de la larva se desarrolla completamente, sin embargo, el embrión se dobla en la parte dorsal, la larva no puede sobrevivir después de 5 días post fertilización (dpf), la señal verde fluorescente se localiza en la región dorsal donde la larva se dobla, con diferentes puntos fluorescentes. 3) wildtype-like; el embrión se desarrolla de forma normal, la presencia de la señal verde fluorescente se aprecia en diferentes partes del cuerpo de la larva, principalmente en el vitelo, las larvas pueden sobrevivir después de 5 dpf. En la figura 21 se muestran estos fenotipos.



**Figura 21.** Evaluación de morfología de embriones con sobreproducción de la proteína Mctp2b-GFP. a) Fenotipo wild-type (control). b) Fenotipo potato-like c) Fenotipo v-like. d) Fenotipo wildtype-like. Se observan tres morfologías diferentes a causa de la sobreproducción de la proteína Mctp2b-GFP.

La supervivencia de los embriones que presentan la señal verde fluorescente a las 48hpf es del 66%. Los embriones con fenotipo potato-like y v-like al tener malformaciones severas en su desarrollo no logran sobrevivir después de 120 hpf.

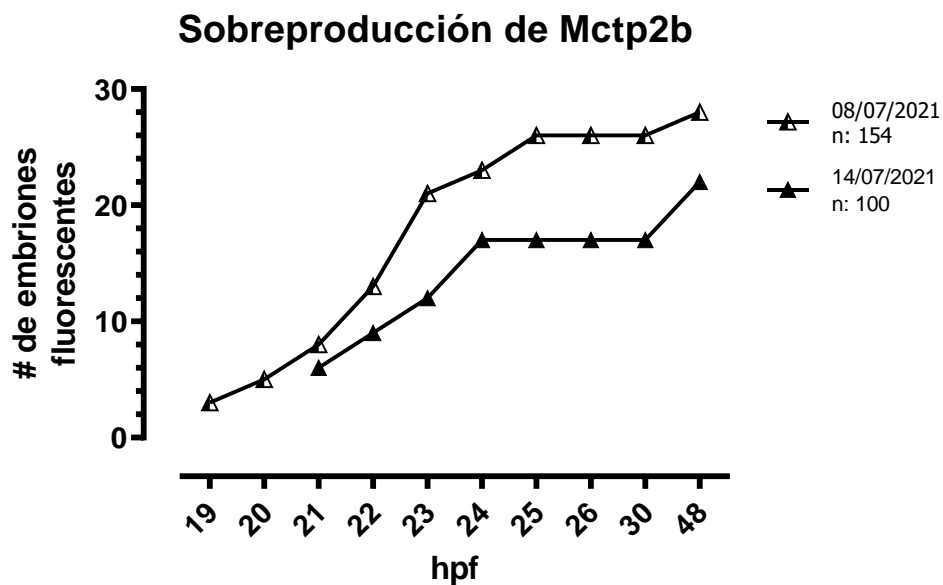
Las larvas wildtype-like que presentan sobreproducción de la proteína Mctp2b pueden mantener su desarrollo después de las 120 hpf. Las larvas que sobreviven pierden la señal verde fluorescente.



**Figura 22.** Evaluación de morfología y fluorescencia de embriones con expresión de la proteína Mctp2b-GFP.

e. Lapso de tiempo

Se observó la morfología y la presencia de puntos fluorescentes de embriones microinyectados con pPC1 (100 ng/μl) a diferentes horas post-fertilización. Con las observaciones de dos días diferentes se cuantificó el número de embriones fluorescentes que obtienen con el paso del tiempo. Se encontró que entre las 22 y 25 hpf se tiene el mayor número de embriones con señal verde fluorescente resultantes de la sobreexpresión de *mctp2b*.

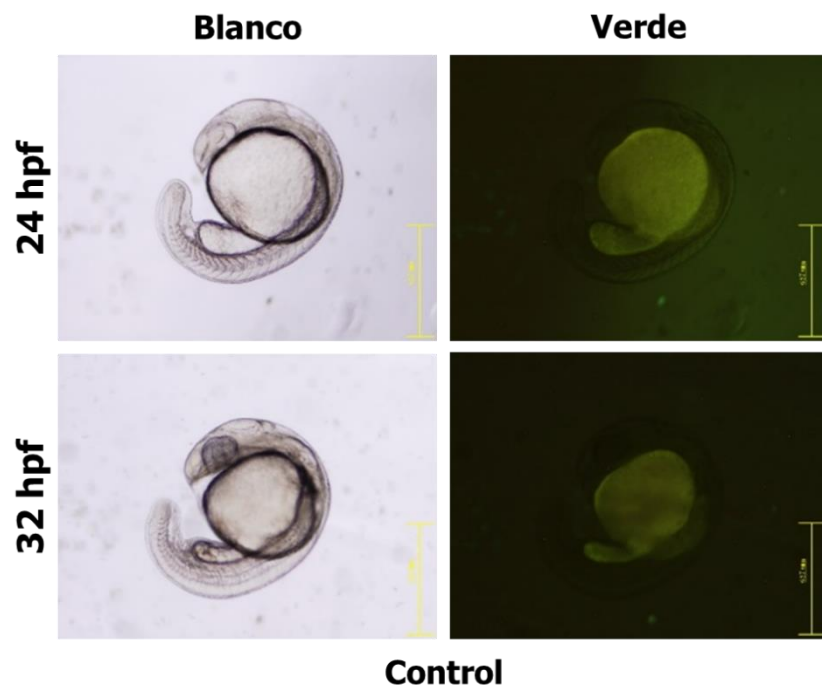


**Figura 23.** Grafica que muestra el número de embriones fluorescentes obtenidos en diferentes hpf. Se muestra el resultado de dos experimentos, con una n total de 154 y 100 respectivamente. Se observa que entre las 22 y 25 hpf hay un aumento de los embriones que presentan la sobreexpresión, y este se mantiene constante en horas posteriores.

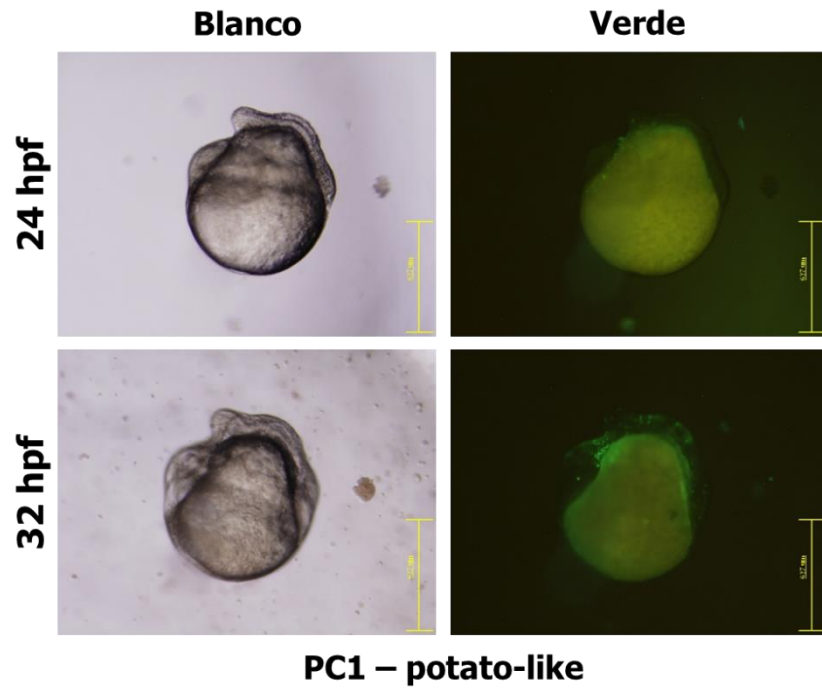
Del total de embriones observados (n= 38) se seleccionaron las imágenes que permitían observar el desarrollo del embrión y la sobreexpresión de *mctp2b* mediante la presencia de la señal verde fluorescente. Las imágenes de cada embrión se recopilaron en una animación GIF ([Carpeta drive](#)) y en las imágenes asociadas a los fenotipos previamente descritos (figuras 25, 26, y 27).

La preparación de los embriones montados con agarosa de bajo punto de fusión al 1% en portaobjetos no afecta el desarrollo embrionario. Se observó que la detección de señal verde fluorescente en el embrión se dio de forma súbita entre las 22 y 24 hpf, y no de forma gradual durante diferentes tiempos. La localización de la señal verde fluorescente en los embriones, puede asociarse al fenotipo, como se describió previamente. La fluorescencia encontrada en el vitelo no afecta, aparentemente, el desarrollo del embrión a diferencia de los embriones que presentan la señal verde fluorescente en partes del cuerpo diferentes al vitelo que producen diferentes fenotipos (potato-like, v-like).

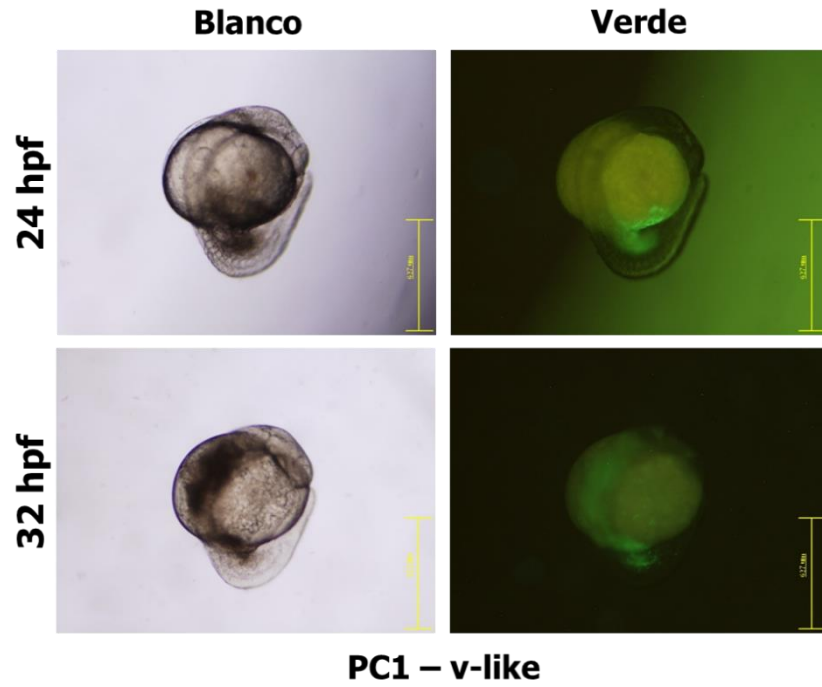
Además, el seguimiento de los embriones durante diez horas nos permitió observar que la distribución de la señal fluorescente aumenta su intensidad y comienza a distribuirse por el cuerpo del embrión cuando comienza su proceso de muerte ([Carpeta drive](#)).



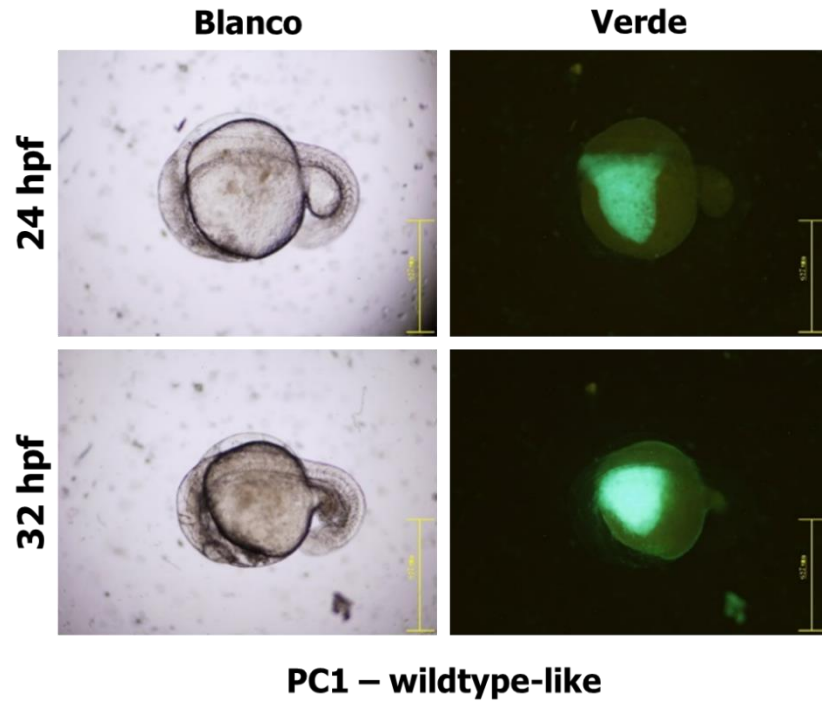
**Figura 24.** Experimento lapso de tiempo, embrión control. Se observa el desarrollo y fluorescencia del embrión a las 24 y 32 hpf.



**Figura 25.** Experimento lapso de tiempo, fenotipo potato-like. Se observa el desarrollo y fluorescencia del embrión a las 24 y 32 hpf. Se observa malformación en el desarrollo, así como el aumento de la sobreexpresión de *mctp2b*.



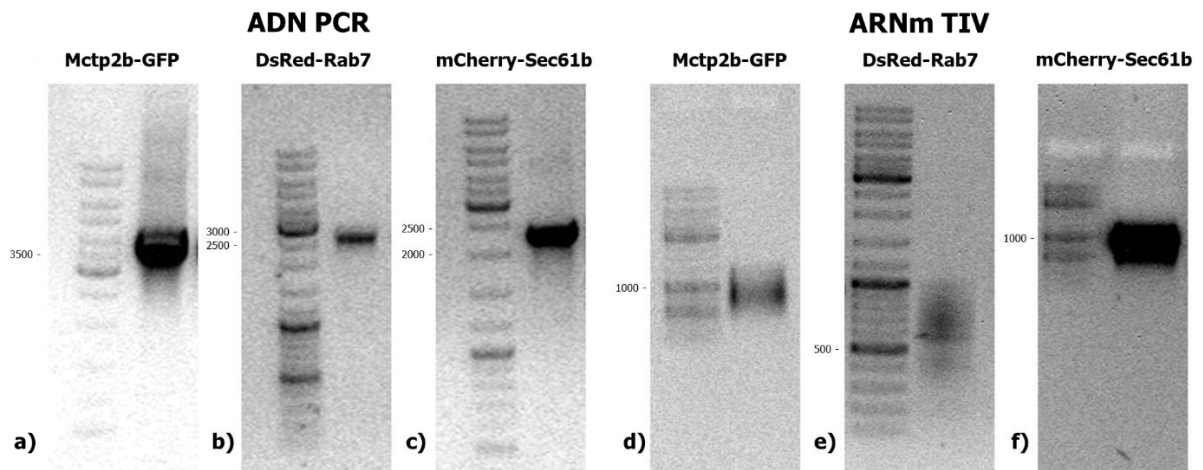
**Figura 26.** Experimento lapso de tiempo, fenotipo v-like. Se observa el desarrollo y fluorescencia del embrión a las 24 y 32 hpf. Se observa fluorescencia localizada fuera del vitelo.



**Figura 27.** Experimento lapso de tiempo, fenotipo wildtype-like. Se observa el desarrollo y fluorescencia del embrión a las 24 y 32 hpf. Se observa fluorescencia localizada en vitelo, así como aumento en la intensidad de la sobreproducción de Mctp2b.

f. Sobreexpresión con ARNm

Se realizaron reacciones de PCR para la obtención de fragmentos de ADN que codifiquen para las proteínas Mctp2b-GFP, DsRed-Rab7 y mCherry-Sec61b según las condiciones de la tabla 8 para poder generar ARNm *in vitro* y utilizarlo para generar la sobreproducción de las proteínas en embriones de *D. rerio*. Se logró obtener por PCR el ADN molde para la transcripción *in vitro*: 3754 pb, 2616 pb y 2255 pb para Mctp2b-GFP, DsRed-Rab7 y mCherry-Sec61b respectivamente.

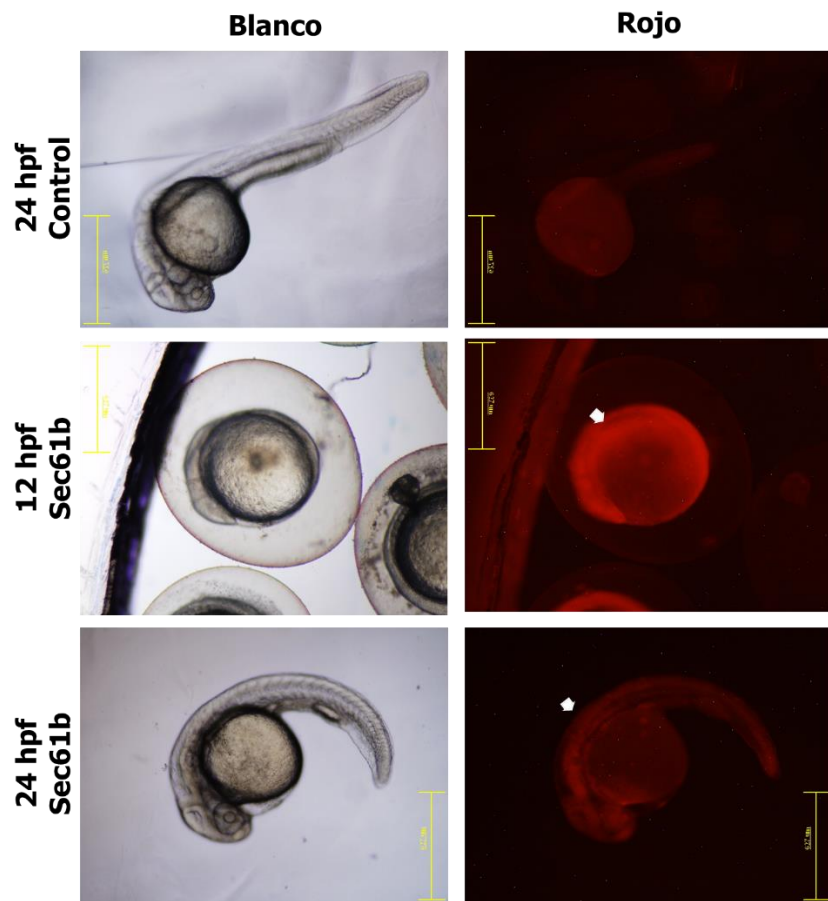


**Figura 28.** ADN-PCR y ARNm-TIV. Productos de la amplificación de fragmentos de plásmidos (a-c) y el producto de ARNm de la transcripción *in vitro* (d-f), con la secuencia que codifica para proteínas Mctp2b-GFP, DsRed-Rab7 y mCherry-Sec61b. **a)** Carril 1: M.P.M.; carril 2: Mctp2b-GFP. **b)** Carril 1: M.P.M, Carril 2 DsRed-Rab7. **c)** Carril 1: M.P.M.; Carril 2: mCherry-Sec61b. **d)** Carril 1: M.P.M.; Carril 2: ARNm Mctp2b-GFP. **e)** Carril 1: M.P.M.; carril 2: ARNm DsRed-Rab7. **f)** Carril 1: M.P.M.; Carril 2: mCherry-Sec61b.

Se realizaron microinyecciones de embriones unicelulares de pez cebra con los ARNm de Mctp2b-GFP, DsRed-Rab7 y mCherry-Sec61b. Con el ARNm de Mctp2b-GFP a 200 ng/μl y con el ARNm de DsRed-Rab7 a 200 ng/μl en 180 y 192 embriones, respectivamente, no se obtuvo la expresión de la proteína, no se observó fluorescencia, ni cambios de morfología de las larvas. No hubo diferencias en el porcentaje de supervivencia de los embriones microinyectados y control. Con el ARNm de mCherry-Sec61b a 200 ng/μl en 178 embriones se observó la expresión



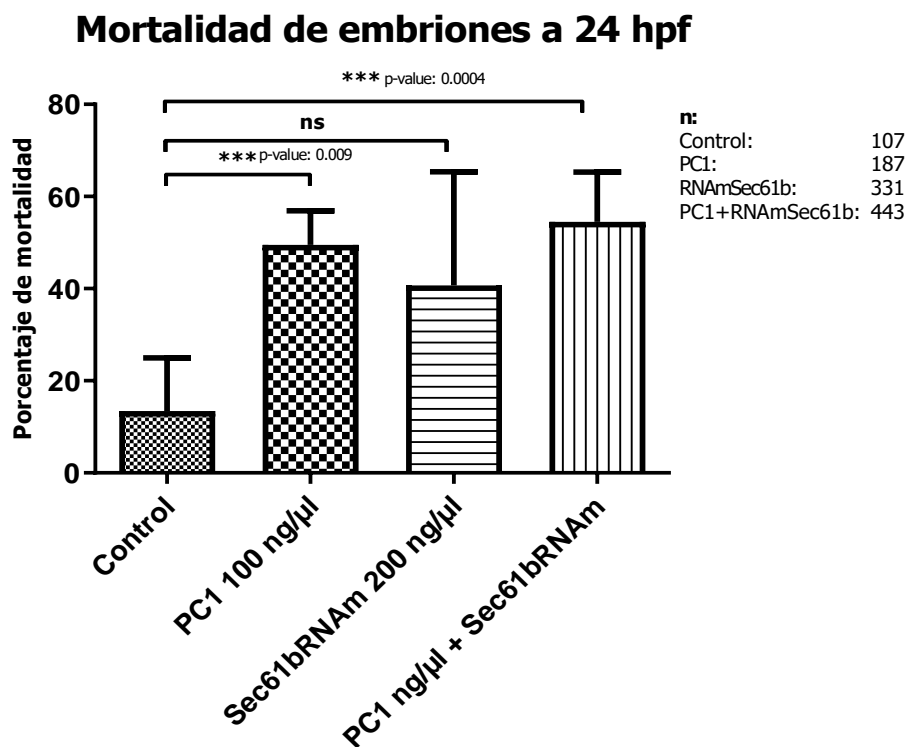
de la proteína, se observó fluorescencia en rojo (mCherry), no se observaron cambios en la morfología de las larvas. Realizando una prueba estadística t-Student se encontró que no había diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia del grupo control y el grupo microinyectado con ARNm de mCherry-Sec61b a 200 ng/μl, obteniendo un p-value de 0.1663. La fluorescencia observada se muestra en la figura 29 donde se aprecia la distribución uniforme de la fluorescencia en los embriones, la localización de esta se presenta en el cuerpo de la larva, en las células que proliferan, diferentes al vitelo. El porcentaje de embriones que expresan la proteína mCherry-Sec61b es del 41.5%.



**Figura 29.** Evaluación de fluorescencia de embriones microinyectados con ARNm sec61b 200 ng/μl. Las imágenes de la izquierda se muestran en campo claro, las de la derecha el filtro rojo. Se puede observar la presencia de fluorescencia de forma uniforme en el embrión.

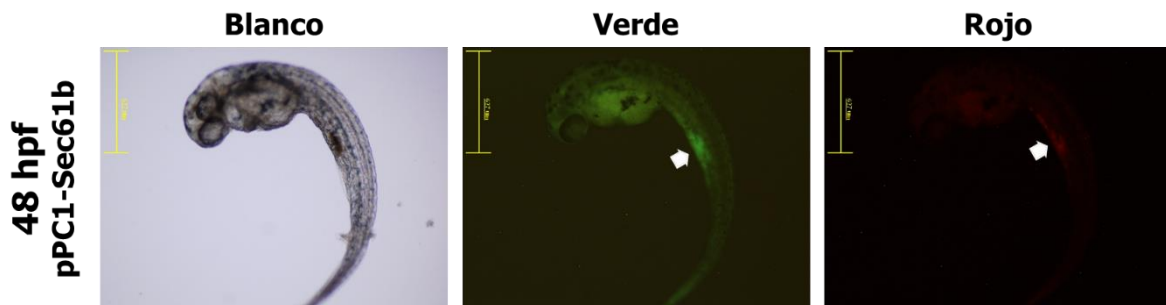
### g. Co-inyección pPC1 y ARNm Sec61b

Se realizó una microinyección con el plásmido pPC1 100 ng/μl y el ARNm de mCherry-Sec61b a 200 ng/μl con el objetivo de observar la posible co-localización de las proteínas fluorescentes. Se microinyectaron 223 embriones. Se analizó la supervivencia de estos embriones comparada con los datos obtenidos de las microinyecciones de ARNm Sec61b y pPC1. Se realizó una prueba ANOVA entre los grupos, se obtuvo una p-value de 0.0025, lo que muestra una diferencia significativa entre los grupos. También se realizó una prueba t-Student contra el control obteniendo un valor de 0.0004, mostrando una diferencia significativa mayor que en los grupos previamente analizados. La mortalidad de los embriones se ve incrementada por la co-inyección de los sistemas de sobreexpresión.



**Figura 30.** Mortalidad de embriones a 24 hpf. Gráfica del porcentaje de mortalidad de embriones a 24 hpf. Se muestra la diferencia de la media del porcentaje de mortalidad de cada grupo.

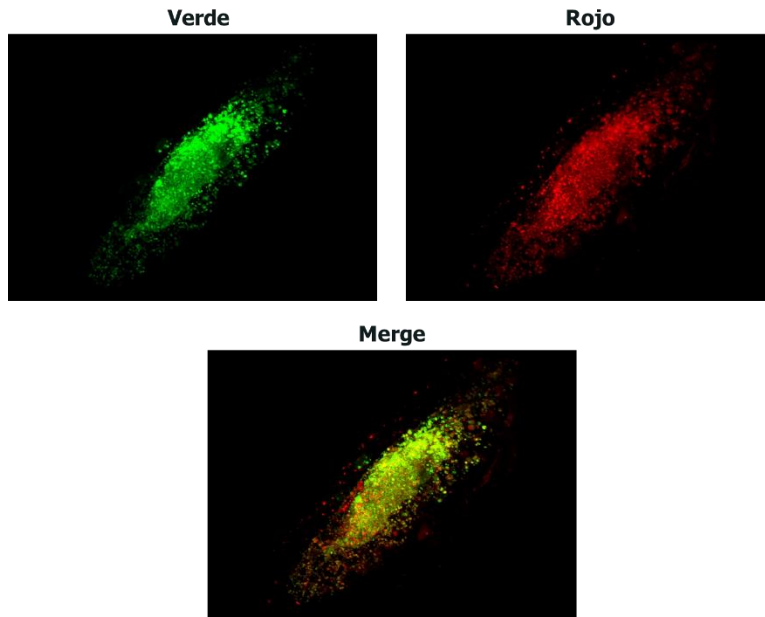
El porcentaje de embriones que presentan señal fluorescente ya sea verde para GFP o roja para mCherry es del 10.28%, y de estos embriones solo el 1.34% presenta ambas señales. La fluorescencia observada no es congruente con los experimentos previos, ya que la distribución de la fluorescencia roja no es uniforme por el cuerpo de la larva, sino que se encontró localizada en diferentes puntos del vitelo. La fluorescencia en verde se puede observar también en la región del vitelo en la larva.



**Figura 31.** Evaluación de fluorescencia de embriones microinyectados con ARNm sec61b 200 ng/ $\mu$ l y pPC1 100ng/ $\mu$ l. Se muestra la imagen en campo claro, filtro verde y rojo. Se puede observar la presencia de fluorescencia en el mismo punto del embrión.

#### h. Análisis de localización

De las imágenes obtenidas con el microscopio confocal LSM 780 (Zeiss) de los embriones microinyectados con pPC1 (100 ng/ $\mu$ l) y ARNm Sec61b (200 ng/ $\mu$ l) a 24 hpf, se realizó el análisis de co-localización, obteniendo valores de; coeficiente de Pearson's:  $r=0.885$ , coeficiente de superposición: ICQ= 0.46345283406877613, y coeficiente de Manders M1=0.924 (fracción de A sobreponiéndose a B) y M2=0.999 (fracción de B sobreponiéndose a A). Estos resultados indican que las señales fluorescentes en rojo y en verde co-localizan.



**Figura 32.** Evaluación de co-localización de embriones microinyectados con ARNm sec61b 200 ng/ $\mu$ l y pPC1 100ng/ $\mu$ l. Se muestra imágenes tomadas con confocal de puntos fluorescentes en embriones microinyectados con ARNm sec61b 200 ng/ $\mu$ l y pPC1 100ng/ $\mu$ l. Los puntos en amarillo muestran la colocación de la señal.

## 7. Discusión

En este trabajo se exploró el efecto de la sobreproducción de Mctp2b fusionado a la proteína verde fluorescente en pez cebra. La función de las MCTPs es poco conocida, pero sabemos que está asociada a retículo endoplásmico y que en *Drosophila* y *C. elegans* participa en la regulación de la transmisión sináptica (Genc et al., 2017; Téllez-Arreola et al., 2020). En vertebrados, parece tener una distribución más amplia, incluyendo en sistema nervioso y muscular (Qiu et al., 2015; Shin et al., 2005) y particularmente en pez cebra, en donde existen cuatro genes MCTP, sus RNAm se han detectado en cerebro, corazón, hígado, etc. (Espino-Saldaña et al., 2020). La estructura molecular de las MCTPs sugiere que su función está relacionada al tráfico vesicular, ya que sus dominios C2 le confieren la posibilidad de unir calcio y asociarse con fosfolípidos de membrana mientras que sus dos pasajes transmembrana dirigirían su localización en organelos, en especial en retículo endoplásmico (Duran-Ríos, 2019; Olivares-Hernández, 2018; Shin et al., 2005; Téllez-Arreola et al., 2022). Por otro lado, en pez cebra, la delección dirigida del gen *mctp2b* induce muerte prematura en estados embrionarios (Espino Saldaña et al., 2020) lo que sugiere un papel importante de estas proteínas para el desarrollo normal del embrión. Por tanto, en este trabajo se exploraron las consecuencias de la sobreexpresión de este mismo gen *mctp2b*, que es el que se expresa de forma más abundante durante el desarrollo embrionario del pez (Espino Saldaña et al., 2020).

De los resultados obtenidos se pudo observar que la microinyección del plásmido de sobreexpresión de *mctp2b* pPC1, que porta a la Mctp2b fusionada a GFP bajo el control del promotor CMV, induce la expresión de la proteína fusión y un aumento en la mortalidad en embriones de *D. rerio*. Se comprobó que el estrés generado debido a la microinyección no tiene relación con el aumento de la mortalidad de los embriones al compararlo con un control microinyectado con agua y con un control microinyectado que contiene pPC1 sin transposasa, descartando la posibilidad de la toxicidad del ADN (figuras. 13-14). Por lo tanto, podemos argumentar que la

transposición del plásmido pPC1 induce la sobreexpresión *mctp2b* provocando el aumento en la mortalidad de los embriones.

De las tres concentraciones de pPC1 utilizadas en la microinyección de embriones de pez cebra que fueron evaluadas, la concentración de pPC1 de 100 ng/μl tiene un efecto negativo mayor en el desarrollo del embrión (figura 13). La concentración de 100 ng/μl del plásmido produce una mayor tasa de mortalidad, lo que podría indicar que su efectividad para generar la transposición del plásmido es mayor. La concentración de 100 ng/μl genera un mayor porcentaje de embriones que presentan señal verde fluorescente indicando una mayor efectividad de la transposición. La concentración de 100 ng/μl de pPC1 induce diversas morfologías en los embriones que sobreexpresan Mctp2b-GFP y que clasificamos en tres grupos generales: potato-like, v-like y wildtype-like (figura 21). De estos tres grupos, los que nombramos potato-like, por su evidente forma redondeada similar a los de una papa, presentan la mayor deformación e interrupción de su desarrollo, generando solo vestigios del cuerpo de la larva y comprometiendo severamente su supervivencia. De la misma forma las otras morfologías, v-like, por su deformación en la mitad del dorso que genera un ángulo agudo entre la cola y el cuerpo, y wildtype-like, con morfología similar al pez silvestre, presentan una disminución en su supervivencia, sin embargo, el desarrollo del cuerpo de la larva es completo, y se pueden apreciar puntos específicos de señal verde fluorescente, las larvas logran sobrevivir hasta 5 días post fertilización.

La evaluación fenotípica de los efectos de mutaciones, sobreexpresión y exposición a agentes químicos en pez cebra se hace actualmente de manera no cuantitativa y es un proceso relativamente subjetivo (Teixidó et al., 2019; Raudonis et al., 2019). El fenotipo v-like inducido por la sobreexpresión de Mctp2b asemeja al fenotipo “up curved fish” reportado por Jeanray et al 2015, el cual es inducido por la exposición a agentes químicos. El fenotipo potato-like parece corresponder a un proceso de necrosis que deberá ser investigado utilizando marcadores moleculares específicos para este proceso. La sobreexpresión de la proteína Mctp2b genera una reducción en la endocitosis en diferentes tipos de células (Qiu, et al., 2015) y este puede ser

el factor que genera una interrupción en el correcto desarrollo del embrión induciendo su muerte prematura.

El porcentaje de mortalidad de los embriones microinyectados con el plásmido pPC1 es de aproximadamente 50%, de este porcentaje, no detectamos sobreexpresión de *mctp2b* mediante el reportero GFP. Es probable que este porcentaje alto de mortalidad, donde no se presenta fluorescencia se deba a la sobreproducción de la proteína Mctp2b, en fases donde no evaluamos la presencia de fluorescencia o que la cantidad de proteína expresada aun no sea suficiente para detectarla, y aun así comprometa su desarrollo.

La microinyección utilizando ARNm de *sec61b* (200 ng/μl) permite la expresión de la proteína, y su detección de señal fluorescente en el filtro de luz para mCherry, esta expresión no afecta la supervivencia de los embriones de forma significativa, comparada con el control, y permite marcar el retículo endoplasmático. Por otro lado, la co-inyección del plásmido pPC1 (100 ng/μl) y el ARNm *Sec61b* (200 ng/μl) genera un incremento significativo en el porcentaje de mortalidad de los embriones claramente inducido por la expresión de *mctp2b*

Sin embargo, este resultado también puede ser consecuencia de la expresión de *mctp2b* en conjunto con la proteína *Sec61b*, la cual produce un estrés reducido en el retículo endoplasmático (Zhu et al., 2018), que en conjunto con Mctp2b puede ocasionar la muerte del embrión, reforzando la hipótesis de la participación de Mctp2b en este organelo. En los embriones que presentan la expresión de ambas proteínas, se encontró que estas proteínas sí colocalizan, lo que permite asociar a Mctp2b al retículo endoplasmático *in vivo* y su posible participación en el tráfico vesicular. En este sentido, estudios recientes han mostrado que la sobreexpresión de MCTP de mamíferos en células COS-7 en cultivo, induce un rearrreglo de la organización del retículo endoplasmático y vincula la función de las MCTPs con la generación de gotas lipídicas (Joshi et al., 2021). Según nuestras observaciones, una de las causas posibles de los cambios morfológicos observados en este estudio, podrían estar provocados por cambios en el retículo endoplasmático, como lo sugiere Joshi.





## 8. Referencias

Ambion (2012). *mMESSAGE mMACHINE® Kit*. High Yield Capped RNA Transcription Kit SP6, T7, and T3 Kits. Thermo Scientific. [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2Fcms\\_055516.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2Fcms_055516.pdf)

Baker, P. A., Meyer, M. D., Tsang, A., & Uribe, R. A. (2019). Immunohistochemical and ultrastructural analysis of the maturing larval zebrafish enteric nervous system reveals the formation of a neuropil pattern. *Scientific reports*, *9*(1), 6941. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43497-9>

Bolte S. & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*. Volume 224. Issue 3: 213-232.

Braunbeck, T., Lammer, E. (2006). Fish embryo toxicity assays. Umwelt Bundes Amt, German Federal Environment Agency.

Corbalan-Garcia, S., Gómez-Fernández, J.C. (2014). Signaling through C2 domains: more than one lipid target. *Biochim Biophys Acta*. 1838:1536-47. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.008.

Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., Francke, U., & Ullrich, A. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* (New York, N.Y.), *233*(4766), 859–866. <https://doi.org/10.1126/science.3755548>

de Abreu, M. S., Genario, R., Giacomini, A., Demin, K. A., Lakstygai, A. M., Amstislavskaya, T. G., Fontana, B. D., Parker, M. O., & Kalueff, A. V. (2020). Zebrafish as a Model of Neurodevelopmental Disorders. *Neuroscience*, *445*, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.034>

DeBello, W. M., Betz, H., & Augustine, G. J. (1993). Synaptotagmin and neurotransmitter release. *Cell*, *74*(6), 947–950. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90716-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90716-4)

Di Virgilio, F., Pietrobon, D., Pozzan, T. (1996). The basis of intracellular calcium homeostasis in eukaryotic cells. En Bittar E., Bittar N. (Ed.) *Cell Chemistry and Physiology: Part II*.

Djurovic, S., Le Hellard, S., Kähler, A. K., Jönsson, E. G., Agartz, I., Steen, V. M., Hall, H., Wang, A. G., Rasmussen, H. B., Melle, I., Werge, T., & Andreassen, O. A. (2009). Association of MCTP2 gene variants with schizophrenia in three independent samples of Scandinavian origin (SCOPE). *Psychiatry research*, 168(3), 256–258. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.08.007>

Duran-Ríos, K. (2019). *Localización Intracelular De la proteína Mctp en neuronas del sistema nervioso central de Danio rerio*. [Tesis de Maestría, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México].

Elíes, J., Yáñez, M., Pereira, T. M. C., Gil-Longo, J., MacDougall, D. A., Campos-Toimil, M. (2020). An Update to Calcium Binding Proteins. *Adv Exp Med Biol*. 183-213. doi: 10.1007/978-3-030-12457-1\_

Espino-Saldaña, A. E. (2017). *Patrón de expresión y evaluación de la función de los genes mctp del pez cebra Danio rerio, que codifican para proteínas transmembranales con múltiples dominios C2*. [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Querétaro].

Espino-Saldaña, A.E., Durán-Ríos, K., Olivares-Hernández, E., Rodríguez-Ortiz, R., Arellano-Carbajal, F., Martínez-Torres, A. (2020). Temporal and spatial expression of zebrafish mctp genes and evaluation of frameshift alleles of mctp2b. *Gene*, vol. 738. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144371>

Genc, O., Dickman, D. K., Ma, W., Tong, A., Fetter, R. D., & Davis, G. W. (2017). MCTP is an ER-resident calcium sensor that stabilizes synaptic transmission and homeostatic plasticity. *ELife*, 6.

Holder, N., Xu, Q. (1999). The zebrafish. An overview of its early development. *Methods Mol Biol*. 97:431-9. doi: 10.1385/1-59259-270-8:431

Jeanray, N., Marée, R., Pruvot, B., Stern, O., Geurts, P., Wehenkel, L., Muller, M. (2015). Phenotype classification of zebrafish embryos by supervised learning. *PLoS One*. 10:e0116989. doi: 10.1371/journal.pone.0116989.

Joshi, A. S., Ragusa, J. V., Prinz, W. A., & Cohen, S. (2021). Multiple C2 domain-containing transmembrane proteins promote lipid droplet biogenesis and growth at specialized endoplasmic reticulum subdomains. *Molecular biology of the cell*, 32(12), 1147–1157. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-09-0590>

Kalies, K. U., Rapoport, T. A., Hartmann, E. (1998). The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol.* 141:887-94. doi: 10.1083/jcb.141.4.887

Kawakami K. (2005) Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev Dyn.* 2005 Oct;234(2):244-54. doi: 10.1002/dvdy.20516.

Kawakami K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome biology*, 8, S7. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-s1-s7>

Kramer, I. M. (2016). *Intracellular calcium*. Signal transduction. Chapter 6. 381-439.

Key, B., Devine, C. A. (2003). Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies. *Methods Cell Sci.* 2003;25(1-2):1-6. doi: 10.1023/B:MICS.0000006849.98007.03.

Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. *Fish Biology.* 10(2), 121-173. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04049.x>

Lin, C. Y., Chiang, C. Y., Tsai, H. J. (2016). Zebrafish and Medaka: new model organisms for modern biomedical research. *J Biomed Sci.* 2016 Jan 28;23:19. doi: 10.1186/s12929-016-0236-5

Leonard, T. A. (2013). C2 Domain Proteins. Kretsinger R.H., Uversky V.N., Permyakov E.A. (eds) *Encyclopedia of Metalloproteins*. Springer, New York, NY.

Martens, S., McMahon, H. T. (2011). *C2 Domains and membrane fusion*. Current topics in membrane. Chapter 6. Volume 68. 141-159.

O'Connor, V., Augustine, G.J., Betz, H. (1994). Synaptic vesicle exocytosis: molecules and models. *Cell.* 76:785-7. doi: 10.1016/0092-8674(94)90352-2

Olivares-Hernández, E. (2018). *Localización de la proteína MCTP expresada heterológicamente en células HEK-293*. [Tesis de Maestría, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México].

Peulen, O., Rademaker, G., Anania, S., Turtoi, A., Bellahcène, A., Castronovo, V. (2019). Ferlin Overview: From Membrane to Cancer Biology. *Cells*. 8:954. doi: 10.3390/cells8090954.

Putney, J.W. (1999). Ca<sup>2+</sup> Signaling. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Qiu, L., Yu, H., & Liang, F. (2015). Multiple C2 domains transmembrane protein 1 is expressed in CNS neurons and possibly regulates cellular vesicle retrieval and oxidative stress. *Journal of neurochemistry*, 135(3), 492–507. <https://doi.org/10.1111/jnc.13251>

Raudonis, V., Paulauskaite-Taraseviciene, A., Sutiene, K., Jonaitis, D. (2019). Towards the automation of early-stage human embryo development detection. *Biomed Eng Online*. 18:120. doi: 10.1186/s12938-019-0738-y

Rizo, J., Südhof, T. C. (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain. *J Biol Chem*. 273:15879-82. doi: 10.1074/jbc.273.26.15879.

Rosen, J. N., Sweeney, M. F., & Mably, J. D. (2009). Microinjection of Zebrafish Embryos to Analyze Gene Function. *Journal of Visualized Experiments*, (25). doi:10.3791/11115

Saheki, Y., De Camilli, P. (2017). The Extended-Synaptotagmins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 1864:1490-1493. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.03.013

Sato, T., Takahoko, M., & Okamoto, H. (2006). HuC:Kaede, a useful tool to label neural morphologies in networks in vivo. *Genesis* (New York, N.Y. : 2000), 44(3), 136–142. <https://doi.org/10.1002/gene.20196>

Scott, L. J., Muglia, P., Kong, X. Q., Guan, W., Flickinger, M., Upmanyu, R., Tozzi, F., Li, J. Z., Burmeister, M., Absher, D., Thompson, R. C., Francks, C., Meng, F., Antoniadis, A., Southwick, A. M., Schatzberg, A. F., Bunney, W. E., Barchas, J. D., Jones, E. G., Day, R., ... Boehnke, M. (2009). Genome-wide association and

meta-analysis of bipolar disorder in individuals of European ancestry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7501–7506. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813386106>

Shin, O. H., Hau, W., Wang, Y., & Sudhof, T. C. (2005). Evolutionarily conserved multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions (MCTPs) and unusual Ca<sup>2+</sup> binding properties. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1641–1651.

Südhof, T.C. (2012). Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a011353. doi: 10.1101/cshperspect.a011353.

Teixidó, E., Kießling, T.R., Krupp, E., Quevedo, C., Muriana, A., Scholz, S. (2019). Automated Morphological Feature Assessment for Zebrafish Embryo Developmental Toxicity Screens. *Toxicol Sci.* 167:438-449. doi: 10.1093/toxsci/kfy250

Téllez-Arreola J. L. (2014). *Patrón de expresión y diversidad estructural del gen D2092.1 de C. elegans*. UNAM]. [Tesis de Maestría, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México].

Téllez-Arreola, J. L., Martínez-Torres, A., Flores-Moran, A. E., Lazaro-Guevara, J. M., & Estrada-Mondragón, A. (2022). *Analysis of the MCTP Amino Acid Sequence Reveals the Conservation of Putative Calcium- and Lipid-Binding Pockets Within the C2 Domains In Silico*. *Journal of molecular evolution*, 90(3-4), 271–282. <https://doi.org/10.1007/s00239-022-10057-1>

Thermo Scientific. (2012). *GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit*. Thermo Scientific. [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0012671\\_GeneJET\\_RNA\\_Cleanup\\_Concentration\\_Micro\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0012671_GeneJET_RNA_Cleanup_Concentration_Micro_UG.pdf)

Verma, R., Holmans, P., Knowles, J. A., Grover, D., Evgrafov, O. V., Crowe, R. R., Scheftner, W. A., Weissman, M. M., DePaulo, J. R., Jr, Potash, J. B., & Levinson, D. F. (2008). Linkage disequilibrium mapping of a chromosome 15q25-26 major depression linkage region and sequencing of NTRK3. *Biological psychiatry*, 63(12), 1185–1189. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.02.005>

Wang, T., Ming, Z., Xiaochun, W., Hong, W. (2011). Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. *Cell Signal*. 23:516-21. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.09.012.

Zhang, D., Aravind, L. (2010). Identification of novel families and classification of the C2 domain superfamily elucidate the origin and evolution of membrane targeting activities in eukaryotes. *Gene*. 469:18-30. doi: 10.1016/j.gene.2010.08.006

Zhu, Y., Zhang, G., Lin, S., Shi, J., Zhang, H., & Hu, J. (2018). Sec61 $\beta$  facilitates the maintenance of endoplasmic reticulum homeostasis by associating microtubules. *Protein & cell*, 9(7), 616–628. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0492-5>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura general de las proteínas MCTP	12
<b>Figura 2.</b> Estructura del dominio C2.	13
<b>Figura 3.</b> Mctp en <i>D. rerio</i> .	16
<b>Figura 4.</b> Fases selectas del desarrollo de <i>D. rerio</i> .	17
<b>Figura 5.</b> Desarrollo normal de larvas de pez cebra ( <i>D. rerio</i> ).	18
<b>Figura 6.</b> Estrategia con oligonucleótidos.	21
<b>Figura 7.</b> Mapa de plásmidos.	23
<b>Figura 8.</b> Esquema de montaje.	28
<b>Figura 9.</b> Lapso de tiempo.	28
<b>Figura 10.</b> Productos de la amplificación de fragmentos de plásmido con la secuencia que codifica para proteínas Mctp2b.	30
<b>Figura 11.</b> Caracterización del plásmido pPC1, resultado obtenido de la reacción con la enzima de restricción <i>Bgl</i> II.	31
<b>Figura 12.</b> Diferencia entre controles.	32
<b>Figura 13.</b> Mortalidad de embriones a 24 hpf.	33
<b>Figura 14.</b> Mortalidad de embriones a 24 hpf.	34
<b>Figura 15.</b> Controles de <i>D. rerio</i> a 30 hpf.	35
<b>Figura 16.</b> Evaluación preliminar de la expresión de Mctp2b-GFP.	36
<b>Figura 17.</b> Evaluación de fluorescencia de embriones microinyectados con pPC1-100ng/μl a 48 hpf.	37
<b>Figura 18.</b> Evaluación de fluorescencia de embriones microinyectados con pPC1-100ng/μl a 48 hpf.	38
<b>Figura 19.</b> Evaluación de fluorescencia de embriones microinyectados con pPC1-100ng/μl a 48 hpf.	38
<b>Figura 20.</b> Gráfica de porcentaje de fluorescencia de los embriones microinyectados con diferentes concentraciones de pPC1.	39
<b>Figura 21.</b> Evaluación de morfología de embriones con expresión de la proteína Mctp2b-GFP.	40

<b>Figura 22.</b> Evaluación de morfología y fluorescencia de embriones con expresión de la proteína Mctp2b-GFP.	41
<b>Figura 23.</b> Grafica que muestra el número de embriones fluorescentes obtenidos en diferentes hpf.	42
<b>Figura 24.</b> Experimento lapso de tiempo, embrión control.	43
<b>Figura 25.</b> Experimento lapso de tiempo, fenotipo potato-like.	44
<b>Figura 26.</b> Experimento lapso de tiempo, fenotipo v-like.	45
<b>Figura 27.</b> Experimento lapso de tiempo, fenotipo wildtype-like.	46
<b>Figura 28.</b> ADN-PCR y ARNm-TIV.	47
<b>Figura 29.</b> Evaluación de fluorescencia de embriones microinyectados con ARNm sec61b 200 ng/μl.	48
<b>Figura 30.</b> Mortalidad de embriones a 24 hpf.	49
<b>Figura 31.</b> Evaluación de fluorescencia de embriones microinyectados con ARNm sec61b 200 ng/μl y pPC1 100ng/μl.	50
<b>Figura 32.</b> Evaluación de co-localización de embriones microinyectados con ARNm sec61b 200 ng/μl y pPC1 100ng/μl.	51



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Plásmidos utilizados.....	20
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de fragmentos que codifican para las proteínas MCTP, marcadores de organelo y marcadores fluorescentes, utilizados en este proyecto.....	21
<b>Tabla 3.</b> Componentes para la reacción de PCR.....	22
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de la reacción de PCR para la obtención de los fragmentos que contienen los genes que codifican Mctp.....	22
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de la reacción de PCR para la obtención de los fragmentos que contienen los genes que codifican para DsRed-Rab7, mCherry-Sec61b y el promotor T3.....	26