



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS NEUROBIOLOGÍA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“Sobreexpresión del gen *mctp2b* en neuronas de *Danio rerio*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARTIN DAREL LUGO LEYVA

TUTOR:

**DR. LUIS ROBERTO RODRÍGUEZ ORTIZ- INVESTIGADORES POR MÉXICO
CONAHCYT - INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA ROSA ÁVILA COSTA – FES IZTACALA

DR. FRANCISCO VÁZQUEZ CUEVAS – INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Juriquilla, Querétaro, México, febrero del 2024



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.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Martin Darel Lugo Leyva, cuyo título es: "Sobreexpresión del gen *mctp2b* en neuronas de *Danio rerio*" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Julio Moran Andrade
Presidente

Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz
Secretario:

Fausto Arellano Carbajal
Vocal:

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas
Suplente:

Dra. Diana Maria Escalante Alcalde
Suplente:

Coordinador del programa.

Agradecimientos.

Mis agradecimientos más sinceros a:

Al Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz por su confianza y guía durante la maestría, me ha enseñado mucho todos estos años y me ha dado diversas estrategias para resolver problemas, además de motivarme a seguir con mi carrera científica.

Al comité tutorial, Dra. María Rosa Ávila Costa y Dr. Francisco Vázquez Cuevas, por sus valiosas aportaciones y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto.

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

Al titular del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular (D-15) del Instituto de Neurobiología – UNAM, Dr. Ataúlfo Martínez Torres.

Al técnico académico, la Dra. Edith Ángeles Espino Saldaña, por su disponibilidad, paciencia y apoyo durante este proyecto.

Al técnico auxiliar del laboratorio Marina Ramírez Romero por todo su apoyo, consejo y consolación en el laboratorio, así por todas las desayunos y comidas que me brinda a lo largo de los años.

Al zebbrateam del laboratorio, Freya, Fernando, Jacky, Ruby, Pablo, Fernanda, Toño y Selma por toda su ayuda en el cuidado y mantenimiento de los peces, por siempre hacer su trabajo con ética y bienestar animal y por sus asesorías en las técnicas de cuidado de los animales.

A las Doctoras y grandes científicas en ascenso, Cynthia Alejandra Rodríguez Arzate y Marianne Lizeth Martínez Mendoza por su guía durante estos años.

A todos los miembros del laboratorio, Denisse, Fernando Tovilla, Eduardo, Valeria, Adán, Leyma, Nacho e Ingrid por brindarme su amistad y apoyo durante este tiempo.

Al Dr. Miguel Ángel Moreno Mateos y el Morelab por haberme recibido e integrado en su laboratorio durante el verano del 2023.

A mis profesores de preparatoria Alejo Vega Gastelum, Irma Guadalupe Ruiz Hernández y Ascensión Florina Ramírez Bernal por despertar e impulsar mi interés científico hace más de 10 años.

A mis amigos y compañeros de “The Stingray Academy” por todo su apoyo y compañía en los momentos difíciles, atentamente.....

A mis exalumnos, que con sus preguntas y dudas siempre me han motivado a aprender más.

A mi amigo Arq. José Luis Ramírez Campos por todo su apoyo.

A la Dra. Nuri Aranda por su apoyo en todo el seguimiento y tramites realizados en la Unidad de Enseñanza del Instituto de Neurobiología.

Al Mtro. Moisés Mendoza Baltazar por su apoyo en las videoconferencias y enlaces en exámenes y clases.

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

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

A la M. C. Adriana Gonzales por su apoyo en la unidad de Proteogenómica.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnologías, Proyecto CONACYT A1-S-10450 y beca para posgrado número: 797941

Al programa Doctor Joven de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Dedicatoria.

Con todo mi amor a mis padres Faustino Lugo Castro y Elizabet Leyva Araujo, quienes me motivan a levantarme de la cama todos los días.

A mis hermanos Guadalupe Lugo Leyva, Erika Lugo Leyva, Daniel Lugo Leyva y David Lugo Leyva que como hermanos mayores siempre están al pendiente de mi aun estando lejos.

A mis sobrinos Daniela, Diana, Jesús Adrián, Jimena Guadalupe, Gabriela Elizabet y Jesús Adrián que siempre esperan en Sinaloa con una sonrisa y mucho cariño.

Resumen

Las proteínas MCTP (*Multiple C2 domain and transmembrane region protein*) poseen tres dominios C2 hacia el lado del citosol capaces de coordinar dos o tres iones de calcio y dos regiones transmembranales que sirven para anclar la proteína a la membrana de distintos organelos. Diversos estudios indican que estas proteínas podrían participar en la sinapsis química, la migración celular, la síntesis de gotas lipídicas, regulación del metabolismo redox y en el establecimiento tubular del retículo endoplasmático. El pez cebra (*Danio rerio*) posee cuatro genes *mctp* (*mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a*, *mctp2b*) y la sobreexpresión de *mctp2b* en todas las células del embrión produce una mortalidad de cerca del 50% a las 24 horas post-fertilización (hpf), además, mutaciones dirigidas al gen *mctp2b* causan una mortalidad del 100% en los primeros dos días post-fertilización. Se ha identificado que en las neuronas de pez cebra la proteína Mctp2b se localiza en organelos de la vía endocítica. El presente estudio tuvo como objetivo sobreexpresar el gen *mctp2b* en neuronas de larvas de *Danio rerio*, para conocer más sobre la función de la proteína Mctp2b en la actividad neuronal. Se diseñó un vector de sobreexpresión que contiene la secuencia codificante para la proteína Mctp2b fusionada a GFP modulada por el promotor neuronal *elavl3*. La sobreexpresión de *mctp2b* en neuronas produjo mayor mortalidad (15% en promedio) comparada con el control no microinyectado ($P=0.001$), mientras que la sobreexpresión neuronal de *gfp* no presentó diferencias significativas en la mortalidad comparada con los controles. La sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp* se observó mayormente en las motoneuronas primarias y en las neuronas Rohon-Beard, debido a que éstas son de las primeras líneas neuronales en diferenciarse. Se hipotetiza que al sobreexpresar *mctp2b-gfp* las funciones celulares de la proteína Mctp2b se alteran, lo que compromete la supervivencia neuronal y por ende la supervivencia de los embriones a las 24 hpf, pero se necesitan más experimentos para conocer cuáles son las funciones celulares que se ven afectadas.

Abstract

MCTP proteins (Multiple C2 domain and transmembrane region protein) have three C2 domains towards the cytosol side capable of coordinating two or three calcium ions and two transmembrane regions that serve to anchor the protein to the membrane of different organelles. Various studies indicate that these proteins could participate in chemical synapsis, cell migration, synthesis of lipid droplets, regulation of redox metabolism and in the tubular establishment of the endoplasmic reticulum. Zebrafish (*Danio rerio*) has four *mctp* genes (*mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a*, *mctp2b*) and overexpression of *mctp2b* in the embryo produces a mortality of about 50% at 24 hours post-fertilization (hpf), in addition, mutations targeting the *mctp2b* gene cause 100% mortality in the first two days post-fertilization. It has been identified that in zebrafish neurons the Mctp2b protein is located in organelles of the endocytic pathway. The present study aimed to overexpress the *mctp2b* gene in neurons of *Danio rerio* larvae, to learn more about the function of the Mctp2b protein in neuronal activity. An overexpression vector was designed that contains the coding sequence for the Mctp2b protein fused to GFP modulated by the neuronal *elavl3* promoter. Overexpression of *mctp2b* in neurons produced greater mortality (15% on average) compared to the non-microinjected control ($P=0.001$), while neuronal overexpression of *gfp* did not present significant differences in mortality compared to controls. The neuronal overexpression of *mctp2b-gfp* was observed mainly in primary motoneurons and in Rohon-Beard neurons, because these are among the first neuronal lines to differentiate. It is hypothesized that by overexpressing *mctp2b-gfp* the cellular functions of the Mctp2b protein are altered, which compromises neuronal survival and therefore the survival of embryos at 24 hpf, but more experiments are needed to know what cellular functions are affected.

Índice

2.-Antecedentes.	6
2.1.- Proteínas MCTP.	6
2.2.- <i>Danio rerio</i> como modelo experimental.	8
2.3.-Sistema nervioso central en <i>D. rerio</i>	9
2.4.-Proteínas Mctp en <i>D. rerio</i>	11
2.5.- Promotor elavl3.	13
2.6.- Sistema Tol2.	13
3.- Justificación.	15
4.- Hipótesis.	15
5.- Objetivos.	15
6.- Materiales y métodos.	16
6.1.-Generacion de plásmidos de sobreexpresión neuronal.	16
6.1.1.-Generación del plásmido pDestol2pA2-elavl3-mctp2b-GPF (pDL1+).	16
6.1.2 Generación del plásmido pDestol2pA2-elavl3-GPF (pDL2).	19
6.2.- Microinyección de embriones.	20
6.3.- Sobreexpresión neuronal de <i>mctp2b-gfp</i>	20
6.4.-Fijación de embriones en paraformaldehído y montaje en glicerol.	21
6.5.-Observaciones en microscopia confocal.	22
6.6.- Obtención de peces cebra transgénicos Elavl3: mctp2b: GFP.	22
7.- Resultados.	24
7.1.-Generación de plásmidos de sobreexpresión neuronal.	24
7.1.1.-Generacion del plásmido pDestol2pA2-elavl3-mctp2b-GPF.	24
7.1.2.- Generación del plásmido pDestol2pA2-elavl3-GPF.	28
7.2.- Microinyección de embriones.	29
7.3.- Observaciones en microscopio de epifluorescencia.	32
7.4.- Observaciones en microscopia confocal.	37
7.5.- Obtención de una F1 Tg Elavl3: mctp2b: GFP.	38
8.- Discusión.	39
9.-Conclusiones.	44
10.- Figuras suplementarias.	45
11.- Referencias.	47
12.- Anexos	53

**Anexo 1. Proyecto de estancia de investigación en el Centro Andaluz de Biología del
Desarrollo- Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España. 53**

1.-Introducción.

Distintos experimentos sugieren que las proteínas MCTP (Proteínas con Múltiples Dominios C2 y Regiones Transmembranales) (Shin et al., 2005) pueden participar en el transporte intracelular, en las sinapsis químicas, en la regulación del metabolismo Redox, en la síntesis de gotas lipídicas y en la migración celular (Espino-Saldaña et al., 2020; Joshi et al., 2018; Kim et al., 2020; Qiu et al., 2015).

En el genoma del pez cebra (*Danio rerio*) se encuentran cuatro genes *mctp* (*mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a*, *mctp2b*) que se expresan en distintos órganos, incluido el cerebro. Se ha encontrado que las mutaciones generadas por CRISPR/Cas9 y la sobreexpresión del gen *mctp2b* producen alteraciones en el desarrollo embrionario y muerte prematura en el pez cebra. A su vez, este gen se expresa en gran medida en el sistema nervioso central y la evidencia sugiere que participa en las sinapsis químicas y transporte vesicular (Espino-Saldaña et al., 2020; Pérez-Cortés, 2021; Qiu et al., 2015). Por lo cual, este trabajo tiene como objetivo sobreexpresar el gen *mctp2b* fusionado a la región codificante para la proteína GFP en neuronas para explorar más sobre la función de la proteína Mctp2b en el sistema nervioso del pez cebra.

2.-Antecedentes.

2.1.- Proteínas MCTP.

Las proteínas MCTP (Proteínas con Múltiples Dominios C2 y Regiones Transmembranales) se caracterizan por contener tres dominios C2 hacia el extremo N-terminal, los cuales tienen la capacidad de unirse con el Ca^{2+} intracelular y con distintos lípidos de las membranas celulares, además, tienen un tamaño variable dependiendo de la especie y de la isoforma de la proteína, pero en promedio miden entre 700 y 1000 aminoácidos (Joshi et al., 2021; Shin et al., 2005). Además, poseen dos regiones transmembranales hacia el extremo C-terminal (Figura 1), que anclan la proteína a la membrana de distintos organelos como el retículo endoplasmático, los lisosomas y los endosomas de reciclaje y tardíos (Espino-Saldaña et al., 2020). Por otra parte, se ha encontrado que las regiones transmembranales de MCTP tienen similitudes estructurales con el Dominio de Homología de las Reticulonas (RHD) debido a que ambos cuentan con dos regiones hidrofóbicas de 30 a 37 aminoácidos que orientan tanto el extremo C como el N hacia el lado citosólico (Figura 1). Además, las regiones transmembranales de MCTP como el RHD son capaces de afectar la morfología de la membrana del retículo endoplasmático (Joshi et al., 2021).

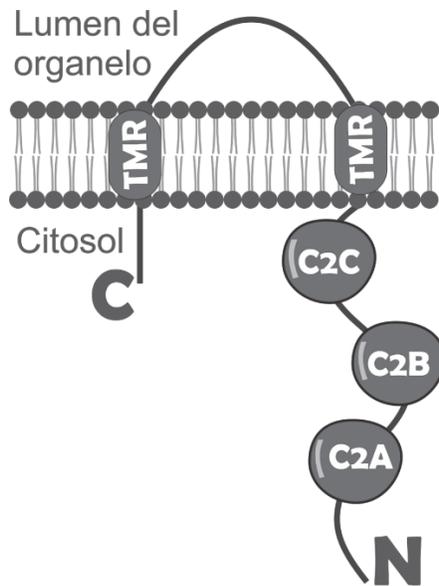


Figura 1.- Esquema de la proteína MCTP. Se muestran las regiones transmembranales ancladas en la membrana y los dominios C2 en el lado citosólico. TMR: región transmembranal, C2: dominio C2, C: segmento carboxilo-terminal, N: segmento amino-terminal. (Basada en Shin et al, 2005).

Las proteínas MCTP se involucran en diversas funciones, la evidencia indica que actúan como sensores intracelulares de calcio más que como *buffer* regulador de calcio. Se ha reportado que las proteínas MCTP pueden participar en el transporte intracelular por su localización en el retículo endoplasmático (uno de los organelos principales de este proceso). También se ha encontrado evidencia que demuestra la intervención de las proteínas MCTP en las sinapsis químicas, además, se sugiere que estas proteínas podrían estar involucradas en la síntesis de gotas lipídicas, en la migración celular, en la regulación del metabolismo Redox y en el establecimiento de la forma tubular del retículo endoplasmático (Joshi et al., 2018, 2021; Qiu et al., 2015; Téllez-Arreola et al., 2020).

Las proteínas MCTP se han estudiado en diversos modelos animales, los cuales han aportado información variada sobre su funcionamiento. Al inactivar la expresión del gen *mctp-1* mediante ARNi en *Caenorhabditis elegans* se encontró una mortalidad del 25% de los individuos durante el desarrollo embrionario (Maeda et al., 2001). Otro estudio realizado en el mismo nemátodo demostró que la proteína MCTP se localiza en un subconjunto de neuronas sensoriales y motoras, está involucrada en la detección de alimentos, modula la velocidad de liberación de neurotransmisores y que el *knockout* para dicho gen presenta una respuesta motora exacerbada durante la inducción optogenética (Téllez-Arreola et al., 2020; Tovilla-Loza, 2020). Por otra parte, estudios realizados en *Drosophila melanogaster* encontraron que el gen *mctp* se expresa en los órganos olfatorios y que funciona como un sensor de calcio localizado en el retículo endoplasmático que es necesario para la plasticidad homeostática presináptica, la cual se define como la

modulación homeostática de la liberación de neurotransmisores presinápticos (Genç et al., 2017; Tunstall et al., 2012). Un estudio realizado en *Xenopus laevis* bloqueó la transcripción del ARNm para la proteína Mctp2 generando embriones con malformaciones cardíacas, lo que confirma la importancia de esta proteína para el desarrollo de este órgano (Lalani et al., 2013). Además, se han generado ratones *knockout* para el gen *Mctp1* que no muestran ningún tipo de afectaciones (Tarchini et al., 2018). Por otra parte, se ha descrito que en ratones la pérdida de Mctp2 en la vida adulta conduce a la insuficiencia cardíaca (Alkhouli, 2021).

Los únicos síndromes humanos que se han comprobado que se producen por alteraciones de alguna proteína MCTP, es el síndrome del corazón izquierdo hipoplásico y la coartación de la aorta, los cuales resultan de mutaciones en el gen que codifica para MCTP2 (Lalani et al., 2013; Liu et al., 2022). Por otra parte, mediante estudios de asociación genética se describió que alelos para *MCTP1* y *MCTP2* se encuentran asociados a pacientes con síndrome bipolar y esquizofrenia respectivamente (Djurovic et al., 2009; Scott et al., 2009). Además, se ha encontrado que la disminución de la transcripción de un ARNm llamado “*miR-18b-5p*” se asoció a la aparición de esclerosis lateral amiotrófica, dicho ARNm regula la expresión de los genes *Hif1a*, *Mef2c*, *miR-206*, *Rarb* y entre ellos *Mctp1* (Kim et al., 2020).

2.2.- *Danio rerio* como modelo experimental.

El pez cebra (*Danio rerio*) es un actinopterio perteneciente a los cipriniformes del género *Danio*, reciben su nombre común por sus distintivas rayas horizontales pigmentadas a los costados (Figura 2.a). En vida silvestre se distribuyen en aguas lentas o estancadas de países asiáticos (Pakistan, India, Bangladesh, Nepal y Myanmar) (Figura 2.b); habitan arroyos, canales, zanjas y estanques; se alimentan de gusanos y pequeños crustáceos. En las últimas décadas se ha popularizado su uso como mascota y como modelo biológico en estudios biomédicos y de biología del desarrollo (Froese & Binohlan, 2009).



Figura 2.- Anatomía externa del pez cebra (*Danio rerio*) y su distribución geográfica. a) Anatomía externa del pez cebra, nótense sus distintivas rayas horizontales pigmentadas a los costados por las cuales recibe su nombre. b) Distribución geográfica del pez cebra, se marcan con rojo los países en los cuales se distribuye de manera silvestre (Adaptada de Froese & Binohlan, 2009 y Markowski, 2011).

A partir de la década de 1970, el pez cebra se comenzó a utilizar como modelo experimental debido a que es más fácil de manipular genéticamente que el ratón. Posee una gran variedad de características que lo hacen útil como organismo modelo entre las que se encuentran su desarrollo rápido fuera de la madre, es transparente en los primeros días de desarrollo (lo que permite observar las estructuras anatómicas con mayor facilidad), el costo de mantenimiento es bajo, necesitan poco espacio y poca infraestructura técnica, además alcanza la madurez sexual muy rápido y tiene una alta tasa de fecundidad (Khan & Alhewairini, 2018).

El pez cebra es ideal para estudios biomédicos porque posee muchas similitudes fisiológicas y genéticas con los humanos, incluido cerebro, tracto digestivo, musculatura y sistema inmune. Una comparación del genoma de pez cebra con la base de datos “Herencia Mendeliana en el Hombre en Línea (OMIM, www.omim.org)” encontró que el 82% de estos genes tienen al menos un ortólogo en pez cebra (Howe et al., 2013). Entre las enfermedades humanas que se han podido estudiar en este animal están las enfermedades de Huntington, el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, cáncer, diabetes mellitus, entre otras (Best & Alderton, 2008; Khan & Alhewairini, 2018; Zang et al., 2018). A su vez, se ha usado como modelo para el estudio de procesos biológicos y biotecnológicos como la hematopoyesis, la crío preservación, la fisiología neuronal, el desarrollo de vacunas, etc. (Bailone et al., 2020; Bozkurt, 2020; Zang et al., 2018).

2.3.-Sistema nervioso central en *D. rerio*.

El desarrollo del sistema nervioso central en *D. rerio* comienza a las 10 horas post-fertilización (hpf) cuando empieza a distinguirse la placa neural (Figura 3.a). Posteriormente, alrededor de las 13 hpf, las células de la placa comienzan a migrar a la línea media para formar la quilla neural, la cual está más engrosada en su parte medial y posee una forma triangular (Figura 3.b). En las primeras etapas de las somitas, la quilla neural se transforma en una barra sólida (Figura 3.c), luego esta barra sólida se somete a cavitación para formar un lumen y se transforma en un tubo neural. A las 24 hpf las principales regiones del sistema nervioso central como el prosencéfalo (telencéfalo, diencefalo), el mesencéfalo, el rombencéfalo y la medula espinal ya son morfológicamente distinguibles (Figura 3.d). El desarrollo neuronal avanza rápidamente y la mayoría de los tipos celulares, núcleos y circuitos neuronales adultos se forman y funcionan alrededor de los 3 días post-fertilización (dpf) (Kaslin & Ganz, 2020).

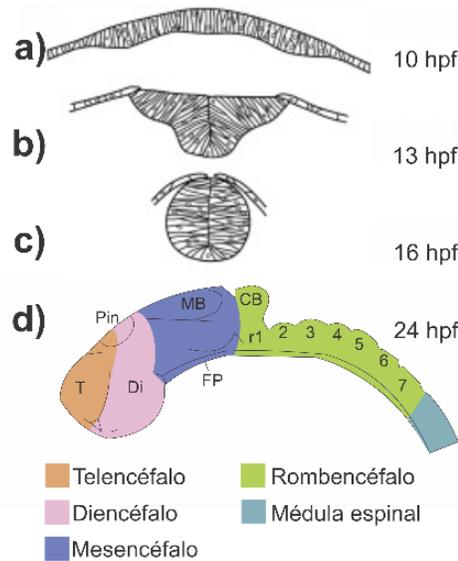


Figura 3.- Desarrollo del sistema nervioso en *D. rerio*. a) Placa neural a las 10 hpf. b) Quilla neural a las 13 hpf. c) Cilindro neural solido a las 16 hpf. d) Las principales regiones del cerebro, como el prosencéfalo (telencéfalo, diencéfalo), el mesencéfalo (mesencéfalo), el rombencéfalo (metencéfalo) y la médula espinal a las 24 hpf. CB: cerebelo, Pin: glándula pineal, MB: mesencéfalo, FP: placa del piso, r: rombómeros, T: telencéfalo (adaptado de Kaslin & Ganz, 2020).

El cerebro del pez cebra tiene la morfología típica de un pez teleósteo. Los bulbos olfatorios se localizan rostralmente. El cerebro anterior (prosencéfalo) está compuesto por el telencéfalo y el diencéfalo, el telencéfalo consiste en una estructura dorsal que forma dos hemisferios bien distinguibles que cubren por completo la parte ventral. En la unión telencéfalica y diencéfalica, se localizan la habénula y la glándula pineal las cuales son fácilmente visibles desde el lado dorsal, mientras que por el lado ventral podemos observar los nervios y el quiasma óptico. En el diencéfalo, justo después de la habénula se localiza el tálamo, en la posición ventral se encuentra el hipotálamo e, inferior a este se encuentra la glándula pituitaria. El mesencéfalo está dominado por los lóbulos ópticos tectales emparejados ubicados dorsalmente. Posterior al techo óptico, está el cerebelo y las estructuras cerebelosas asociadas (Figura 4) (Kaslin & Ganz, 2020).

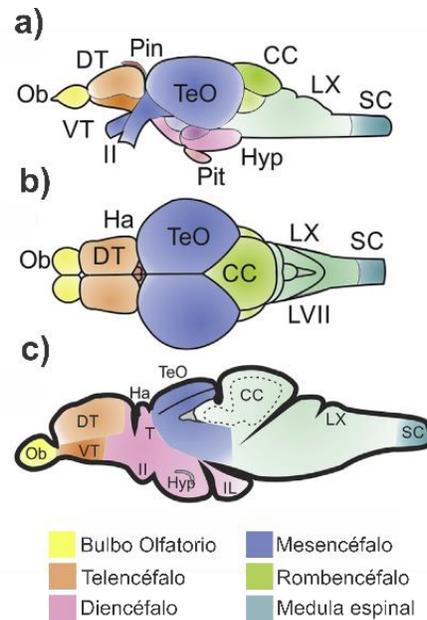


Figura 4.-Principales partes del cerebro de *D. rerio*. a) Vista lateral. b) Vista dorsal y c) Corte sagital. CC: cuerpo cerebeloso, DT: telencéfalo dorsal, Ha: habénula, Hyp: hipotálamo, IL: lóbulo inferior, LX: lóbulo vagal, Ob: bulbo olfatorio, Pin: glándula pineal, SC: medula espinal, TeO: techo óptico, T: tálamo, VT: telencéfalo ventral, II: segundo nervio craneal (nervio óptico); LVII, lóbulo facial. (Kaslin & Ganz, 2020)

2.4.-Proteínas Mctp en *D. rerio*.

Se ha encontrado que las proteínas Mctp se localizan en organelos de la vía endocítica (endosomas de reciclaje, retículo endoplasmático, lisosomas y endosomas tardíos) en las neuronas del pez cebra. También, se ha observado mediante ensayos de hibridación *in situ* que los ARNm de los cuatro genes *mctp* se localizan en el sistema nervioso central en embriones de pez cebra de 24 hpf. Además, se ha encontrado que los mutantes mosaicos generados con CRISPR-Cas9 para el gen *mctp2b* presentan diversas alteraciones en el desarrollo embrionario y una alta mortalidad (figura 5) (Espino-Saldaña et al., 2020), mientras que los individuos con mutaciones en los genes *mctp1a*, *mctp2a* y *mctp1b* no mostraron alteraciones en el desarrollo embrionario ni en la conducta (Lugo-Leyva, 2020; Valadez-Rodríguez, 2021). Por otro lado, la sobreexpresión del gen *mctp2b* resulta en diversas alteraciones al desarrollo embrionario y una alta mortalidad en embriones a las 24 hpf (figura 6) (Pérez-Cortés, 2021).

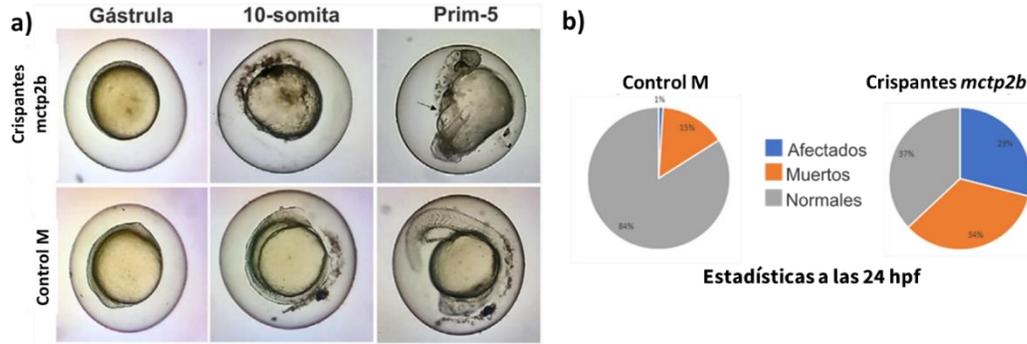


Figura 5.- Mutantes de *mctp2b* en *Danio rerio*. Las mutaciones inducidas mediante CRISPR/Cas9 en el gen *mctp2b* producen alteraciones en el desarrollo embrionario y una alta mortalidad, a) se muestra un embrión mutante para el gen *mctp2b* con alteraciones en la región caudal en el estadio prim-5 (24 hpf) y en la parte inferior un embrión control microinyectado el cual no presenta ninguna alteración. b) Se muestran los porcentajes de mortalidad, afectaciones al desarrollo embrionario y de individuos normales de grupos de peces mutantes para el gen *mctp2b* y de grupos de peces controles microinyectados (Espino-Saldaña et al., 2020).

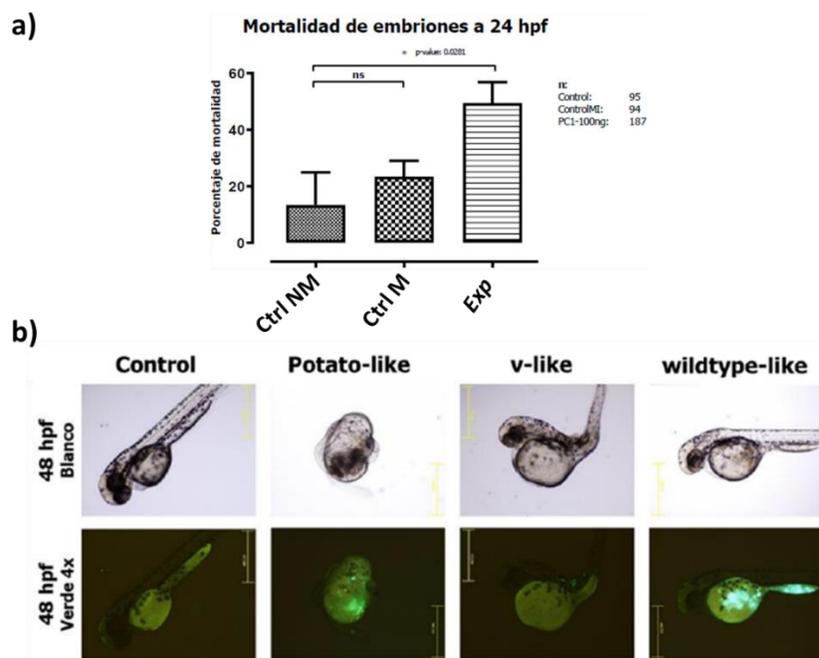


Figura 6.- Sobreexpresión del gen *mctp2b* en *Danio rerio*. La sobreexpresión de *mctp2b* provoca una alta mortalidad a las 24 hpf y distintas malformaciones. a) Se muestran las gráficas con las tasas de mortalidad de los embriones a las 24 hpf, obsérvese una alta mortalidad en el grupo Exp (sobreexpresión de *mctp2b*). b) fenotipos producidos por la sobreexpresión de *mctp2b* (Pérez-Cortés, 2023).

2.5.- Promotor *elavl3*.

Las proteínas Elavl (Proteínas similares a ELAV), también llamadas proteínas Hu, son los homólogos en vertebrados de la proteína ELAV de *Drosophila*. Las proteínas Elavl son un conjunto de proteínas de unión a ARN que interactúan directamente en la regulación del corte y empalme alternativo de ARN inmaduros en el núcleo y regulan la estabilidad de los ARN maduros en el citosol (Ogawa et al., 2018).

La familia de proteínas ELAVL consta de cuatro miembros, ELAVL1-4, las proteínas ELAVL2, ELAVL3 y ELAVL4 se distribuyen principalmente en neuronas, mientras que ELAVL1 se distribuye tanto en tejidos neuronales como no neuronales (Ni et al., 2021). En pez cebra el gen *elavl3* (también llamado *elavC*, *elrc*, *huc*) se expresa de manera temprana en la neurulación (en el estadio de un somita justo después de la gastrulación) participando en la diferenciación del sistema nervioso en múltiples etapas y manteniendo su expresión en el sistema nervioso durante la vida adulta (Chen & Shyu, 1995; Park, Hong, et al., 2000). Se demostró que la expresión de la proteína GFP bajo la regulación del promotor de *elavl3* induce fluorescencia en las neuronas del pez cebra, por lo cual la región promotora del gen *elavl3* fusionada a proteínas de marcaje se ha convertido en una herramienta muy utilizada en el estudio del sistema nervioso del pez cebra (Park, et al., 2000).

2.6.- Sistema Tol2.

El uso de transposones para la edición genética de eucariotas se ha popularizado en las últimas décadas. En 1996 se identificó el elemento Tol2 en el pez *Oryzias latipes* (Koga et al., 1996). De manera endógena Tol2 es un transposón autónomo de 4700 pb que en sus extremos contiene secuencias que recombinan (secuencias Tol2) en el genoma del pez *O. latipes* y en el interior cuenta con una secuencia genética para la producción de la proteína transposasa, la cual es una enzima que induce la recombinación de dicho fragmento en el genoma. De manera experimental se ha removido la secuencia que codifica la transposasa, pero manteniendo las secuencias de recombinación para así generar un transposón no autónomo que permita la inserción de ADN exógeno al genoma de vertebrados (Kawakami, 2007). En pez cebra el sistema Tol2 ha demostrado ser muy eficiente, teniendo una efectividad de hasta el 50% (Kawakami et al., 2004).

Para generar un pez transgénico utilizando el sistema Tol2 primero se tiene que diseñar un plásmido vector que contenga una región delimitada por las secuencias Tol2 y que en su interior contenga el fragmento genético que se pretende integrar en el genoma, por ejemplo, podría ser un promotor específico para un tipo celular (neuronas) y una proteína de marcaje (GFP) (Figura 7.a). Posteriormente se inyectan en el vitelo a los embriones recién fertilizados con una mezcla que contiene el plásmido anteriormente diseñado y un ARNm para la producción de la enzima transposasa (Figura 7.b). El vitelo se mueve hacia los blastómeros llevando la mezcla con él (Figura 7.c), así el fragmento de interés se inserta en el genoma del pez cebra (Figura 7.d) y por último el embrión se desarrolla como un mosaico

genético con células distribuidas por su cuerpo que contienen la inserción (Figura 7.e)(Kawakami, 2007).

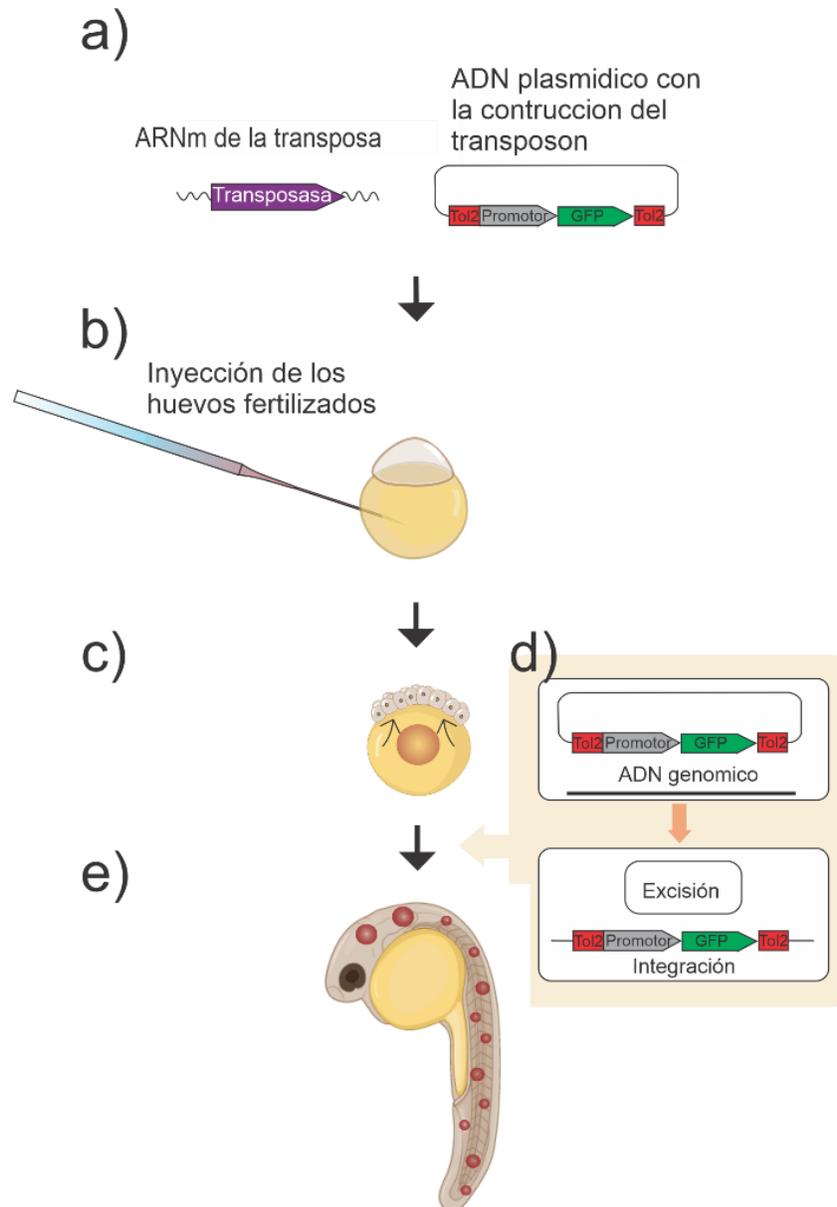


Figura 7.- Generación de peces transgénicos utilizando el sistema Tol2. Esquema cronológico de la generación de peces cebra transgénicos. a) ARNm de la enzima transposasa con el plásmido vector que contiene el fragmento que se desea integrar en el genoma flanqueado por las secuencias Tol2. b) Microinyección de embriones en el estadio de una célula. c) Movimiento de la mezcla que contiene el ARNm de la transposasa con el plásmido vector hacia los blastómeros. d) Proceso de integración del fragmento de interés en el genoma de pez cebra. e) Individuo mosaico. (Adaptada de Kawakami, 2007).

3.- Justificación.

Se ha encontrado que las proteínas Mctp posiblemente participan en procesos de tráfico vesicular en neuronas del sistema nervioso central de *D. rerio*. Además, se ha reportado que tanto la mutación como la sobreexpresión del gen *mctp2b* generan defectos en el desarrollo del embrión y provocan su muerte, mostrando la importancia de esta proteína para el desarrollo temprano del pez cebra. Por lo tanto, durante esta investigación se sobreexpresará de manera específica el gen *mctp2b* en neuronas de *D. rerio* lo que permitirá explorar sus funciones en el sistema nervioso central.

4.- Hipótesis.

La sobreexpresión en neuronas del gen *mctp2b* de *Danio rerio* afecta el desarrollo de su sistema nervioso central.

5.- Objetivos.

5.1.- Objetivo general.

Determinar el efecto de la sobreexpresión del gen *mctp2b* en neuronas de *Danio rerio*.

5.2.- Objetivos particulares.

- Diseñar un vector de expresión neuronal que contenga la secuencia codificante para la proteína Mctp2b fusionada a GFP bajo la regulación del promotor *elavl3*.
- Comprobar mediante microscopía de fluorescencia la sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en neuronas de embriones de pez cebra.
- Evaluar el efecto que tiene la sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en neuronas en el desarrollo del sistema nervioso de pez cebra.

6.- Materiales y métodos.

6.1.-Generación de plásmidos de sobreexpresión neuronal.

6.1.1.-Generación del plásmido pDestol2pA2-elavl3-mctp2b-GPF (pDL1+).

6.1.1.1-Exclusión del promotor CMV del plásmido pPC1.

La generación del plásmido pDestol2pA2-elavl3-mctp2b-GPF parte del plásmido pDestol2pA2-CMV-mctp2b-GPF, llamado pPC1 (Figura 6.a), el cual al integrarse en el genoma del pez cebra induce la sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en todos los tipos celulares debido a su promotor CMV (Pérez-Cortés, 2023). Para excluir el promotor de CMV, realizamos una PCR usando como templado al plásmido pPC1, usando la enzima de alta fidelidad *Phusion Plus DNA Polymerase - Thermo Fisher Scientific* y los oligonucleótidos DL42 y DL43 (Tabla 1), (Thermo scientific, 2019). Las condiciones de la reacción de PCR fueron: una desnaturalización inicial a 98°C durante 5 minutos, posteriormente 25 ciclos con una desnaturalización de 98°C durante 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 52 °C durante 30 segundos y una temperatura de elongación de 72 °C durante 150 segundos y por último una elongación de 72 °C durante 5 minutos. Posteriormente el producto fue digerido con 5 unidades de la enzima *DpnI* ajustando la concentración de Mg^{2+} a 10 mM. La reacción se incubó por 2 horas a 37 °C (Hansson et al.,2008). Después, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% aplicando 90 voltios (V) durante 40 minutos para corroborar que la PCR y la digestión con *DpnI* se llevaron a cabo. Posteriormente el amplificado digerido con *DpnI* fue auto-ligado siguiendo el protocolo *Self-circularization of Linear DNA* de ThermoFisher (Thermo scientific, 2012). El nuevo plásmido ya ligado fue producido transformando bacterias (*Escherichia coli*, XL1-Blue). Los plásmidos fueron purificados de las bacterias mediante extracción alcalina (Sambrook & Russell, 2000) y se verificó que el promotor CMV fue removido digiriendo con la enzima de restricción *ClaI*. A este nuevo plásmido se le nombro pPC1.1 (Figura 8.b).

Posteriormente, se ligó un sitio de clonación múltiple que contiene los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRI*, *PacI*, *AgeI*, *NheI* y *NcoI* al plásmido pPC1.1. Para ello, se realizó una reacción de alineamiento usando los oligonucleótidos DL19 y DL21 (Tabla 1), se colocó en una solución en condiciones equimolares, e incubó a 95 °C durante 5 minutos y luego se enfrió a temperatura ambiente durante 45 minutos, posteriormente se ligó la alineación de ambos 16oligonucleótidos con el plásmido pPC1.1 a una relación de 7:1 (Addgene., 2011). Luego, realizamos una transformación bacteriana y se comprobó mediante secuenciación que el sitio de clonación múltiple se haya ligado. Dicho plásmido recibió el nombre pPC1.2 (Figura 8.c).

6.1.1.2.-Ligación del promotor elavl3 al plásmido pPC1.2 para generar al plásmido pDestol2pA2-elavl3-mctp2b-GPF.

Se extrajo el promotor elavl3 mediante PCR usando los oligonucleótidos DL15 y DL16 (Tabla 1), utilizando como templado el plásmido p5E-elavl3 (Figura 8.d) (Don et al., 2016). Las condiciones para la PCR fueron: una desnaturalización inicial a 98 °C durante 5 minutos, 25

ciclos con una desnaturalización a 98 °C durante 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 55 °C durante 30 segundos y una temperatura de elongación de 72 °C durante un minuto y por último una elongación con una temperatura de 72 °C durante 5 minutos. Se ligó el producto de PCR al plásmido pJET1.2 usando el *CloneJET PCR Cloning Kit* de *ThermoFischer* (Figura 8.e), dicho plásmido recibió el nombre de pJET1.2-elavl3. Se hizo una PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos LR133 y LR134 (Tabla 1), para comprobar que el promotor elavl3 se ligó al plásmido pJET1.2. Para la PCR se utilizó una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, 25 ciclos con una desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, una alineación a 54 °C durante 30 segundos y una temperatura de elongación a 72 °C durante 4 minutos y por último se realizó una elongación a una temperatura de 72 °C durante 5 minutos.

Para ligar el promotor elavl3 al plásmido pPC1.2, primero se digirieron los plásmidos pJET1.2-elavl3 y pPC1.2 con la enzima *NcoI*, posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% aplicando 70 V durante 2 horas, luego, se cortaron y purificaron las bandas que contienen los fragmentos de interés usando el *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Posteriormente se ligaron ambos fragmentos usando el protocolo *DNA Insert Ligation (sticky-end and blunt-end) into Vector DNA* de *ThermoFisher* y se hizo una transformación bacteriana. Posteriormente, se realizó una extracción plasmídica alcalina (Sambrook & Russell, 2000) y se llevó a cabo una reacción de restricción utilizando la enzima *XcmI* para comprobar que la colonia contiene al plásmido pDestol2pA2-elavl3-mctp2b-GPF (Figura 8.f), dicho plásmido se nombró pDL1.

Para reducir el espacio (570 pb) entre el promotor elavl3 y el sitio de inicio de la traducción de *mctp2b*, se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos DL44 y DL45 (Tabla 1). Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 98 °C durante 5 minutos, 25 ciclos con una desnaturalización a 98 °C durante 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 58 °C durante 30 segundos y una elongación a 72 °C durante 45 segundos, por último, una elongación final a 72 °C durante 3 minutos. Posteriormente se auto-ligó la PCR siguiendo el protocolo *Self-circularization of Linear DNA* de *ThermoFisher* (Thermo scientific, 2012) y se realizó una transformación bacteriana. Por último, se extrajeron los plásmidos mediante extracción alcalina (Sambrook & Russell, 2000) y se hizo una reacción de restricción con la enzima *EcoRV* para comprobar que la exclusión se ha llevado a cabo (Figura 8.g), dicho plásmido recibió el nombre de pDL1+.

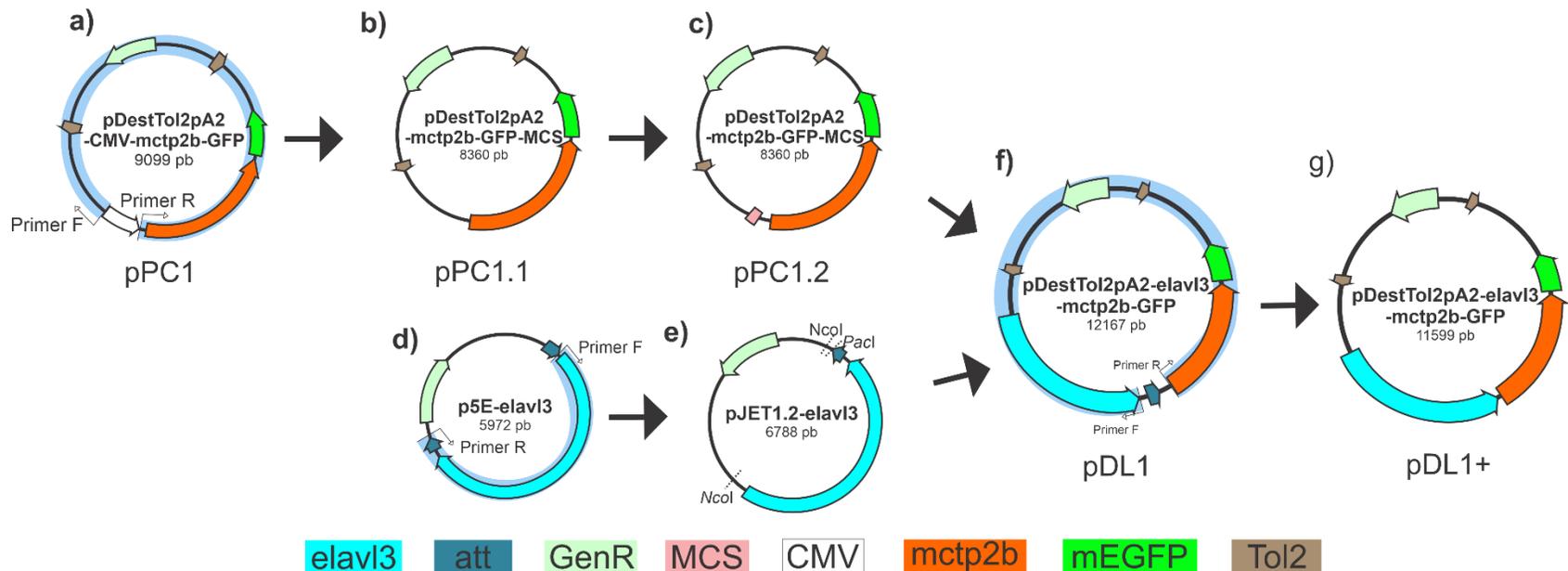


Figura 8.- Estrategia para generar el plásmido pDestol2pA2-elavl3-mctp2b-GPF. a) Plásmido pPC1, sombreado en azul se muestra la región amplificada por PCR para excluir el promotor CMV. b) Plásmido pPC1.1. c) Plásmido pPC1.2 con el sitio de clonación múltiple. d) Plásmido p5E-elavl3, sombreado en azul se muestra la región amplificada por PCR para extraer el promotor elavl3. e) Plásmido pJET1.2-elavl3. f) plásmido pDL1 (pDestol2pA2-elavl3-mctp2b-GPF), sombreado en azul se muestra la región amplificada por PCR para disminuir el número de pares de bases entre el promotor elavl3 y el sitio de inicio de la traducción de *mctp2b*. g) Plásmido pDL1+ con reducción en el número de pares de bases entre el promotor elavl3 y el sitio de inicio de la traducción de *mctp2b*.

6.1.2 Generación del plásmido pDestol2pA2-elavl3-GPF (pDL2).

Se generó un plásmido para sobreexpresar *gfp* en neuronas, para poder usarlo como control. Se excluyó la región codificante para la proteína MCTP2B al plásmido pDL1+ basándose en el protocolo de Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit de ThermoFisher (Figura 9.a). Se utilizaron los oligonucleótidos DL47 y DL54 (Tabla 1) para realizar una PCR con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 98 °C durante 5 minutos, 25 ciclos con una desnaturalización a 98 °C durante 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 63 °C durante 30 segundos y una temperatura de elongación de 72 °C durante 180 segundos, por último, una elongación final a 72 °C durante 5 minutos. Posteriormente, para eliminar el plásmido pDL1+, se ajustó la concentración de Mg^{2+} a 10 mM y se realizó una reacción de restricción utilizando 5 unidades de la enzima *DpnI* e incubando 2 horas a 37 °C (Hansson et al.,2008). Después, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% aplicando 90 V durante 40 minutos para corroborar que la PCR y la digestión con *DpnI* fue exitosa. Se auto-ligó la PCR siguiendo el protocolo *Self-circularization of Linear DNA de ThermoFisher* (Thermo scientific, 2012) y luego se realizó una transformación bacteriana. Se Extrajeron los plásmidos de las bacterias mediante extracción alcalina (Sambrook & Russell, 2000) y comprobó que la región codificante para la proteína MCTP2B ha sido removida digiriéndola con la enzima de restricción *EcoRI* y mediante secuenciación se comprobó que el codón de inicio de la traducción ha sido integrado con éxito, a dicho plásmido se le nombró pDL2 (Figura 9.b).

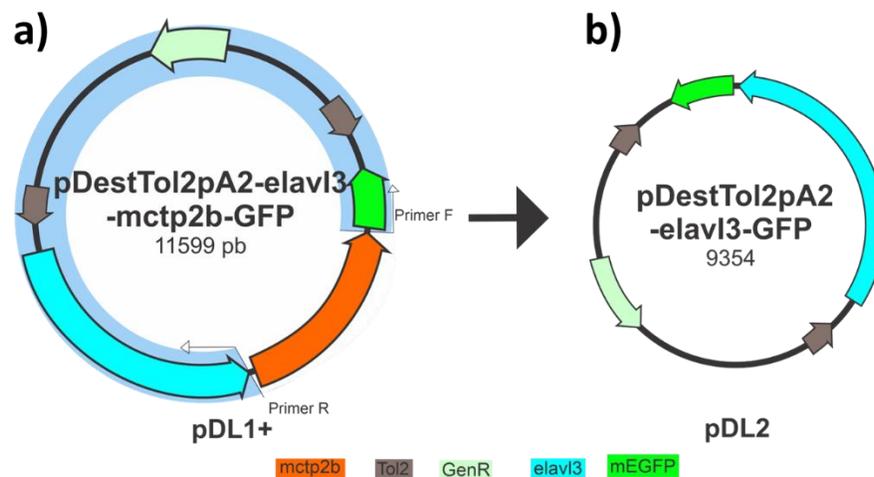


Figura 9.- Estrategia para la generación del plásmido pDestol2pA2-elavl3-GPF. a) Plásmido pDL1+, sombreado en azul se muestra la región amplificada por PCR para excluir la región codificante para la proteína MCTP2B, b) plásmido pDL2.

6.2.- Microinyección de embriones.

Se colocaron dos hembras y un macho en peceras de reproducción durante toda una noche. Las peceras contenían una rejilla en la parte inferior para proteger a los embriones de los padres y un separador en la parte longitudinal para tener al macho y a las hembras en compartimientos diferentes. Por la mañana, se retiró el separador longitudinal para que los peces entren en contacto y se reproduzcan, luego se filtraron y colocaron los embriones en medio blue E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄ y 0.001% azul de metileno). Se comprobó que los embriones estaban fecundados y se montaron en una placa con carriles de agarosa al 2%. Se microinyectaron los embriones con entre 1 y 5 nl de una solución de 25 ng/μl de plásmido, 25 ng/μl ARNm de la transposasa Tol2, 0.05% rojo fenol y agua libre de ARNasas, con la ayuda de un microinyector neumático con presión de vacío y una aguja de vidrio (Pérez-Cortés, 2023). Se microinyectaron embriones tanto en el vitelo como en el blastómero, esto debido a que según la literatura las inyecciones de ADN en el vitelo ejercen un menor estrés mecánico al embrión lo cual se ve reflejado en una mayor sobrevivencia, pero disminuyen la entrada del ADN al blastómero lo que se refleja en una menor expresión. Por otra parte, al microinyectar en el blastómero se tiene una mejor expresión, pero una mayor tasa de mortalidad debida al estrés mecánico que produce la microinyección (Kwan et al., 2007).

Los embriones se mantuvieron a 28 °C, con ciclo luz/ oscuridad de 10 hora de luz y 14 de oscuridad. El protocolo para el uso de animales en la investigación científica fue aprobado por el comité de Ética en la Investigación del Instituto de Neurobiología - UNAM con el número 095.A.

6.3.- Sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp*.

Se determinó la sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp* en los embriones entre las 20 y 24 hpf mediante la observación en el estereoscopio con el adaptador de fluorescencia *NightSea SFA*, posteriormente se hicieron observaciones más detalladas al microscopio de epifluorescencia Olympus CKX41 con el filtro de luz para GFP, EXFO X-Cite 120. Para ello, se realizaron observaciones panorámicas a 4X a todo el embrión y posteriormente se enfocaron a áreas específicas del embrión a 10X (Figura 10).

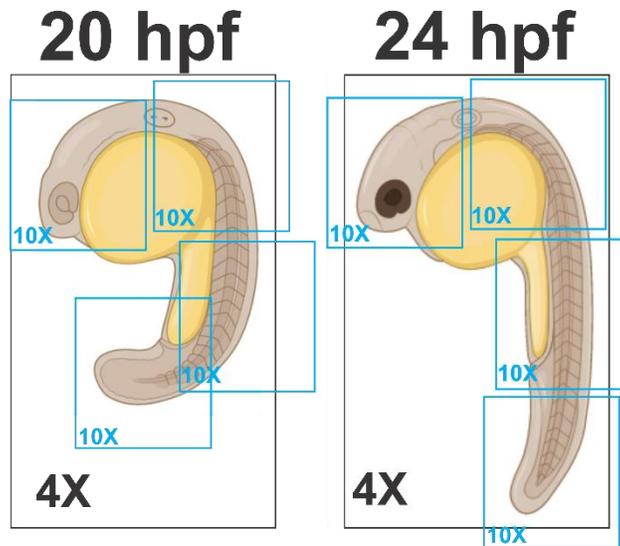


Figura 10.- Enfoques específicos a embrión de 20 y 24 hpf. Esquemas de las observaciones que se realizan a los embriones en el microscopio epifluorescencia Olympus CKX41, primero se realiza una observación panorámica con el objetivo de 4X y posteriormente se realizan enfoques con el objetivo de 10X en áreas específicas del embrión.

6.4.-Fijación de embriones en paraformaldehído y montaje en glicerol.

Se fijaron los embriones en paraformaldehído (PFA) y se montaron en un portaobjetos y glicerol para conservarlos y observarlos en el microscopio confocal Zeiss LSM 510. Primero, se descorionaron los embriones a las 24 hpf y se sacrificaron dejándolos en hielo por 10 minutos, se colocaron en PFA al 4% durante 24 horas a 4 °C con agitación suave. Posteriormente, se realizaron dos lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS, 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) durante 2 y 10 minutos respectivamente. Luego, se deshidrataron los embriones colocándolos en metanol-PBS 1:3 durante 10 minutos, seguido en metanol-PBS 1:2 durante 10 minutos, después en metanol-PBS 1:1 durante 10 minutos y para finalizar se colocaron en metanol al 100% para almacenarlos a -20 °C por el tiempo que sea requerido.

Para montar los embriones en un portaobjetos, primero se rehidrataron utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente de manera inversa, es decir, pasándolos en las distintas soluciones a concentraciones menores de metanol para posteriormente mantenerlos en PBS. En un portaobjetos se hizo un rectángulo con plastilina lo más delgado posible y se adhirió con Kola-loka, posteriormente se colocó una gota de glicerol al 70% y una gota con los embriones en el portaobjetos, se alinearon los embriones de manera lateral y se adhirió un cubreobjetos con Kola-loka, finalmente se almacenaron a -4 °C durante 24 horas para observarlos al microscopio (Duran-Rios, 2019).

6.5.-Observaciones en microscopia confocal.

Una vez fijados y montados los embriones, se observaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 510, con el láser Argón 488. Las fotografías se construyeron a partir de 27 fotografías (*slices*) que presentaban una distancia de 0.30 μm entre ellas.

6.6.- Obtención de peces cebra transgénicos *Elavl3: mctp2b: GFP*.

Se seleccionaron embriones de pez cebra mosaicos *Elavl3: mctp2b: GFP* y se criaron hasta llegar a la etapa reproductiva (tres-cinco meses), posteriormente se realizaron cruza con individuos silvestres para obtener una F1 heterocigota que sobreexpresara *mctp2b-gfp* en neuronas. Se comprobó que dichos peces sobreexpresaran *mctp2b-gfp* mediante microscopia de fluorescencia.

Tabla 1: Oligonucleótidos que se utilizan en este protocolo

Nombre	Secuencia 5'-3'.	Descripción.
DL14	GTTAACGCTACCATGGAGCTC	Oligonucleótido directo utilizado para amplificar el promotor <i>elavl3</i> con el sitio de corte para <i>NcoI</i> .
DL15	CCCGTTAATTAAGGCTCATAACACCC	Oligonucleótido directo utilizado para amplificar el promotor <i>elavl3</i> con el sitio de corte para <i>PacI</i> .
LR133	CRACTACTATAGGGAGAGCGGC	Oligonucleótido directo utilizado para la PCR en colonia realizada para comprobar la ligación del promotor <i>elavl3</i> en el plásmido pJET1.2.
LR134	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Oligonucleótido reverso utilizado para la PCR en colonia realizada para comprobar la ligación del promotor <i>elavl3</i> en el plásmido pJET1.2.
DL42	P-GCTGAACGCCATGGTTATAGG	Oligonucleótido directo fosforilado en el extremo 5' que contiene la secuencia de corte para la enzima <i>NcoI</i> , utilizado para excluir el promotor CMV del plásmido pPC1.
DL43	P-CTCTGGCGAATTCGAGAACCCAC	Oligonucleótido reverso fosforilado en el extremo 5' que contiene la secuencia de corte para la enzima <i>EcoRI</i> , utilizado para excluir el promotor CMV del plásmido pPC1.
DL19	AATTCTTAATTAACCGGTGCTAGCC	Oligonucleótido directo utilizado para general el sitio de clonación múltiple que se liga en el plásmido pPC1.1.

DL21	CATGGGCTAGCACCGGTTTAATTAAG	Oligonucleótido reverso utilizado para generar el sitio de clonación múltiple que se liga en el plásmido pPC1.1.
DL44	P-GCTTGGTACCGAGCTCG	Oligonucleótido reverso fosforilado en el extremo 5' utilizado para disminuir las pares de bases entre el promotor elavl3 y el sitio de inicio de la traducción al plásmido pDL1.
DL45	P-GGTACCGTCTGACTGCAG	Oligonucleótido directo fosforilado en el extremo 5' utilizado para disminuir las pares de bases entre el promotor elavl3 y el sitio de inicio de la traducción al plásmido pDL1.
DL47	P-CGAGCTCGGTACCAAGC	Oligonucleótido directo fosforilado en el extremo 5' utilizado para deletar la región codificante del gen <i>mctp2b</i> al plásmido pDL1 +.
DL54	P-GGAatgGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	Oligonucleótido reverso fosforilado en el extremo 5' utilizado para deletar la región codificante del gen <i>mctp2b</i> al plásmido pDL1+, el cual contiene el codón de inicio de la traducción (ATG) al inicio de GFP.

7.- Resultados.

7.1.-Generación de plásmidos de sobreexpresión neuronal.

7.1.1.-Generación del plásmido pDestol2pA2-elavl3-mctp2b-GPF.

7.1.1.1-Exclusión del promotor CMV del plásmido pPC1.

Se realizó una PCR para excluir el promotor CMV usando como templado al plásmido pPC1, resultando en la amplificación de 8355 pb (Figura 11.a). Posteriormente se realizó una auto-ligación de dicha amplificación como se describe en materiales y métodos, los plásmidos resultantes se caracterizaron mediante una reacción de digestión con la enzima *Clal*, encontrando el patrón de bandeado esperado al ocurrir la exclusión, siendo dos bandas de 7345 y 1010 pb (Figura 11.b).

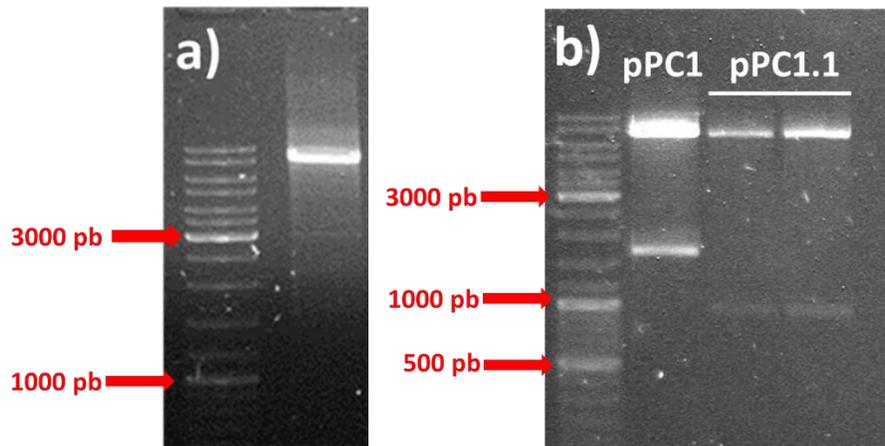


Figura 11.- Exclusión del promotor CMV al plásmido pPC1. a) Fragmento de 8355 pb amplificado mediante PCR con los oligonucleótidos DL42 y DL43. b) Plásmidos resultantes de la exclusión del promotor CMV (pPC1.1) digeridos con la enzima *Clal*, se muestran dos bandas de 7345 y 1010 pb, a la izquierda se muestra el plásmido pPC1 digerido con la misma enzima en el que se muestran dos bandas de 7345 y 1754 pb.

Posteriormente se ligó un sitio de clonación múltiple al plásmido pPC1.1, para generar al plásmido pPC1.2. Para confirmar la identidad y fidelidad del plásmido. Se secuenciaron sitios específicos para el plásmido (sitio de clonación múltiple, sitio de inicio de la traducción de *mctp2b*, sitio de termino de *mctp2b*, sitio de inicio de la traducción de GFP, sitio de termino de GFP) (Figura 12). Se encontró que los sitios analizados se encuentran íntegros.

	MCS	
pPC1	ACATGGATATTGGTACCCGATCGTGGCCAAATTAATTCTTAAGCTCTGGGTGACGAATG	60
pPC1.2	ACATGGATATTGGTACCCGATCGTGGCCAAATTAATTCTTAAGCTCTGGGTGACGAATG	60

	Sitio de inicio de mctp2b	
pPC1	ATGAAGGTTAGGTTACGGTGGTACGCTCCGAAAAAGAAAAATCTTCAGCTTAATGCTG	60
pPC1.2	ATGAAGGTTAGGTTACGGTGGTACGCTCCGAAAAAGAAAAATCTTCAGCTTAATGCTG	60

	Termino de mctp2b	
pPC1	GTCTTTTCTTCTAGGAGTGGTCCGTAACCATCACCTCGTTGCCGTCGTCGCCTA---	176
pPC1.2	GTCTTTTCTTCTAGGAGTGGTCCGTAACCATCACCTCGTTGCCGTCGTCGCCTAGGCA	175

	Inicio de GFP	
pPC1	CACTCGTTCGCTCCTCGACAAGTGGCCACACGGGTAGGACCAGCTCGACCTGCCG	60
pPC1.2	CACTCGTTCGCTCCTCGACAAGTGGCCACACGGGTAGGACCAGCTCGACCTGCCG	60

	Termino de GFP	
pPC1	ACTGGCGGCGCCCTAGTGAGAGCCGTACCTGCTCGACATGTTTCATCATTAGATCTCCCG	78
pPC1.2	ACTGGCGGCGCCCTAGTGAGAGCCGTACCTGCTCGACATGTTTCATCATTAGATCTCCCG	120

Figura 12. Secuenciación de sitios de interés del plásmido pPC1.2. Resultado de las secuenciaciones realizadas a sitios específicos del plásmido pPC1.2, en azul se muestra el sitio de clonación múltiple, en rojo el sitio de inicio de la traducción de *mctp2b*, en naranja el sitio de termino de *mctp2b*, en verde el sitio de inicio de la traducción de GFP y en negro el sitio de termino de GFP, Todas las secuencias se muestran en sentido 5-3.

7.1.1.2.- Ligación del promotor *elav13* para generar el plásmido pDestol2pA2-*elav13-mctp2b-GPF*.

Se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos DL14 y DL15 para amplificar el promotor *elav13* del plásmido p5E-*elav13* (Figura 13.a), posteriormente dicha PCR se ligó al plásmido pJET1.2 usando el *CloneJET PCR Cloning Kit* de *ThermoFischer*, la ligación se comprobó mediante PCR en colonia, teniendo como resultado una amplificación de alrededor de 3850 pb, además como control positivo (C+) se realizó una PCR al plásmido pJET1.2-*mctp2b-GPF* previamente generado con una amplificación de 3700 pb, encontrándose tres colonias con la ligación del promotor *elav13* (Figura 13.b).

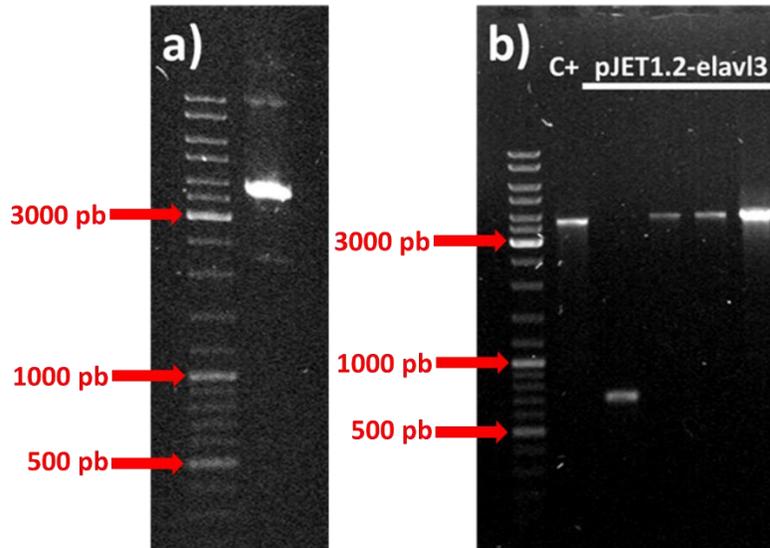


Figura 13.- Promotor elavl3 del plásmido p5E-elavl3. a) PCR para la amplificación del promotor elavl3, se observa una banda de 3800 pb. b) PCR en colonia para corroborar la ligación del promotor elavl3 en el plásmido pJET1.2, en el primer carril (C+) se muestra el control positivo para elavl3, en el segundo carril se muestra una colonia que no integro el promotor elavl3, del tercero al quinto se muestra las colonias que integraron el promotor elavl3.

Se realizó la ligación del promotor elavl3 al plásmido pPC1.2 y posteriormente se digirieron los plásmidos resultantes utilizando la enzima *XcmI*, encontrando que los plásmidos que presentaban la ligación en el sentido correcto muestran dos bandas de 9109 y 3058 pb, respectivamente (Figura 14.a. carril 2), mientras que aquellos en los que la ligación ocurrió en el sentido inverso presentan bandas de 9846 y 2354 pb, respectivamente (Figura 14.a. carril 3) mientras que el plásmido pPC1.2 presenta únicamente una banda de 8323 pb (Figura 14.a. carril 1). El plásmido pDestol2pA2-elavl3-mctp2b-GPF en sentido correcto recibió el nombre de pDL1.

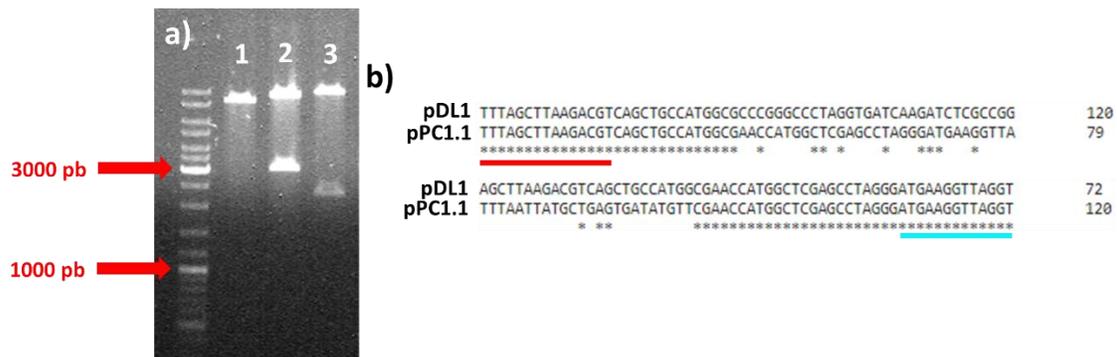


Figura 14.- Generación del plásmido pDestol2pA2-elavl3-mctp2b-GPF (pDL1). a) Digestión con la enzima *XcmI* de los plásmidos resultantes de la ligación del promotor *elavl3* al plásmido *pPC1.2*, en 1 se muestra el plásmido *pPC1.2* resultando en una sola banda de 8323 pb, en 2 se muestra al plásmido *pDL1* ligado de manera correcta resultando en una banda de 9109 y otra de 3058 pb, en 3 se muestra al plásmido *pDL1* invertido mostrando una banda de 9846 y otra de 2354 pb. b) Se muestra la secuenciación realizada a la región entre el promotor *elavl3* y el sitio de inicio de la traducción de *mctp2b*, mostrando que no había alteraciones al compararla con la secuencia de *pPC1.2*, en rojo se muestra el termino de *elavl3* y en azul el sitio de inicio de la traducción de *mctp2b*.

Se secuenció la región entre el promotor *elavl3* y el sitio de inicio de la traducción de *mctp2b*, encontrando que no había diferencias con la secuencia de *pPC1.2* (Figura 14.b) y que contenía 604 pb. Se decidió eliminar 570 pb entre el término del promotor *elavl3* y el sitio de inicio de la traducción de *mctp2b* al plásmido *pDL1* mediante una PCR como se describe en materiales y métodos. Posteriormente los plásmidos resultantes de la exclusión se caracterizaron mediante digestión con la enzima *EcoRV* encontrando cinco en los cuales la exclusión fue exitosa (Figura 15.a), dicho plásmido se nombró *pDL1+*. Se secuenció la región entre el promotor *elavl3* y el sitio de inicio de la traducción de *mctp2b* de dicho plásmido, encontrando que el promotor *elavl3* y el sitio de inicio de la traducción de *mctp2b* se encuentran íntegros (Figura 15.b).

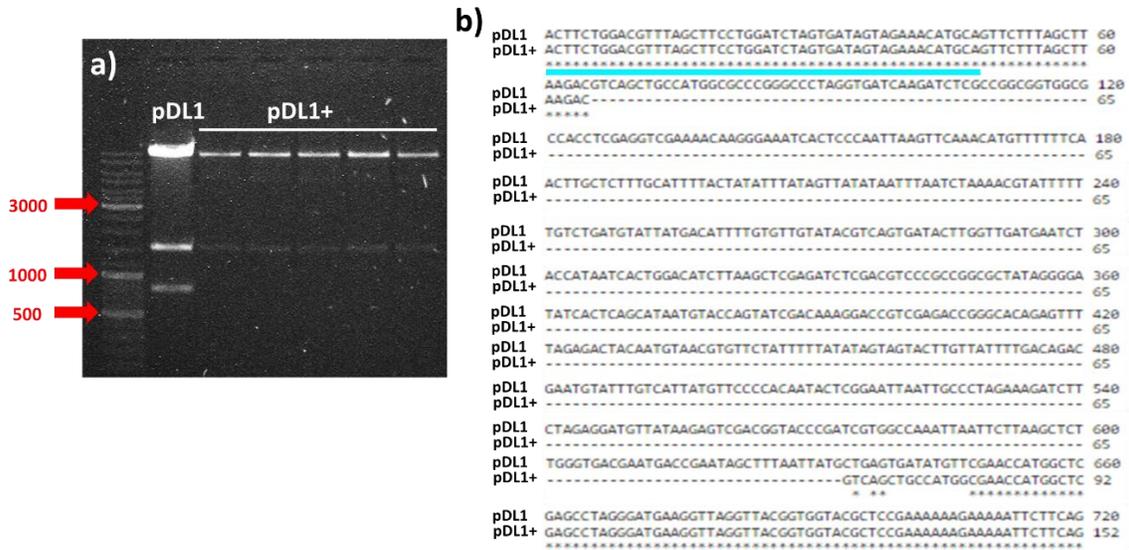


Figura 15.- Plásmido pDL1+. a) Patrón de bandeo resultante de la reacción de restricción realizada por la enzima *EcoRV*, a la izquierda se muestra al plásmido pDL1 con 3 bandas de 9711, 1617 y 839 pb, mientras que el plásmido pDL1+ presenta dos bandas de 9982 y 1617 pb. b) Resultado de la secuenciación de la región entre el promotor *elavl3* (azul) y el sitio de inicio de la traducción de *mctp2b* del plásmido pDL1+, en la cual se muestra integro (naranja).

7.1.2.- Generación del plásmido pDestol2pA2-*elavl3*-GPF.

Se excluyó mediante PCR la región codificante para la proteína *Mctp2b* al plásmido pDL1+ para generar el plásmido pDestol2pA2-*elavl3*-GPF, que recibió el nombre de pDL2. Primero se comprobó que la amplificación de la PCR fuera de 9349 pb (Figura16.a). Posteriormente se realizó una auto-ligación de dicha amplificación como se muestra en materiales y métodos, los plásmidos resultantes se caracterizaron mediante una reacción de digestión con la enzima *EcoRI*, encontrando el patrón de bandeo esperado al ocurrir la exclusión, siendo dos bandas de 6138 y 3166 (Figura16.b). Posteriormente se secuenció el sitio de inicio de la traducción de GFP para comprobar que se había incorporado el codón de inicio 5' - ATG - 3' (Figura16.c).

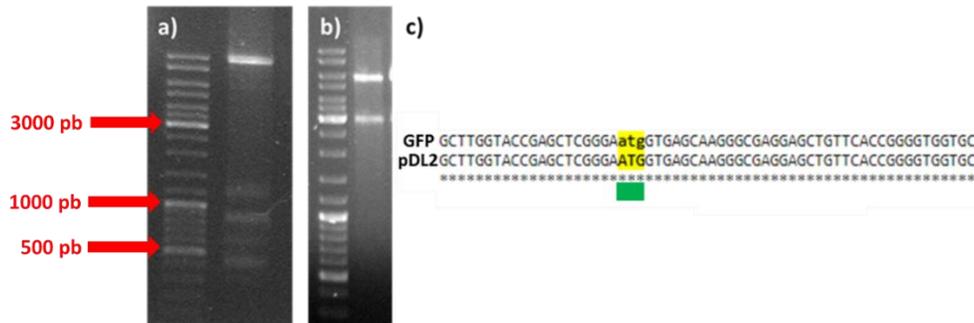


Figura 16. Plásmido pDL2. a) Fragmento de 9349 pb amplificado por PCR usando como templado al plásmido pDL1 y usando los oligonucleótidos DL47 y DL54. b) Digestión del plásmido pDL2 usando la enzima *EcoRI*, se observan dos bandas, una de 6138 y otra de 3166. c) Secuenciación del sitio de inicio de la traducción para la proteína GFP donde se observa el codón de inicio de la traducción en verde.

7.2.- Microinyección de embriones.

Se microinyectaron embriones en el vitelo y el blastómero con el fin de sobreexpresar *mctp2b-gfp*, se microinyectaron con entre 1 y 5 nl de una solución que contenía 25 ng/ μ l del plásmido pDL1+ (el cual induce la sobreexpresión de *mctp2b-gfp*) y con 25 ng/ μ l de ARNm Tol2 Transposasa (grupo experimental; Exp), además, se microinyectaron embriones únicamente con 25 ng/ μ l del plásmido pDL1+ (grupo control microinyectado; Ctrl MI) y se dejaron embriones sin microinyectar (grupo control no microinyectado; Ctrl NMI). Por otra parte, se realizaron microinyecciones en el vitelo utilizando el plásmido pDL2 (con el fin de sobreexpresar de manera neuronal *gfp*), se generaron los mismos grupos, todas las mezclas de microinyección contenían rojo fenol al 0.05% como marcador. Se calculó la tasa de supervivencia a las 24 hpf para todos los grupos y además se calculó el porcentaje de individuos con sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp* y *gfp* en los grupos experimentales.

Una vez calculadas las tasas de supervivencia a las 24 hpf se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en las tres condiciones de microinyección. Para las microinyecciones del plásmido pDL1+ en el vitelo (que inducía la sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp*) se encontraron diferencias significativas al comparar las tasas de supervivencia del grupo experimental contra ambos grupos controles ($P_{Exp/CtrlMI}=0.0010$; $P_{Exp/CtrlNMI}=0.0157$), mientras que al comparar ambos grupos controles no se observaron diferencias significativas ($P_{CtrlMI/CtrlNMI}=0.3009$; Figura 17). Al comparar la supervivencia en los grupos inyectados con el plásmido pDL1+ en el blastómero (para inducir la sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp*) también se observaron diferencias significativas entre el grupo experimental con respecto a los grupos controles ($P_{Exp/CtrlMI}=0.0002$; $P_{Exp/CtrlNMI}=0.0159$) y no se encontraron diferencias significativas al comparar ambos grupos control ($P_{CtrlMI/CtrlNMI}=0.1048$; Figura 18). Por otro lado, al comparar los grupos microinyectados con el plásmido pDL2 (para inducir la sobreexpresión neuronal de *gfp*) no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($P=0.7277$; Figura 19).

Al comparar el porcentaje de los individuos inyectados con el plásmido PDL1+ que mostraban sobreexpresión de *mctp2b-gfp* a las 24 hpf, se encontró que en el grupo experimental microinyectado en el vitelo el 82.6% de los individuos sobreexpresaban *mctp2b-gfp*, mientras que el grupo experimental microinyectado en el blastómero el 47.7% de los individuos lo hacían, por su parte en el grupo experimental microinyectado con el plásmido pDL2 el 100% de individuos sobreexpresaba *gfp*.

Sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp* (Microinyección en vitelo)

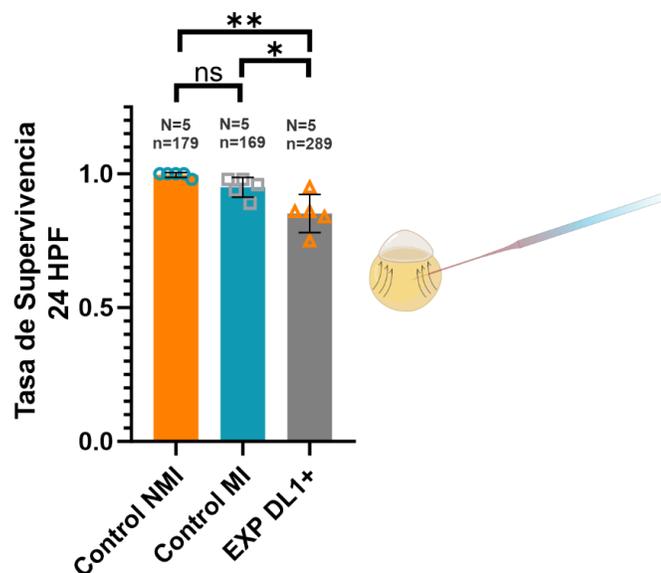


Figura 17.- Tasa de supervivencia a las 24 hpf de los embriones microinyectados con el plásmido pDL1+ en el vitelo. Se muestran los promedios de las tasas de supervivencia de los embriones microinyectados en el vitelo con el plásmido pDL1+. *= diferencias significativas entre dos grupos ($P < 0.05$), ns= no se observan diferencias significativas entre dos grupos, valores de P en el texto, Control NMI = Control no microinyectado, Control MI= Control microinyectado.

**Sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp*
(Microinyección en blastomera)**

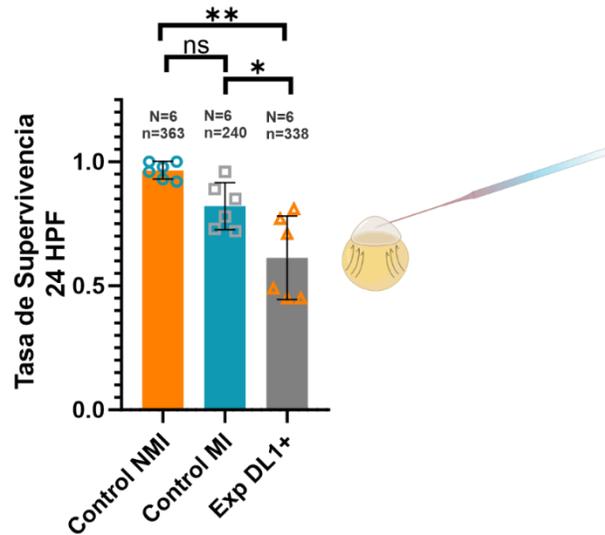


Figura 18.- Tasa de supervivencia a las 24 hpf de los embriones microinyectados con el plásmido pDL1+ en el blastómero. Se muestran los promedios de las tasas de supervivencia de los embriones microinyectados en el blastómero con el plásmido pDL1+. *= diferencias significativas entre dos grupos ($P < 0.05$), ns= no se observan diferencias significativas entre dos grupos, valores de P en el texto, Control NMI = Control no microinyectado, Control MI= Control microinyectado.

**Sobreexpresión neuronal de *gfp*
(Microinyección en vitelo)**

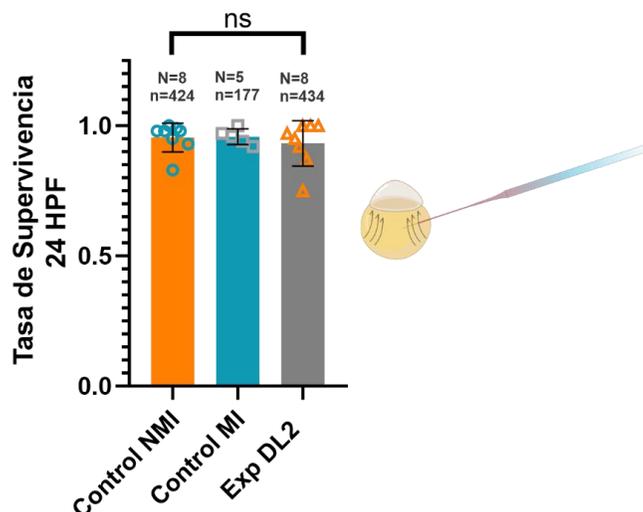


Figura 19.- Tasa de supervivencia a las 24 hpf de los embriones microinyectados con el plásmido pDL2 en el vitelo. Se muestran los promedios de las tasas de supervivencia de los embriones microinyectados en el vitelo con el plásmido pDL2. ns= no se observan diferencias significativas entre dos grupos, ($P = 0.07277$), Control NMI = Control no microinyectado, Control MI= Control microinyectado.

El hecho de que ambos grupos experimentales que sobreexpresan de manera neuronal *mctp2b-gfp* presenten tasas de sobrevivencia menores al ser comparadas con los grupos controles microinyectados y no microinyectados, y que esto no ocurra al sobreexpresar *gfp* en las neuronas, nos indica que la sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en neuronas de pez cebra tiene influencia en la sobrevivencia del embrión, lo cual concuerda con lo encontrado al sobreexpresar *mctp2b-gfp* en todo el cuerpo (Pérez-Cortés, 2023). Por otra parte, el encontrar un menor porcentaje de individuos que sobreexpresen *mctp2b-gfp* al realizar la microinyección directa en el blastómero contradice lo reportado por Kwan et al., 2007.

7.3.- Observaciones en microscopio de epifluorescencia.

Los embriones se observaron en un microscopio de epifluorescencia entre las 20 y 24 hpf encontrando que los individuos microinyectados con el plásmido pDL1+ sobreexpresaban *mctp2b-gfp* (Figura 20) y que estos lo hacían en la parte dorsal del embrión en estructuras con forma de neurona (Figura 20.b.4). Por su parte, los individuos microinyectados con el plásmido pDL2 expresaban *gfp* a lo largo del sistema nervioso (Figura 21).

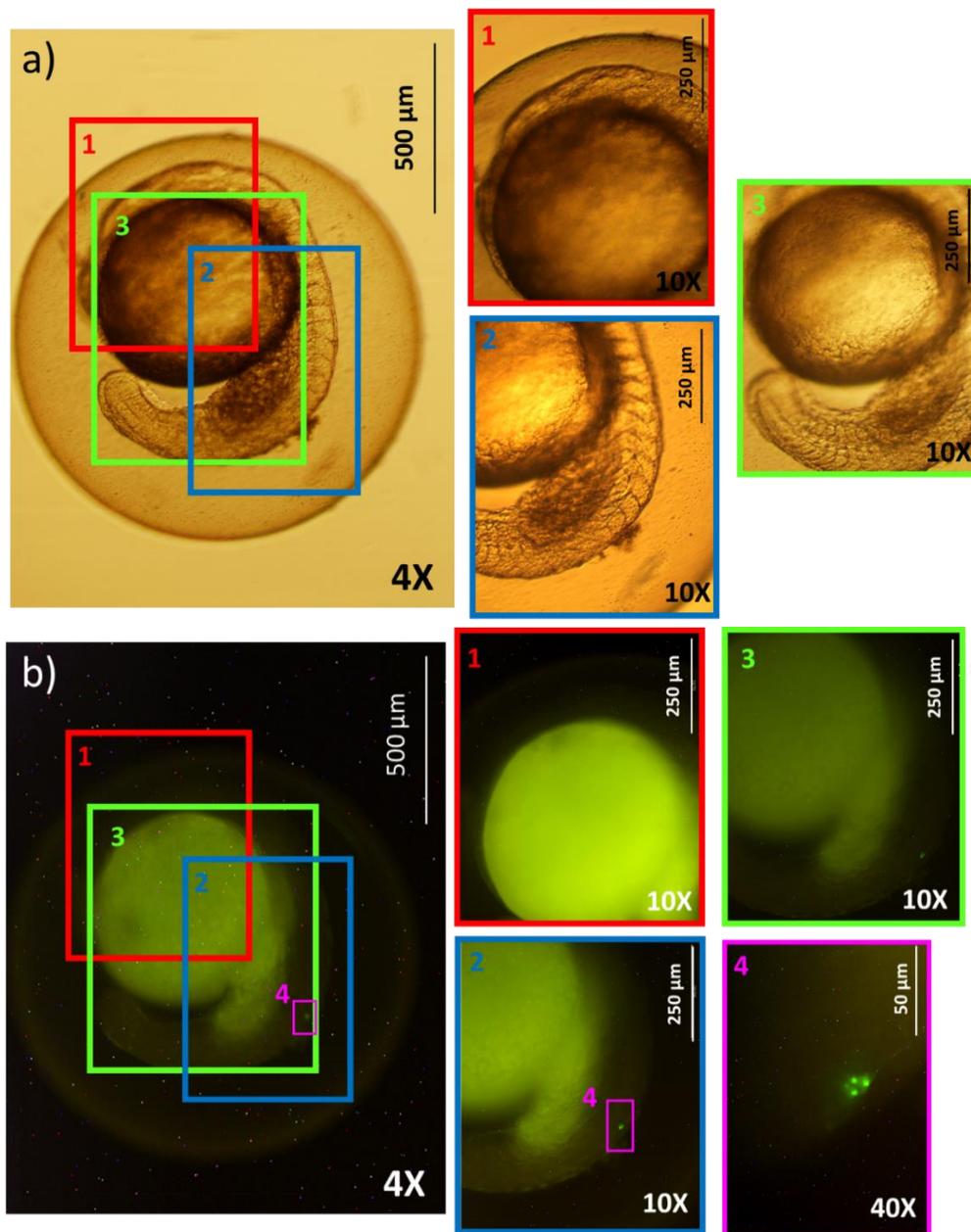


Figura 20.- Observación de la expresión de *mctp2b-gfp* en el microscopio de epifluorescencia en embriones microinyectados con el plásmido pDL1+. a) Fotografía panorámica de un embrión de entre 20-24 hpf en campo claro con el objetivo de 4X, en 1, 2 y 3 se muestran observaciones en zonas específicas con el objetivo de 10X. b) Fotografía panorámica de un embrión de entre 20-24 hpf en el microscopio de epifluorescencia con el objetivo de 4X, en 1, 2 y 3 se muestran observaciones en zonas específicas con el objetivo de 10X, en 4 se muestran observaciones con el objetivo de 40X en el cual se observa la expresión de la proteína Mctp2b-GFP, nótese que el punto fluorescente se divide en cuatro puntos bien distinguidos en una zona central de la que surgen prolongaciones con fluorescencia.

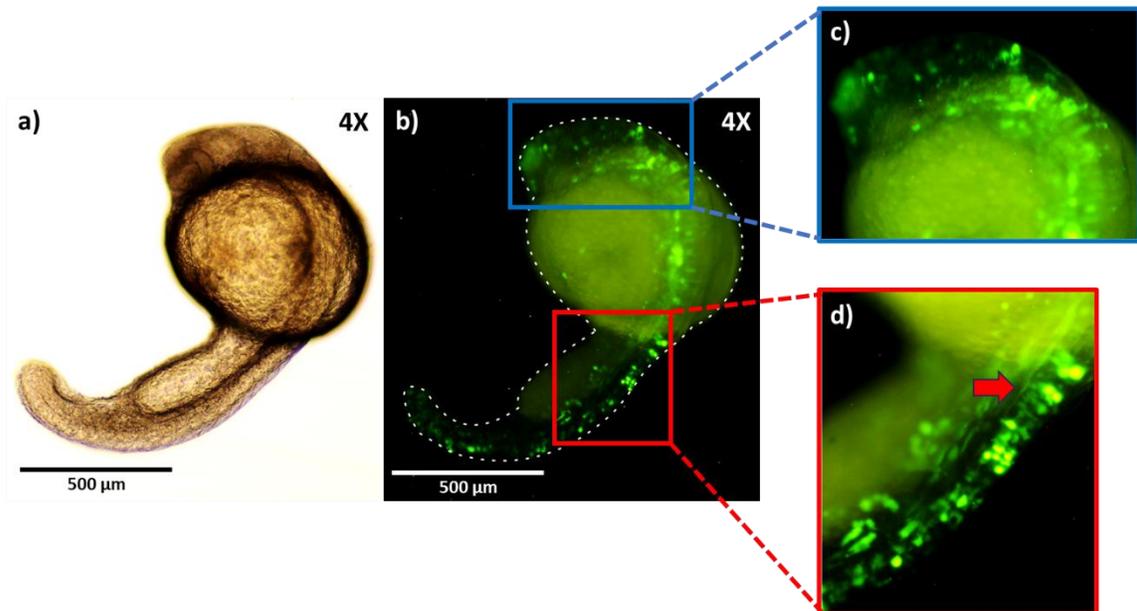


Figura 21.- Observación de la expresión de gfp en el microscopio de epifluorescencia en embriones microinyectados con el plásmido pDL2. a) fotografía panorámica de un embrión de entre 20-24 hpf en campo claro con el objetivo de 4X. b) fotografía panorámica de un embrión de entre 20-24 hpf en el microscopio de epifluorescencia con el objetivo de 4X, donde se observa la expresión de gfp a lo largo del sistema nervioso. c) acercamiento a la región cefálica. d) acercamiento a la región dorsal del embrión con el objetivo 10X donde se observan neuronas con sus prolongaciones (Flecha roja).

En la mayoría de las ocasiones la sobreexpresión de *mctp2b-gfp* se observa en neuronas de la región dorsal de la médula espinal (Figura 22). Estas neuronas por posición, morfología y tamaño al compararlas con las descritas en la bibliografía se asemejan a neuronas Rohon-Beard o motoneuronas primarias de la médula espinal (Figura 23) (Rossi et al., 2009; Williams & Ribera, 2020).

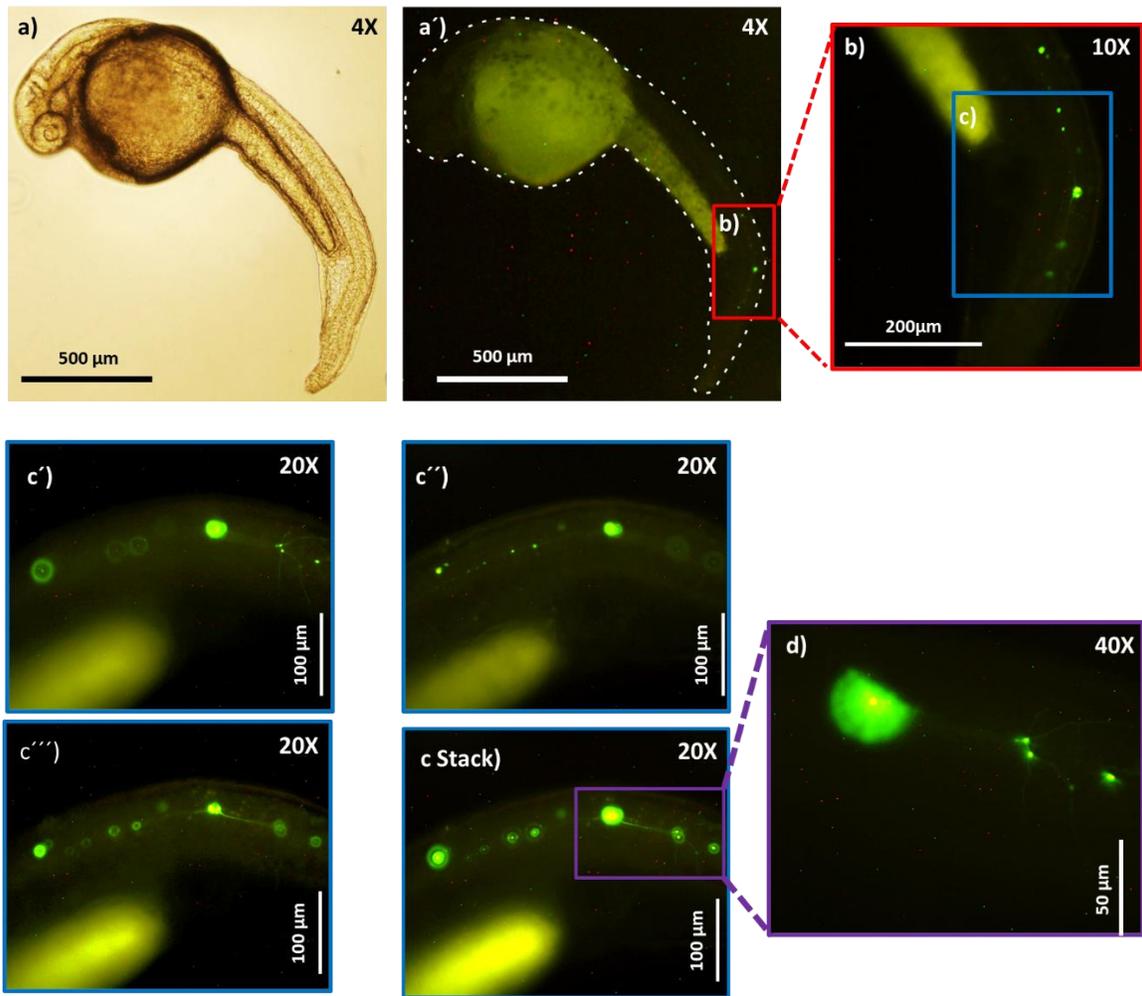


Figura 22.-Observación detallada de neuronas de la medula espinal que expresan *mctp2b-gfp*. a) Fotografía panorámica de un embrión a las 24 hpf con el objetivo 4X en a) campo claro y a') en epifluorescencia, nótese la sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en la región posterior de la medula espinal (recuadro rojo). b) Acercamiento a la región posterior de la medula espinal que sobreexpresa *mctp2b-gfp* con el objetivo 10X. c) Acercamiento a la región posterior de la medula espinal que expresa *mctp2b-gfp* con el objetivo 20X. c'), c''), c''') misma región de la figura c) con enfoques en distintos planos focales. c) Composición en Z de las 3 fotografías anteriores con enfoques en distintos planos focales. d) Fotografía de una neurona de la medula espinal que sobreexpresa *mctp2b-gfp* tomada con el objetivo 40X, se observa el soma con una prolongación citoplasmática hacia la región dorsal, por lo cual podría tratarse de una neurona Rohon-Bear o una motoneurona primaria.

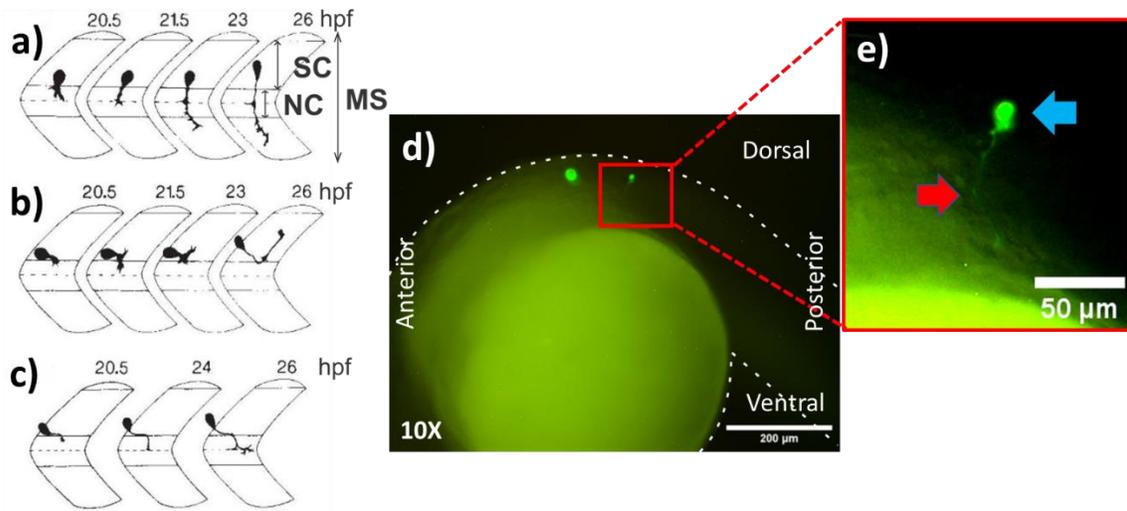


Figura 23.- Motoneuronas primarias. Esquema del desarrollo axonal en distintas etapas del desarrollo de: a) una motoneurona primaria caudal (Cap), b) una motoneurona primaria media (MiP), c) una motoneurona primaria rostral (RoP). SC: Médula espinal, NC: Notocorda, MS: Miosepto (a-c adaptadas de Eisen et al., 1986). d) Embrión de pez cebra a las 24 hpf que sobreexpresa *mctp2b-gfp* en dos sitios de la región dorsal. e) Neurona sobreexpresando *mctp2b-gfp* con una morfología similar a una motoneurona primaria caudal, obsérvese el axón (flecha roja) y el soma (flecha azul).

Al realizar las microinyecciones en el blastómero se aumentó la incidencia de la sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en la región cefálica de los embriones de pez cebra (Figura 24), en la mayoría de las ocasiones solo se observaban puntos discretos en el telencéfalo, diencefalo y rombencéfalo (Figura suplementaria 3), cuando la sobreexpresión de *mctp2b-gfp* se observó de manera más abundante en la región cefálica estos presentaban un mayor grado de deformidad y tendían a vivir durante un menor tiempo (Figura 25).

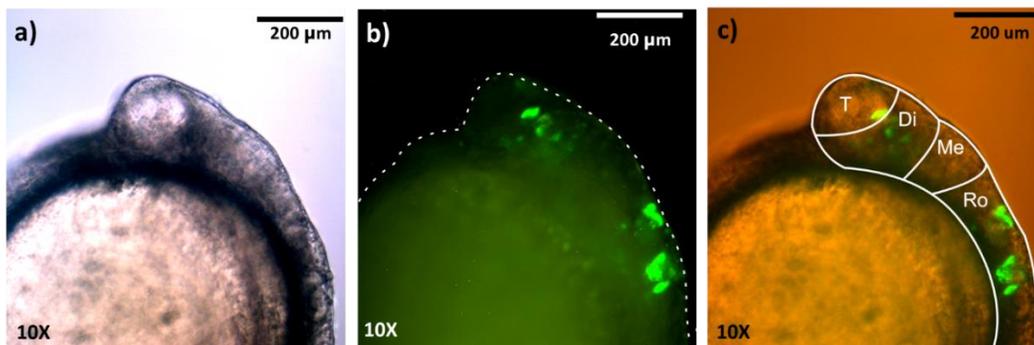


Figura 24.- Sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en region cefálica. Se observa un embrión de pez cebra de 24 hpf que sobreexpresa *mctp2b-gfp* en la región cefálica con el objetivo 10X, se muestra la expresión en el telencéfalo, diencefalo y rombencéfalo. a) Fotografía en campo claro. b) Fotografía en microscopio de epifluorescencia. c) Colocalización de ambas fotografías. T: telencéfalo, Di: diencefalo, Me: mesencéfalo, Ro: rombencéfalo.

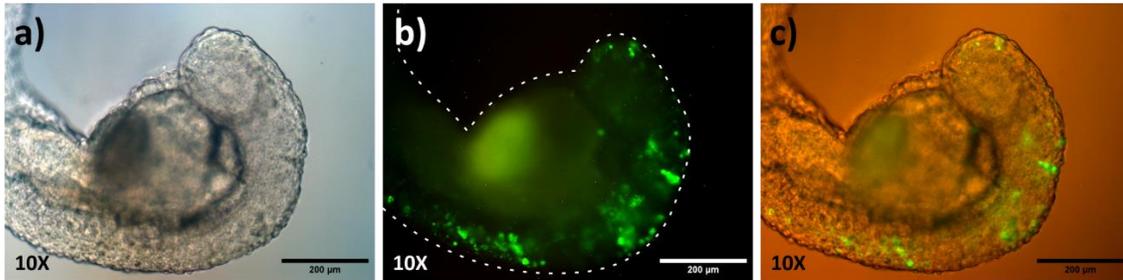


Figura 25.- Sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en neuronas de distintas regiones de un embrión de pez cebra a las 24 hpf. Se observan fotografías de un embrión de pez cebra a las 24 hpf que sobreexpresa *mctp2b* en diversas neuronas tomadas con el objetivo 10X, dicho embrión se microinyectó en el blastomero con la mezcla experimental (pDL1 y ARNm de transposasa con rojo fenol), nótese la expresión en la región cefálica en el diencefalo y rombencéfalo y el grado de descomposición del tejido al tomar la foto. a) Fotografía de campo claro. b) Fotografía con microscopia de epifluorescencia. c) Colocalización de ambas fotografías. Escala de 200 µm.

7.4.- Observaciones en microscopia confocal.

Se observaron los embriones fijados en el microscopio confocal Zeiss LSM 510, con el láser Argón 488, usando el objetivo 20X (Figura 26), observando neuronas que sobreexpresan *mctp2b-gfp*, las cuales aglutinan la proteína Mctp2b-GFP en el soma y en cúmulos de las prolongaciones dendríticas similar a lo descrito anteriormente por Duran-Ríos en 2019.

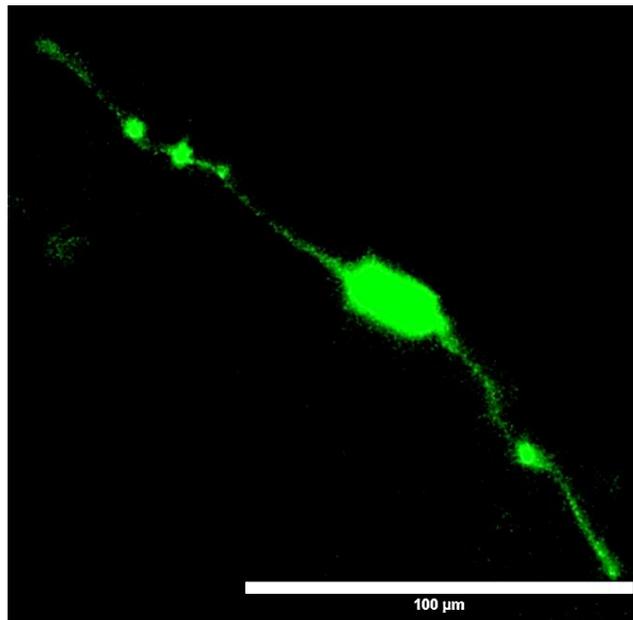


Figura 26.- Fotografía en microscopia confocal. Fotografía de una neurona que sobreexpresa *mctp2b-gfp* en el microscopio confocal Zeiss LSM 510, con el láser Argón 488, usando el objetivo 20X.

7.5.- Obtención de una F1 Tg Elavl3: mctp2b: GFP.

Se realizaron cruces de hembras adultas mosaicos para Elavl3: mctp2b: GFP con machos silvestres, los embriones resultantes de estos cruces se observaron en microscopía de fluorescencia, encontrando que ninguna de estas cruces produjo embriones con sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en neuronas.

Tabla 2- Obtención de una F1 Tg Elavl3: mctp2b: GFP.

Individuo mosaico	Embriones F1 observado	% de embriones que sobreexpresan <i>mctp2b- gfp</i>.
1	31	0
2	59	0
3	46	0
4	92	0
5	149	0
6	12	0
7	15	0
8	31	0
9	31	0
10	11	0
11	45	0
12	19	0
13	10	0
14	12	0
15	8	0

8.- Discusión.

La información sobre las funciones celulares de las proteínas MCTP es variada. Distintos trabajos indican que podrían desempeñar un papel importante en la sinapsis química, la migración celular, la síntesis de gotas lipídicas, la regulación del metabolismo redox y en el establecimiento tubular del retículo endoplasmático (Joshi et al., 2018, 2021; Qiu et al., 2015; Téllez-Arreola et al., 2020). En *Danio rerio* se ha encontrado que la proteína Mctp2b se localiza a la largo del sistema nervioso, en neuronas, se ha localizado en organelos de la vía endocítica como el retículo endoplasmático, endosomas tardíos, endosomas de reciclaje y lisosomas, lo que sugiere que Mctp2b podría participar en procesos de tráfico vesicular (Duran-Rios, 2019). Por otro lado, se ha encontrado que las mutaciones dirigidas al gen *mctp2b* usando el sistema CRISPR/Cas9 producen defectos en el desarrollo embrionario y por consecuencia una alta mortalidad en larvas de pez cebra. Por su parte, la sobreexpresión de *mctp2b* en todo el embrión también produce una alta tasa de mortalidad (Pérez-Cortés, 2021).

Este trabajo tuvo como objetivo sobreexpresar *mcp2b* en neuronas de *Danio rerio*, para investigar su función específica en estas células, encontrando que los embriones con sobreexpresión neuronal de *mctp2b* tienen una tasa de mortalidad mayor que los individuos controles, además esta sobreexpresión se detecta principalmente en neuronas de la región dorsal del pez cebra las cuales tienen una morfología similar a las neuronas Rohon-Bear y a las motoneuronas primarias. Para obtener la siguiente generación a partir de los individuos mosaicos, se realizó el cruce de hembras mosaicos Elavl3: *mctp2b*: GFP con machos silvestres, pero no se lograron obtener embriones con sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp*.

Durante este trabajo se diseñó un plásmido de sobreexpresión neuronal para el gen *mctp2b* fusionado a la proteína GFP que recibió el nombre de pDL1+ y un plásmido de sobreexpresión neuronal para el gen *gfp* al cual se le llamo pDL2. Se encontró una sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp* en el 82.6% de los individuos microinyectados con el plásmido en el vitelo, mientras que al ser microinyectado en el blastómero se encontró que el 47.7% de los individuos sobreexpresaban de manera neuronal *mctp2b-gfp*. Por su parte, la microinyección del plásmido pDL2 en el vitelo resulto en un 100% de individuos con sobreexpresión neuronal de *gfp*. Se ha reportado una expresión de *mCherry* en el 75.2% de embriones al ser microinyectados en el blastómero con el plásmido pDestTol2CG:hsp70:mCherryCAAX-polyA (que expresa mCherry en distintos órganos al ser expuesto a un choque de calor) en las mismas condiciones que nuestros experimentos (Kwan et al., 2007). Además, dicho plásmido contiene las mismas secuencias Tol2 que los plásmidos pDL1+ y pDL2. Esto nos indica que los plásmidos generados en este trabajo poseen una alta capacidad de integración en el genoma del pez, reflejado en un alto porcentaje de individuos con expresión neuronal de *mctp2b-gfp* y *gfp*.

Por otro lado, en nuestros ensayos encontramos una mayor sobreexpresión de *mctp2b-gfp* al realizar las microinyecciones en el vitelo que en el blastómero, contrario a lo reportado por Kwan et al., 2007. Un protocolo de microinyección de embriones de pez cebra de *JoVE Science Education Database* menciona que, debido a que no hay membranas que separen las blastomeras y el vitelo en etapas tempranas del desarrollo, las soluciones inyectadas en una blastomera o en un vitelo se distribuyen uniformemente por todo el organismo, por lo cual no debería de haber diferencias en cuanto a la expresión al microinyectar en la blastomera o en el vitelo (*Database JoVE Science Education*, 2023) , de igual manera, nuestros resultados muestran que sí hay diferencias en ambos tipos de microinyecciones.

Se observó que los individuos que fueron microinyectados con el plásmido pDL2 expresaban de manera más abundante *gfp* y en una mayor cantidad de neuronas que aquellos que fueron microinyectados con pDL1+. Lo encontrado con la sobreexpresión neuronal de *gfp* en nuestro trabajo coincide por lo reportado por Park et. al. 2000 (Park, Kim, et al., 2000). Los embriones que sobreexpresan *mctp2b-gfp* muestran solo pocas neuronas con sobreexpresión y presentan una tasa de supervivencia menor. Esto nos indica que posiblemente ocurra una alta mortalidad de neuronas que afecta la sobrevivencia de las larvas. El sistema nervioso tiene la capacidad de adaptarse y compensar la pérdida neuronal, pero cuando esta muerte ocurre en zonas extensas que comprometan las funciones vitales pueden conducir a la muerte del individuo (Fricker, Tolkovsky, Borutaite, Coleman, & Brown, 2018). Es necesario realizar más experimentos para confirmar la relación entre la sobreexpresión de *mctp2b-gfp* y la muerte neuronal. Se podría sobreexpresar *mctp2b-gfp* en embriones tg (Elavl3: *mcherry*) para cuantificar las neuronas con ambos marcadores, a su vez, en dichos peces se podría cuantificar la expresión genética de marcadores pre-neuronales (familia *SoxB1*, *hesx1* y *her3*, *Neurog1*), neuronales (*id2a*, *lhx2b*, *lhx9*, *Elavl3*, *GAD1*, *VgluT*, *Cav3.1*) y de apoptosis (*p53* y *Caspasa 9*, *8* y *3*) mediante qPCR (Kalyn et al., 2020; Rocha et al., 2020; Thurtle-Schmidt & Lo, 2018).

Se ha encontrado que la proteína Mctp2b se localiza en organelos de la vía endocítica (aparato de Golgi, lisosomas, endosomas tardíos y de reciclaje) de las neuronas de pez cebra (Duran-Rios, 2019). La vía endocítica, desde el punto de vista funcional, podría definirse como el circuito de reciclaje de la membrana plasmática y sus componentes, el sistema integrativo para la degradación de moléculas y el sistema de conexión entre el transporte y la degradación de moléculas (Repnik et al., 2013). La vía endocítica es particularmente importante en las neuronas, ya que permite la recuperación de componentes de las vesículas sinápticas. Es por ello que el mecanismo de tráfico endosomal define la composición y función presináptica y postsináptica al controlar la biogénesis de las vesículas sinápticas, así como la distribución subcelular de los transportadores y receptores de neurotransmisores (Cosker & Segal, 2014; Ryder & Faundez, 2009). Problemas con esta maquinaria intracelular se han asociado a diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia frontotemporal

y esclerosis lateral amiotrófica (Overhoff et al., 2021; Wang et al., 2018), lo que demuestra la importancia de esta vía en la supervivencia neuronal.

Por otra parte, se ha reportado que en humanos un ARNm llamado “*miR-18b-5p*” que regula la expresión continua de los genes *Hif1a*, *Mef2c*, *miR-206*, *Mctp1* y *Rarb*, al disminuir su transcripción como resultado de una mutación, se asoció a la aparición de esclerosis lateral amiotrófica (Kim et al., 2020), esto también nos podría indicar que las proteínas MCTP participan en la vía endocítica. Por otro lado, mediante estudios de asociación genética en humanos se han asociado distintos polimorfismos de los genes *MCTP1* y *MCTP2* a enfermedades neuropsiquiátricas como el trastorno bipolar y la esquizofrenia, dichas enfermedades a su vez tienen asociados como polimorfismos de alto riesgo a polimorfismos de genes que codifican para proteínas que participan en la vía endocítica (Plooster et al., 2021; Ryder & Faundez, 2009; Wang et al., 2021). Por lo cual, el modelo de sobreexpresión de *mctp2b-gfp* descrito en este trabajo, pretende contribuir al estudio de la vía endocítica de las neuronas de pez cebra para conocer más sobre la función de *mctp2b* en este proceso.

Joshi y colaboradores han descrito que la sobreexpresión de MCTP2 humana en células COS-7 conlleva a un mayor número y tamaño de gotas lipídicas, mientras que la eliminación de la MCTP2 en células HeLa y la abolición genética de *mctp-1* en *C. elegans* conllevan a efectos contrarios sobre las gotas lipídicas (Joshi et al., 2018, 2021). Las gotas lipídicas son organelos dinámicos que almacenan lípidos intracelulares, controlan el metabolismo celular de lípidos, desempeñan un papel protector frente a muchos factores de estrés celular, incluido el estrés oxidativo, participan en la regulación de la expresión genética y la inmunidad intracelular. Hasta hace poco, el conocimiento sobre las gotas lipídicas en el sistema nervioso y en especial en las neuronas era mínimo, pero ahora se sabe que existen múltiples vínculos entre las gotas de lípidos y la neurodegeneración.

Usualmente las neuronas carecen o contienen pocas gotas lipídicas, pero esto cambia en estados de estrés o condiciones patológicas (Islimy et al., 2022; Ralhan et al., 2021; Welte, 2015). Se ha descrito que los ratones knockout para el gen *Ddhd2* que codifica para la proteína fosfolipasa intracelular A1, la cual participa en el metabolismo de lípidos, muestran abundantes gotas lipídicas en el sistema nervioso. Se encontró que estas se acumulan en el soma, las dendritas y los axones y que estos ratones exhiben deficiencias en la cognición y en la coordinación motora similares a los presentados en pacientes con paraplejias espásticas hereditarias (Inloes et al., 2014; Rainier et al., 2008). Por lo anterior, nuestro modelo de sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en neuronas de pez cebra podría ser útil para determinar si también existe la sobreproducción de gotas lipídicas y cuál es su efecto en el funcionamiento neuronal.

Se ha encontrado que la ausencia de *mctp-1* en *C. elegans* afecta la velocidad de liberación de acetilcolina (Téllez-Arreola et al., 2020) y un experimento realizado por Qiu y colaboradores (2015) encontró que sobreexpresar MCTP1L de rata en células SH-SY5Y afecta la migración celular. Este tipo celular forma una monocapa en cultivo y muestra un

buen comportamiento de migración compartiendo características fenotípicas con células neuronales adrenérgicas (Qiu et al., 2015). Además, las neuronas postmitóticas migran desde su sitio de origen hasta su destino final en el encéfalo del pez cebra para formar complejas estructuras funcionales (Theisen et al., 2018). Se ha descrito que al bloquear los receptores nicotínicos de las neuronas del núcleo tegmental del rombencéfalo tienden a migrar más lento hacia el extremo ventral del límite mesencéfalo-rombencéfalo y se hipotetiza que la ralentización de la migración neuronal podría conllevar a consecuencias dramáticas para todo el organismo, debido a que las neuronas que no hayan migrado a su destino final pueden quedar atrapadas en un entorno equivocado (Theisen et al., 2018).

En el presente trabajo encontramos que neuronas con una morfología similar a neuronas Rohon-Bear presentaban mayor expresión *mctp2b-gfp* y que esta se mantenía hasta por 3 dpf. Esto podría ser debido a que las neuronas Rohon-Bear comienzan a migrar antes de las 10 hpf mientras que el promotor exógeno *elav13* comienza a expresarse después de las 10 hpf, por lo cual no se ven afectadas por la sobreexpresión de *elav13-mctp2b-gfp* (Kwan et al., 2007; Rocha et al., 2020). Además, encontramos que las larvas que muestran sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en la región encefálica también presentan tasas de supervivencia más bajas y alteraciones en el desarrollo embrionario (Figura 24, Figura suplementaria 3). Esto podría deberse a alteraciones en la migración neuronal en el encéfalo debida a la sobreexpresión de *mctp2b-gfp*. Para confirmar esta hipótesis se podrían realizar experimentos enfocados a evaluar el efecto de la sobreexpresión neuronal de *mctp2b* en la migración de neuronas postmitóticas en el encéfalo de pez cebra.

Se encontró que al microinyectar el plásmido pDL1+, las neuronas que presentaban mayor sobreexpresión de *mctp2b-gfp* eran neuronas similares a neuronas Rohon-Bear y motoneuronas primarias. Como se mencionó en el párrafo anterior, en el caso de las neuronas Rohon-Bear esto podría deberse a que este tipo de neuronas son las primeras que comienzan su diferenciación durante el desarrollo embrionario (antes de que inicie la expresión de *elav13*) y a que el sistema Tol2 tarda en integrarse al genoma y por ende en expresar su contenido (Kwan et al., 2007; Rocha et al., 2020).

Las neuronas Rohon-Bear se caracterizan porque poseen un gran soma y se localizan en la parte superficial de la médula espinal dorsal (Figuras suplementarias 1 y 2). Estas neuronas comienzan su diferenciación en la gastrulación a partir del borde de la placa neural (región del ectodermo que se encuentra entre la placa neural y el ectodermo epidérmico) antes de la neurulación, posteriormente alcanzan su punto máximo de diferenciación a las 24 hpf para luego comenzar a disminuir en número por apoptosis a partir del día 5 post-fertilización. Se sabe que las neuronas Rohon-Bear participan en la respuesta mecanosensorial de las larvas, se ha descrito que cuando sus terminales nerviosas se activan con un ligero estímulo mecánico, la larva contrae los músculos del lado opuesto del cuerpo para flexionar el tronco alejándose del estímulo nadando en la dirección opuesta, además, se ha observado que los peces cebra mutantes nulos para el gen *prdm1a* (PR

domain zinc finger protein 1; Proteína 1 con dedos de zinc del dominio PR, participa en la diferenciación de la cresta neural) no poseen células Rohon-Bear siendo incapaces de escapar cuando se les estimula de manera táctil) (Birkholz et al., 2009; Rossi et al., 2009; Williams & Ribera, 2020). Dicha respuesta se puede evaluar con la prueba de respuesta producida por contacto (*Touch-evoked Response*) descrita por Sztal y colaboradores en 2016, que se realiza en larvas de 2 dpf.

Por otra parte, las motoneuronas primarias de la médula espinal comienzan su desarrollo a partir de las 20 hpf y se caracterizan por su gran diámetro del soma (9.8 μm). Las motoneuronas primarias se pueden clasificar en tres grupos por las posiciones de los somas en la médula espinal y la trayectoria de sus axones: motoneuronas primarias caudales (CaP), motoneuronas primarias medias (MiP) y motoneuronas primarias rostrales (RoP) (Figura 23). Las CaP, inervan el músculo axial ventral, las MiP proyectan sus axones para inervar el músculo axial dorsal, mientras que las RoP proyectan sus axones para controlar al músculo medio. Las larvas de pez cebra comienzan su actividad motora a las 17 hpf presentando pequeños espasmos musculares, que producen un coleteo, los cuales pueden ser resultado de contracciones espontáneas de los músculos o al ser activados por las motoneuronas primarias. Se ha usado la prueba de respuesta producida por contacto a los 2 dpf o de nado abierto a partir de los 5 dpf para medir la actividad de las motoneuronas primarias (Gong et al., 2017; Sztal et al., 2016).

Ambas pruebas conductuales podrían ser de utilidad para conocer el efecto de la sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en estas neuronas, dichas pruebas deben realizarse en individuos mutantes F1 o F2, para tener resultados más fiables, debido a que en individuos mosaicos la sobreexpresión de *mctp2b-gfp* no está en todas las neuronas. En este trabajo se intentó generar una línea mutante F1 que sobreexpresara *mctp2b-gfp* en sus neuronas, pero luego de cruzar 15 hembras mosaico *Elav13:mctp2b:GFP* con individuos silvestres no se encontró en la descendencia larvas que sobreexpresaran *mctp2b-gfp*. Esto podría deberse a que las hembras sobrevivientes podrían tener baja tasa de inserción de *Elav13-mctp2b-gfp* en el genoma, específicamente en el genoma de sus células germinales (Kwan et al., 2007). De manera interesante, las cruas produjeron una menor cantidad de embriones y altas tasas de mortalidad; sin embargo, no se detectó sobreexpresión de *mctp2b-gfp* mediante microscopía de fluorescencia.

Las proteínas MTCP pertenecen al grupo de proteínas con al menos dos dominios C2 y una región transmembranal que ancla la proteína a la membrana plasmática, en dicho grupo encontramos a las sinaptotagminas, a las ferlinas y a las sinaptotagminas extendidas, las cuales en conjunto con las MCTP se cree que están involucradas en el tráfico celular, la generación de segundos mensajeros, la señalización dependiente de Ca^{2+} y la neurotransmisión (Cho & Stahelin, 2006; Corbalan-García & Gómez-Fernández, 2014; Shin et al., 2005). En estudios anteriores se ha realizado la sobreexpresión neuronal de sinaptotagminas y sinaptotagminas extendidas en *Drosophila melanogaster*, encontrando que la sobreexpresión neuronal de sinaptotagmina extendida mejora el crecimiento sináptico y el mantenimiento del conjunto de vesículas durante la actividad neuronal

intensa (Kikuma et al., 2017), mientras que la sobreexpresión neuronal de la Synaptotagmina 7 redujo la liberación espontánea de vesículas sinápticas (Guan et al., 2020). En ninguno de los trabajos se describe el efecto de la sobreexpresión neuronal de las signatotagminas y sinatotagminas extendidas en la mortalidad de las larvas de *D. melanogaster* o si los efectos observados conllevan a la mortalidad neuronal.

9.-Conclusiones.

- Se generó un plásmido que induce la sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp*.
- Los peces que sobreexpresan *mctp2b-gfp* en neuronas tienen tasas de supervivencia menores que los individuos controles.
- El patrón de sobre expresión de *mctp2b-gfp* en neuronas es similar al descrito anteriormente por Duran-Rios, 2019.
- La sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp* se detecta mayormente en neuronas con morfología similar a neuronas Rohon-Bear y motoneuronas primarias.
- Los embriones con sobreexpresión neuronal de *mctp2b-gfp* abundante en la región craneal presentan una mayor tasa de mortalidad y alteraciones en el desarrollo.

10.- Figuras suplementarias.

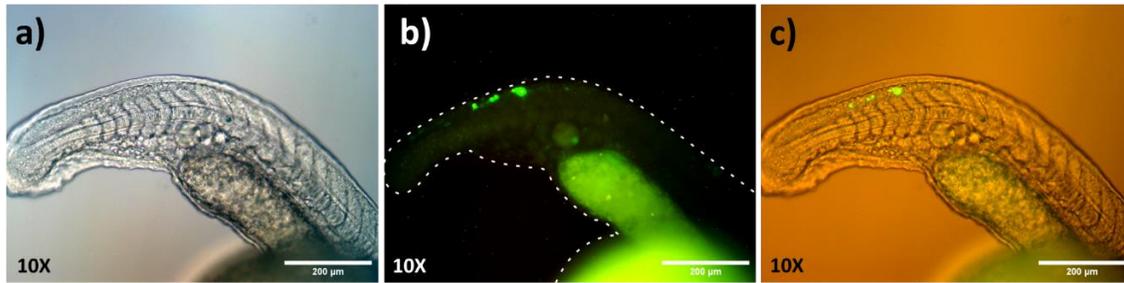


Figura suplementaria 1.- Neuronas morfológicamente similares a neuronas Rohon-Bear en la región posterior de la medula espinal. Se observan neuronas que sobreexpresan *mctp2b-gfp* en un embrión de pez cebra a las 24 hpf con una morfología similar a las neuronas Rohon-Bear en la región posterior de la medula espinal, dicho embrión se microinyectó en el vitelo con la mezcla experimental (pDL1 y ARNm de transposasa con rojo fenol), observadas en con el objetivo 10X. a) Fotografía de campo claro. b) Fotografía con microscopia de epifluorescencia. c) Colocalización de las imágenes anteriores. Escala de 200 µm

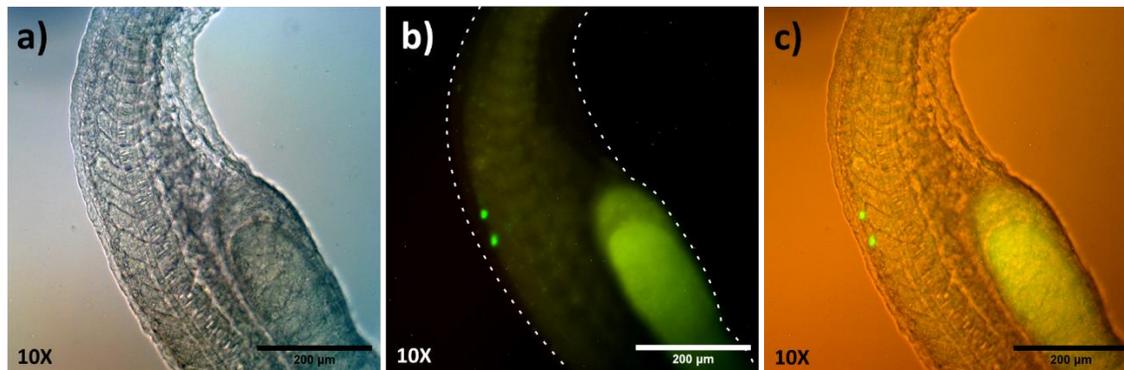


Figura suplementaria 2.- Neuronas morfológicamente similares a neuronas Rohon-Bear en la región media de la medula espinal. Se observan neuronas que sobreexpresan *mctp2b-gfp* en embriones de pez cebra de 24 hpf con una morfología similar a las neuronas Rohon-Bear en la región media de la medula espinal, dicho embrión se microinyectó en el vitelo con la mezcla experimental (pDL1 y ARNm de transposasa con rojo fenol), observada en con el objetivo 10X. a) Fotografía de campo claro. b) Fotografía con microscopia de epifluorescencia. c) Colocalización de las imágenes anteriores. Escala de 200 µm.

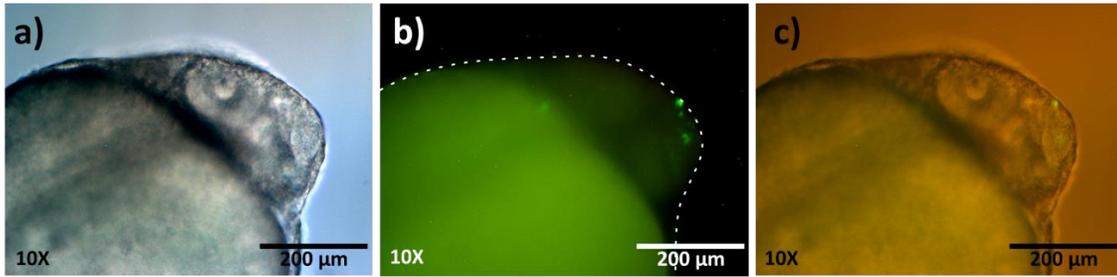


Figura suplementaria 3.- Sobreexpresión de *mctp2b-gfp* en neuronas del telencéfalo de un embrión de pez cebra de 24 hpf. Se observan fotografías de un embrión de 24 hpf que sobreexpresa *mctp2b-gfp* en neuronas del telencéfalo con el objetivo 10X, dicho embrión se microinyectó en el blastomero con la mezcla experimental (pDL1 y ARNm de transposasa con rojo fenol). a) Fotografía de campo claro, b) Fotografía con microscopia de epifluorescencia. c) Colocalización de ambas fotografías. Escala de 200 μm.

11.- Referencias.

- Addgene. (2011). Newsletter Techniques. Retrieved May 2, 2022, from <https://www.addgene.org/newsletter/techniques/#sept2011>
- Alkhouli, M. A. (2021). *The Role of MCTP2 in Health and Disease*. Indiana University.
- Bailone, R. L., Fukushima, H. C. S., Ventura Fernandes, B. H., De Aguiar, L. K., Corrêa, T., Janke, H., ... Borra, R. C. (2020). Zebrafish as an alternative animal model in human and animal vaccination research. *Laboratory Animal Research*, *36*, 1–10.
- Best, J. D., & Alderton, W. K. (2008). Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *4*(3), 567–576. <https://doi.org/10.2147/ndt.s2056>
- Birkholz, D. A., Killian, E. C. O., George, K. M., & Artinger, K. B. (2009). Prdm1a is necessary for posterior pharyngeal arch development in zebrafish. *Developmental Dynamics*, *238*(10), 2575–2587. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dvdy.22090>
- Bozkurt, Y. (2020). Introductory Chapter: Importance of Zebrafish (*Danio rerio*) as Model Organism in Biomedical Research. In *Zebrafish in Biomedical Research*. IntechOpen.
- Chen, C.-Y. A., & Shyu, A.-B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, *20*(11), 465–470. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89102-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89102-1)
- Cho, W., & Stahelin, R. V. (2006). Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1761*(8), 838–849. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.06.014>
- Corbalan-Garcia, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2014). Signaling through C2 domains: More than one lipid target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1838*(6), 1536–1547. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.008>
- Cosker, K. E., & Segal, R. A. (2014). Neuronal Signaling through Endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(2). Retrieved from <http://cshperspectives.cshlp.org/content/6/2/a020669.abstract>
- Database JoVE Science Education. (2023). Biology II: Mouse, Zebrafish, and Chick. Zebrafish Microinjection Techniques.
- Djurovic, S., Le Hellard, S., Kähler, A. K., Jönsson, E. G., Agartz, I., Steen, V. M., ... 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>
- Don, E. K., Formella, I., Badrock, A. P., Hall, T. E., Morsch, M., Hortle, E., ... Cole, N. J. (2016). A Tol2 Gateway-Compatible Toolbox for the Study of the Nervous System and Neurodegenerative Disease. *Zebrafish*, *14*(1), 69–72. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1321>
- Duran-Rios, K. (2019). LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA PROTEÍNA Mctp EN NEURONAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE *Danio rerio*.
- Eisen, J. S., Myers, P. Z., & Westerfield, M. (1986). Pathway selection by growth cones of identified

- motoneurons in live zebra fish embryos. *Nature*, 320(6059), 269–271.
<https://doi.org/10.1038/320269a0>
- Espino-Saldaña, A. E., Durán-Ríosa, K., Olivares-Hernandez, 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*, 738. Retrieved from
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144371>
- Fricke, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., & Brown, G. C. (2018). Neuronal Cell Death. *Physiological Reviews*, 98(2), 813–880. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2017>
- Froese, R., & Binohlan, C. B. (2009). Fishbase. Retrieved from Danio rerio (Hamilton, 1822) website: <https://www.fishbase.se/summary/Danio-rerio.html>
- Genç, Ö., 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, e22904. <https://doi.org/10.7554/eLife.22904>
- Gong, J., Wang, X., Zhu, C., Dong, X., Zhang, Q., Wang, X., ... Liu, D. (2017). Insm1a Regulates Motor Neuron Development in Zebrafish. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00274>
- Guan, Z., Quiñones-Frías, M. C., Akbergenova, Y., & Littleton, J. T. (2020). Drosophila Synaptotagmin 7 negatively regulates synaptic vesicle release and replenishment in a dosage-dependent manner. *ELife*, 9, e55443. <https://doi.org/10.7554/eLife.55443>
- Hansson, M. D., Rzeznicka, K., Rosenbäck, M., Hansson, M., & Sirijovski, N. (2008). PCR-mediated deletion of plasmid DNA. *Analytical Biochemistry*, 375(2), 373–375. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.12.005>
- Hernandez-Huertas, L., Kushawah, G., Diaz-Moscoso, A., Tomas-Gallardo, L., Moreno-Sanchez, I., da Silva Pescador, G., ... Moreno-Mateos, M. A. (2022). Optimized CRISPR-RfxCas13d system for RNA targeting in zebrafish embryos. *STAR Protocols*, 3(1), 101058. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.101058>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Inloes, J. M., Hsu, K.-L., Dix, M. M., Viader, A., Masuda, K., Takei, T., ... Cravatt, B. F. (2014). The hereditary spastic paraplegia-related enzyme DDHD2 is a principal brain triglyceride lipase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(41), 14924–14929. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413706111>
- Islimy, E., Girard, V., & Gould, A. P. (2022). Functions of Stress-Induced Lipid Droplets in the Nervous System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.863907>
- Joshi, A. S., Nebenfuehr, B., Choudhary, V., Satpute-Krishnan, P., Levine, T. P., Golden, A., & Prinz, W. A. (2018). Lipid droplet and peroxisome biogenesis occur at the same ER subdomains. *Nature Communications*, 9(1), 1–12.
- 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>
- Kalyn, M., Hua, K., Mohd Noor, S., Wong, C. E. D., & Ekker, M. (2020). Comprehensive Analysis of Neurotoxin-Induced Ablation of Dopaminergic Neurons in Zebrafish Larvae. *Biomedicines*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/biomedicines8010001>
- Kaslin, J., & Ganz, J. (2020). Chapter 18 - Zebrafish Nervous Systems. In S. C. Cartner, J. S. Eisen, S. C. Farmer, K. J. Guillemin, M. L. Kent, & G. E. Sanders (Eds.), *The Zebrafish in Biomedical Research* (pp. 181–189). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00018-X>
- Kawakami, K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biology*, 8(1), S7. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-s1-s7>
- Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., & Mishina, M. (2004). A Transposon-Mediated Gene Trap Approach Identifies Developmentally Regulated Genes in Zebrafish. *Developmental Cell*, 7(1), 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.06.005>
- Khan, F. R., & Alhewairini, S. S. (2018). Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model Organism. In L. Streba, D. I. Gheonea, & M. Schenker (Eds.), *Current Trends in Cancer Management*.
- Kikuma, K., Li, X., Kim, D., Sutter, D., & Dickman, D. K. (2017). Extended Synaptotagmin Localizes to Presynaptic ER and Promotes Neurotransmission and Synaptic Growth in *Drosophila*. *Genetics*, 207(3), 993–1006. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300261>
- Kim, K. Y., Kim, Y. R., Choi, K. W., Lee, M., Lee, S., Im, W., ... Sung, J.-J. (2020). Downregulated miR-18b-5p triggers apoptosis by inhibition of calcium signaling and neuronal cell differentiation in transgenic SOD1 (G93A) mice and SOD1 (G17S and G86S) ALS patients. *Translational Neurodegeneration*, 9(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00203-4>
- Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B., & Schilling, T. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. Retrieved from https://www.mbl.edu/zebrafish/files/2013/03/Kimmel_stagingseries1.pdf http://www.researchgate.net/profile/Bonnie_Ullmann/publication/227763372_Stages_of_embryonic_development_of_the_zebrafish/links/55352d8b0cf268fd00156437.pdf
- Koga, A., Suzuki, M., Inagaki, H., Bessho, Y., & Hori, H. (1996). Transposable element in fish. *Nature*, 383(6595), 30. <https://doi.org/10.1038/383030a0>
- Kwan, K. M., Fujimoto, E., Grabher, C., Mangum, B. D., Hardy, M. E., Campbell, D. S., ... Chien, C.-B. (2007). The Tol2kit: A multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Developmental Dynamics*, 236(11), 3088–3099. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dvdy.21343>
- Lalani, S. R., Ware, S. M., Wang, X., Zapata, G., Tian, Q., Franco, L. M., ... Belmont, J. W. (2013). MCTP2 is a dosage-sensitive gene required for cardiac outflow tract development. *Human Molecular Genetics*, 22(21), 4339–4348. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt283>
- Liu, Y.-X., Liu, L., Dong, Y., Zhao, M., Sheng, Y., & Fan, L.-L. (2022). Novel heterozygous mutation of MCTP2 gene in a patient with coarctation of the aorta. *QJM: An International Journal of Medicine*, 115(3), 157–159. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcab310>

- Lugo-Leyva, M. D. (2020). *Generación y caracterización de mutantes del gen mctp1a de Danio rerio y análisis bioinformático de sus posibles secuencias promotoras de la transcripción*. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M., & Sugimoto, A. (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current Biology*, *11*(3), 171–176. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00052-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00052-5)
- Ni, S., Zhou, Y., Song, L., Chen, Y., Wang, X., Du, X., & Zhang, S. (2021). ELAVL1a is an immunocompetent protein that protects zebrafish embryos from bacterial infection. *Communications Biology*, *4*(1), 251. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01777-z>
- Ogawa, Y., Kakumoto, K., Yoshida, T., Kuwako, K., Miyazaki, T., Yamaguchi, J., ... Okano, H. J. (2018). Elavl3 is essential for the maintenance of Purkinje neuron axons. *Scientific Reports*, *8*(1), 2722. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21130-5>
- Overhoff, M., De Bruyckere, E., & Kononenko, N. L. (2021). Mechanisms of neuronal survival safeguarded by endocytosis and autophagy. *Journal of Neurochemistry*, *157*(2), 263–296. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jnc.15194>
- Park, H.-C., Hong, S.-K., Kim, H.-S., Kim, S.-H., Yoon, E.-J., Kim, C.-H., ... Huh, T.-L. (2000). Structural comparison of zebrafish Elav/Hu and their differential expressions during neurogenesis. *Neuroscience Letters*, *279*(2), 81–84. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00940-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00940-4)
- Park, H.-C., Kim, C.-H., Bae, Y.-K., Yeo, S.-Y., Kim, S.-H., Hong, S.-K., ... Huh, T.-L. (2000). Analysis of Upstream Elements in the HuC Promoter Leads to the Establishment of Transgenic Zebrafish with Fluorescent Neurons. *Developmental Biology*, *227*(2), 279–293. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9898>
- Pérez-Cortés, F. (2021). *Sobre expresión de los genes mctp de Danio rerio y su función como sensores neuronales de calcio*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Plooster, M., Rossi, G., Farrell, M. S., McAfee, J. C., Bell, J. L., Ye, M., ... Brennwald, P. (2021). Schizophrenia-Linked Protein tSNARE1 Regulates Endosomal Trafficking in Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *41*(45), 9466 LP – 9481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0556-21.2021>
- 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>
- Rainier, S., Bui, M., Mark, E., Thomas, D., Tokarz, D., Ming, L., ... Fink, J. K. (2008). Neuropathy Target Esterase Gene Mutations Cause Motor Neuron Disease. *The American Journal of Human Genetics*, *82*(3), 780–785. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.12.018>
- Ralhan, I., Chang, C.-L., Lippincott-Schwartz, J., & Ioannou, M. S. (2021). Lipid droplets in the nervous system. *Journal of Cell Biology*, *220*(7), e202102136. <https://doi.org/10.1083/jcb.202102136>
- Repnik, U., Česen, M. H., & Turk, B. (2013). The Endolysosomal System in Cell Death and Survival. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008755>

- Rocha, M., Singh, N., Ahsan, K., Beiriger, A., & Prince, V. E. (2020). Neural crest development: insights from the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 249(1), 88–111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dvdy.122>
- Rossi, C. C., Kaji, T., & Artinger, K. B. (2009). Transcriptional control of Rohon-Beard sensory neuron development at the neural plate border. *Developmental Dynamics*, 238(10), spcone-spcone. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dvdy.22128>
- Ryder, P. V., & Faundez, V. (2009). Schizophrenia: The “BLOC” May Be in the Endosomes. *Science Signaling*, 2(93), pe66–pe66. <https://doi.org/10.1126/scisignal.293pe66>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Scott, L. J., Muglia, P., Kong, X. Q., Guan, W., Flickinger, M., Upmanyu, 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., Han, W., Wang, Y., & Südhof, T. C. (2005). Evolutionarily Conserved Multiple C2 Domain Proteins with Two Transmembrane Regions (MCTPs) and Unusual Ca²⁺ Binding Properties. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1641–1651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407305200>
- Sztal, T. E., Ruparella, A. A., Williams, C., & Bryson-Richardson, R. J. (2016). Using Touch-evoked Response and Locomotion Assays to Assess Muscle Performance and Function in Zebrafish. *JoVE*, (116), e54431. <https://doi.org/doi:10.3791/54431>
- Tarchini, B., Longo-Guess, C., Tian, C., Tadenev, A. L. D., Devanney, N., & Johnson, K. R. (2018). A spontaneous mouse deletion in *Mctp1* uncovers a long-range cis-regulatory region crucial for NR2F1 function during inner ear development. *Developmental Biology*, 443(2), 153–164.
- Téllez-Arreola, J. L., Silva, M., & Martínez-Torres, A. (2020). MCTP-1 modulates neurotransmitter release in *C. elegans*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 107, 103528.
- Theisen, U., Hennig, C., Ring, T., Schnabel, R., & Köster, R. W. (2018). Neurotransmitter-mediated activity spatially controls neuronal migration in the zebrafish cerebellum. *PLOS Biology*, 16(1), 1–33. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002226>
- Thermo scientific. (2012). *Self-circularization of Linear DNA*. Retrieved from https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013192_Selof_Linear_DNA_UG.pdf
- Thermo scientific. (2019). *Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit*.
- Thurtle-Schmidt, D. M., & Lo, T.-W. (2018). Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education: A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 46(2), 195–205. <https://doi.org/10.1002/bmb.21108>
- Tovilla-Loza, F. I. (2020). *Respuesta del mutante del gen mctp-1 de Caenorhabditis elegans al estímulo optogenético de sus neuronas colinérgicas*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Tunstall, N. E., Herr, A., de Bruyne, M., & Warr, C. G. (2012). A screen for genes expressed in the olfactory organs of *Drosophila melanogaster* identifies genes involved in olfactory behaviour.

PLoS One, 7(4), e35641.

- Valadez-Rodriguez, R. Y. (2021). *Generacion de mutantes del gen mctp2a de Danio rerio por CRISPR/Cas9 y su caracterizacion molecular y fenotipica*. Tecnologico Nacional de Mexico campus Celaya.
- Wang, C., Telpoukhovskaia, M. A., Bahr, B. A., Chen, X., & Gan, L. (2018). Endo-lysosomal dysfunction: a converging mechanism in neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurobiology*, 48, 52–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.09.005>
- Wang, Q.-W., Wang, Y.-H., Wang, B., Chen, Y., Lu, S.-Y., & Yao, J. (2021). Synaptotagmin-7-mediated activation of spontaneous NMDAR currents is disrupted in bipolar disorder susceptibility variants. *PLOS Biology*, 19(7), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001323>
- Warga, R. M., & Kimmel, C. B. (1990). Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development*, 108(4), 569–580. <https://doi.org/10.1242/dev.108.4.569>
- Welte, M. A. (2015). Expanding Roles for Lipid Droplets. *Current Biology*, 25(11), R470–R481. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.004>
- White, R. J., Collins, J. E., Sealy, I. M., Wali, N., Dooley, C. M., Digby, Z., ... Busch-Nentwich, E. M. (2017). A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *ELife*, 6, e30860. <https://doi.org/10.7554/elife.30860>
- Williams, K., & Ribera, A. B. (2020). Long-lived zebrafish Rohon-Beard cells. *Developmental Biology*, 464(1), 45–52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.05.003>
- Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F. M., & Martinez, E. (2007). Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene*, 389(1), 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.09.029>
- Zang, L., Maddison, L. A., & Chen, W. (2018). Zebrafish as a Model for Obesity and Diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 91. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00091>

12.- Anexos

Anexo 1. Proyecto de estancia de investigación en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo- Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España.

Silenciamiento de *mctp2b* durante las primeras etapas del desarrollo utilizando la técnica CRISPR-Cas13d.

Introducción.

Actualmente se tiene poca información sobre las funciones específicas de las proteínas MCTP. Estas proteínas poseen tres dominios C2 hacia el lado del citosol capaces de coordinar dos o tres iones de calcio y dos regiones transmembranales que sirven para anclar la proteína a la membrana de distintos organelos (Shin et al., 2005). Mutaciones dirigidas al gen *mctp2b* del pez cebra (*Danio rerio*) usando el sistema CRISPR-Cas9 causan una mortalidad del 100% en los primeros dos días post-fertilización (dpf), mientras que a las 24 horas post-fertilización (hpf) se observa que el 29% de los individuos presentan diversas alteraciones en el desarrollo embrionario, lo cual nos indica que *mctp2b* tiene un papel importante en las primeras etapas del desarrollo. Por otra parte, se han detectado mediante hibridación *in situ* niveles moderados de mRNA del gen *mctp2b* en el estadio de una sola célula (0 hpf), lo que nos indica que *mctp2b* podría jugar un rol importante en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Espino-Saldaña et al., 2020). Este mRNA es de origen materno, debido a que la activación del genoma cigótico ocurre alrededor de las 3 hpf (Gilbert, 2014; Laue et al., 2019), es por ello por lo que este proyecto tuvo como objetivo utilizar el sistema CRISPR-Cas13d para la eliminación del ARNm materno de *mctp2b* en embriones de pez cebra y observar su efecto en las primeras divisiones embrionarias. Se estableció una colaboración con el Dr. Miguel A. Moreno-Mateos debido a que él junto con su equipo han sido pioneros en el desarrollo de dicha técnica, la cual han demostrado que es eficiente para la eliminación del ARNm de origen materno durante las primeras etapas del desarrollo en pez cebra (Kushawah et al., 2020).

Materiales y métodos.

Diseño de ARNg CRISPR-RfxCas13.

Se diseñaron ARNg para CRISPR-Cas13d para los cuatro genes *mctp* con el propósito de utilizar los genes *mctp1a*, *mctp2a* y *mctp1b* como controles. Los ARNg se diseñaron siguiendo el protocolo de Huertas-Hernández y colaboradores 2022, el cual se basa en la accesibilidad del ARNg al sitio diana del gen. Para encontrar la región más accesible para CRISPR-Cas13d se usó el *software RNAfold*, el cual indica la probabilidad de plegamiento del ARNm y muestra las zonas con menos probabilidad de plegamiento en color azul y las que tienen mayor probabilidad en rojo, se seleccionaron 4 protoespaciadores de 22 a 23 pb con índices de mayor accesibilidad (verdes - azules) para cada gen (Hernandez-Huertas et al., 2022).

Síntesis de ARNg.

Los ARNg se sintetizaron a partir de un oligonucleótido de ADN con la secuencia diana. Se realizó una PCR utilizando 2.5 μ L de oligonucleótido universal 5'-TAATACGACTCACTATAGGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAAAC-3', 2.5 μ L de oligonucleótidos específicos sintetizados con la secuencia diana, 0.5 μ L de dNTP, 5 μ L de búfer Q5 5X, 0.25 μ L de ADN polimerasa de alta fidelidad Q5 y 14.25 μ L de H₂O libre de DNasa/RNasa. La PCR se realizó con una

temperatura inicial de 98 °C durante 30 segundos, luego 30 ciclos con una desnaturalización de 98 °C durante 10 segundos, una alineación de 60 °C durante 30 segundos y una extensión de 72 °C durante 30 segundos, por último, una extensión de 72 °C durante dos minutos. Una vez terminada la PCR se comprobó que ocurrió la amplificación mediante una electroforesis y se purificó la banda del gel (Hernandez-Huertas et al., 2022).

Posterior a la purificación de la PCR se realizó una reacción de transcripción *in vitro* utilizando el kit *AmpliScribe T7 Flash Transcription* (Epicentre, Lucigen # ASF3257). La reacción se montó utilizando 6.3 µL de templado de ADN (resultado de PCR ya purificado), 1.8 µL de ATP (100 mM), 1.8 µL CTP (100 mM), 1.8 µL GTP (100 mM), 1.8 µL UTP (100 mM), 2 µL DTT (100mM), 2 µL Búfer de reacción *AmpliScribe-T7 Flash 10X*, 0.5 µL Inhibidor de ARNas *RiboGuard*, 2 µL Enzima *AmpliScribe T7-Flash*, se incubó a 37 °C durante 12 horas y posteriormente se agregó 1 µL de *TURBO DNase (2 U/µL)*, y por último se incubó a 37 °C por 20 minutos. Una vez terminada la transcripción *in vitro* se purificó mediante precipitación con alcohol (Hernandez-Huertas et al., 2022).

Microinyección de embriones.

Los embriones se microinyectaron utilizando el protocolo de Hernández-Huertas y colaboradores 2022. Una noche antes de microinyectar se separaron 10 hembras y 10 machos, posteriormente en la mañana se quitó el separador y esperamos a que se reproduzcan, tomamos los embriones y los lavamos cuidadosamente con medio E3. Para decoroionar los embriones se utilizó pronasa a 1 mg/ml en medio E3 y se incubó durante dos minutos, posteriormente se lavó cuidadosamente durante 10 minutos (cinco – siete lavados). Los embriones se colocaron en una caja de microinyección con mucho cuidado utilizando una pipeta Pasteur de vidrio. Los embriones se microinyectaron en el estadio de una célula con la mezcla de Cas13d (3 ng/µL) y ARNg (300 – 900 ng/µL). Posteriormente se pasaron los embriones microinyectados con cuidado a una caja Petri con una cama de agarosa al 1% y medio E3.

Observación de fenotipos.

Se observaron y clasificaron los fenotipos a las 6 horas post-fertilización (hpf), se clasificaron en: epibolia al 30% (4.7 hpf), epibolia 50% (5.3 hpf), anillo de gemación (*gem ring*, 5.7 hpf), escudo (*shield*, 6 hpf) (Kimmel et al., 1995). A las 24 hpf se observaron los fenotipos y se clasificaron en aquellos que tienen desarrollo normal y aquellos que presentan deformaciones.

qPCR.

Se realizó una qPCR para cuantificar la expresión de *mctp2b* en embriones controles microinyectados únicamente con la proteína Cas13d y la mezcla de la proteína Cas13d y los ARNg para el gen *mctp2b* siguiendo el protocolo de Kushawah y colaboradores 2020.

Resultados.

Se realizaron cuatro microinyecciones con cada una de las mezclas para los cuatro genes *mctp* (*mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a*, *mctp2b*), cada mezcla de microinyección contenía cuatro ARNg para cada gen, además se microinyectó una mezcla con cuatro ARNg que bloquean la traducción del gen *tbxta* produciendo un fenotipo sin cola (no tail), se microinyectó la enzima Cas13d sin ARNg y se dejaron embriones sin microinyectar (NI) como controles.

Se cuantificó la supervivencia de los embriones a las 24 hpf encontrando que los embriones a los que se les bloqueó la traducción del gen *mctp2b* en las primeras horas de desarrollo presentaban en promedio una tasa de supervivencia del 0.34 (Figura 1) con diferencias significativa comparada con los individuos controles (P= 0.0002) según la prueba de *Kruskal - Wallis*.

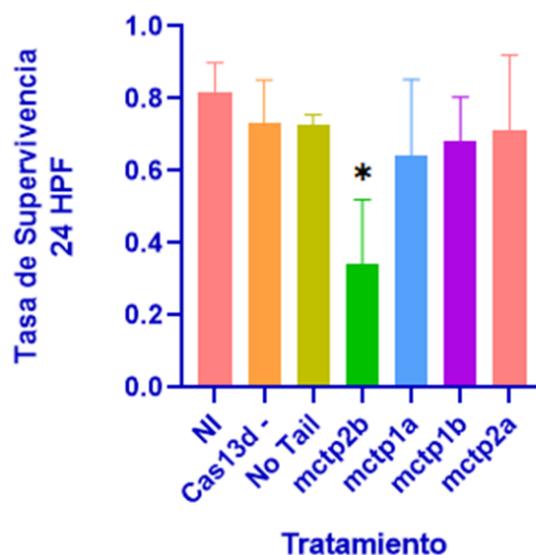


Figura 1.- Supervivencia a las 24 hpf: Se muestran los valores de supervivencia de los embriones a las 24 hpf, se observa que los individuos a los cuales se les bloqueó la traducción de *mctp2b* en las primeras etapas del desarrollo presentan una tasa de supervivencia menor que los individuos controles, P= 0.0002. NI: No microinyectado, Cas13d-: Microinyectado con la enzima Cas13d sin ARNg, No Tail: Individuos microinyectados con la enzima Cas13d y cuatro ANRg para el gen *tbxta*.

Se observaron los fenotipos a las 6 hpf, encontrando que el 70% de los individuos a los que se les eliminó el ARNm de *mctp2b* presentaban un retraso de aproximadamente una hora con 15 minutos, mientras que los individuos controles no presentaban un retraso significativo en el desarrollo (Figura 2). Esto nos indica que el gen *mctp2b* tiene una actividad importante en el desarrollo en las primeras 6 hpf.

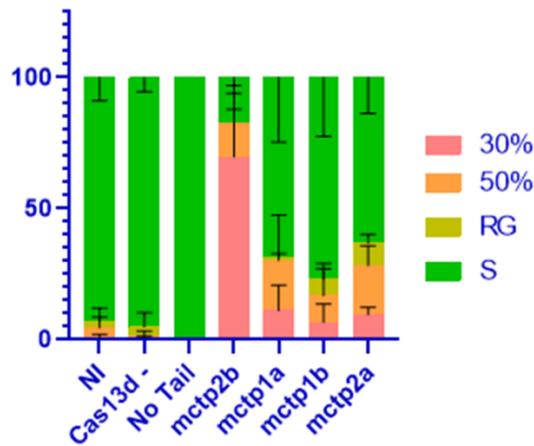


Figura 2.- Fenotipos a las 6 hpf: Se muestran los porcentajes de los fenotipos a las 6 hpf, nótese que a los individuos a los que se les bloqueó la traducción temprana del gen *mctp2b* presenta un porcentaje mayor de individuos en epibolia al 30%, fenotipo característico de las 4.7 hpf. NI: No microinyectado, Cas13d-: Microinyectado con la enzima Cas13d sin ARNg, No Tail: Individuos microinyectados con la enzima Cas13d y cuatro ANRsg para el gen *tbxta*. 30%: epibolia al 30% (4.7 hpf), 50%: epibolia 50% (5.3 hpf), RG: anillo de gemación (5.7 hpf), S: escudo (6 hpf),

Se observó que los individuos en los que se bloqueó la traducción del gen *mctp2b* presentan un porcentaje mayor de individuos con malformaciones comparado con los individuos controles ($P < 0.0001$) (Figura 3). Esto nos indica que la falta de *mctp2b* en las etapas tempranas del desarrollo conlleva a malformaciones generales en el embrión a las 24 hpf.

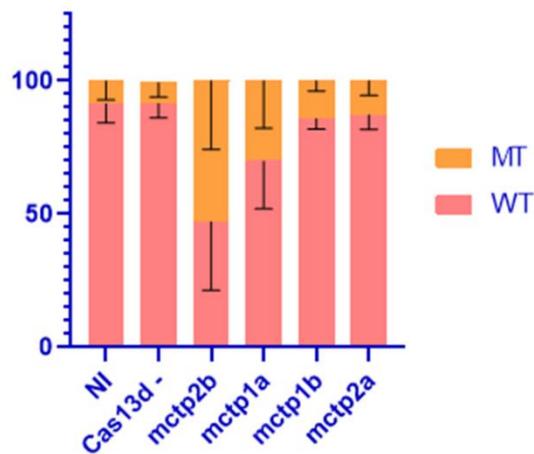


Figura 3.- Fenotipos a las 24 hpf: Se muestra la cuantificación de los fenotipos a las 24 hpf, obsérvese que en los individuos a los que se les bloqueó la traducción de *mctp2b* en etapas tempranas del desarrollo presentan un mayor porcentaje de individuos con malformaciones comparado con los demás grupos experimentales. NI: No microinyectado, Cas13d-: Microinyectado con la enzima Cas13d sin ARNg, No Tail: Individuos microinyectados con la enzima Cas13d y cuatro ANRsg para el gen *tbxta*, MT: Individuos con malformaciones, WT: Individuos sin malformaciones.

Se comprobó la eliminación del ARNm del gen *mctp2b* mediante una qPCR, se realizó una qPCR a embriones de 6 hpf que fueron microinyectados únicamente con la enzima Cas13d y a los embriones que se les bloqueó la traducción de *mctp2b* y presentaban retraso en el desarrollo, encontrando que efectivamente la cantidad de ARNm de *mctp2b* estaba severamente reducida en dichos individuos (Figura 4).

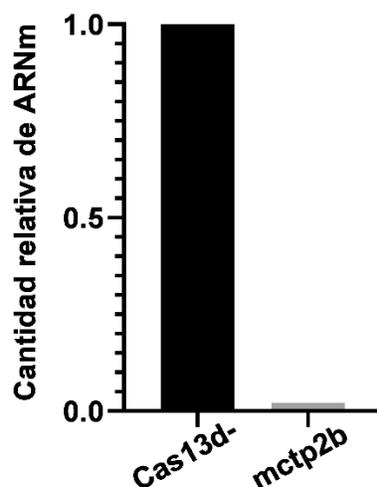


Figura 4.- Cuantificación de ARNm del gen *mctp2b* a las 6 hpf. Se muestran los niveles de expresión de *mctp2b* mediante la realización de una qPCR.

Discusión.

En este trabajo reportamos que al bloquear la traducción del gen *mctp2b* mediante la técnica de CRISPR-Cas13d en embriones de pez cebra, estos muestran un retraso en el desarrollo a las 6 hpf, una alta mortalidad y diversas malformaciones a las 24 hpf, mientras que los embriones a los que se les bloqueó la traducción del gen *mctp1a*, *mctp2a* y *mctp1b* no presentaron alteraciones. Anteriormente se había reportado que los mutantes para el gen *mctp2b* generados mediante CRISPR-Cas9 presentan alteraciones diversas en el desarrollo embrionario y una alta mortalidad a las 24 hpf, mientras que los mutantes para los genes *mctp1a*, *mctp2a* y *mctp1b* no muestran alteraciones y tampoco una alta mortalidad (Espino-Saldaña et al., 2020; Lugo-Leyva, 2020; Valadez-Rodriguez, 2021). A su vez, el análisis de las posibles regiones promotoras para los cuatro genes *mctp* encontró que el gen *mctp2b* carece de caja TATA, característica de un gen constitutivo (Lugo-Leyva, 2020; Yang et al., 2007). Por otro lado, al consultar los valores de expresión en la base de datos “*Expression Atlas*”, encontramos que el gen *mctp2b*, a diferencia de los otros genes *mctp*, es el que tiene una mayor cantidad de transcritos en las primeras etapas del desarrollo (Figura 5) (White et al., 2017). En conjunto estos resultados nos indican que de los cuatro genes *mctp* el gen *mctp2b* es el que tiene una función más relevante en el pez cebra.

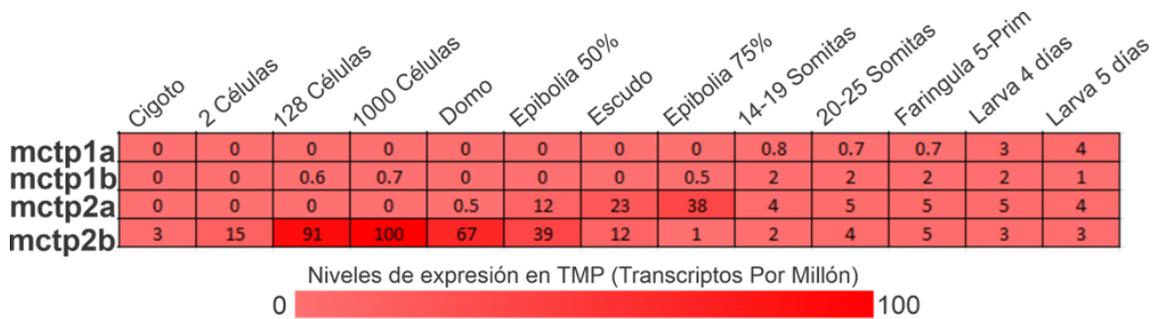


Figura 5.- Niveles de expresión de los genes *mctp*: Se observan los niveles de expresión en Transcriptos por millón de los cuatro genes *mctp* en distintas etapas del desarrollo de pez cebra (White et al., 2017).

A las cuatro hpf comienza la epibolia en los embriones de pez cebra, en dicho proceso las células comienzan a migrar y a reorganizarse para formar las capas germinales del embrión (Warga & Kimmel, 1990). Anteriormente se ha sugerido que las proteínas MCTP podrían participar en la migración celular (Qiu et al., 2015), el hecho de que el proceso de epibolia se vea afectado al bloquear la traducción de *mctp2b* nos indica que dicho gen podría jugar un rol importante en la migración celular durante la epibolia.

Agradecimientos.

Mis más sinceras gratitudes al Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz por motivarme a realizar esta estancia y al Dr. Miguel Ángel Moreno Mateos y los miembros de su laboratorio por recibirme como un miembro más del equipo y apoyarme en la realización de esta estancia.

Bibliografía.

- Espino-Saldaña, A. E., Durán-Ríosa, K., Olivares-Hernandez, 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*, 738. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144371>
- Hernandez-Huertas, L., Kushawah, G., Diaz-Moscoco, A., Tomas-Gallardo, L., Moreno-Sanchez, I., da Silva Pescador, G., ... Moreno-Mateos, M. A. (2022). Optimized CRISPR-RfxCas13d system for RNA targeting in zebrafish embryos. *STAR Protocols*, 3(1), 101058. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.101058>
- Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B., & Schilling, T. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. Retrieved from https://www.mbl.edu/zebrafish/files/2013/03/Kimmel_stagingseries1.pdf%0Ahttp://www.researchgate.net/profile/Bonnie_Ullmann/publication/227763372_Stages_of_embryonic_development_of_the_zebrafish/links/55352d8b0cf268fd00156437.pdf
- Lugo-Leyva, M. D. (2020). *Generación y caracterización de mutantes del gen mctp1a de Danio rerio y análisis bioinformático de sus posibles secuencias promotoras de la transcripción*. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- 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>

- Shin, O.-H., Han, W., Wang, Y., & Südhof, T. C. (2005). Evolutionarily Conserved Multiple C2 Domain Proteins with Two Transmembrane Regions (MCTPs) and Unusual Ca²⁺ Binding Properties. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1641–1651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407305200>
- Valadez-Rodriguez, R. Y. (2021). *Generacion de mutantes del gen mctp2a de Danio rerio por CRISPR/Cas9 y su caracterizacion molecular y fenotipica*. Tecnologico Nacional de Mexico campus Celaya.
- Warga, R. M., & Kimmel, C. B. (1990). Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development*, 108(4), 569–580. <https://doi.org/10.1242/dev.108.4.569>
- White, R. J., Collins, J. E., Sealy, I. M., Wali, N., Dooley, C. M., Digby, Z., ... Busch-Nentwich, E. M. (2017). A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *ELife*, 6, e30860. <https://doi.org/10.7554/elife.30860>
- Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F. M., & Martinez, E. (2007). Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene*, 389(1), 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.09.029>