



La proteína Higd1a en el desarrollo del pez cebra: puesta a punto de un modelo de pérdida de función

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Subárea Biología Celular y Molecular

PEDECIBA

Ileana Sosa Redaelli

Orientador: Dra. Gabriela Bedó

Co-orientador: Dr. Flavio Zolessi

Montevideo, 2019



RESUMEN

El gen *higd1a* (hypoxia-induced gene 1a) codifica para una proteína pequeña de la membrana mitocondrial interna, cuya presencia ha sido descrita en varias especies y tipos celulares. Existen referencias de su participación en procesos de diferenciación, y en procesos patológicos principalmente asociados a hipoxia y estrés metabólico severo. Las evidencias recabadas hasta el momento indican que la proteína posee un rol anti-apoptótico y de incremento de la viabilidad celular, que es mediado por inhibición de la liberación de citocromo C, y de la consecuente activación de la vía de las caspasas. También se ha relacionado su función al mantenimiento de la homeostasis mitocondrial, reportándose que interacciona con otras proteínas mitocondriales, incluidos componentes de la cadena respiratoria.

En nuestro laboratorio, se ha abordado el análisis de la expresión y función de *higd1a* durante el desarrollo, tanto en ratas como en el pez cebra. En este último, se comenzaron a llevar a cabo ensayos de *knockdown* de la proteína utilizando oligómeros de morfolino. Los resultados preliminares evidenciaron alteraciones anatómicas y un aumento de muerte celular. Sin embargo, las altas dosis de inyección requeridas y la pobre reproducibilidad de los experimentos revelaron la necesidad de obtener un modelo más robusto de pérdida de función.

En el presente trabajo, nos propusimos profundizar en la caracterización de la expresión y función del gen *higd1a* durante el desarrollo del pez cebra. En este sentido, se confirmó la presencia de proteína Higd1a a lo largo de la embriogénesis, con niveles especialmente elevados entre las 24 y las 48 horas post-fecundación. Para el estudio de la función, se diseñó y puso a punto el uso de la metodología de edición genómica CRISPR/Cas9, con la cual establecer una línea *knockout* para *higd1a*. Como resultado de la implementación de esta técnica, se generaron dos líneas de peces portadoras de mutaciones distintas, ambas afectando la correcta traducción de la proteína Higd1a. El análisis preliminar de su fenotipo reveló leves alteraciones en la actividad locomotora de los individuos mutantes, así como una mayor tolerancia frente a la depleción de oxígeno. También se evidenciaron mayores niveles basales de histona H2AX fosforilada en las líneas mutantes, indicio de un incremento de daño en el ADN. Contrastando con lo observado tras el *knockdown* con morfolino, no se encontraron alteraciones notorias en el desarrollo de los cartílagos cefálicos en los individuos mutantes. Adicionalmente, las características fenotípicas de las dos líneas no resultaron idénticas. En conjunto, estas discrepancias podrían sugerir una activación diferencial de mecanismos compensatorios de la función de la proteína Higd1a en las líneas mutantes generadas.

Consideramos que el establecimiento de ambas líneas *knockout* constituye una valiosa herramienta para explorar las interrogantes aún pendientes respecto al rol de *higd1a*, en particular, permitiendo aportar evidencias *in vivo* en el contexto del desarrollo embrionario.

Contenidos

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	4
I.I- Identificación de Higd1a	4
I.II- La familia de proteínas HIG	4
I.III- Expresión de isoformas de la familia HIG	5
I.IV- Expresión de Higd1a y su regulación	6
I.V- Expresión de Higd1a en el Sistema Nervioso.....	7
I.VI- HIGD1A y la función mitocondrial	9
I.VII- Higd1a en el pez cebra.....	11
I.VIII- El uso del pez cebra para el estudio de eventos del desarrollo	14
I.IX- El pez cebra y la manipulación de la expresión génica	15
II. JUSTIFICACIÓN & OBJETIVOS	17
III. MATERIALES & MÉTODOS	18
III.I- Mantenimiento de animales y obtención de embriones.....	18
III.II- Ensayos de knockdown con Morfolino	18
III.III- Generación de la línea knockout.....	19
III.III.I- Diseño y síntesis de sgRNAs	19
III.III.II- Microinyección del Sistema CRISPR/Cas9.....	20
III.III.III- Detección de individuos mutantes	20
III.IV- Extracción de proteínas	21
III.V- Electroforesis & Western Blot	22
III.VI- Inmunofluorescencia	23
III.VII- Marcaje retrógrado de neuronas retículo-espinales.....	24
III.VIII- Tinción de cartílagos cráneo-faciales.....	25
III.IX- Pruebas comportamentales.....	25
III.X- Ensayos de hipoxia	25
III.XI- Extracciones de ARN y RT-PCR cuantitativa.....	26
III.XII- Imágenes.....	27
III.XIII- Análisis estadísticos	27
IV. RESULTADOS	29
IV.I- Expresión temprana de genes de la familia hig en el desarrollo del pez cebra.....	29
IV.II- Expresión de la proteína Higd1a a lo largo del desarrollo del pez cebra	30
IV.II.I- Diseño y caracterización del anticuerpo anti-Higd1a	30

IV.II.II- Perfil temporal de expresión de la proteína Higd1a.....	31
IV.II.III- Patrón espacial detectado con el anticuerpo anti-Higd1a	32
IV.III- Generación y caracterización de líneas knockout para higd1a	36
IV.III.I- Establecimiento de una línea knockout para higd1a.....	37
IV.III.II- Inmunodetección de la proteína Higd1a en líneas knockout y en animales knockdown	41
IV.IV- Análisis preliminar del fenotipo mutante.....	42
IV.IV.I- Efectos del knockout de higd1a sobre la capacidad motora.....	43
IV.IV.II- Efectos del knockout de higd1a sobre el desarrollo de cartílagos cráneo-faciales....	45
IV.IV.III- higd1a en respuesta a bajos niveles de oxígeno	47
IV.IV.IV- Expresión diferencial de γ -H2AX en las líneas mutantes para higd1a	50
V. DISCUSIÓN	51
V.I- El patrón de expresión de Higd1a, ROS y su relación con eventos del desarrollo	51
V.II- Aportes a la regulación de la expresión de higd1a.....	55
V.III- Obtención de la línea mutante para higd1a	58
V.IV- Análisis preliminar del fenotipo en líneas mutantes para higd1a.....	60
V.V- Discrepancias fenotípicas y compensación genética	65
VI. CONCLUSIONES & PERSPECTIVAS.....	68
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	71
VIII. ANEXOS.....	81

I. INTRODUCCIÓN

1.1- Identificación de *Higd1a*

HIG-1 (Hypoxia-induced gene 1) es una pequeña proteína de aproximadamente 11 kDa, situada en la membrana mitocondrial interna, cuya expresión ha sido reportada en diversas especies y diferentes tipos celulares. Denko y colaboradores fueron los primeros en identificar la proteína en células cervicales de ratón y en células humanas, por su expresión inducida frente a hipoxia y a cambios en la concentración de glucosa (Denko et al., 2000). Más tarde, en la medida en que se fue describiendo una familia de proteínas relacionadas, este gen fue más específicamente denominado como *Higd1a* (Hypoxia inducible domain family member 1A). En este punto vale la pena aclarar que a lo largo del trabajo se adoptará la nomenclatura propuesta en <http://www.ssr.org/NomenBullets>: cuando se trate de las especies de rata o ratón, nos referiremos al gen como *Higd1a* y a la proteína como HIGD1A; cuando se hable de humanos, *HIGD1A* y HIGD1A para gen y proteína respectivamente; y cuando se trate del pez cebra, se referirá como *higd1a* al gen y como Higd1a a la proteína.

En nuestro laboratorio, examinando cambios en la expresión génica en el Sistema Nervioso Central (SNC) de ratas durante el período peri y post-natal temprano, se identificó una secuencia aún no reportada en ratas (Bedó et al., 2005), homóloga a la descrita por Denko y colaboradores. Poco más tarde, otro grupo describió en células pancreáticas murinas el gen que codifica para HIMP1 (hypoglycemia/hypoxia inducible mitochondrial protein 1), reconocido en ese momento como homólogo de *hig-1* y más tarde establecido como sinónimo de *Higd1a*. Los investigadores demostraron que HIMP1 se localiza en la membrana de las crestas mitocondriales, y su estructura consiste en dos hélices hidrofóbicas que forman un *loop* a través de la membrana, con ambos extremos N- y C-terminal hacia el espacio intermembrana (Fig. 1.A; Wang et al., 2006).

1.11- La familia de proteínas HIG

A partir de las primeras descripciones, se identificaron por comparación de secuencia homólogos de *Higd1a* en diversas especies, e incluso en varias de ellas se han hallado múltiples isoformas de la proteína. De este modo fue definiéndose una familia de proteínas con un dominio Hig1, que se encuentra evolutivamente muy conservada, con miembros que van desde las alfa-proteobacterias hasta diversos taxones eucariontes, incluyendo hongos, plantas, peces, mamíferos, entre otros (Strogolova et al., 2012).

La familia Hig ha sido subdividida en dos grupos cercanamente relacionados: Hig tipo 1 y Hig tipo 2. Los integrantes del tipo 1 serían susceptibles a la regulación por hipoxia y otras condiciones de estrés, y su presencia estaría restringida a eucariotas superiores. Por el contrario, los

miembros del tipo 2 representarían isoformas expresadas constitutivamente y tendrían una distribución más universal. La clasificación en ambos grupos se basa en la presencia del motivo conservado (Q/I)X3(R/H)XRX3Q (abreviado QRRQ), característico de Hig tipo 2; en la Figura 1.B se muestra la posición de dicho motivo respecto al dominio conservado Hig, y alineamientos parciales que ejemplifican su presencia en proteínas de levaduras, mamíferos y proteobacterias. Por otro lado, los integrantes del tipo 1 poseen una versión modificada de esta secuencia, por ejemplo HIGD1A en los mamíferos presenta en su lugar el motivo (I/V/L)HLIHMRX3Q (Garlich et al., 2017).

La estructura completa para las isoformas HIGD1A y HIGD1B humanas fue resuelta hace unos años por espectroscopía NMR (Fig. 1.C). En aquel trabajo, Klammt y colaboradores caracterizaron estructuralmente una serie de proteínas integrales de membrana, en vista de su potencial importancia para la industria farmacéutica, ya que alrededor de la mitad de las principales drogas desarrolladas tienen como blanco este tipo de proteínas. En concordancia con descripciones previas, los dominios conservados transmembrana presentaron una estructura helicoidal laxa (*loosely packed*), con contactos de Van der Waals inter-hélice relativamente escasos y cercanos a los extremos. En ambas isoformas, la primera región transmembrana es precedida por una pequeña hélice N-terminal anfifílica (Klammt et al., 2012).

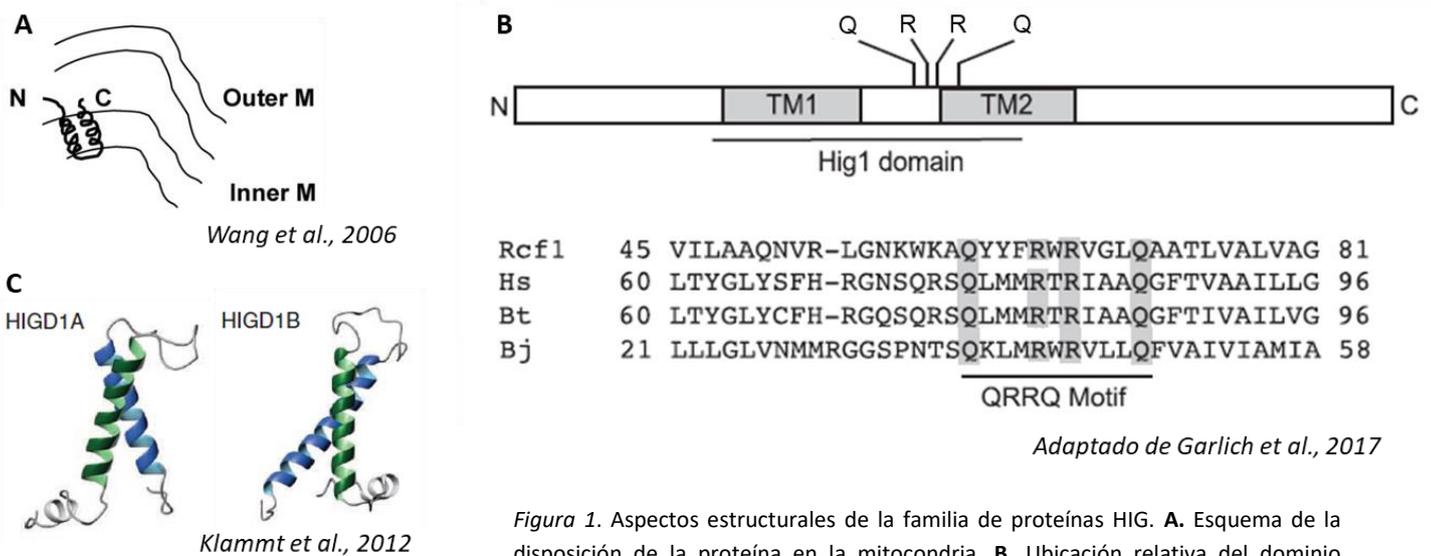


Figura 1. Aspectos estructurales de la familia de proteínas HIG. **A.** Esquema de la disposición de la proteína en la mitocondria. **B.** Ubicación relativa del dominio conservado Hig, de los dominios transmembrana (TM1 y TM2) y del motivo QRRQ característico las proteínas Hig tipo 2. Abajo se ejemplifica la presencia de dicho motivo en la proteína Rcf1 de *Saccharomyces cerevisiae*, en las proteínas HIGD2A humana (Hs) y bovina (Bt), y en una proteína homóloga de *Bradyrhizobium japonicum* (Bj). **C.** Estructura de las proteínas humanas HIGD1A y HIGD1B resueltas por NMR.

1.III- Expresión de isoformas de la familia HIG

Los primeros trabajos que abordaron el estudio de proteínas de la familia Hig lo hicieron en modelos murinos. Una de las investigaciones describió la expresión de dos variantes de *splicing* de *Higd1a*, HIMP1-a y HIMP1-b, en embriones E10-12 y en varios órganos adultos. Examinando

los islotes pancreáticos, los autores observaron que estas proteínas se expresan predominantemente en células α , pero no en células β . Sin embargo, cuando expresaban ectópicamente HIMP1-a en cultivos de células β -pancreáticas, se constataba un aumento de la viabilidad celular y de protección contra la apoptosis frente a la exposición a hipoxia o a variaciones en la concentración de glucosa del medio (Wang et al., 2006). Más tarde, An y colaboradores reportaron que *Higd1a* y *Higd2a* son las formas mayoritarias en varios tejidos de ratón, especialmente en tejido cardíaco y renal, y *Higd1a* también presenta altos niveles en el cerebro. Por otro lado, las formas *Higd1b* y *Higd1c*, si bien están presentes en todos los tejidos examinados, muestran una expresión francamente menor. Asimismo, ese estudio puso de manifiesto que el factor inducible por hipoxia HIF1 es capaz de inducir la expresión de *Higd1a* en cultivos de macrófagos, y que dicha activación ocurre a través de un elemento canónico de respuesta a hipoxia (HRE) situado en el promotor del gen. Al exponer los cultivos a hipoxia, tanto *Higd1a* como *Higd2a* incrementaban su expresión en una escala de tiempo similar (6 horas), pero el segundo lo hacía en menor medida; contrariamente, *Higd1b* y *Higd1c* mostraron poco efecto frente a este tipo de estrés (An et al., 2011).

Recientemente en nuestro laboratorio, se analizó la expresión de los distintos miembros de la familia Hig en ratas. Para esta especie, las bases de datos arrojan la existencia de cuatro proteínas -HIGD1A, HIGD1B, HIGD1C y HIGD2A- codificadas en *loci* diferentes, así como de al menos tres pseudogenes que presentan una alta similitud con los ORFs de sus homólogos, *Higd1a* y *Higd2a*. El análisis del perfil de expresión a nivel de ARNm de las cuatro formas codificantes mostró que en los tejidos de cerebro, hígado, pulmón y corazón las formas mayoritarias son *Higd1a* y *Higd2a*, expresándose *Higd2a* incluso en mayor medida que *Higd1a*. De forma similar a lo observado en ratón, los transcritos de *Higd1b* y *Higd1c*, si bien minoritarios, estuvieron presentes en todos los tejidos analizados. Es interesante que estas dos formas parecerían ser más importantes durante el desarrollo postnatal, puesto que mostraron una expresión significativamente más alta en las crías (p10) que en las ratas adultas, mientras que lo opuesto sucede con *Higd1a* y *Higd2a*. En lo que refiere a la distribución de *Higd1a* en los distintos tejidos, hígado y corazón presentaron más abundancia de transcripto, seguidos por el cerebro y por último pulmón, en menor proporción (Blanco, V., 2017).

1.IV- Expresión de Higd1a y su regulación

Desde su primera descripción a la fecha, el gen *Higd1a* ha sido citado en varios análisis transcriptómicos. Algunos estudios relacionan su expresión con la protección celular (Chanrion et al., 2008; Gavriouchkina et al., 2010), mientras que otros lo asocian a la diferenciación; por ejemplo, se ha descrito una inducción de varios genes que son blanco de regulación por HIF1 durante la diferenciación condrogénica estimulada por insulina, entre los que se cita *Higd1a* (Chen et al., 2005). Asimismo, una publicación reciente evidenció que la vía de señalización de HIF1 y de respuesta a la hipoxia cumplen un papel importante en la mecano-transducción de osteocitos. Dicho estudio identificó 8 genes clave que son diferencialmente regulados en

cultivos de osteocitos, ante la aplicación de distintos tipos de estrés mecánico. *Higd1a* es uno de los que integran este pequeño grupo; también se incluye el gen codificante para la enzima glicolítica γ -Enolasa (*Eno2*), y los autores observaron que el *knockdown* de este gen provoca una baja significativa en la expresión de *Higd1a* (Wang et al., 2018).

Una serie de otros trabajos ha relacionado cambios en la expresión de *Higd1a* con la respuesta a algún tipo de estrés, pero sin profundizar mayormente en su función. Así, Jin y colaboradores mostraron una inducción en la expresión del gen en cultivos primarios de neuronas expuestas a un medio hipóxico durante 24 horas (Jin et al., 2002). Se ha descrito que la exposición a níquel de fibroblastos de embrión de ratón en cultivo aumenta 13 veces la expresión de *Higd1a*; y se propone que la inducción ocurriría a nivel transcripcional y en forma HIF1-dependiente (Salnikow et al., 2003). Por otro lado, un aumento de 2,6 veces fue observado en cardiomiocitos tratados con el flavonoide quercetina, capaz de proteger las células del estrés oxidativo (Angeloni et al., 2007). Lattanzi y colaboradores describen también una inducción de *Higd1a* en cultivos neuronales de la línea PC12, como parte de la respuesta al estrés y a la degeneración inducida por tratamiento con trimetiletina (Lattanzi et al., 2007).

En 2015, una investigación llevada adelante por Ameri y colaboradores en la que se proponían desentrañar el papel de la vía de HIF1 -y en particular de HIGD1A- sobre el crecimiento tumoral, encontró que HIGD1A parece participar en la regulación metabólica del crecimiento tumoral, en particular actuando como un represor del mismo. El trabajo reportó la hipermetilación de sitios CpG ubicados en la vecindad de varios elementos de respuesta a hipoxia (HREs), en el promotor de *HIGD1A*. Los autores observaron que en distintas líneas de cáncer humanas esta modificación epigenética tendría por consecuencia impedir la transactivación por HIF1 y, a diferencia de lo que se ha descrito en otros modelos, esto ocurriría aún bajo condiciones hipóxicas (Ameri et al., 2015).

Por último, además de estos mecanismos de regulación transcripcional, experimentos de hibridación *in situ* realizados en tejido nervioso de ratas han evidenciado la presencia de un ARN antisentido de *Higd1a*. Por tanto, no es de descartar que la expresión de esta familia génica se halle también sujeta a otras formas de regulación, de carácter post-transcripcional (Bedó et al., 2005; Costa et al., 2012).

1.V- Expresión de Higd1a en el Sistema Nervioso

En el último tiempo, nuestro equipo de trabajo ha analizado la expresión de la proteína HIGD1A en el Sistema Nervioso Central (SNC) de ratas, durante los primeros días de vida post-natal. Al estudiar los tejidos de ratas de ocho días (P8), se comprobó que HIGD1A es abundante y posee una distribución amplia, aunque no homogénea. La médula espinal es la región del SNC que presentó más alta expresión de la proteína. En el cerebro anterior, las regiones con mayor inmunorreactividad para HIGD1A incluyen el núcleo endopiriforme, algunos núcleos talámicos,

la amígdala basolateral, hipocampo, putamen y núcleo caudado. Además, se constataron niveles altos en varias estructuras del tronco encefálico, algunas de ellas involucradas en la función auditiva, como el colículo inferior, lemnisco lateral, cuerpo trapezoide y complejo olivar superior, y también en otras como tracto trigémino, *substantia nigra*, núcleos del rafe, área tegmental y formación reticular (Fig. 2.A, B). Se propone que este patrón de expresión extendido pero heterogéneo que muestra HIGD1A se vincularía con eventos de maduración y plasticidad, y no tanto con los aspectos funcionales específicos de cada área (López et al., 2018).

A nivel celular, la morfología y la co-localización con los marcadores NeuN y GFAP sugirieron que en algunas regiones HIGD1A es expresado predominantemente en neuronas, mientras que en otras está presente mayoritariamente en astrocitos (Fig. 2.C) (López et al., 2018). En este sentido, en la médula espinal se observa un cambio de distribución con la edad: durante los primeros días de vida HIGD1A es abundante en neuronas, y a partir de los 15 días luego del nacimiento pasa a localizarse principalmente en células gliales (Bedó et al., 2012).

Resulta interesante que en el SNC de ratas, los eventos de apoptosis tienen un pico enseguida luego del nacimiento y van decreciendo en el transcurso de la primera semana de vida (Lowrie & Lawson, 2000). A lo largo de este período, la expresión de *Higd1a* va en aumento, y experimentos de hibridación *in situ* han mostrado que los grupos neuronales más preservados durante esos días coinciden con aquellos que tienen un mayor nivel del ARNm de *Higd1a* (Bedó et al., 2012).

En suma, las observaciones acerca de la distribución de HIGD1A sugieren que podría cumplir un rol importante durante el desarrollo del SNC, en particular relacionado a la protección contra la apoptosis, y a la correcta diferenciación y maduración de los tejidos.

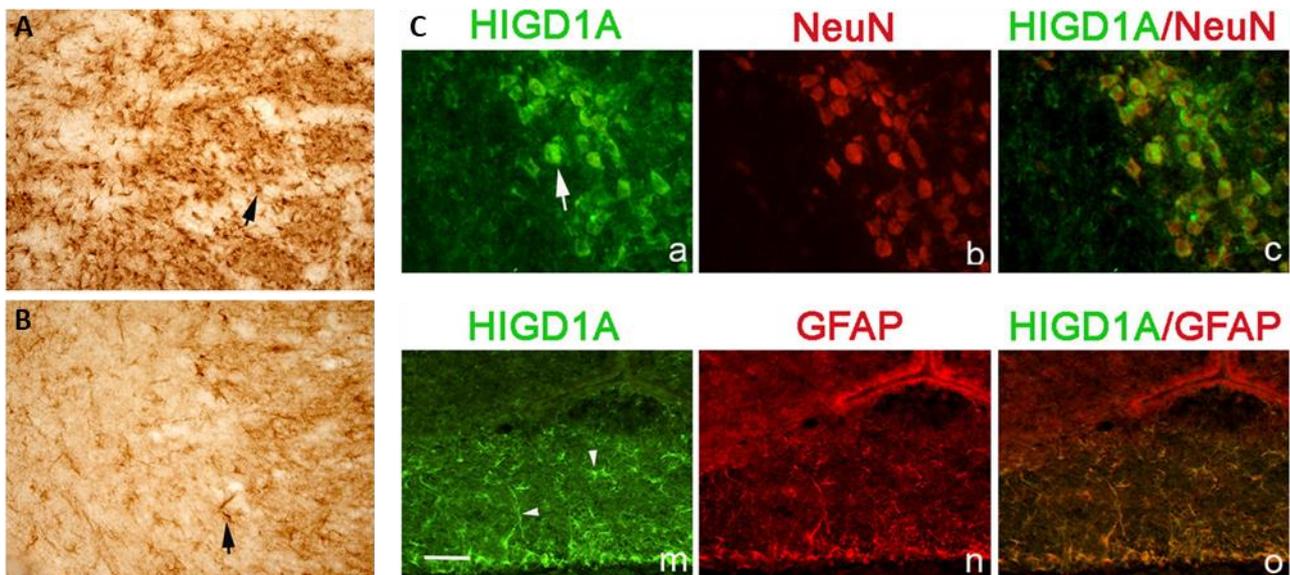


Figura 2. Distribución de HIGD1A en el SNC de ratas P8. **A, B.** Ensayos de inmunohistoquímica revelan niveles elevados de HIGD1A en diversas áreas; a modo de ejemplo se muestran núcleos talámicos (A) y núcleo endopiriforme (B). **C.** Co-localización de la señal de HIGD1A con neuronas del hipocampo (arriba) y con astrocitos en el quiasma óptico (abajo). *Figuras tomadas de López et al., 2018.*

1.VI- HIGD1A y la función mitocondrial

Los estudios que han abordado más específicamente la función de HIGD1A han puesto de manifiesto su importancia sobre el mantenimiento de la homeostasis y la función mitocondrial. Los primeros trabajos vincularon la proteína a la protección celular mediada por la prevención de la activación de la vía mitocondrial de apoptosis (Wang et al., 2006; An et al., 2011). En particular, se demostró en macrófagos de ratón expuestos a hipoxia que cuando las dos isoformas *Higd1a* y *Higd2a* son silenciadas por siRNA, existe un incremento en la apoptosis, y que su efecto anti-apoptótico consiste en inhibir la liberación de citocromo C desde la membrana mitocondrial y, por consiguiente, reducir la actividad de caspasas (An et al., 2011). Más tarde, se reportó la presencia de la proteína HIGD1A en el núcleo, bajo condiciones de estrés metabólico severo, y que la misma se solapaba con la de AIF (Apoptosis inducing-factor), existiendo una interacción física entre ambas proteínas. Si bien en dicho trabajo no se clarifica el mecanismo por el cual HIGD1A podría ser transportada al núcleo, se propone que existiría un *pool* minoritario de proteína HIGD1A en el citoplasma y que éste sería pasible de translocación nuclear. Realizando ensayos *in vivo*, los autores correlacionaron dicha re-localización de HIGD1A con distintas situaciones patológicas, como cardiopatía isquémica, encefalopatía hipóxico-isquémica y también con cáncer (Ameri et al., 2013).

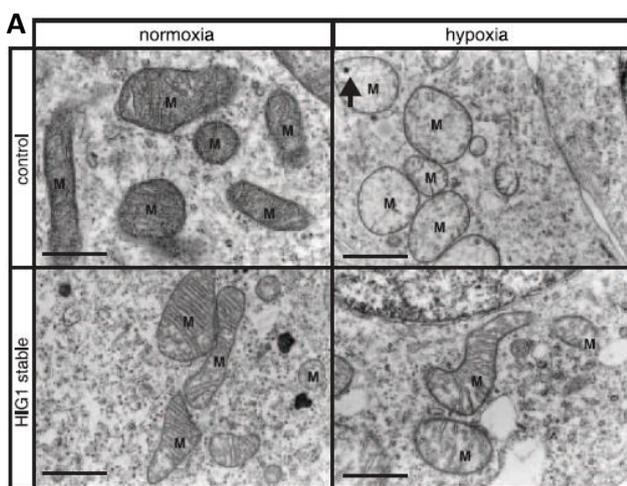
Un trabajo posterior de An y colaboradores profundizó en el rol de HIGD1A sobre el mantenimiento de la integridad mitocondrial. Ellos demostraron que el gen es esencial para preservar la organización de las crestas y para que ocurra la fusión mitocondrial. A través de ensayos en cultivos celulares de las líneas HeLa y HEK293T, comprobaron que la depleción de HIGD1A conduce a la fragmentación mitocondrial, pérdida severa del ADN mitocondrial y un retraso en el crecimiento celular. Cabe puntualizar que este retraso pareció deberse a una inhibición de la proliferación y no a un aumento de la apoptosis. Adicionalmente, los autores describen que estas funciones de HIGD1A están mediadas por la unión y prevención del clivaje de la proteína Opa1 (Optic atrophy 1), una GTPasa que reside en la membrana mitocondrial interna y juega un papel importante en el sostén estructural de dicha membrana y en el remodelado de las crestas (An et al., 2013).

A su vez, se ha relacionado a HIGD1A con la regulación de la proteína γ -secretasa mitocondrial y del péptido β -amiloide (Hayashi et al., 2012). La actividad anormal de estas proteínas se asocia al desarrollo de importantes enfermedades, como Alzheimer (Haass & Selkoe, 1993), apoplejía (Arumugam et al., 2006), aterosclerosis (Aoyama et al., 2009) y cáncer (Shih et al., 2007). Hayashi y colaboradores observaron en ese trabajo que tanto los niveles de γ -secretasa como de la proteína β -amiloide se incrementan en células neuronales cuando son sujetas a condiciones de hipoxia. En estas condiciones, la acumulación de ambas proteínas conduciría a una sobre-producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y a la disfunción mitocondrial, provocando en última instancia la muerte celular. En células que expresaban HIGD1A en forma estable, la actividad de γ -secretasa mostró estar regulada negativamente, previniendo así la acumulación de β -amiloide y ayudando a mantener la correcta estructura y función mitocondrial

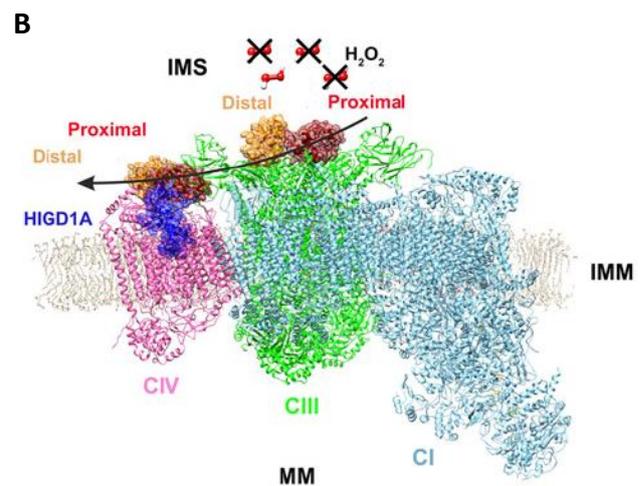
(Fig. 3.A). Por el contrario, el *knockdown* de HIGD1A resultó en un aumento de ROS, incluso en condiciones normóxicas, y en alteración del funcionamiento mitocondrial.

Más tarde, una publicación de otro grupo probó que en cardiomiocitos de rata, HIGD1A se une directamente al complejo IV de la cadena respiratoria (referido también como Citocromo C Oxidasa o COX) alterando la estructura de su sitio activo y aumentando la producción de ATP mitocondrial. Los autores proponen que bajo condiciones de hipoxia, este incremento de la producción de ATP ejercería un rol citoprotector (Hayashi et al., 2015).

En acuerdo con estos hallazgos, investigaciones realizadas en levaduras identificaron dos genes de la familia Hig, cuyo producto proteico es necesario para el correcto ensamblaje del supercomplejo citocromo bc_1 -COX; tal es así, que los autores propusieron nombrarlos *Respiratory supercomplex factors 1 y 2* (Rcf1 y Rcf2). El estudio encontró que ambos, Rcf1 y Rcf2, se asocian físicamente con el supercomplejo bc_1 -COX, estabilizando su ensamblaje y modulando la actividad enzimática de COX. Asimismo, realizando ensayos con una versión truncada de Rcf1 que sólo poseía los dominios transmembrana conservados pero no la porción C-terminal específica de levaduras, se vio que la asociación se mantenía. Por tanto, los autores plantean que la función de soporte de la actividad COX sería un rasgo conservado de la familia Hig (Strogolova et al., 2012). En un trabajo más reciente, el mismo grupo encontró que la asociación de Rcf1 con COX se establece por intermedio de las subunidades Cox2 y Cox3, y que involucra la formación de dos pares Gln/Arg conservados. Los autores postulan que Rcf1 no constituye un componente físico del complejo, sino que se uniría de manera dinámica y transitoria, posiblemente durante el ensamblaje del complejo, modificando su estabilidad y propiedades catalíticas. Se sugiere, además, que esta modulación podría involucrar algunos lípidos asociados a COX, como cardiolipina y fosfatidilgliceroles (Garlich et al., 2017).



Hayashi et al., 2012



Guerra-Castellano et al., 2018

Figura 3. Relación de HIGD1A con la función mitocondrial. **A.** La expresión estable de HIGD1A preserva la integridad mitocondrial frente a la hipoxia en una línea celular de neuroblastoma humano. **B.** Modelo alternativo de fosforilación oxidativa y disminución de ROS, facilitado por la formación del supercomplejo respiratorio y la versión fosforilada de CytC. HIGD1A contacta con CIV y la molécula de CytC ubicada en el sitio proximal (rojo). La flecha negra indica la vía uniendo los complejos III y IV por la que CytC sería canalizado.

En una línea similar, Guerra-Castellano y colaboradores publicaron un trabajo en el que se buscaba estudiar los efectos de la fosforilación de citocromo C (CytC) en determinado residuo de tirosina; en particular, buscaban elucidar la participación de esta modificación post-traduccional en la neuroprotección ejercida por el tratamiento con insulina frente a la injuria isquémica. En el trabajo se describe una interacción entre CytC y la porción N-terminal de HIGD1A; la unión ocurriría tanto con CytC *wild type* como con la especie fosforilada, aunque hacia esta última presenta una menor afinidad. Se sugiere que esta disminución de la afinidad daría lugar a una tasa de recambio más alta en la interacción HIGD1A-CytC, y esto promovería la reducción del complejo IV. Los autores proponen que la fosforilación de CytC y el ensamblado de supercomplejos respiratorios tienen un efecto regulador sobre la tasa de reducción del complejo IV, de modo de prevenir el aumento de ROS y frenar la inducción de apoptosis. Específicamente, proponen que la formación de estas supraestructuras moleculares provee sitios de contacto alternativos entre los complejos III y IV, proporcionando una vía más rápida para el tráfico de electrones (Fig. 3.B). En este escenario, HIGD1A facilitaría interacciones entre componentes de la cadena respiratoria, de modo de mantener a raya el nivel de estrés oxidativo en la mitocondria y la activación de caspasas (Guerra-Castellano et al., 2018).

Por otra parte, el ya mencionado trabajo de Ameri y colaboradores (2015) encontró que HIGD1A se asocia a la cadena respiratoria a través del complejo III. En vista de que este complejo constituye un sitio importante de producción de superóxido $O_2^{\cdot -}$ (Buetler et al., 2004; Chen & Gibson, 2008), examinaron también la influencia de HIGD1A sobre el consumo de oxígeno y la producción de ROS mitocondrial. Curiosamente, los resultados mostraron que la expresión de HIGD1A provoca una reducción en la tasa de consumo de oxígeno y un aumento de la producción mitocondrial de ROS en cultivos de fibroblastos sometidos a baja concentración de glucosa. No obstante, al adicionar glucosa al medio, las células que expresaban HIGD1A restituían más rápidamente el consumo de oxígeno, en comparación con las que no lo expresaban. Una estrategia celular para evitar fenómenos de apoptosis causados por ROS consiste en la activación de AMPK (proteína quinasa AMP-dependiente) y de vías adaptativas ligadas, que incluyen mecanismos antioxidantes (Jeon et al., 2012). A este respecto, los autores comprobaron -tanto *in vitro* como *in vivo*- que la expresión de HIGD1A se encontraba asociada a un aumento de los niveles de la forma fosforilada y activa de AMPK (pAMPK), y que esto originaba un descenso de ROS totales en las células (Ameri et al., 2015).

1.VII- Higd1a en el pez cebra

En el pez cebra (*Danio rerio*) se han identificado a la fecha dos genes de la familia Hig que son codificantes de proteínas. El primero en describirse fue un ortólogo de *Higd1a*, y más recientemente, la penúltima actualización del genoma (GRCz10, año 2015) ha mostrado la existencia de la variante *higd2a* (ver Anexo I). Inicialmente este gen fue catalogado como *putative protein coding*, y más recientemente, se confirmó la traducción a proteína y la secuencia aminoacídica de Higd2a.

La bibliografía que existe en el pez cebra acerca de la familia Hig es escasa. Los primeros reportes consisten en ensayos de hibridación *in situ* a gran escala llevados a cabo por Thisse y colaboradores durante la embriogénesis del pez cebra. Los mismos mostraron que *higd1a* es un gen que se expresa desde etapas muy tempranas, presenta una distribución ubicua hasta aproximadamente las 30 horas post-fecundación (hpf) y luego la señal se concentra en las regiones de la cabeza, los arcos branquiales y las aletas pectorales (tejido cartilaginoso) (Fig. 4.A; Thisse et al., 2001). De modo consistente con estos datos, experimentos de hibridación *in situ* realizados en nuestro laboratorio sobre cortes histológicos de la zona de la cabeza mostraron que, en larvas de 7 dpf, el ARNm de *higd1a* se encontraba ampliamente distribuido, con particular intensidad en los condrocitos. Asimismo, la cuantificación del mensajero por experimentos de PCR en tiempo real indicó que el gen se expresa a lo largo de todo el desarrollo, con niveles más elevados en etapas bien tempranas y en el lapso comprendido entre las 24 y las 48 hpf (Fig. 4.B); muestras de ovocitos también mostraron una abundancia especialmente alta del ARNm de *higd1a* (Sosa, I., 2014).

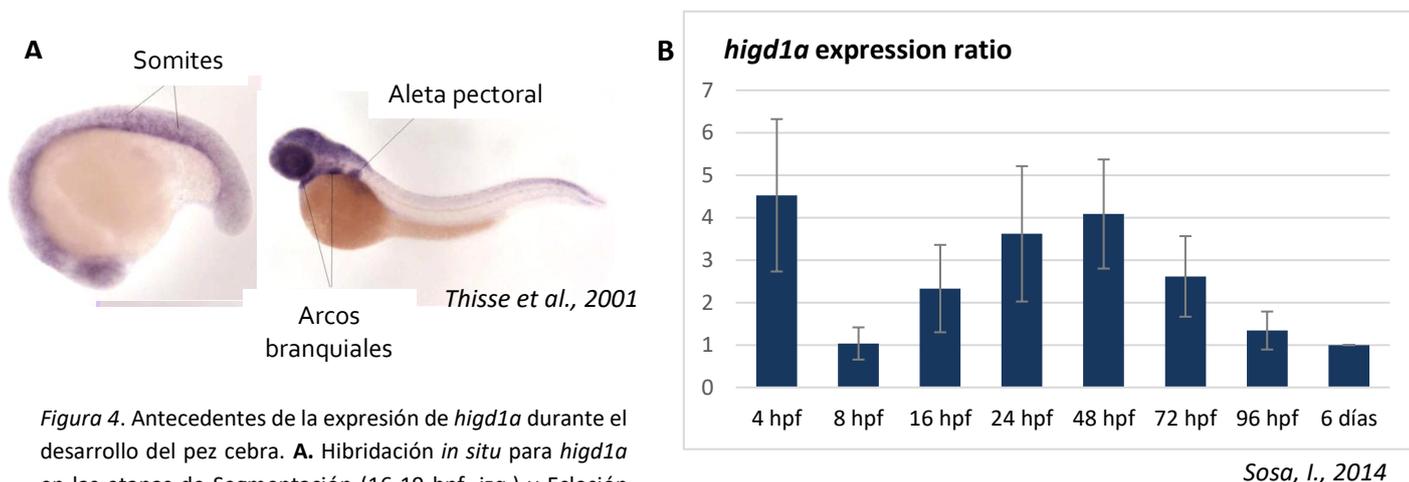


Figura 4. Antecedentes de la expresión de *higd1a* durante el desarrollo del pez cebra. **A.** Hibridación *in situ* para *higd1a* en las etapas de Segmentación (16-19 hpf, izq.) y Eclosión (48-60 hpf, der.). **B.** Cuantificación del ARNm de *higd1a* a lo largo de los primeros días de la embriogénesis.

Además de estos antecedentes, existen tres análisis transcriptómicos que citan a *higd1a* entre grupos de genes inducidos frente a distintos estímulos. Por un lado, estudiando la implicancia de la vía de señalización de sonic hedgehog (*shh*) en el desarrollo de carcinoma basocelular, Chen y colaboradores describieron a *higd1a* como uno de los principales genes significativamente inducidos por sobre-expresión de *shh* en la epidermis (Chen et al., 2009). Un análisis más reciente que abordaba el estudio de la respuesta al estrés por bajas temperaturas, también cita a *higd1a* como parte del conjunto de genes inducidos (Hu et al., 2015).

Otra publicación señaló que *higd1a* constituye uno de los 19 genes inducidos en embriones que habían sufrido exposición continua a luz. Los autores encontraron que varios de los genes regulados positivamente están relacionados con la respuesta a estrés y con la reparación del ADN (Gavriouchkina et al., 2010). En este sentido, ha sido documentado que las especies reactivas del oxígeno son capaces de inducir la transcripción de genes de respuesta directa a la

luz (Hirayama et al., 2007). Por otra parte, el estudio propone a Tef (Tyrotroph embryonic factor) como un factor de transcripción clave en la activación de este grupo de genes. Dicha activación estaría mediada por la unión a elementos de respuesta PARRE (PAR Response Elements), que se encontraron en los promotores de todos los genes inducidos, incluyendo *higd1a* (Gavriouchkina et al., 2010).

En lo que respecta a los aspectos funcionales de la proteína Higd1a, en nuestro laboratorio hemos realizado ensayos de *knockdown* utilizando un oligómero de morfolino (MO) que interfiere con el correcto *splicing* del pre-ARNm del gen. La disminución del transcripto normal produjo alteraciones y retrasos en el desarrollo, en particular, se observó un aumento de la muerte celular en el área del mesénquima de la cabeza derivado de la cresta neural (Fig. 5.A, B). Dado que en esta región residen los progenitores que dan origen al tejido cartilaginoso, se realizaron tinciones para evaluar la morfología de los cartílagos de la cabeza, en los que efectivamente parecieron haber anomalías tras el *knockdown* de Higd1a (Fig. 5.C, D; Sosa, I., 2014).

Estos experimentos, si bien alentadores, no resultaron completamente satisfactorios en cuanto que se requerían altas dosis de inyección de MO y la reproducibilidad de los ensayos tampoco fue la esperada.

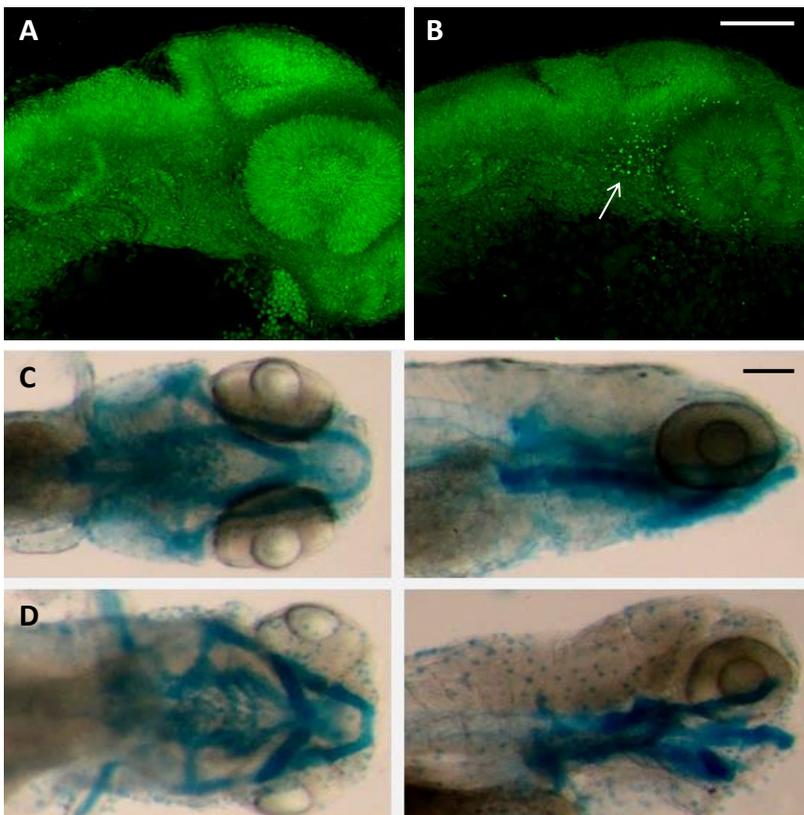


Figura 5. Efecto del *knockdown* de *higd1a* con morfolino. **A, B.** Imágenes de microscopía confocal de embriones de 30 hpf teñidos con verde de metilo. Los embriones inyectados con morfolino contra *higd1a* (**B**) presentan un aumento en el número de núcleos picnóticos (flecha), indicio de muerte celular, en comparación con embriones inyectados con un morfolino control (**A**). **C, D.** Tinción de cartílagos cráneo-faciales sobre larvas de 5 días inyectadas con morfolino control (**C**) o morfolino contra *higd1a* (**D**). Barras de escala corresponden a 100 μm . Figuras tomadas de Sosa, I., 2014.

I.VIII- El uso del pez cebra para el estudio de eventos del desarrollo

Existen varias características que hacen del pez cebra (*Danio rerio*) una herramienta valiosa para la investigación. En primer lugar, una pareja de adultos es capaz de producir cientos de huevos fecundados con una periodicidad semanal, y es posible mantener un número considerable de peces en un espacio relativamente reducido. Esto representa una disminución importante del costo en comparación, por ejemplo, con especies de mamíferos comúnmente usadas para la experimentación. Por otro lado, los embriones poseen un desarrollo externo y rápido, y son transparentes durante las primeras etapas, lo cual posibilita la observación de la organogénesis en tiempo real y facilita la evaluación fenotípica luego de un determinado tratamiento o manipulación. Además, la bibliografía existente acerca de los fenómenos celulares y moleculares que ocurren a lo largo del desarrollo es extensa, y los principales eventos que tienen lugar en cada etapa se encuentran bien documentados. En este sentido, es posible determinar con bastante precisión el momento del desarrollo en que se encuentran los embriones, a través de datos cuantitativos como el ángulo entre la cabeza y el tronco, o el número de somites. Inclusive, controlando la temperatura del medio es posible adelantar o retrasar el desarrollo, lo cual constituye una herramienta muy útil cuando se desean observar ciertos momentos específicos de la embriogénesis (Kimmel et al., 1995).

En lo que refiere al papel del oxígeno, es un hecho constatado que su homeostasis es crítica para el desarrollo y la fisiología normales en eucariotas, y se ha propuesto que la hipoxia puede regular procesos morfogenéticos como el desarrollo del sistema nervioso, o el desarrollo de cartílagos y huesos (Royer et al., 2000; Schipani et al., 2001; Wang et al., 2007). También ha sido descrita la participación de ROS en procesos celulares esenciales del desarrollo, como proliferación, migración, diferenciación y muerte celular (Covarrubias et al., 2008; Hamanaka et al., 2013; Hernández-García et al., 2010).

En peces, al igual que en mamíferos, la familia HIF es considerada el “regulador maestro” de la respuesta a hipoxia, y se ha establecido que la vía de HIF1 es operativa a lo largo de la embriogénesis, activando la transcripción de genes en forma HRE-dependiente (Kajimura et al., 2006; Rojas et al., 2007; Zhang et al., 2012). Más específicamente, Barriga y colaboradores han descrito que HIF1- α juega un papel clave en la migración de la cresta neural y en el desarrollo de sus derivados. Su investigación demostró que HIF1- α es necesario para que ocurran los procesos de migración y de transición epitelio-mesénquima que caracterizan a esta población celular. Los autores sugieren entonces que los gradientes de oxígeno pueden tener un importante rol en el desarrollo de la cresta neural, por intermedio de la vía de HIF1 (Barriga et al., 2013).

Es interesante, a su vez, que *Danio rerio* es una especie que posee una alta resistencia a la depleción de oxígeno durante su desarrollo. Hasta la edad de 25 hpf, los embriones pueden sobrevivir hasta 24 horas de anoxia. La tolerancia se reduce cuando los embriones entran en el período de enderezamiento de la cola (30 hpf), y luego de la eclosión (50 hpf) se tornan muy sensibles a las condiciones anóxicas (Padilla & Roth, 2001). Pese a que en etapas tempranas

logran sobrevivir esta larga exposición a anoxia, los individuos ingresan en un estado de arresto del desarrollo, probablemente como una respuesta adaptativa para la conservación de la energía (Richards et al., 2009). No obstante, esta detención es reversible, y cuando los embriones son devueltos a un ambiente normóxico, el desarrollo se reanuda (Kajimura et al., 2005). Sumado a esto, experimentos en los que se incubaban embriones con concentraciones variables de oxígeno, mostraron que son capaces de adaptarse exitosamente de acuerdo a la disponibilidad del mismo. El consumo de oxígeno por parte de los embriones resultó mayor cuanto más oxígeno era provisto al medio, pero incluso a concentraciones muy bajas (2 mg/L) - que se esperaba fueran letales para la mayoría de los ciprínidos adultos- los embriones de pez cebra lograban adaptarse y no mostraban secuelas significativas (Braunbeck & Lammer, 2006).

1.1X- El pez cebra y la manipulación de la expresión génica

Otra importante ventaja del pez cebra como especie para la experimentación radica en que su genoma se encuentra completamente secuenciado (Howe et al., 2013), y ha sido actualizado periódicamente incorporando mejoras en la calidad del ensamblado y la anotación génica. Esto ha posibilitado el desarrollo de un amplio espectro de técnicas de genética reversa. Un ejemplo es el uso de oligómeros de morfolino para el *knockdown* transitorio de la expresión, que permite un estudio rápido y efectivo de la función génica (Nasevicius & Ekker, 2000). Sin embargo, esta aproximación posee ciertas debilidades, como su restricción al estudio de procesos que no se extienden más allá de los primeros días del desarrollo; además, últimamente ha sido objeto de cuestionamientos, principalmente en lo que concierne a su especificidad (Law et al., 2014; Kok et al., 2015). Para sobrellevar estas limitaciones, puede recurrirse al uso de peces mutagenizados químicamente con etilnitrosourea (ENU), estando disponibles comercialmente un amplio repertorio de mutaciones gen-específicas a través del “Zebrafish Mutation Project” (Kettleborough et al., 2013).

Desde hace algunos años, se han venido desarrollando otras técnicas para la generación de mutaciones dirigidas, basadas en el uso de nucleasas y en la introducción de cortes en el ADN de modo locus-específico. Inicialmente se destacaron las metodologías de ZFNs y TALENs (Carroll, 2011; Sander et al., 2011) y más tarde el sistema CRISPR/Cas9 (Hwang et al., 2013). En su modalidad más sencilla -y tal como se muestra en la Figura 6- la técnica de edición genómica por CRISPR/Cas9 se basa en moléculas guías de ARN que dirigen con alta especificidad y eficiencia la introducción de cortes en la doble hebra de ADN. Luego, por la vía de reparación NHEJ (*non-homologous end joining*), se producen pequeñas inserciones o deleciones (*indels*) que resultan en la mutación del gen o genes de interés (Hsu, Lander & Zhang, 2014; Harrison et al., 2014).

El uso del sistema CRISPR/Cas9 se ha venido extendiendo enormemente durante los últimos años, en la medida que se han desarrollado diferentes adaptaciones funcionales y adecuaciones para diversos modelos biológicos. En el caso del pez cebra, ya en 2013 fue reportada la generación de una proteína Cas9 con un uso de codones optimizado para esta especie. La

utilización del sistema adaptado resultó en altas tasas de mutagénesis (75-99%) en los peces inyectados (F_0), indicando que la mayoría de las células contenía mutaciones bialélicas. Además, el mismo trabajo describió la posibilidad de realizar un *knockout* múltiple, anulando con éxito hasta 5 genes en forma simultánea (Jao et al., 2013). Más tarde, mejoras en la estabilidad y eficiencia de los ARNs guía, junto al desarrollo de metodologías libres de clonado que facilitan su implementación, impulsaron el uso de CRISPR para estudios genéticos a gran escala (Moreno-Mateos et al., 2015; Varshney et al., 2015; Shah et al., 2015). Trabajos posteriores han incorporado la anulación de genes en forma tejido-específica, ampliando así el abordaje experimental para aquellos casos en que se busca un mayor control espacio-temporal de la inactivación génica (Ablain et al., 2015; Di Donato et al., 2016). Por último, también se ha descrito la puesta a punto de complejos ribonucleoproteicos Cas9-ARNs guía que son ensamblados *in vitro* e inyectados en el vitelo de los embriones, dando como resultado la aparición de mutaciones somáticas con una eficiencia notablemente alta. Esta adaptación permite recapitular en la F_0 el fenotipo de mutaciones transmitidas por línea germinal, reduciendo significativamente los costos y tiempos experimentales (Burger et al., 2016; Wu et al., 2018).

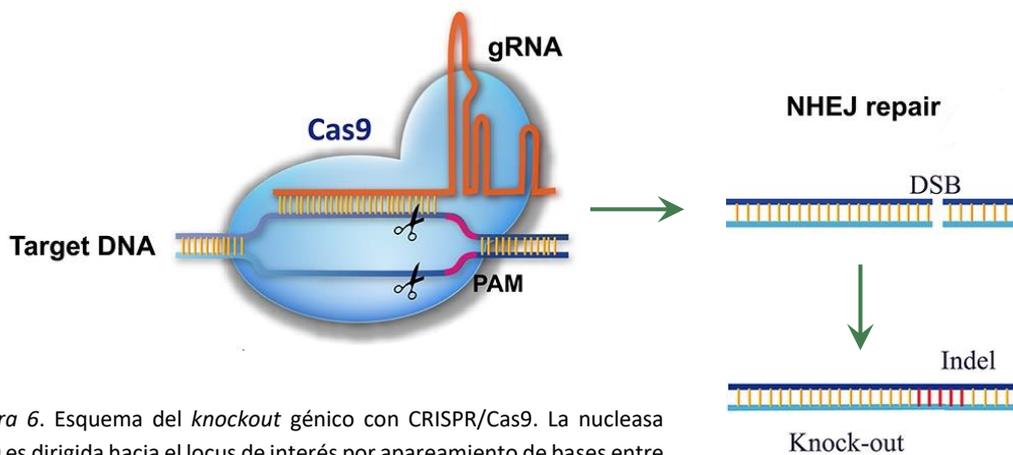


Figura 6. Esquema del *knockout* génico con CRISPR/Cas9. La nucleasa Cas9 es dirigida hacia el locus de interés por apareamiento de bases entre el ARN guía (gRNA) y el ADN blanco. La presencia de un motivo conservado "PAM" *downstream* al sitio de unión del gRNA es necesaria para la acción de la enzima. El corte en la doble hebra del ADN (DSB) es reparado por la vía NHEJ, proclive a errores, generándose una pequeña inserción o deleción que eventualmente anula la función génica.

Adaptado de Ding et al., 2016

Pese a las grandes ventajas que presenta el sistema CRISPR/Cas9, ha sido reportado que la generación de líneas con mutaciones deletéreas puede activar mecanismos que compensan la pérdida de función (El-Brolosy & Stainier, 2017; Bickers et al., 2018), y la probabilidad de observar este efecto sería mayor en aquellos casos en que el blanco de interés forma parte de una familia de proteínas relacionadas (Rossi et al., 2015; Sztal et al., 2018).

II. JUSTIFICACIÓN & OBJETIVOS

Los antecedentes expuestos indican que HIGD1A podría jugar un importante papel en mantener la homeostasis mitocondrial, en promover la supervivencia celular ante distintas situaciones de estrés, y en posibilitar procesos vinculados a la morfogénesis y a la diferenciación. No obstante, son pocos los trabajos que han abordado su rol durante el desarrollo fisiológico normal, y las evidencias recabadas hasta al momento provienen casi en su totalidad de aproximaciones *in vitro*, ignorando los efectos de la señalización entre tejidos en el contexto de un organismo entero.

Por otro lado, la compleja regulación a la que parece estar sujeto el gen y las evidencias de posibles mecanismos post-transcripcionales plantean la necesidad de considerar la expresión de *higd1a* tanto a nivel de ARNm como de proteína.

En suma, si bien existen pistas claves respecto a la función de HIGD1A, para poder integrar estas evidencias y lograr una comprensión más global de la misma, se hace necesaria la puesta a punto de un modelo *in vivo* de pérdida de función, con el cual poder responder las múltiples interrogantes que aún están pendientes. En vista de las ventajas experimentales que ofrece el pez cebra y de la particular modulación del metabolismo del oxígeno que esta especie parece tener durante su desarrollo embrionario, consideramos que constituye un interesante modelo para profundizar en el estudio de la proteína Higd1a.

Es así que para esta tesis nos propusimos como objetivo general: **profundizar en la caracterización *in vivo* de la expresión y función del gen *higd1a*, utilizando como modelo el pez cebra.**

Con dicho fin, nos trazamos los siguientes objetivos específicos:

- Establecer el patrón temporal y espacial de expresión de la proteína Higd1a durante el desarrollo embrionario del pez cebra.
- Generar una línea de pez cebra *knockout* para Higd1a utilizando el sistema CRISPR/Cas9.
- Realizar una evaluación preliminar del fenotipo de los individuos *knockout* y contrastar los resultados con las evidencias obtenidas previamente a través del abordaje *knockdown*.
- Confirmar la participación de Higd1a en la respuesta al estrés hipóxico, en el marco del desarrollo embrionario del pez cebra.

III. MATERIALES & MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos planteados, la estrategia experimental consistió, a grandes rasgos, en analizar la expresión de la proteína Higd1a por medio de ensayos de western blot e inmunofluorescencia, en diseñar y poner a punto la metodología CRISPR/Cas9 con la cual generar una línea de pez cebra *knockout* para el gen. Finalmente, una vez obtenidos los individuos mutantes, analizamos algunos aspectos relevantes del fenotipo, como cambios en su capacidad motora, morfología de cartílagos cráneo-faciales y cambios en la tolerancia a hipoxia. A continuación se detallan los aspectos técnicos de los distintos abordajes experimentales.

III.I- Mantenimiento de animales y obtención de embriones

Fueron utilizadas las instalaciones del Laboratorio de Zebrafish del Institut Pasteur de Montevideo. Los peces adultos fueron mantenidos en condiciones adecuadas, en un sistema semi-automatizado Tecniplast Zebtec, con flujo continuo de agua de ósmosis reversa que cuenta con el control de distintos parámetros físico-químicos (conductividad 500-900 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$, pH 7,5 y temperatura 28 °C) y con un sistema de filtros químico y biológico. Los peces fueron alimentados diariamente con ración seca y alimento vivo (larvas de *Artemia salina*). Los embriones utilizados en este trabajo fueron obtenidos mediante cruzamientos de adultos de acuerdo a procedimientos estándar, e incubados hasta la etapa de interés en estufa refrigerada, a temperaturas entre 25 y 30 °C. Los embriones fueron datados según Kimmel et al., (1995). A lo largo del trabajo se emplearon peces de la línea TAB-5 (*wild type*) y de las líneas transgénicas *Sox10:GFP*, *HuC:GFP*, *Islet-1:GFP* y *NeuroD:TagRFP*.

Todas las manipulaciones llevadas a cabo durante este trabajo fueron realizadas siguiendo procedimientos aprobados por la CEUA de la Institución (Protocolo N° 010-13).

III.II- Ensayos de knockdown con Morfolino

Los embriones de pez cebra fueron inyectados en el vitelo entre las etapas de 1 y 8 células. La inyección se llevó a cabo bajo microscopio estereoscópico y utilizando un microinyector neumático. El morfolino empleado contra *higd1a* consiste en un morfolino de *splicing* dirigido contra el límite exón 2/intrón 2 de la secuencia del ARNm de *higd1a* (GenBank accession number NM_200100), que altera el corte y empalme normal del gen. El producto esperado sería un ARNm de menor tamaño, posiblemente debido a la escisión del exón 2 -que contiene el codón de inicio de la traducción- y de los intrones adyacentes. El diseño y la síntesis de la molécula de morfolino estuvo a cargo de la empresa GeneTools, y su secuencia fue la siguiente: 5' - aat aat tca caa cag ttt acc tgc a - 3'. La utilización de este morfolino fue puesta a punto en trabajos de

previos de nuestro laboratorio (Sosa, I., 2014). Se utilizó una solución de trabajo 0,5 mM y los volúmenes inyectados fueron 2 nL o 5 nL, según se especifica en los distintos experimentos.

III.III- Generación de la línea knockout

III.III.I- Diseño y síntesis de sgRNAs

Las moléculas de ARNs guía (sgRNAs) fueron desarrolladas de acuerdo a la metodología libre de clonado propuesta por Varshney et al., 2015, en la cual se utilizan dos oligonucleótidos parcialmente solapantes: uno de ellos genérico; y el otro de carácter específico conteniendo la secuencia promotora T7, la secuencia complementaria al sitio de unión en el ADN (Binding) y una cola de 15 nucleótidos que hibrida con el oligonucleótido genérico (Fig. 7).

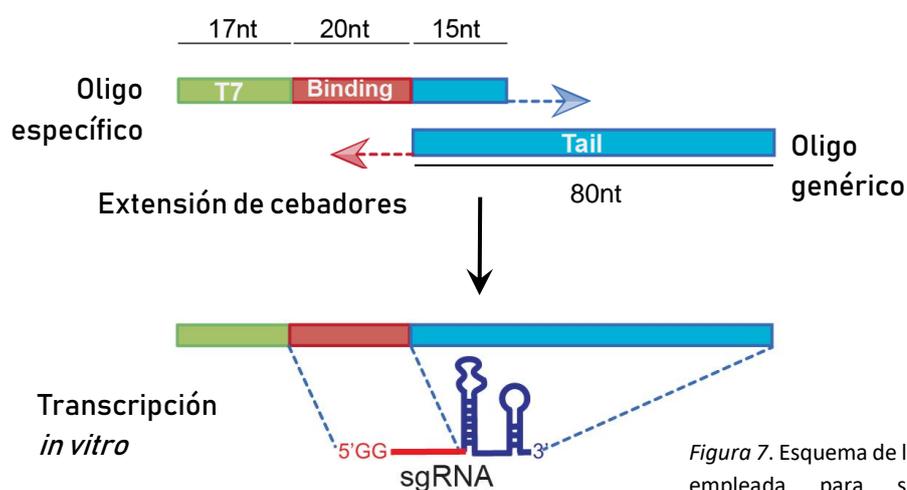


Figura 7. Esquema de la metodología empleada para sintetizar las moléculas de ARNs guía.

Dos moléculas de sgRNAs fueron diseñadas utilizando la plataforma de libre acceso CRISPRscan, desarrollada en el Laboratorio de Antonio Giraldez, Universidad de Yale (<http://www.crisprscan.org>) y la herramienta desarrollada en el Laboratorio de Feng Zhang, MIT (no disponible actualmente). La síntesis de los moldes ADN doble cadena para ambos sgRNAs se realizó mediante reacción de PCR, tal como describe Moreno-Mateos et al., 2015.

La obtención de los productos esperados fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa, y la transcripción *in vitro* de ambos sgRNAs fue llevada a cabo utilizando el kit comercial MAXIscript® AM 1320, siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante con las siguientes adaptaciones: incubación O.N. a 37 °C, adición de inhibidor de RNAsas RiboLock (ThermoFisher Scientific) en una concentración de 0,7 U/μL de reacción, tratamiento con TURBO DNaseI (ThermoFisher Scientific) 0,1 U/μL de reacción. Los productos fueron purificados por precipitación con Acetato de Sodio/Etanol y resuspendidos en TE libre de RNAsas. La presencia de los correspondientes ARNs fue también verificada por electroforesis en gel de agarosa y su

concentración fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

III.III.II- Microinyección del Sistema CRISPR/Cas9

Todas las inyecciones se realizaron en el citoplasma de embriones en etapa de una célula. Se utilizó un ARN mensajero de la enzima Cas9 adquirido comercialmente (GeneArt® CRISPR Nuclease, Invitrogen). La efectividad del mismo fue previamente verificada a través de la co-inyección con un sgRNA dirigido al gen codificante de la enzima Tirosinasa, cuya mutación produce un fenotipo albino.

III.III.III- Detección de individuos mutantes

- ◆ Embriones: el ADN genómico fue extraído a partir de embriones previamente colocados en hielo, por homogeneización en NaOH 50 mM, seguida de baño a 100 °C durante 5 min, y finalización de la reacción con la adición de Tris-HCl 90 mM final pH 8,0. Las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 1 min y se recuperó el sobrenadante. Alternativamente, al realizar las extracciones a partir de embriones fijados (ver III.VI), fueron seccionadas las colas bajo lupa y luego lavadas en PBS 1X durante al menos 30 min antes de proceder con la extracción. La porción anterior de cada embrión se mantuvo aislada hasta la asignación de genotipo, luego de lo cual se continuó con las siguientes técnicas experimentales.
- ◆ Individuos adultos: los animales fueron anestesiados en MS-222 0,02 % (Tricaína) y se cortó una pequeña porción de aleta caudal con tijera de disección (*fin clip*). El tejido se colocó en buffer de lisis (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM, Tween 20 0,3 %, Tritón X-100 0,3 %, Proteínasa K 1 mg/mL) y se llevó a 55 °C O.N. Seguidamente, se inactivó la Proteínasa K incubando a 98 °C durante 10 min, se realizó una dilución 1/20 de los extractos en agua ultrapura y se guardaron a -20 °C hasta su utilización. Los animales fueron mantenidos en el sistema en forma aislada hasta la asignación del genotipo.

El genotipado de los individuos se llevó a cabo mediante PCR utilizando cebadores apropiados, abarcando la región del gen comprendida por ambos sgRNAs (Tabla 1, Fig. 17.B). Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 7,2 % y visualizados por tinción con Nitrato de Plata. Los individuos heterocigotas para las diferentes mutaciones fueron identificados por la presencia de una banda de migración retrasada, correspondiente a la especie heterodúplex alelo *wild type*/alelo mutante. Los individuos homocigotas fueron identificados hibridando el producto de PCR con un amplicón *wild type* ya conocido (5 min a 95 °C + 5 min a 60 °C) y observando la aparición (individuo mutante) o no (individuo *wild type*) de la banda de heterodúplex tras una segunda electroforesis en gel de poliacrilamida. La caracterización de las mutaciones y, alternativamente, el genotipado o su confirmación se llevó a cabo por secuenciación. En el caso de los individuos heterocigotas, el electroferograma

producto de la secuenciación presenta, a partir del sitio de la mutación, la aparición de dos picos superpuestos; la anotación de esas secuencias se realizó de manera manual, leyendo el electroferograma y teniendo el amplicón *wild type* como referencia.

Gen	Nombre y secuencia del oligo	T _m	Tamaño esperado del amplicón
<i>higd1a</i>	Genotipado Fw 5' – ACTGTCTTTCAAGGGATGGCT –3'	60 °C	274 pb
	Genotipado Rev 5' – TGACAAGCACGGATGAACTG –3'		
	Z_RT Fw 5' – ATGAGAAAATCAAGCAGAATCC –3'	57 °C	81 pb
	Z_RT Rev 5' – TTGAACAGTCTGTACGCCACA –3'		
<i>ef1a</i>	ef1a Fw 5' – CTACCTACCCTCCTCTTGTCG –3'	57 °C	182 pb
	ef1a Rev 5' – ACACGCCCAACCTTTGGAA –3'		
<i>l13a</i>	l13a Fw 5' – TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC –3'	57 °C	148 pb
	l13a Rev 5' – TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC –3'		
<i>egl3</i>	egl3 Fw 5' – GCATTCGTGCGAGGTCAAAGGC –3'	57 °C	156 pb
	egl3 Rev 5' – GCAATCCCCATGTTCTTGCA –3'		
CRISPR <i>higd1a</i>	sgRNA1 5' – taatagactactata GGACAGTCTGTACGCCACAA gttttagagctagaa –3'	45 °C	117 pb
	sgRNA2 5' – taatagactactata GGTGCACAAGGCTTCGTGGT gttttagagctagaa –3'		
	Primer "tail" 5' – AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAA GTTGATA ACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTAT ttctagctctaaaac –3'		

Tabla 1. Resumen de los cebadores utilizados en los ensayos de PCR y Real Time PCR. En los oligonucleótidos sgRNA1 y sgRNA2, el segmento en letras minúsculas hacia 5'- representa la secuencia común del promotor T7, mientras que el segmento en 3'- corresponde a la porción común que hibridará con la región 3'- del Primer "tail" (segmento en minúsculas).

III.IV- Extracción de proteínas

Las extracciones de proteínas se realizaron de acuerdo a protocolos estándar. Brevemente, los embriones fueron desvitelinizados en PBS 70% mantenido en hielo y colocados en buffer de lisis (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, Tritón 0,5%; suplementado antes de usar con PMSF 0,2 mM, Cocktail de inhibidor de proteasas 1/10000 y EDTA 25 mM, concentraciones finales). A continuación las muestras fueron homogeneizadas e incubadas en hielo durante 5 min; luego, se sometieron a centrifugación durante 5 min a 20.000 g y se recuperó el sobrenadante, que fue almacenado a -20 °C hasta su uso. Según la edad de los embriones, se ajustó el número de individuos que conformaron el *pool* y la cantidad de buffer de lisis utilizada (Tabla 2).

La concentración de los extractos proteicos fue estimada mediante el método de Bradford o, alternativamente, por medidas en fluorómetro Qubit utilizando el kit comercial Qubit™ Protein Assay (Invitrogen).

Edad	N° de embriones en el <i>pool</i>	Volumen Buffer de Lisis
16 hpf	100	50 µL
24 hpf	100	200 µL
48 hpf	80	200 µL
72 hpf	60	400 µL
5 dpf	50	400 µL

Tabla 2. Condiciones empleadas para la extracción de proteínas totales a partir de embriones en distintas etapas del desarrollo.

III.V- Electroforesis & Western Blot

Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 14%. La corrida electroforética se realizó en buffer Tris 25 mM - Glicina 200 mM – SDS 0,1%, pH 8,3 a 100 V. A continuación, fueron transferidas a membrana de Nitrocelulosa (Bio-Rad, Cat.# 162-0115) por electrotransferencia a 300 mA durante 1 hora 30 min, en refrigeración; se empleó un buffer Tris 25 mM - Glicina 200 mM – Etanol 20%. La transferencia y la calidad de las proteínas fue verificada por tinción de las membranas con rojo Ponceau (0,5% Ponceau S en 1% ácido acético) y el bloqueo de uniones inespecíficas se llevó a cabo mediante incubación en TBS-Leche descremada 5%. Las membranas fueron luego incubadas con los correspondientes anticuerpos, ajustando las condiciones en forma particular para cada uno de ellos, tal como se resume en la Tabla 3. Todos los lavados fueron realizados con TBS (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5) o TBS-Tween 0,1%.

Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a HRP y la señal fue revelada por quimioluminiscencia (Novex™ ECL Chemiluminiscent Substrate Reagent Kit, Invitrogen) en placa radiográfica. En el caso de comparación de la expresión entre distintas etapas del desarrollo, la señal de interés fue normalizada respecto al carril entero observado tras la tinción con Ponceau. Se procedió de esta manera a raíz de ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio y de evidencias encontradas en la literatura, que muestran que la mayoría de las proteínas usualmente utilizadas como normalizadoras varían su expresión a lo largo del desarrollo embrionario y no son adecuadas para la corrección en este tipo de ensayos (McCurley & Callard, 2008; Aldridge et al., 2008 y Romero-Calvo et al., 2010). En aquellos casos en los cuales se pretendía comparar distintas condiciones de una misma edad (esto es, comparaciones *wild type* vs. mutantes para *higd1a*), se intentó utilizar como control de carga algunas de las clásicas proteínas que se usan a estos efectos, en particular, β -Actina, β -Tubulina y GAPDH. No obstante, al compararlas con las proteínas totales observadas con Ponceau, y teniendo como referencia la cantidad estimada que había sido cargada en el gel, resultó evidente que dichas proteínas no resultaban buenos normalizadores; en particular, debido a que consistentemente

las proteínas del citoesqueleto parecían hallarse disminuidas en los extractos de individuos de 5 dpf mutantes para *higd1a*, mientras que GAPDH presentó una señal de dos o tres bandas cercanas en migración, que no resultaban siempre parejas en la comparación *wild type* vs. mutantes (Fig. 8). Por tales motivos, la normalización en estos casos se realizó nuevamente con respecto a la tinción con Ponceau, ya sea utilizando el carril entero o seleccionando bandas representativas.

En todos los ensayos, la cuantificación de la señal luminiscente se realizó con el programa ImageJ (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012).

Anticuerpo	Concentración	Condiciones de Incubación	Condiciones de Bloqueo
Anti-Higd1a, Rabbit Polyclonal (Genscript)	1/4000	1 hora 30 min, TA	Overnight, 4 °C
Anti-γ-H2AX, Rabbit Polyclonal (AbFrontier)	1/2000	Overnight, 4 °C	1 hora, TA
Anti-β-Actina, Rabbit Polyclonal (Sigma)	1/6000	1 hora, TA	1 hora, TA
Anti-β-Tubulina, Mouse Monoclonal	1/12000	1 hora, TA	1 hora, TA
Anti-GAPDH, Rabbit Polyclonal	1/4000	2 horas, TA	1 hora, TA
IgG Anti-Rabbit HRP (Sigma)	1/10000 Anti-Higd1a; 1/7000 otros anticuerpos primarios	1 hora, TA	-
IgG Anti-Mouse HRP (Invitrogen)	1/7000	1 hora, TA	-

Tabla 3. Anticuerpos y condiciones empleadas en ensayos de western blot.

III.VI- Inmunofluorescencia

Los embriones fueron previamente tratados con Feniltiourea (PTU) para inhibir el desarrollo de pigmentación y facilitar la visualización. La adición de PTU al medio se realiza antes de las 24 hpf, utilizándose una concentración final de 0,003%. Los embriones fueron crecidos hasta la edad de interés y fijados con Paraformaldehído 4% a 4 °C, O.N.

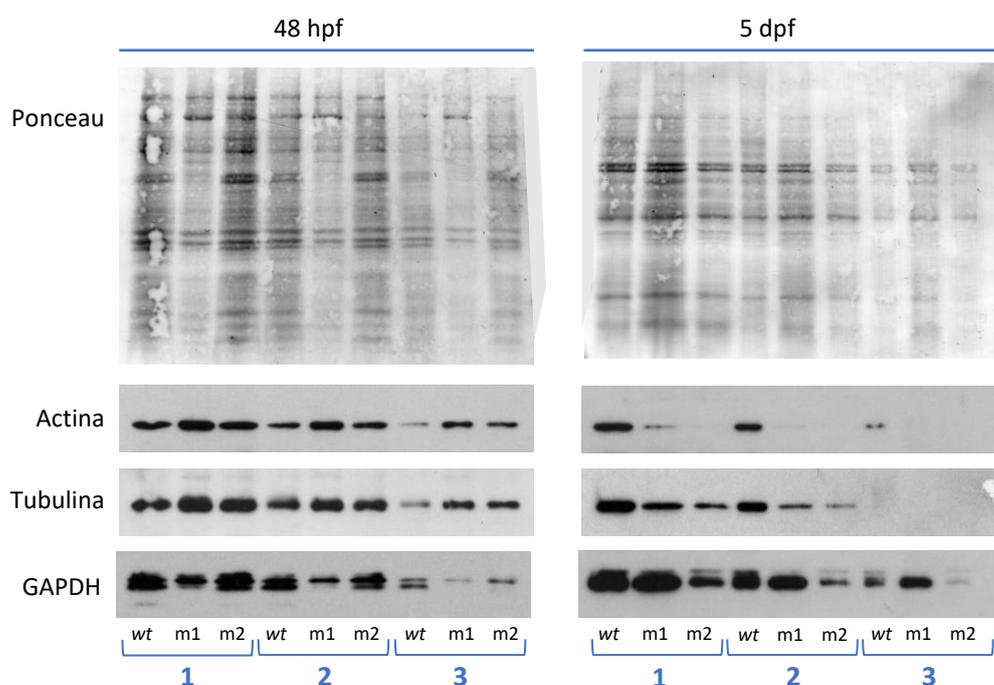


Figura 8. Evaluación de GAPDH y proteínas del citoesqueleto como normalizadores en ensayos de western blot. Se partió de muestras proteicas de embriones de 48 hpf y 5 dpf de los siguientes grupos experimentales: *wild type* (wt), mutación 1 (m1) y mutación 2 (m2) (ver más adelante, IV.III.I), siguiendo el orden de carga de izquierda a derecha. Se sembraron tres concentraciones proteicas de cada condición, preparando diluciones seriadas al medio; 1, 2, y 3 corresponden aproximadamente a 48, 24 y 12 μ g de proteína, respectivamente.

Todos los ensayos fueron realizados *in toto*, siguiendo un protocolo estándar. Brevemente, los embriones fueron lavados en PBS 1X-Tritón 1% (PBS-T; 3 lavados de 5 min) y permeabilizados incubando con 0,25 % Tripsina-EDTA en hielo. A continuación, se realizó el bloqueo incubando en PBS 1X - Tritón 1% - BSA 0,1% (PBS-T-BSA; 3 lavados de 15 min). Las incubaciones con anticuerpos primarios y secundarios se realizaron a 4 °C, O.N., y los lavados posteriores se llevaron a cabo a temperatura ambiente en PBS-T-BSA o PBS-T. Los embriones fueron luego montados en Glicerol 50% - Agarosa 1,5% - Tris 0,1 M pH 8,0.

Los anticuerpos primarios anti-Higd1a y anti-Zn5 (Trevarrow, Marks & Kimmel, 1990) se utilizaron a una concentración 1/1500 y 1/100, respectivamente. Se usaron anticuerpos secundarios conjugados a diferentes fluoróforos: Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 y Alexa Fluor 647, todos a una concentración 1/1000. La tinción de los núcleos se realizó en simultáneo con la incubación del anticuerpo secundario, incluyendo verde de metilo en una dilución 1/5000 (a partir de stock 2%); este colorante se une de manera no-intercalante al surco mayor del ADN y posee un pico de emisión de fluorescencia hacia el rojo lejano ($\lambda = 677$) (Prieto et al., 2014). Alternativamente, se realizó tinción con DAPI a una concentración 1/1000. Para la visualización de actina, se adicionó a la solución de anticuerpo secundario Faloidina-TRITC en una concentración final 1/2000.

III.VII- Marcaje retrógrado de neuronas retículo-espinales

La identificación de las células de Mauthner se llevó a cabo en larvas de 4 dpf por tinción retrógrada con Dextrano-Rodamina 5%, en base al protocolo descrito por Moens et al., 1996.

III.VIII- Tinción de cartílagos cráneo-faciales

Se llevó a cabo con el colorante Alcian Blue, según protocolos ya descritos (Neuhauss et al., 1996; Kimmel et al., 1998; Barrallo-Gimeno et al., 2004), con ligeras modificaciones.

Embriones de 5 dpf fueron fijados y teñidos O.N. con una solución de Alcian Blue 0,1% - Etanol 70% - Ác. Clorhídrico 1%. Posteriormente se realizaron 4 lavados con Etanol 70% - Ác. Clorhídrico 5% y se incubaron los embriones en esa misma solución durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, fueron rehidratados incubándolos durante 5 min en una serie de soluciones decrecientes Etanol - Ác. Clorhídrico/Agua destilada, como sigue:

- 75%/25% HCl-EtOH/H₂O
- 50%/50% HCl-EtOH/H₂O
- 25%/75% HCl-EtOH/H₂O
- 100% H₂O.

Los embriones fueron guardados hasta su observación en Glicerol 50% - KOH 0,5% a 4 °C.

III.IX- Pruebas comportamentales

El comportamiento de larvas de 7 dpf de los distintos grupos experimentales fue analizado siguiendo procedimientos publicados por Nery et al., 2014; 2017, con algunas variaciones. Brevemente, las larvas fueron colocadas individualmente en placa de 24 pocillos conteniendo 2 mL de agua del sistema. Tras 1 minuto de aclimatación, se registró el comportamiento de los animales durante una sesión de 5 min. Los videos fueron adquiridos con una cámara digital Nikon D5200 y procesados con la aplicación de libre acceso *ToxTrac* (Rodríguez et al., 2018). Se estimaron algunos parámetros representativos del comportamiento motor, como la velocidad promedio con que se movían los animales, la distancia total recorrida durante el tiempo del ensayo, la tasa de motilidad (definida como la frecuencia con que la velocidad instantánea supera un determinado valor umbral) y la tasa de exploración (definida en base a la subdivisión del pocillo -o arena- en sub-zonas y calculada como la frecuencia de las detecciones en cada una de esas sub-zonas). Las larvas fueron genotipadas luego de realizar el ensayo.

III.X- Ensayos de hipoxia

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en una cámara hipóxica C-Chamber BioSpherix acoplada a un controlador de oxígeno ProOx 28 °C P110 que fue instalada dentro de estufa refrigerada con temperaturas fijadas en 27 °C o 28 °C.

Para el diseño de los experimentos se tomó como base lo reportado previamente por Padilla & Roth, 2001; Mendelsohn et al., 2008 y Manchenkov et al., 2015, introduciendo algunas variaciones.

Los ensayos para determinar cambios en la expresión de *higd1a* en respuesta a hipoxia se realizaron conectando la cámara a un tanque con una mezcla de gases aire:N₂ de 20:80, lo que resultó en una atmósfera con 0,9 % O₂ (aproximadamente 1,2 mg/L de O₂ disuelto). Se colocaron embriones *wild type* en la etapa de escudo (aproximadamente 6 hpf) y se incubaron durante 3 (n = 40 embriones) o 16 horas (n = 25 embriones) a 28 °C. Una vez cumplidos los tiempos los embriones fueron procesados para extracción de ARN.

Los experimentos para evaluar posibles cambios en la tolerancia a bajos niveles de oxígeno de embriones mutantes para *higd1a* se llevaron a cabo en condiciones de anoxia, conectando a la cámara un tanque con 100% N₂. A fin de comparar la respuesta de individuos portadores de dos mutaciones diferentes para *higd1a* (mutaciones 1 y 2), se utilizaron las progenies provenientes de tres tipos de cruzamientos: *wild type* x *wild type*, heterocigotas mut1 x heterocigotas mut1 y heterocigotas mut2 x heterocigotas mut2. Al momento de ingresar en la cámara los embriones se encontraban en etapa de 24 hpf y fueron incubados durante 3 (n = 40 por cada grupo experimental) y 16 horas (n = 40 por cada grupo experimental) a 27 °C. Transcurridos los tiempos correspondientes, los embriones fueron retornados a ambiente normóxico y monitoreados durante las siguientes 72 horas para evaluar la sobrevivencia y posibles efectos aparentes en el desarrollo.

III.XI- Extracciones de ARN y RT-PCR cuantitativa

Las extracciones de ARN se realizaron con el kit comercial Aurum™ Total RNA Mini Kit, BioRad de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Los ARN resultantes se cuantificaron por espectrofotometría (absorción a $\lambda = 260$ nm) con un equipo NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) y se verificó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Las muestras fueron mantenidas a -80 °C hasta su uso.

Para las reacciones de retrotranscripción se utilizó la enzima M-MuLV, New England BioLabs siguiendo las instrucciones propuestas por el fabricante. En todos los casos se incluyó 1 µg de ARN molde y como cebadores se usó una mezcla de Oligo (dT) y Random hexamers en una proporción 1:1. El ADNc se almacenó a -20 °C hasta ser utilizado.

Para determinar el curso temporal de acción del morfolino, embriones *wild type* inyectados con morfolino o no inyectados (control) se incubaron hasta las etapas de 4 hpf (n = 45), 24 hpf (n = 20) y 48 hpf (n = 17), tras lo cual se procedió con la extracción de ARN y retrotranscripción como se describió arriba. Una vez confirmada la calidad de los ADNc por PCR a tiempo a final y electroforesis en gel de poliacrilamida, se llevaron a cabo los ensayos de PCR en tiempo real usando el kit KAPA™ SYBR® FAST. Se prepararon reacciones de 20 µL usando como molde 2 µL de dilución 1/5 de cDNA. Se amplificaron los genes *higd1a* y *ef1a* (normalizador), incluyendo 3 réplicas técnicas de cada muestra y blancos (sin molde) por duplicado para cada gen. El ciclo utilizado fue el siguiente: Pre-desnaturalización a 95 °C, 5 min; Desnaturalización a 95 °C, 30 seg; Hibridación a 56 °C, 45 seg y Extensión a 72 °C, 30 seg (40 repeticiones). La eficiencia de los

cebadores utilizados ya había sido previamente determinada en estas mismas condiciones, resultando en 107% y 86% para *higd1a* y *ef1a* respectivamente (Sosa, I., 2014).

En los experimentos de cuantificación de *higd1a* en respuesta a hipoxia se utilizó el kit SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX, Bioline. En primer lugar se construyeron curvas estándar para cada uno de los genes (*higd1a*, *egln3*, *ef1a* y *l13a*) a partir de una mezcla de ADNc de todas las condiciones experimentales y diluciones seriadas de dicha mezcla (1 – 1/512). Se graficó C_T promedio vs. logaritmo de la dilución, y se calculó la eficiencia de cada par de cebadores como $E = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1$. A raíz de los resultados obtenidos en las curvas estándar, se optó por trabajar con una dilución 1/8; se prepararon reacciones de 15 μ L con 2 μ L de ADNc molde y se incluyeron dos réplicas técnicas de cada muestra. El ciclado utilizado fue el siguiente: Pre-desnaturalización a 95 °C, 2 min; Desnaturalización a 95 °C, 15 seg; Hibridación a 57 °C, 15 seg y Extensión a 72 °C, 30 seg (40 repeticiones).

Todas las amplificaciones de PCR cuantitativa fueron realizadas en un equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System y las curvas de desnaturalización fueron analizadas para comprobar la especificidad de los productos y la ausencia de contaminación.

III.XII- Imágenes

Las imágenes de fluorescencia fueron adquiridas en Microscopio Confocal Leica TCS-SP5 o en Microscopio Confocal Zeiss LSM 800.

Las imágenes de embriones teñidos con Alcian Blue y de embriones sin teñir fueron tomadas bajo un microscopio estereoscópico Nikon SMZ-800 con iluminación diascópica y equipado con una cámara digital Canon T3i.

Todas las imágenes fueron procesadas con la versión Fiji del programa ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>; Schindelin et al., 2012).

III.XIII- Análisis estadísticos

En los ensayos de cuantificación de expresión de proteínas, comparación de medidas de cartílagos cráneo-faciales y comparación de los estimadores comportamentales se aplicó ANOVA no-pareado de comparaciones múltiples, incorporando corrección de Tukey. Se utilizó un nivel de confianza de 95% (p valor < 0,05 [*]; p valor < 0,01 [**]; p valor < 0,001 [***]).

Para las medidas de cartílagos y las variables de comportamiento se implementó previamente un test de identificación de *outliers* dentro de cada set de datos utilizando el método de Rout. Los puntos identificados como *outliers* no fueron incluidos para la aplicación de ANOVA. Todos estos análisis fueron realizados con el programa GraphPad Prism 7.

Adicionalmente, en el caso de las medidas de cartílagos cráneo-faciales, se implementó un análisis de componentes principales (PCA) en el paquete R. A través de este análisis se determina la combinación lineal de variables originales que maximiza la varianza entre los distintos

conjuntos de datos (componente principal); su ventaja radica en que es de carácter multidimensional y permite visualizar la información para diferentes variables contenida dentro de cada individuo. Previo a la implementación de PCA, las variables fueron estandarizadas a fin de evitar que prevalezcan aquellas variables cuya escala numérica sea mayor (y, por consiguiente, su varianza también sea mayor). Esto se realizó transformando cada valor x en un valor z con la operación:

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

Donde μ es la media de cada variable incluyendo los valores de todos los grupos experimentales y σ es el desvío estándar de ese conjunto de datos.

Los datos correspondientes a experimentos de PCR en tiempo real se analizaron con la hoja de cálculo REST-MCS©. La cuantificación mediante esta herramienta se basa en el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001):

$$\text{Nivel de expresión} = \frac{E_{gen\ blanco} \Delta Ct\ blanco\ (muestra\ referencia-muestra\ problema)}{E_{gen\ normalizador} \Delta Ct\ norm\ (muestra\ referencia-muestra\ problema)}$$

Donde E es la eficiencia de amplificación del juego de cebadores y C_T el ciclo de amplificación en el cual la intensidad de fluorescencia atraviesa el valor umbral.

El análisis estadístico se realizó aplicando un test de permutación o randomización, que no asume una distribución en particular para los datos. El test se basa en la reasignación aleatoria de los datos y en el cálculo de la expresión relativa para cada una de estas reasignaciones. El valor p para cada muestra se obtiene a partir de la comparación entre el cambio en la expresión observado y el calculado para las reasignaciones. Si es baja la proporción de reasignaciones que arroja un cambio de expresión mayor -en términos absolutos- al observado, se considera significativo el cambio de expresión observado (Pfaffl, Horgan & Dempfle, 2002). Se utilizó un nivel de confianza de 95% para determinar diferencias significativas en la expresión de las muestras problema respecto a la muestra tomada como referencia.

IV. RESULTADOS

IV.1- Expresión temprana de genes de la familia *hig* en el desarrollo del pez cebra

Recientemente, han sido publicados estudios de transcriptómica de una sola célula (*single-cell RNAseq*), cuyo objetivo es reconstruir las “trayectorias transcripcionales” que subyacen a la determinación de linajes durante la embriogénesis del pez cebra (Wagner et al, 2018; Farrell et al., 2018).

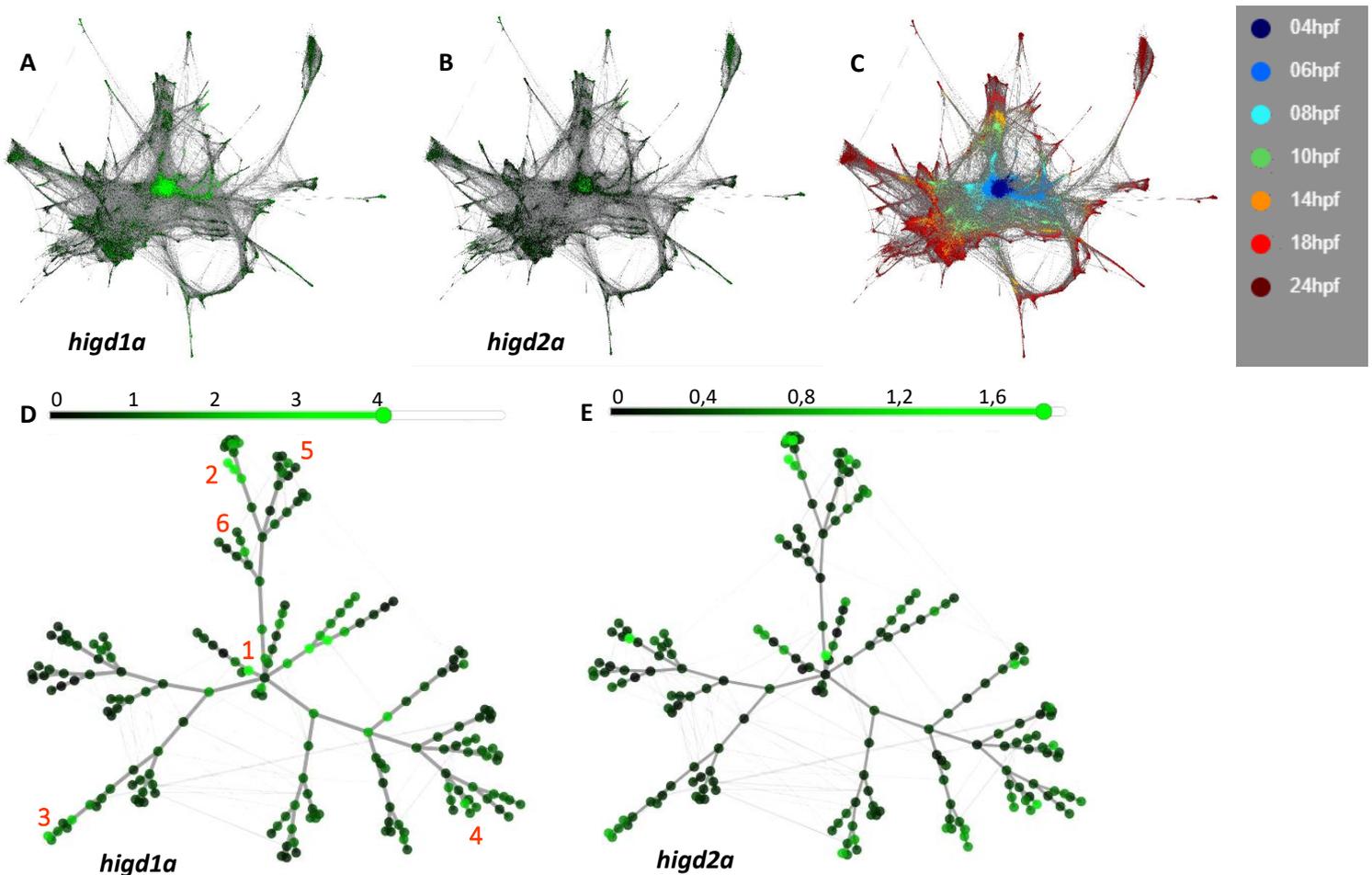


Figura 9. Expresión de *higd1a* y *higd2a* revelada por análisis de *single-cell RNA seq*. A-C. Gráficas “single-cell” que muestran la reconstrucción de todas las células individualmente, a lo largo de todos los tiempos relevantes. D, E. Modelado de “grano grueso” que consiste en una representación simplificada, formando *clusters* de células relacionadas. En etapas tempranas, *higd1a* muestra una expresión particularmente elevada en células de la EVL [1], mientras que en las etapas más avanzadas de la representación, los linajes que muestran la mayor expresión compartida por *higd1a* y *higd2a* son los de células de la epidermis [2], cresta neural [3], pronefros [4] y placodas óptica y ótica [5 y 6]. Datos construidos a partir de Wagner et al., 2018 - kleintools.hms.harvard.edu/paper_websites/wagner_zebrafish_timecourse2018/mainpage.html

Las bases de datos generadas por estos análisis pueden ser exploradas a través de herramientas interactivas, que permiten interrogar la expresión de distintos genes de interés en las primeras horas del desarrollo.

Al examinar la expresión de *higd1a* y *higd2a*, se observó que ambos presentan los mayores niveles en el inicio de la embriogénesis (Fig. 9.A-C). Los mapas de la Figura 9.D y E muestran *clusters* de células relacionadas y su conectividad; en ellos puede verse que ambos genes no comparten un mismo patrón de expresión, si bien parecen coincidir en algunos linajes celulares, principalmente el de las células epidérmicas, el de células de cresta neural y el de células del pronefros. Es de notar además, que la expresión de *higd1a* es en general bastante más alta que la de *higd2a*.

IV.II- Expresión de la proteína Higd1a a lo largo del desarrollo del pez cebra

IV.II.I- Diseño y caracterización del anticuerpo anti-Higd1a

Utilizando los servicios de la empresa Genscript, se diseñó y generó un anticuerpo específico contra Higd1a de pez cebra. De los tres posibles determinantes antigénicos propuestos por los fabricantes, se optó por aquel que comprendía el extremo C-terminal (Fig. 10.A) por encontrarse más expuesto y por ser la región que presenta más diferencia respecto a Higd1a de las posibles especies hospederas (Fig. 10.B), aumentando así la probabilidad de inducción de la respuesta inmune.

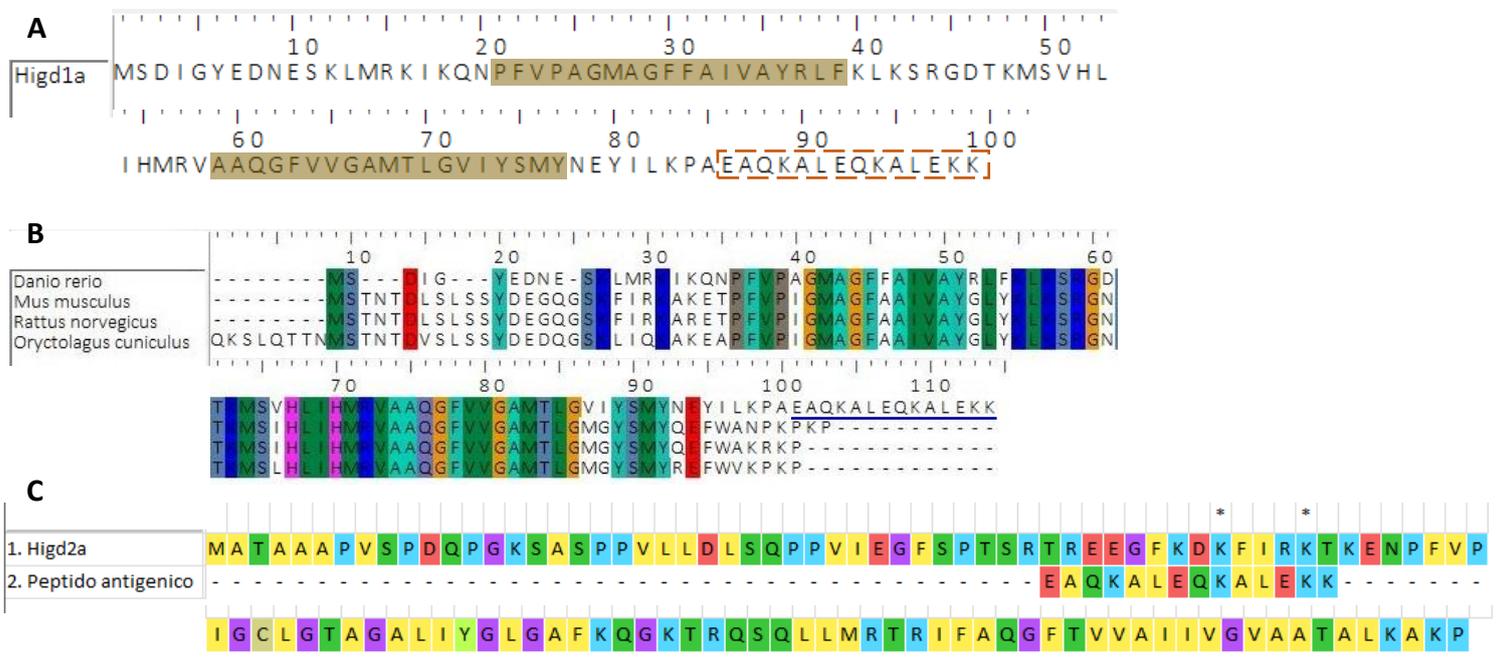


Figura 10. Elección de un determinante antigénico para la síntesis de un anticuerpo contra Higd1a de *Danio rerio*. **A.** Ubicación del epítipo seleccionado en la secuencia proteica de Higd1a (líneas punteadas); en marrón se señalan los dominios transmembrana. **B.** Alineamientos de Higd1a de pez cebra contra los homólogos de posibles especies hospederas; subrayado en azul se indica la porción de la proteína escogida para utilizar como región antigénica. **C.** El alineamiento del péptido contra la secuencia de Higd2a no arrojó homología significativa con ninguna región de esta proteína.

Como control para prevenir el reconocimiento inespecífico del anticuerpo, se realizó un BLASTP de la secuencia del péptido antigénico contra el genoma de *Danio rerio* en la base de datos *Ensembl*, el cual no arrojó homología significativa con otros blancos.

Adicionalmente, se llevó a cabo un alineamiento contra la secuencia proteica de Higd2a de pez cebra, para verificar más específicamente que no hubiese similitud con este segundo miembro de la familia. En efecto, la comparación no reveló semejanzas que alertaran sobre una posible reactividad cruzada (Fig. 10.C).

Una vez adquirido el anticuerpo, se intentó poner a punto su uso ensayando variaciones en la cantidad de proteína sembrada, la concentración de anticuerpos primario y secundario, el tiempo de incubación, tiempo de bloqueo, entre otras. Sin embargo, en ningún caso se logró la detección de una banda única del tamaño esperado. La aparición de bandas inespecíficas resultó estar asociada a la cantidad de proteína sembrada, encontrándose que una carga de 12 μg por carril pareció ser la mejor cantidad a utilizar (Fig. 11). El resto de las condiciones se detallan en la Tabla 3. El control con el suero pre-inmune provisto por el fabricante no arrojó detección de ninguna banda.

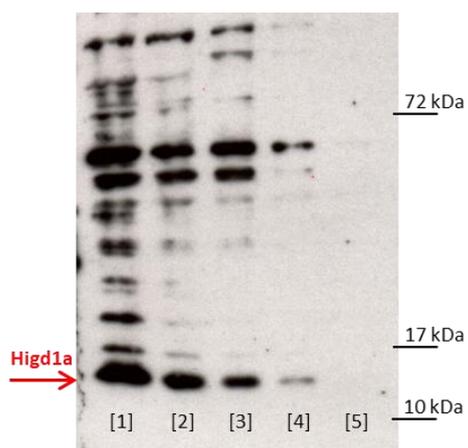


Figura 11. Caracterización de la detección con el anticuerpo anti-Higd1a en función de la carga de proteína sembrada. Se preparó una mezcla con las proteínas extraídas de embriones de distintas edades, a partir de la cual se realizó una serie de diluciones: 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a 48, 24, 12, 6 y 3 μg de proteína, respectivamente.

IV.II.II- Perfil temporal de expresión de la proteína Higd1a

Con el fin de comprobar si la expresión de Higd1a a nivel de proteína concuerda con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio para el ARNm del gen, se realizaron extracciones de proteína de embriones en distintas etapas del desarrollo que fueron utilizadas para electroforesis SDS-PAGE, seguida de western blot contra Higd1a. La cuantificación mostró que existe un importante aumento de la proteína entre las etapas de 24 y 48 hpf con respecto a las demás edades muestreadas (Fig. 12). Estos resultados son consistentes con lo observado anteriormente en ensayos de PCR cuantitativa, confirmándose el patrón de expresión de Higd1a en el curso del desarrollo del pez cebra.

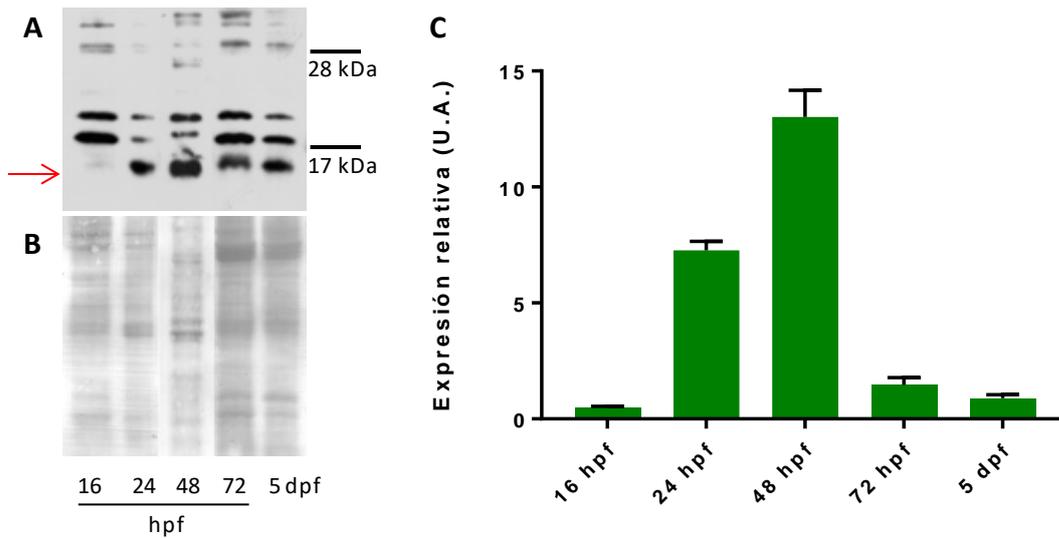


Figura 12. Niveles de Higd1a a lo largo del desarrollo del pez cebra. **A.** Western blot con el anticuerpo anti-Higd1a. La flecha roja señala la banda correspondiente a Higd1a. Las edades de 16 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf y 5 dpf corresponden a los estadios de 14 somites, prim 5 (*primordium*), long-pec (*pectoral fin*), protruding-mouth y larva temprana, respectivamente. **B.** Membrana teñida con rojo Ponceau. **C.** Cuantificación de los niveles de Higd1a detectados mediante western blot, utilizando la muestra de 5 dpf como referencia. Se muestra el promedio y el desvío estándar de dos ensayos, realizados con muestras provenientes de *pools* de embriones.

IV.II.III- Patrón espacial detectado con el anticuerpo anti-Higd1a

Los ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo generado contra Higd1a mostraron una señal intensa y bastante ubicua en embriones de 24 hpf, tanto en la región del tronco (Fig. 13.A, B) como en la región cefálica (Fig. 13.C, D). En etapas posteriores del desarrollo continuó observándose una señal ampliamente distribuida, con particular intensidad en el músculo y en algunas fibras y grupos neuronales (Fig. 13.E-J). A mayor aumento, se ve también que la fluorescencia es intensa en células de la epidermis y que no es homogénea, sino que se presenta en forma de partículas discretas (Fig. 13.K-M). De manera similar, en el tejido muscular puede apreciarse una señal discreta y con un patrón regular (Fig. 13.N-P), que podría asemejarse al arreglo ordenado y repetido espacialmente que adoptan las mitocondrias en el músculo esquelético (Vendelin et al., 2004). Aunque, por otra parte, algunas de las proteínas sarcoméricas también se organizan de manera similar. En particular, la proteína α -actinina se distribuye transversalmente a las fibras musculares en un arreglo regular y asociado a las líneas Z (Kim & Ingham, 2009; Gurung et al., 2017), que resulta semejante a la señal detectada con el anticuerpo anti-Higd1a.

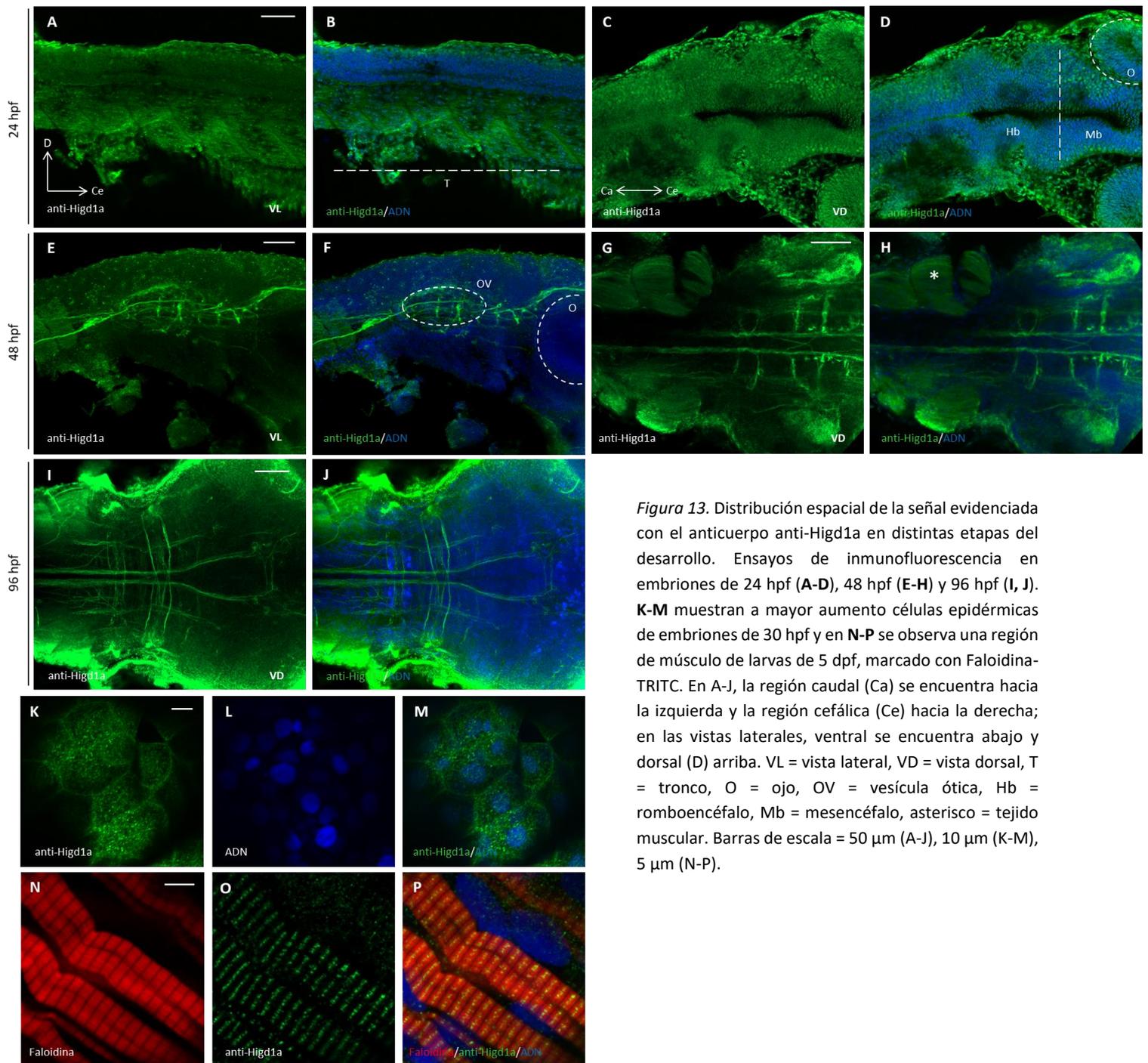


Figura 13. Distribución espacial de la señal evidenciada con el anticuerpo anti-Higd1a en distintas etapas del desarrollo. Ensayos de inmunofluorescencia en embriones de 24 hpf (A-D), 48 hpf (E-H) y 96 hpf (I, J). K-M muestran a mayor aumento células epidérmicas de embriones de 30 hpf y en N-P se observa una región de músculo de larvas de 5 dpf, marcado con Faloidina-TRITC. En A-J, la región caudal (Ca) se encuentra hacia la izquierda y la región cefálica (Ce) hacia la derecha; en las vistas laterales, ventral se encuentra abajo y dorsal (D) arriba. VL = vista lateral, VD = vista dorsal, T = tronco, O = ojo, OV = vesícula ótica, Hb = romboencéfalo, Mb = mesencéfalo, asterisco = tejido muscular. Barras de escala = 50 μ m (A-J), 10 μ m (K-M), 5 μ m (N-P).

A pesar de que en los ensayos de western blot no se pudieron alcanzar condiciones en que se observara una banda única del tamaño esperado, el patrón encontrado en los experimentos de inmunofluorescencia, vinculado con los antecedentes de la expresión del gen y de la proteína (localización mitocondrial, presencia en músculo, en varias áreas del sistema nervioso, etc), y sumando el hecho de que los ensayos fueron realizados con bajas concentraciones de anticuerpo anti-Higd1a, nos alentaron a pensar que la marca observada podía corresponder a una señal específica para la proteína Higd1a.

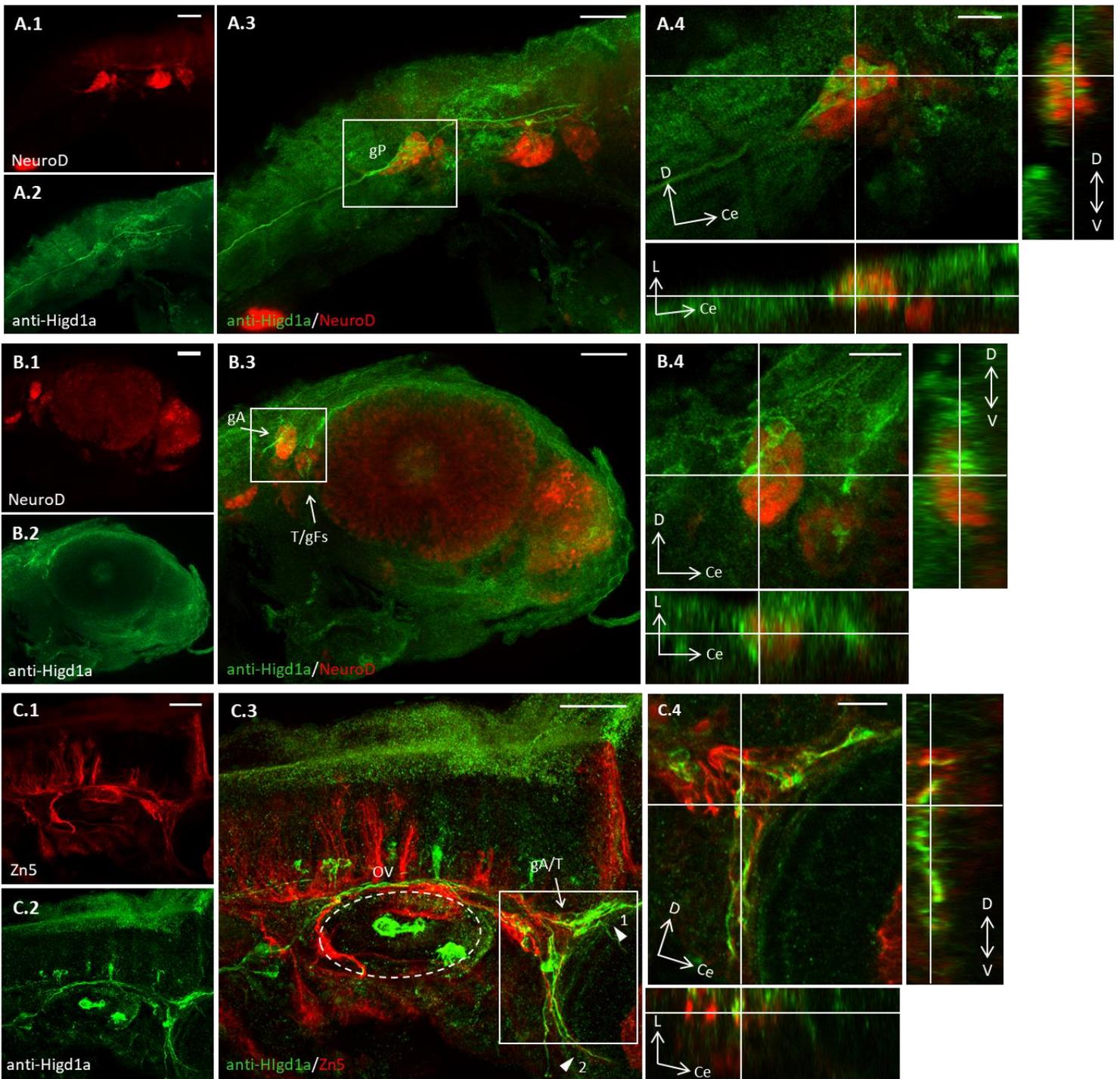


Figura 14. Búsqueda de co-localización de la señal del anticuerpo anti-Higd1a con distintos marcadores neurales. Ensayos de inmunofluorescencia en embriones de 48 hpf. En verde: señal del anticuerpo anti-Higd1a; rojo: señal de NeuroD o Zn5, especificado en cada caso. Todas las imágenes corresponden a vistas laterales, con la misma orientación: dorsal, hacia arriba; cefálico, hacia la derecha. A.4, B.4 y C.4 muestran a mayor aumento las áreas señaladas con recuadros y los cortes ortogonales de esas regiones. Ejes: D = dorsal, V = ventral, Ce = cefálico, L = lateral. Se señalan algunas regiones de interés: OV = vesícula ótica, gP = ganglio posterior de la línea lateral, gA = ganglio anterior de la línea lateral, T = trigémino, gFs = ganglio sensorial facial, las cabezas de flecha en C.3 indican la rama nerviosa oftálmica superior de gA y la rama dorso-lateral de T (1), y la rama bucal de gA (2). Barras de escala = 20 μ m (A.4, B.4 y C.4), 50 μ m (resto de las imágenes).

Utilizando anticuerpos específicos o líneas transgénicas que expresan diferentes marcadores neurales acoplados a proteínas fluorescentes, se intentó identificar los grupos celulares que presentaban mayor intensidad de señal en la inmunodetección con el anticuerpo anti-Higd1a

(Fig. 14). Se llevaron adelante ensayos con la línea *Sox10:GFP*, que permite marcar células de la cresta neural (Ver Anexo II), y con las líneas *Islet-1:GFP*, *HuC:GFP* (ver Anexo II) y *NeuroD:TagRFP* (Fig. 14.A, B), que se expresan en diferentes tipos neuronales; adicionalmente, se ensayó una posible co-marcación con el anticuerpo Zn5 (Fig. 14.C), también neuronal.

No se pudo establecer una correlación clara entre la señal de anti-Higd1a y la correspondiente a los marcadores ensayados, excepto en el caso de algunos *clusters* neuronales positivos para la señal de NeuroD (Fig. 14.A y B) y de algunas fibras nerviosas que rodean el ojo positivas para el anticuerpo Zn5 (Fig. 14.C). El gen *neuroD* codifica para un factor de transcripción que promueve la diferenciación neuronal temprana y se expresa en todas las placodas precursoras de los ganglios craneales (Mueller & Wullmann, 2002; Andermann et al., 2002). En particular, pudo apreciarse coincidencia con la señal del anticuerpo anti-Higd1a en el ganglio posterior de la línea lateral (Fig. 14.A.3, 4), así como también en el ganglio anterior de la línea lateral, el ganglio sensorial facial y el ganglio trigémino (Fig. 14.B.3, 4) (Raible & Kruse, 2000; Cox et al., 2011; Higashijima et al., 2000). Por su parte, el anticuerpo Zn5 marca grupos de neuronas y axones comisurales de los segmentos del cerebro posterior, así como algunas neuronas de los ganglios trigémino, antero-dorsal de la línea lateral y estatoacústico (Fig. 14.C.3, 4) (Trevarrow et al., 1990; Liu et al., 2011).

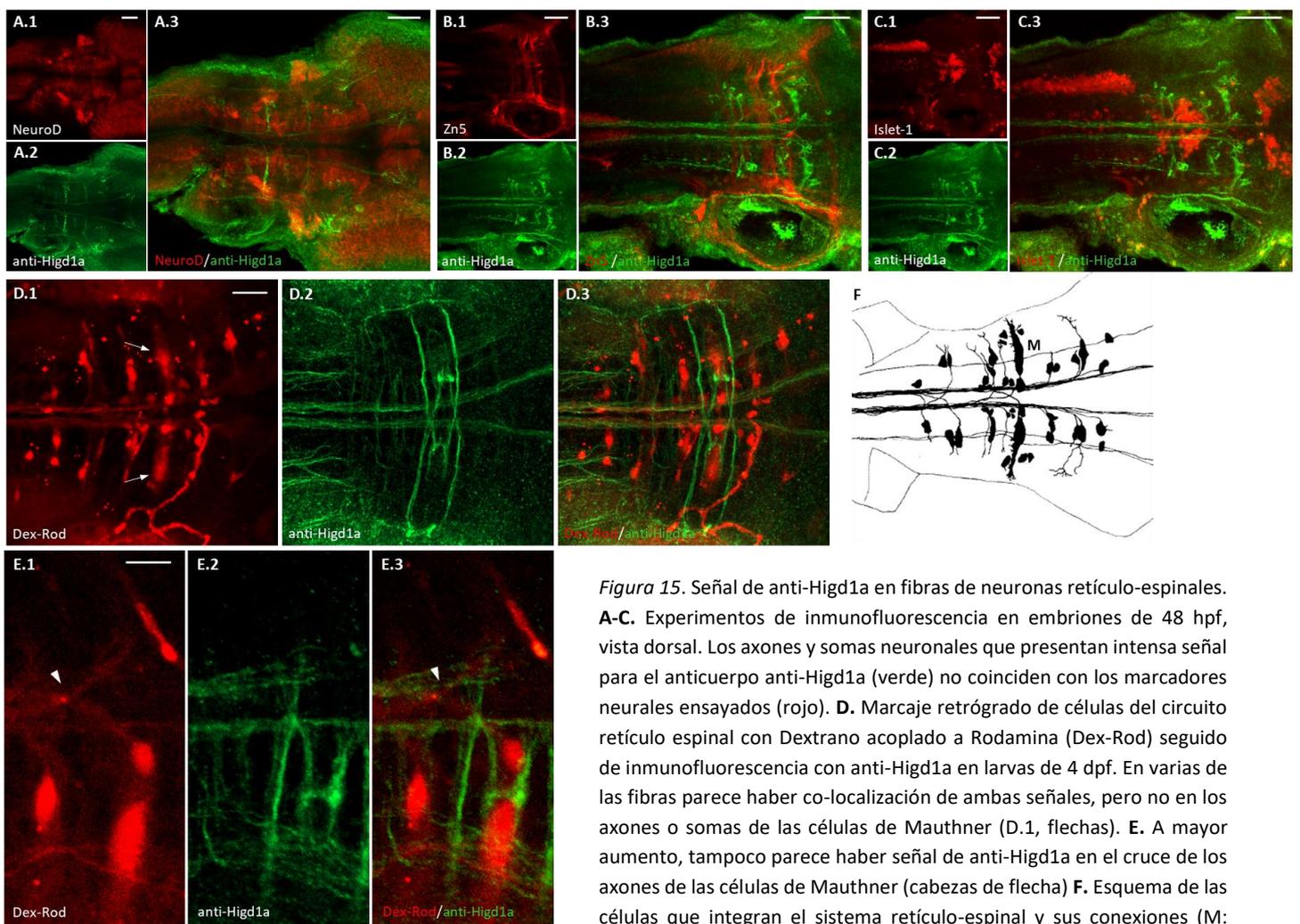


Figura 15. Señal de anti-Higd1a en fibras de neuronas retículo-espinales. **A-C.** Experimentos de inmunofluorescencia en embriones de 48 hpf, vista dorsal. Los axones y somas neuronales que presentan intensa señal para el anticuerpo anti-Higd1a (verde) no coinciden con los marcadores neurales ensayados (rojo). **D.** Marcaje retrógrado de células del circuito retículo espinal con Dextrano acoplado a Rodamina (Dex-Rod) seguido de inmunofluorescencia con anti-Higd1a en larvas de 4 dpf. En varias de las fibras parece haber co-localización de ambas señales, pero no en los axones o somas de las células de Mauthner (D.1, flechas). **E.** A mayor aumento, tampoco parece haber señal de anti-Higd1a en el cruce de los axones de las células de Mauthner (cabezas de flecha) **F.** Esquema de las células que integran el sistema retículo-espinal y sus conexiones (M: neuronas de Mauthner), *adaptado de Mendelson B., 1986.* Barras de escala = 40 μ m (A-C), 25 μ m (D), 10 μ m (E).

Desde una vista dorsal, puede observarse que hay algunas neuronas que presentan simetría bilateral y somas de gran tamaño, cuya señal no coincide con ninguna de las marcas (Fig. 15.A-C). Debido a la ubicación y morfología de estas células, se pensó que podrían tratarse de neuronas retículo-espinales, dentro de las que se encuentra el par de células de Mauthner (Mendelson 1986.I y II; Moens et al., 1996). Para verificarlo, se realizó una tinción retrógrada de embriones de 4 dpf con Dextrano acoplado a Rodamina y, posteriormente, inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-Higd1a. Los resultados revelaron que varias de las fibras con inmunorreactividad positiva para el anticuerpo parecen pertenecer a los fascículos de axones retículo-espinales; sin embargo, en el caso de las células de Mauthner, la marca es positiva para fibras que se encuentran en aposición con los somas pero no parece serlo para los axones de estas células (Fig. 15.D-F).

En síntesis, se observó una señal positiva para el anticuerpo anti-Higd1a en fibras del sistema retículo-espinal, indicio de que la proteína podría cumplir un rol en la coordinación motora.

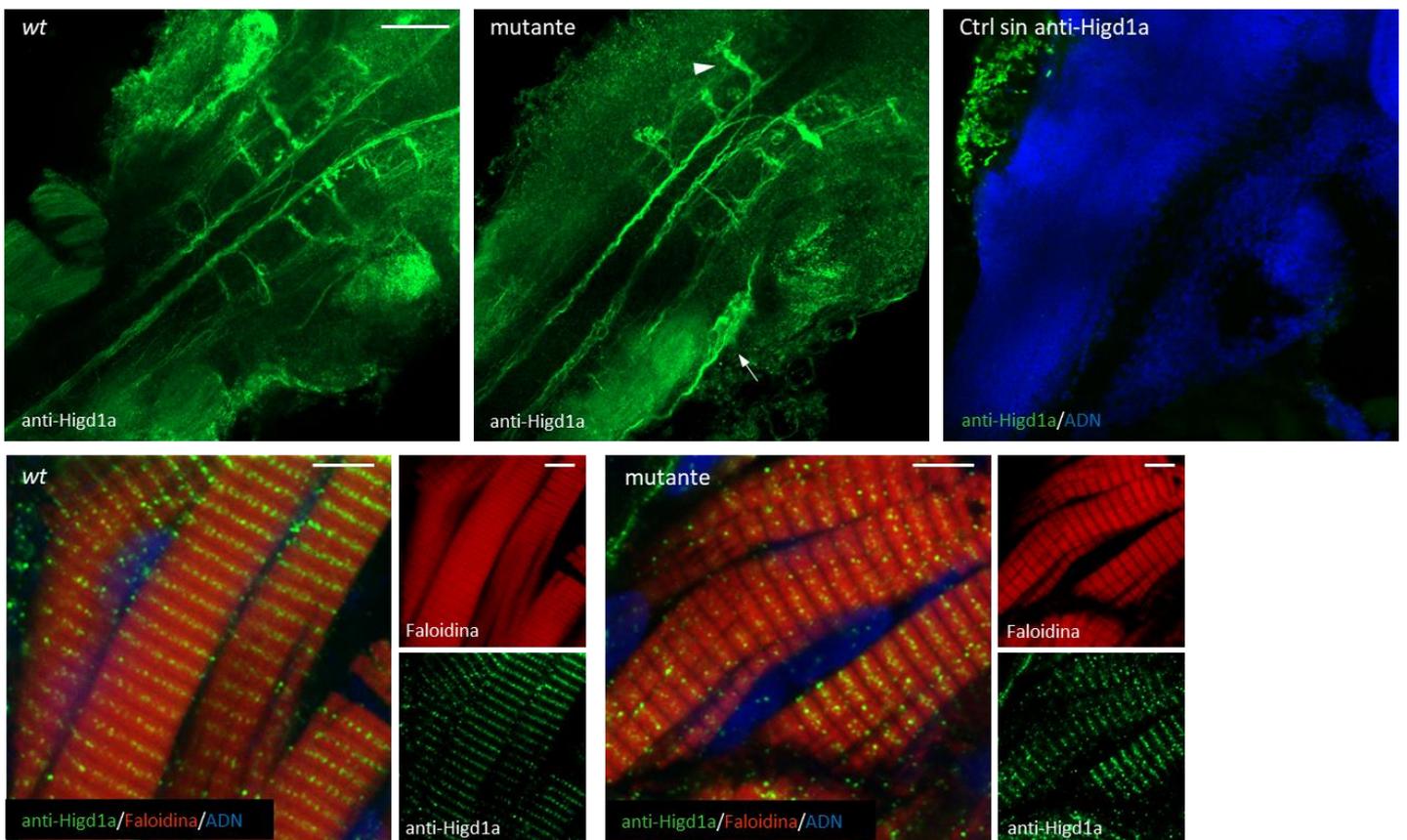


Figura 16. Inmunorreactividad del anticuerpo anti-Higd1a en individuos mutantes para *higd1a*. Ensayos de inmunofluorescencia realizados con embriones de 48 hpf (paneles superiores) y con larvas de 5 dpf (paneles inferiores). No existen diferencias apreciables en la intensidad o distribución de la señal mostrada por individuos homocigotas mutantes respecto de individuos salvajes (wt). Se evidencia señal positiva tanto en ganglios (flecha) y neuronas retículo-espinales (cabeza de flecha) como en el músculo (Faloidina-TRITC). Barras de escala = 50 μ m (paneles superiores), 5 μ m (paneles inferiores).

No obstante, una vez que se contó con individuos homocigotas mutantes para la proteína (ver secciones siguientes) se volvieron a realizar ensayos de inmunofluorescencia para comprobar que la señal observada efectivamente correspondiera a Higd1a. En los individuos homocigotas mutantes no se espera detección de señal, ya que la proteína se encontraría mutada a partir del aminoácido en la posición 34 y la región antigénica contra la que fue diseñado el anticuerpo abarca los últimos 14 aminoácidos. Sin embargo, embriones mutantes presentaron una señal indistinguible respecto de sus pares salvajes, tanto a las 24 hpf (no mostrado) y 48 hpf como a los 5 dpf. La distribución de dicha marca tampoco mostró diferencias apreciables entre individuos *wild type* y homocigotas mutantes, observándose con la misma intensidad en neuronas retículo-espinales, neuronas ganglionares y en el músculo (Fig. 16).

En definitiva, estos resultados condicionan y relativizan el patrón de distribución observado con el anticuerpo anti-Higd1a, imposibilitando establecer de manera certera la distribución de la proteína Higd1a en las diferentes etapas del desarrollo del pez cebra que fueron analizadas.

IV.III- Generación y caracterización de líneas knockout para *higd1a*

IV.III.I- Establecimiento de una línea knockout para *higd1a*

En primer lugar, fueron diseñadas dos moléculas de ARNs guía (sgRNA1 y sgRNA2). Como se mencionó en la sección III.III, se utilizaron dos herramientas informáticas de libre acceso y la búsqueda se realizó en base a la secuencia genómica de referencia para el gen *higd1a* (ID: ENSDARG0000022303). Ambos algoritmos fueron coincidentes en los resultados arrojados y se seleccionaron los dos sgRNAs que presentaron un mayor *score* de calidad y para los cuales no se detectó reconocimiento de blancos inespecíficos (Fig. 17.A). Cabe notar que, al tratarse Higd1a de una proteína bastante pequeña, no son muchas las opciones disponibles en cuanto a la selección de guías que cumplan las características óptimas (requerimiento de un motivo PAM en la secuencia de ADN, hacia 3' del sitio blanco de mutagénesis; elección de una región blanco que sea enriquecida en guaninas y empobrecida en adeninas; entre otros). Asimismo, fueron diseñados cebadores que abarcaran la región comprendida por ambos sgRNAs y resultaran apropiados para la detección de eventuales mutaciones (Fig. 17.B). En la Figura 17.C se diagrama el proceso general que fue seguido para establecer la línea *knockout*, apuntando a la obtención de una generación F₂ compuesta por individuos heterocigotas, todos ellos portadores de la misma mutación en la secuencia de *higd1a*.

Una vez adquiridos los oligonucleótidos que sirven como cebadores para generar el producto de ADN, a partir del cual se transcriben las moléculas de ARN guía (ver III.III.I), se procedió a la síntesis de ambos sgRNAs. Los productos de las reacciones de PCR y de las reacciones de transcripción *in vitro* fueron confirmados por electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose

bandas a la altura esperada (Fig. 18.A). Se obtuvo una concentración de 112,5 ng/μL y una concentración de 279,6 ng/μL para los sgRNA1 y sgRNA2, respectivamente. Se ensayó la inyección de distintas concentraciones de los sgRNAs contra *higd1a* y del ARNm de Cas9, definiendo las cantidades óptimas de trabajo como aquellas que produjeron una buena frecuencia de aparición de mutaciones sin aumentar la mortalidad de los individuos. Dichas cantidades consistieron en una mezcla de 25 pg sgRNA1 + 25 pg sgRNA2 + 150 pg Cas9, dentro de un volumen total de 2 nL; todas las inyecciones fueron realizadas en el citoplasma de embriones de una célula. Como era esperado, el genotipado de la F₀ reveló la presencia de varias mutaciones de tipo *indel* por individuo (mosaico), manifestándose en la electroforesis en gel de poliacrilamida como una serie de bandas con migración relativa similar (Fig. 18.B).

Una vez en edad reproductiva, los individuos de la F₀ que habían mostrado mutaciones somáticas fueron cruzados con animales *wild type*, y los embriones de esas progenies (F₁) fueron genotipados, con el fin de seleccionar parentales portadores de mutaciones en la línea germinal. Al tratarse de heterocigotas, los embriones que albergaban alguna mutación, presentaron dos bandas con una migración levemente distinta (productos muy cercanos en tamaño); asimismo, se visualizan bandas con una corrida electroforética más retrasada que representan las especies heterodúplex alelo *wild type*/alelo mutante (Fig. 18.C). Luego de confirmar y caracterizar las mutaciones por secuenciación, se seleccionó uno de estos individuos como parental para generar la F₁.

Cabe agregar que casi todas las mutaciones encontradas se trataron de pequeñas deleciones (entre 1 y 14 pb) y se ubicaron a nivel del sgRNA1, mientras que el sgRNA2 presentó una eficiencia prácticamente nula bajo las condiciones ensayadas. En la Figura 18.C se muestran, a modo de ejemplo, los alineamientos para dos de las mutaciones halladas en embriones F₁.

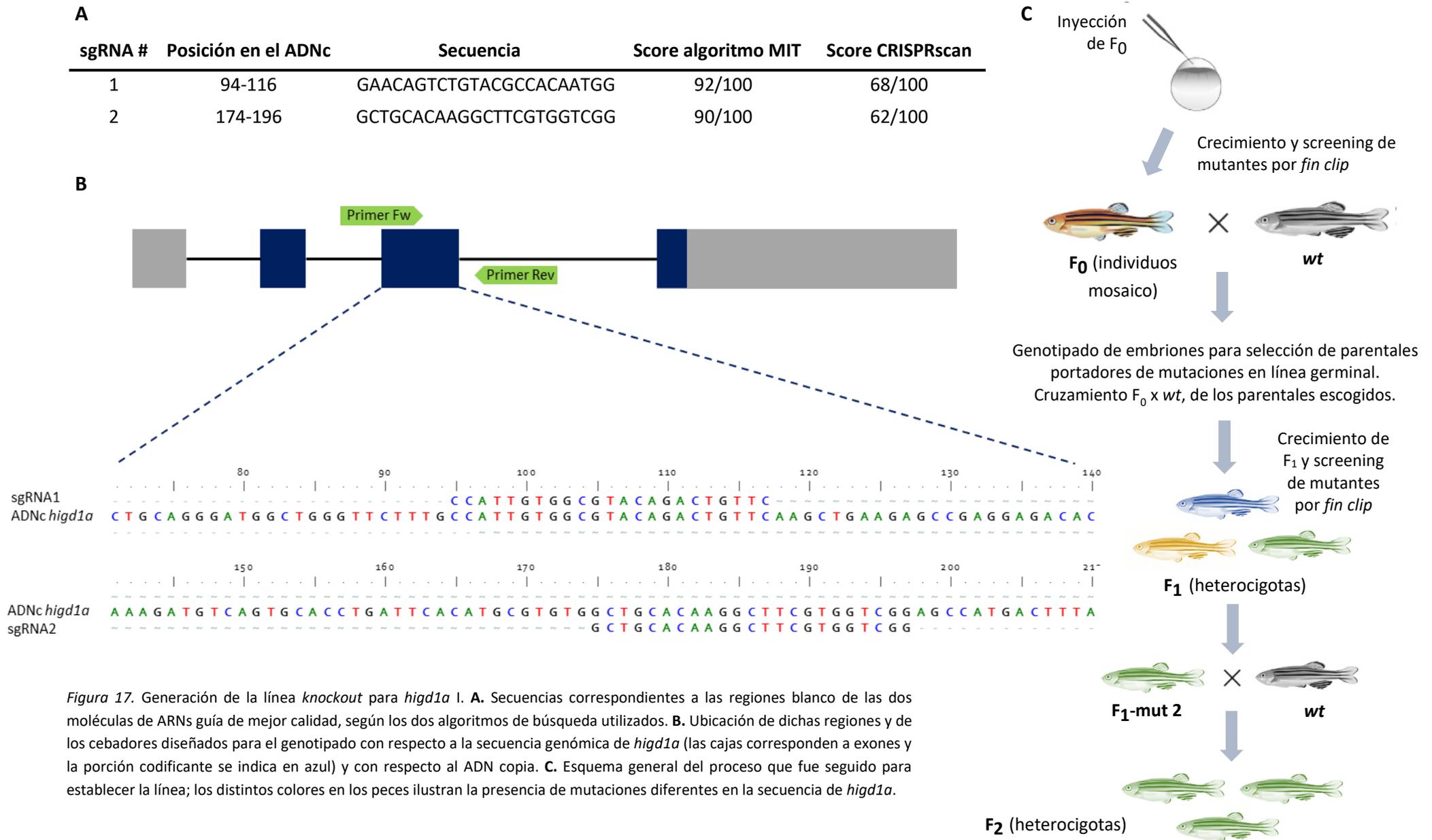


Figura 17. Generación de la línea *knockout* para *higd1a*. **A.** Secuencias correspondientes a las regiones blanco de las dos moléculas de ARNs guía de mejor calidad, según los dos algoritmos de búsqueda utilizados. **B.** Ubicación de dichas regiones y de los cebadores diseñados para el genotipado con respecto a la secuencia genómica de *higd1a* (las cajas corresponden a exones y la porción codificante se indica en azul) y con respecto al ADN copia. **C.** Esquema general del proceso que fue seguido para establecer la línea; los distintos colores en los peces ilustran la presencia de mutaciones diferentes en la secuencia de *higd1a*.

significativa en la abundancia del mismo antes de las 48 hpf, pero sí observando una disminución marcada a partir de esta etapa (Fig. 20.D).

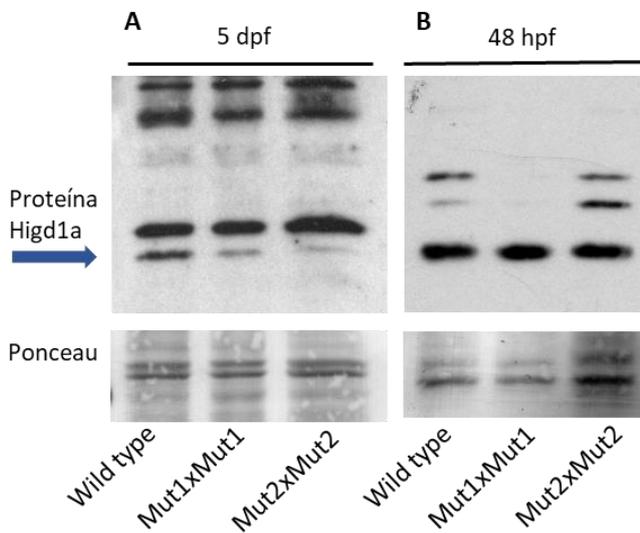
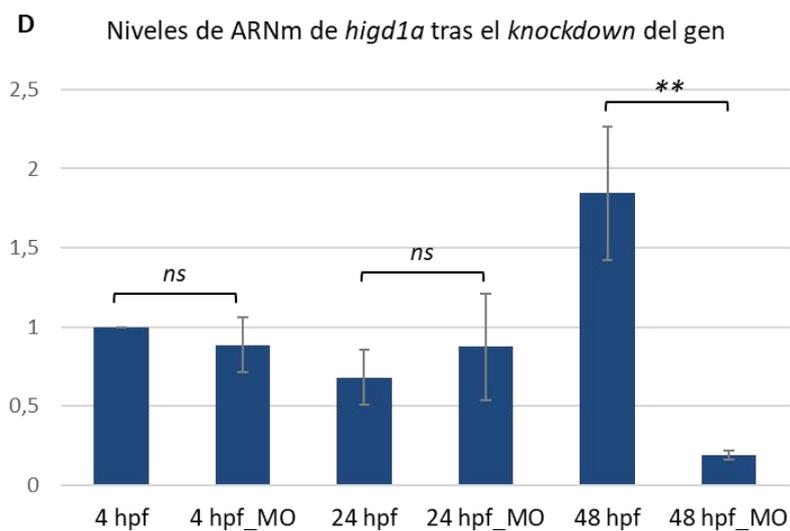
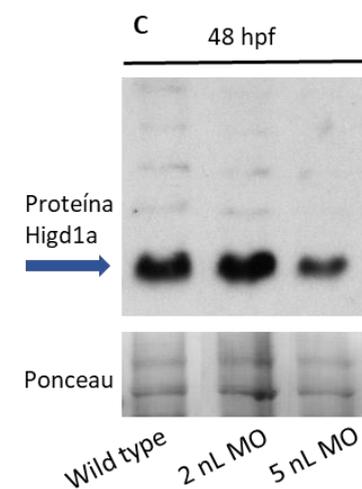


Figura 20. Evaluación de los niveles de Higd1a en individuos *knockout* y *knockdown* para el gen. **A.** Western blot de larvas de 5 dpf *wild type*, portadoras de la mut1 y portadoras de la mut2. **B.** Western blot de embriones de 48 hpf *wild type*, portadores de la mut1 y portadores de la mut2. **C.** Western blot de embriones de 48 hpf *wild type*, inyectados con 2 nL de MO contra *higd1a* e inyectados con 5 nL de MO contra *higd1a*. **D.** Cuantificación del ARNm de *higd1a* por PCR en tiempo real en embriones inyectados con 5 nL de MO contra *higd1a*. Se extrajeron muestras a tres tiempos: 4, 24 y 48 hpf y se compararon con muestras de embriones *wild type* de las mismas etapas; los niveles de ARNm fueron estandarizados usando la edad de 4 hpf como muestra de referencia. ** p = 0,001.



IV.IV- Análisis preliminar del fenotipo mutante

En términos generales, los animales portadores de mutación presentaron un desarrollo y crecimiento normales, y tampoco pareció verse afectada su capacidad reproductiva. No se detectó fenotipo aparente, exceptuando alteraciones en el nado de algunos embriones luego de los 4-5 dpf, manifestándose en movimientos algo más “bruscos y erráticos”. A fin de verificar esta observación, se llevaron a cabo pruebas comportamentales comparando la motilidad de individuos salvajes, heterocigotas y homocigotas para dos de las mutaciones.

Además, en función de los antecedentes de la literatura y de observaciones previas de nuestro equipo, se consideró relevante examinar algunos aspectos del desarrollo normal, como la

estructura de los cartílagos cefálicos, y la posible influencia de la ausencia de *Higd1a* en respuesta a estrés, en particular, estrés hipóxico.

*IV.IV.1- Efectos del knockout de *higd1a* sobre la capacidad motora*

Se evaluó la actividad locomotora de larvas de 7 dpf provenientes de dos cruces entre mutantes heterocigotas (incross), ya sea portadores de la mutación 1 o de la mutación 2. Se seleccionaron al azar larvas hijas de cada cruzamiento y se filmaron individualmente durante 5 minutos, tras lo cual fueron sacrificadas y genotipadas. Los videos fueron analizados con el programa ToxTrac, estimándose algunos parámetros representativos de la capacidad motora de los animales que se muestran en la Figura 21.

En el caso de la progenie portadora de la mutación 1, los animales homocigotas mutantes tendieron a mostrar una actividad motora exacerbada en comparación con sus hermanos *wild type*. Si bien las diferencias sólo resultaron significativas en lo que refiere a la tasa de motilidad ($p = 0,005$), el resto de los parámetros presentaron una tendencia en el mismo sentido, en algunos casos acercándose a la significancia estadística. De hecho, si no se toma en consideración el individuo homocigota mutante catalogado como *outlier* en las estimaciones de velocidad promedio y tasa de motilidad (y que corresponde al punto más bajo en las gráficas de distancia recorrida y tasa de exploración), el resultado de ANOVA para la variable de velocidad promedio arroja un p-valor de 0,12, y para la variable distancia recorrida un p-valor de 0,09. Al observar los individuos heterocigotas, se evidencia una mayor variabilidad en los datos, no obstante lo cual, también resultaron tener una tasa de motilidad significativamente mayor que la del grupo *wild type*.

Las larvas provenientes del cruzamiento que albergaba la mutación 2 mostraron una alta dispersión en las medidas, bastante mayor que la progenie portadora de la mutación 1. Como consecuencia, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los parámetros al comparar los diferentes grupos. Sin embargo, si se observan las medias de cada gráfica, puede verse que la tendencia es similar al caso anterior, con los individuos heterocigotas y homocigotas mutantes mostrando cierto sesgo hacia una actividad motora aumentada en relación a las larvas salvajes.

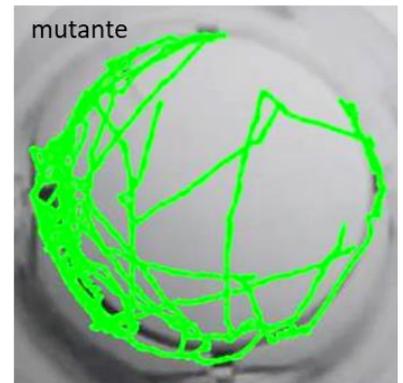
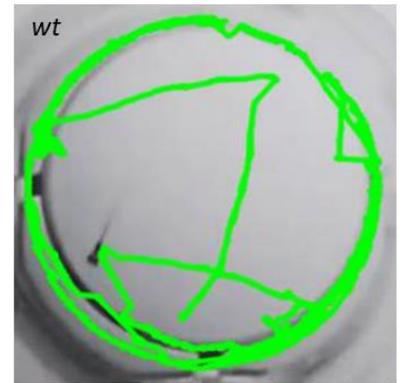
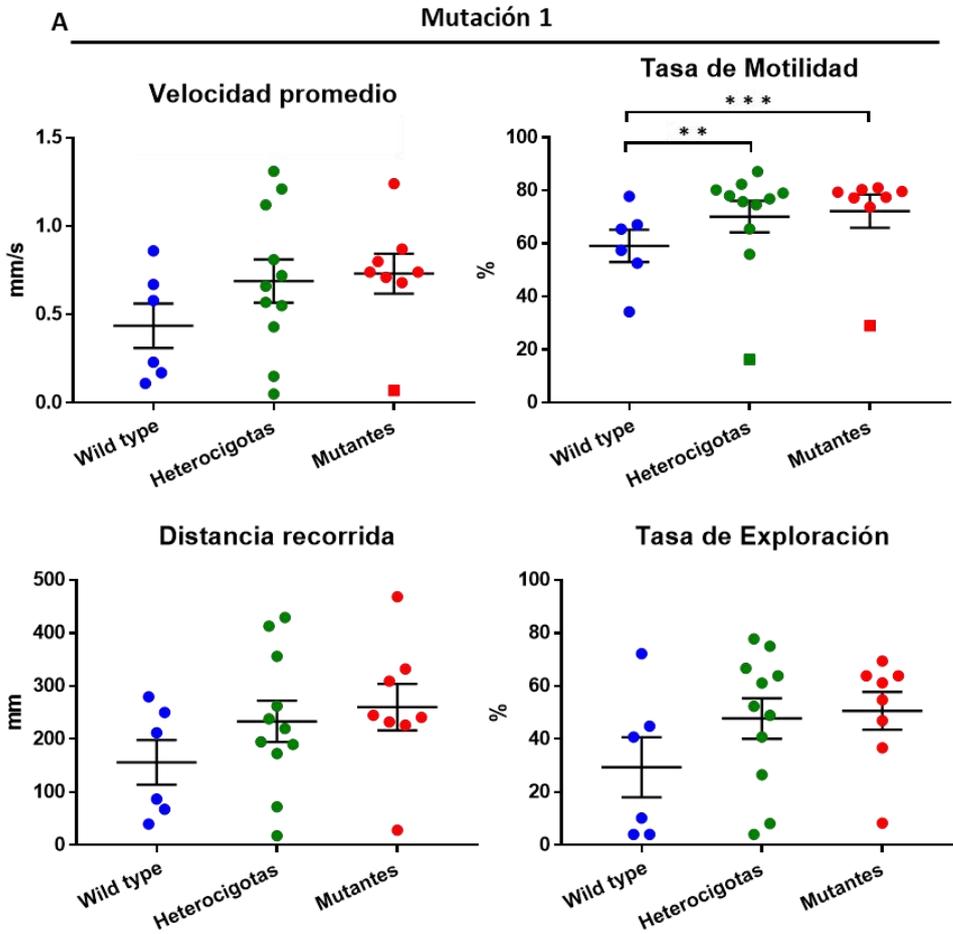
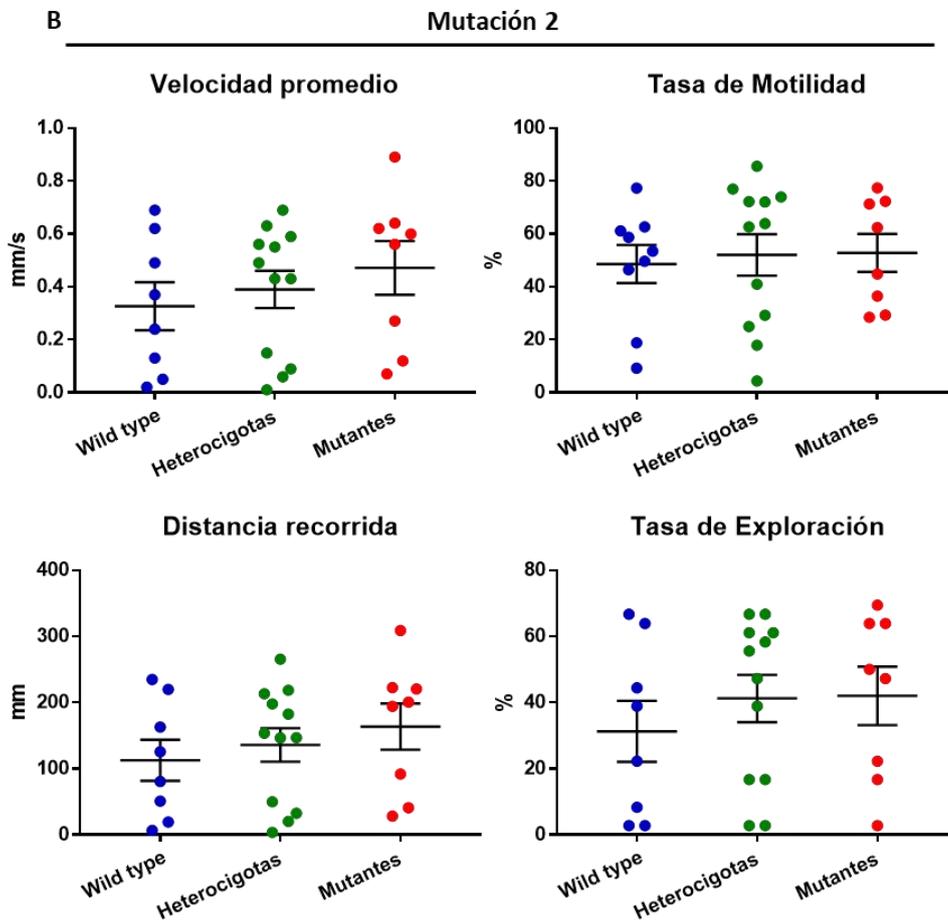


Figura 21. Evaluación de la capacidad motora de líneas mutantes para *higd1a*. Se realizó el *tracking* individual de larvas de 7 dpf a lo largo de sesiones de 5 min. A partir del análisis con el programa ToxTrac se cuantificaron distintos estimadores relativos a la motilidad de los individuos. Se muestra la comparación de los distintos estimadores entre hermanos *wild type*, heterocigotas y homocigotas mutantes, producto del cruce entre heterocigotas portadores de la mutación 1 para *higd1a* (A), o del cruce entre heterocigotas portadores de la mutación 2 para *higd1a* (B). En los gráficos se muestran los puntos correspondientes a cada individuo y la media del grupo \pm SEM. Los individuos representados con un cuadrado fueron catalogados como *outliers* dentro del set de datos y no fueron incluidos para el contraste con ANOVA. ** $p = 0,01$; *** $p = 0,005$.



*IV.IV.II- Efectos del knockout de *higd1a* sobre el desarrollo de cartílagos cráneo-faciales*

Con el objetivo de comprobar si las líneas mutantes para *higd1a* recapitulan las alteraciones morfológicas de los cartílagos cráneo-faciales que habían sido observadas previamente en embriones inyectados con morfolino (Sosa, I., 2014), larvas de 5 dpf provenientes de cruzamientos entre heterocigotas para la mutación 1 o la mutación 2 fueron genotipadas y teñidas con el colorante Alcian Blue. Se tomaron distintas medidas de los cartílagos de la cabeza, tal como se esquematiza en la Figura 22.A.1, y las mismas fueron comparadas entre los diferentes grupos experimentales.

En general, no se registraron diferencias notorias en los individuos mutantes, aunque tanto los homocigotas para la mutación 1 como para la mutación 2 presentaron una ligera tendencia a tener una mayor amplitud de los cartílagos ceratohiales (Fig. 22.A.2, B.2). A pesar de esto, los mutantes que albergan la mutación 2 mostraron una disminución del ancho craneal, que en el caso de los heterocigotas resultó estadísticamente significativa (Fig. 22.B.2).

Al realizar un análisis multivariado, graficando la combinación de las distintas medidas para cada uno de los individuos, puede observarse que en el caso de la mutación 1 los animales de los diferentes grupos experimentales se distribuyen en nubes con un importante grado de solapamiento (Fig. 22.A.3). En el caso de la mutación 2, si bien también existe superposición, los individuos homocigotas mutantes presentan una distribución algo distinta. Se evidencia una menor varianza intra-grupo para las variables ancho y largo craneal, y largo de los cartílagos palatocuadrados, a la vez que la diferenciación respecto a los otros dos conjuntos se maximiza en dirección de las variables ancho del cartílago etmoides y ángulo de los cartílagos ceratohiales (Fig. 22.B.3). Cabe notar que para el caso de la mutación 2 se contó con un número más bajo de individuos, en especial de homocigotas mutantes, por lo cual deberían ampliarse los datos para descartar que las diferencias se deban a sesgos por el menor tamaño muestral.

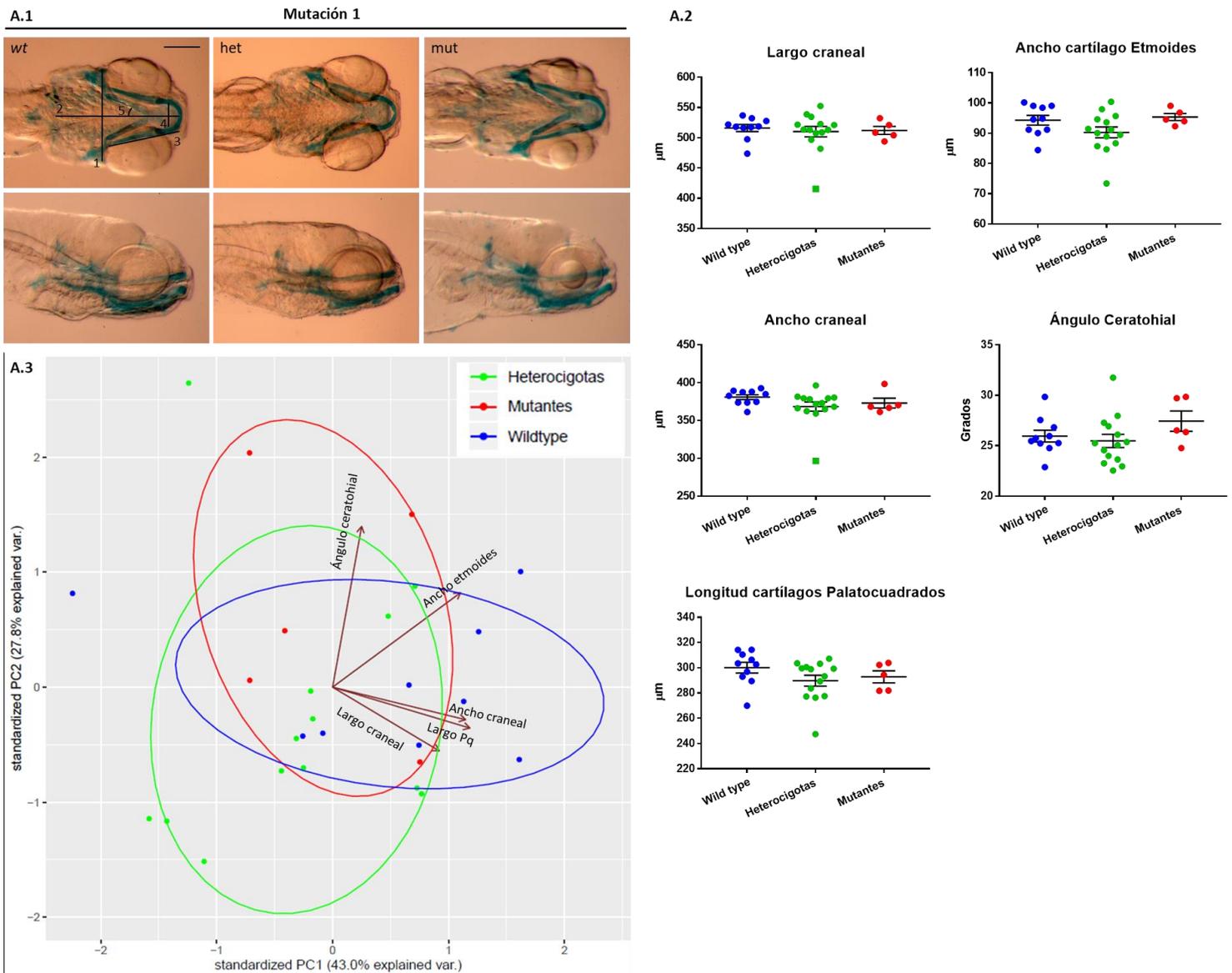
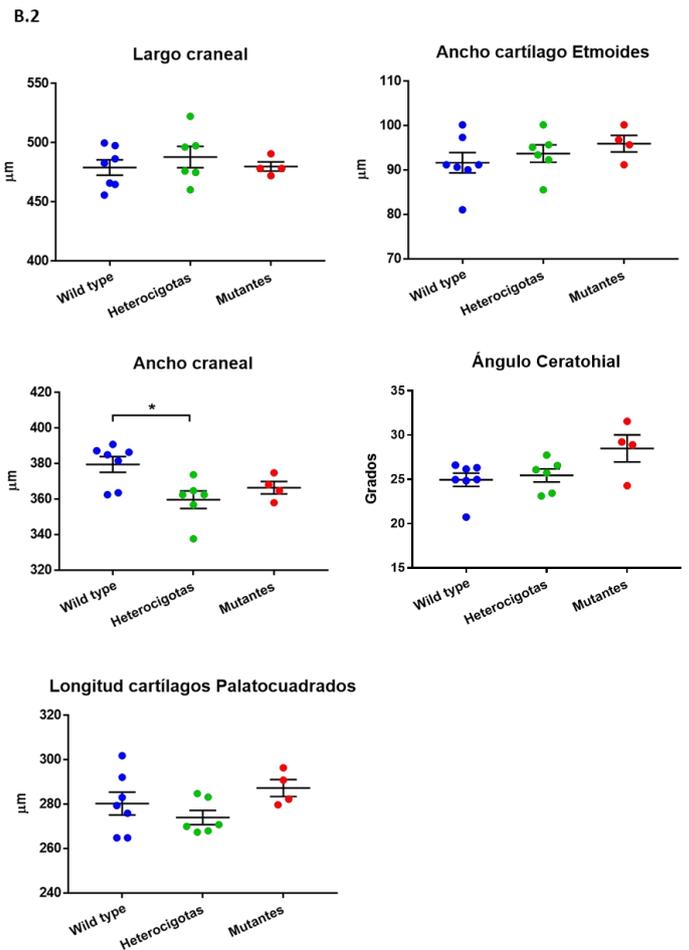
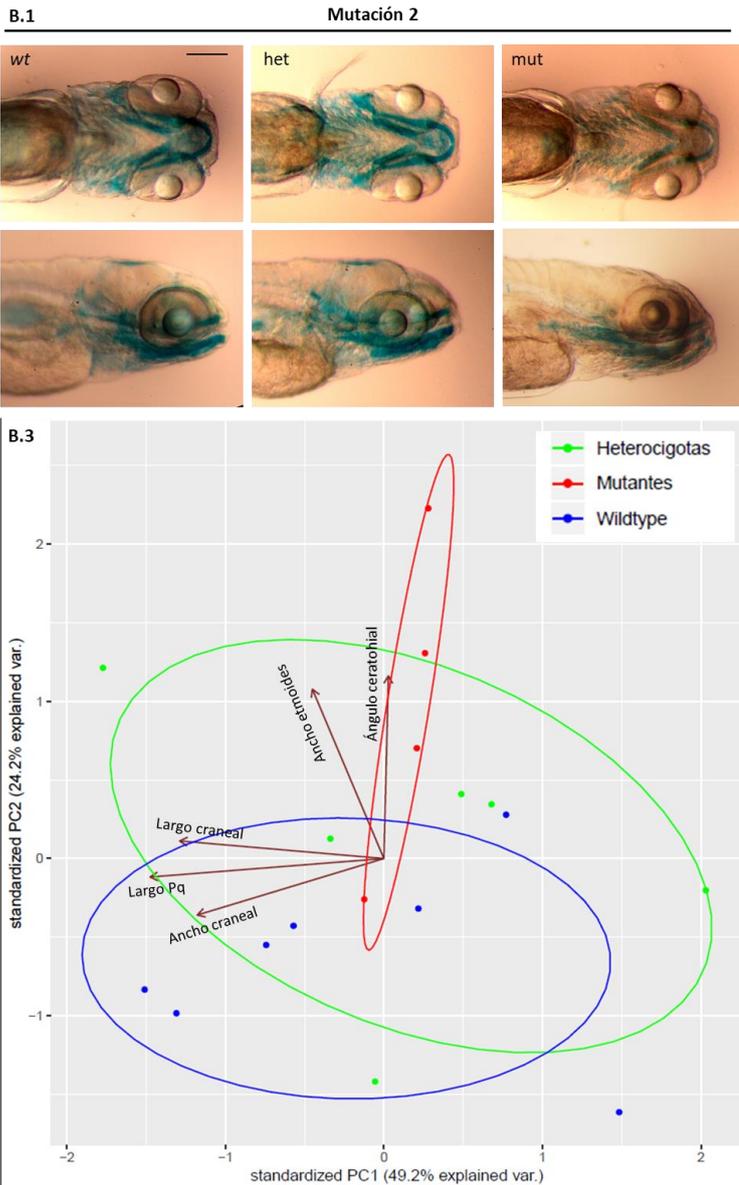


Figura 22. Evaluación de morfología de los cartílagos cráneo-faciales en líneas mutantes para *higd1a*. Larvas de 5 dpf fueron teñidas con el colorante Alcian Blue y fotografiadas. A partir del análisis de las imágenes se estimaron las medidas de distintos cartílagos cefálicos, esquematizados en **A.1**: 1 – ancho craneal, 2 – largo craneal, 3 – largo de cartílagos Palatocuadrados, 4 – ancho del cartilago Etmoides y 5 – ángulo del cartilago Ceratohial. Se compararon hermanos *wild type*, heterocigotas y homocigotas mutantes, producto del cruce entre heterocigotas portadores de la mutación 1 para *higd1a* (**A**), o del cruce entre heterocigotas portadores de la mutación 2 para *higd1a* (**B**). **A.2** y **B.2**. Gráficos para cada una de las 5 medidas; se muestran los puntos correspondientes a cada individuo y la media \pm SEM. Los individuos representados con un cuadrado fueron catalogados como *outliers* dentro del set de datos y no fueron incluidos para el contraste con ANOVA. **A.3** y **B.3** Análisis de componentes principales (PCA), donde se puede apreciar la distribución de cada conjunto, así como la magnitud y dirección en que cada variable (vectores) contribuye a la separación entre los sets de datos. * $p = 0,01$; Barra de escala = 250 μm .



IV.IV.III- *higd1a* en respuesta a bajos niveles de oxígeno

En primer lugar, se investigó una posible inducción transcripcional de *higd1a* en embriones tempranos, como consecuencia de la exposición a hipoxia durante dos tiempos distintos: 3 y 16 horas. Contrariamente a lo esperado, no se encontró incremento en la cantidad de ARNm de *higd1a* a ninguno de estos tiempos, e incluso se observó una leve tendencia a la baja, si bien las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Fig. 23.A, B). A modo de control positivo del protocolo de hipoxia, se cuantificó también el ARNm del gen *egl3*, que codifica para la isoforma PHD3 de la familia de prolil-hidroxilasas reguladoras de los factores HIFs, y cuya inducción por bajos niveles de oxígeno ha sido previamente reportada (Appelhoff et al., 2004; Santhakumar et al., 2012 y Manchenkov et al., 2015). Los resultados revelaron un importante

aumento del ARNm de *egln3*, cercano a 60 veces por encima de los niveles basales, corroborando que las condiciones del experimento fueron efectivas (Fig. 23.A, B).

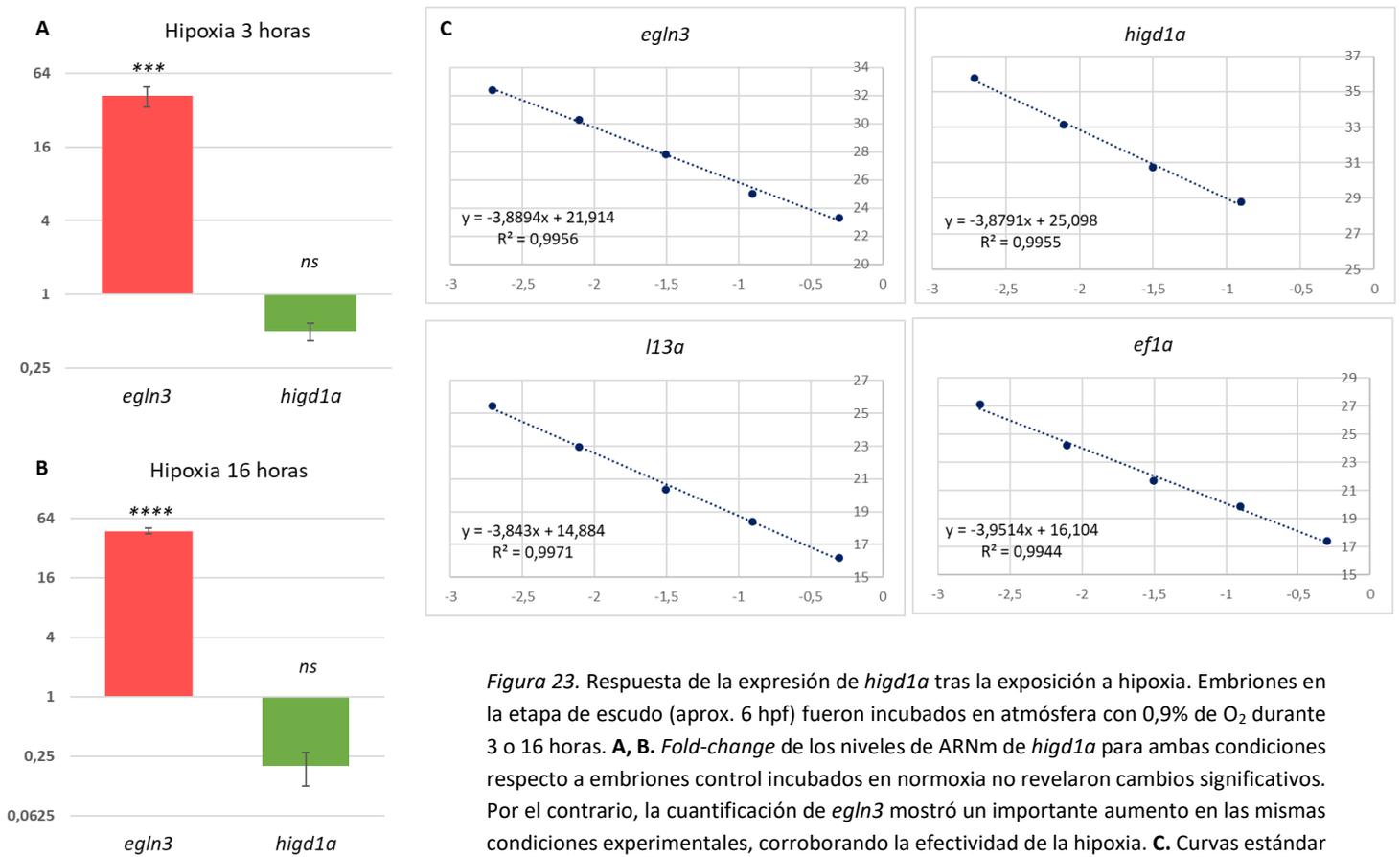


Figura 23. Respuesta de la expresión de *hgd1a* tras la exposición a hipoxia. Embriones en la etapa de escudo (aprox. 6 hpf) fueron incubados en atmósfera con 0,9% de O₂ durante 3 o 16 horas. **A, B.** *Fold-change* de los niveles de ARNm de *hgd1a* para ambas condiciones respecto a embriones control incubados en normoxia no revelaron cambios significativos. Por el contrario, la cuantificación de *egln3* mostró un importante aumento en las mismas condiciones experimentales, corroborando la efectividad de la hipoxia. **C.** Curvas estándar para los genes blanco (*egln3* y *hgd1a*) y para los dos genes utilizados como normalizadores (*l13a* y *ef1a*). Las eficiencias de amplificación calculadas a partir de dichas curvas fueron: *egln3*-81%, *hgd1a*-81%, *l13a*-82% y *ef1a*-79%. *** p = 0,001, **** p < 0,0001.

Puesto que no es infrecuente que varias de las proteínas involucradas en la respuesta a hipoxia estén sujetas a distintos tipos de regulación post-transcripcional y habiendo antecedentes de que esto podría ocurrir en el caso específico de *hgd1a*, se decidió evaluar la posible participación de la proteína en la tolerancia a depleción de oxígeno utilizando las líneas mutantes generadas. Embriones de 24 hpf provenientes de cruces entre heterocigotas portadores de la mutación 1 o de la mutación 2 fueron sometidos a anoxia durante 3 y 16 horas, y se monitoreó su supervivencia durante las 72 horas posteriores al insulto.

Tal como está descrito en la literatura y como puede verse en la Figura 24, los embriones que transcurrieron 16 horas sin oxígeno presentaron un notorio retraso en el desarrollo en comparación con sus pares, tanto los incubados en normoxia, como los expuestos a 3 horas de anoxia. Aquellos individuos con un fenotipo más severo, mostraron reducción en el tamaño de la cabeza y cierta opacidad, característica de muerte celular (Fig. 24.A.4, B.4). Por otro lado, los animales sujetos a 3 horas de anoxia apenas presentaron algo de retraso en el desarrollo y poco

tiempo luego de ser devueltos a un ambiente normóxico resultaron casi indistinguibles de sus pares control.

En cuanto a la sobrevivencia tras 16 horas de anoxia, se constató una mayor proporción de mortalidad en los animales salvajes en comparación con los mutantes, y especialmente respecto a los portadores de la mutación 2, quienes presentaron un 100% de sobrevivencia. La progenie portadora de la mutación 1 y la progenie *wild type* mostraron una sobrevivencia final de 75 y 67,5%, respectivamente, contabilizándose la totalidad de las muertes dentro del lapso de 10 horas luego de la exposición a anoxia. Con los datos se construyó una curva de sobrevivencia de Kaplan-Meier (Fig. 24.D) y los dos tests estadísticos implementados (Log-rank test y Gehan-Breslow-Wilcoxon test) indicaron diferencias significativas entre las curvas de los grupos experimentales (p valor 0,0001).

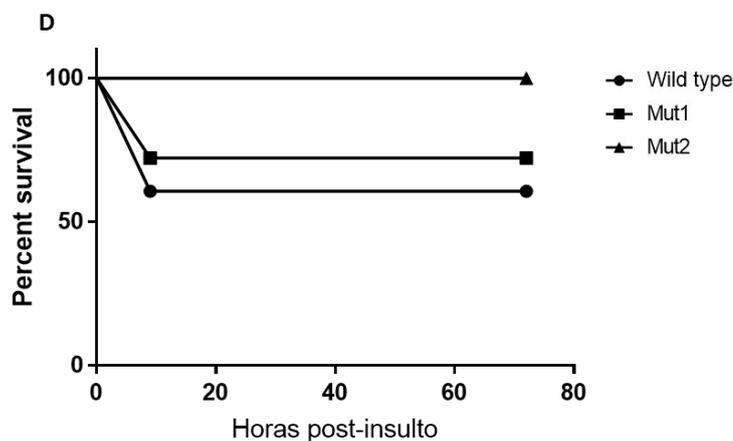
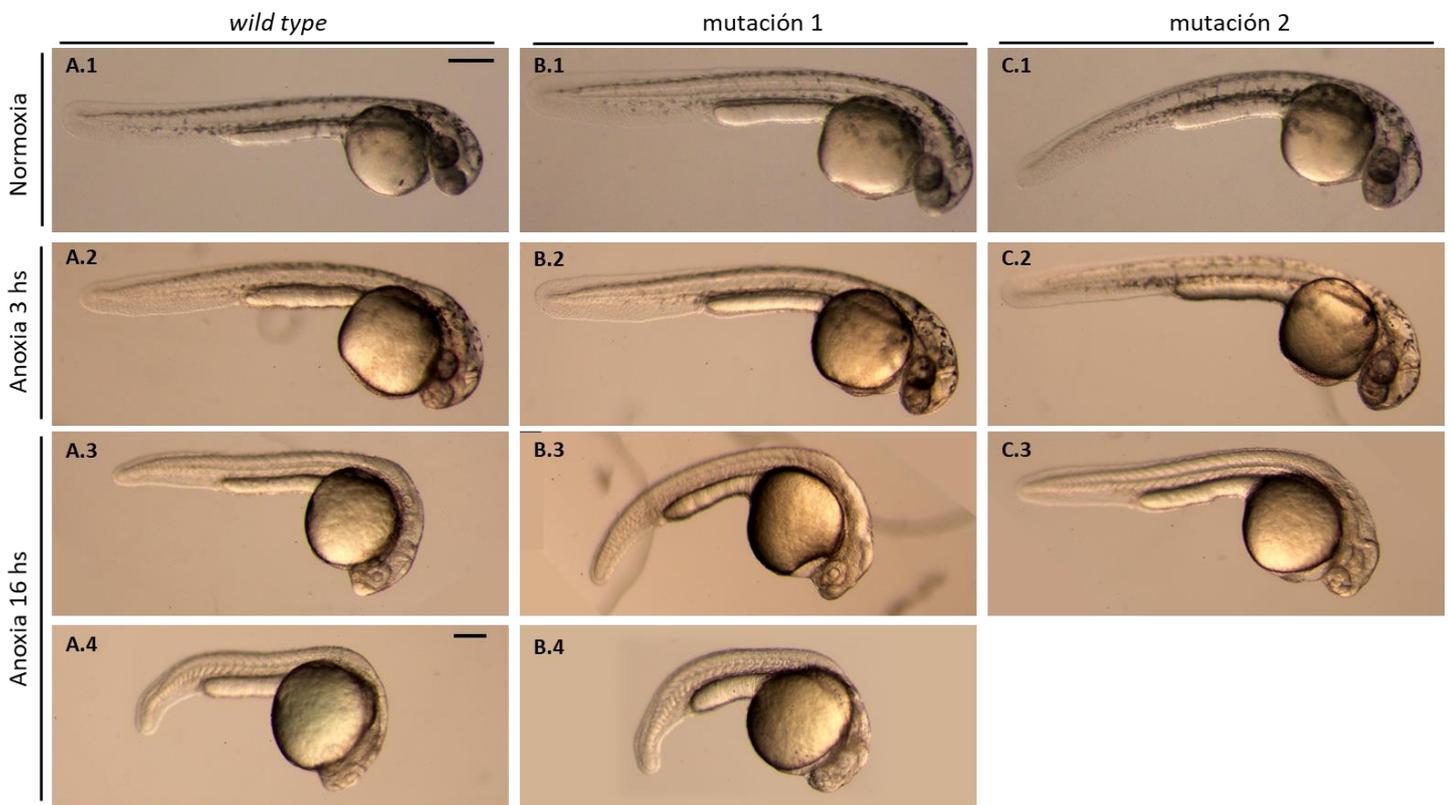


Figura 24. Evaluación de la tolerancia a anoxia de líneas mutantes para *higd1a*. Embriones de 24 hpf producto de cruces entre *wild type* (A) entre heterocigotas portadores de la mutación 1 para *higd1a* (B), o entre heterocigotas portadores de la mutación 2 para *higd1a* (C) fueron expuestos a 3 o 16 horas de anoxia y monitoreados durante las siguientes 72 horas. Fila 1: Control (normoxia), fila 2: Anoxia 3 horas, filas 3 y 4: Anoxia 16 horas. Todas las fotografías fueron tomadas a las 40 hpf (tiempo real transcurrido). D. Curva de sobrevivencia de Kaplan-Meier para los grupos sujetos a 16 horas de anoxia; n = 40. Barra de escala = 250 μ m (filas 1-3) y 400 μ m (fila 4).

IV.IV.IV- Expresión diferencial de γ -H2AX en las líneas mutantes para *higd1a*

A raíz de las distintas respuestas frente a hipoxia que mostraron los individuos con distintas mutaciones para *higd1a*, entre sí y respecto a los embriones salvajes, se resolvió analizar la expresión de γ -H2AX en ambas líneas mutantes para *higd1a*.

La histona H2AX es una variante de las histonas de *core* H2A, que es fosforilada en un residuo de Serina como respuesta al daño oxidativo del ADN, en particular, como respuesta a los cortes de doble hebra (Rogakou et al., 1998; Tanaka et al., 2006). Este mecanismo se encuentra conservado evolutivamente y la detección de la forma fosforilada de la proteína (designada como γ -H2AX) se ha utilizado como indicador de aumento del estrés oxidativo y de daño del ADN en varias especies, incluyendo *Danio rerio* (Podhorecka et al., 2010; Schultz-Rogers et al., 2018).

Se llevaron a cabo ensayos de western blot con proteínas extraídas de *pools* de animales de 5 dpf, que provenían de cruzamientos entre heterocigotas para cada una de las mutaciones. Los experimentos mostraron una inducción de γ -H2AX de casi 2,5 veces en la línea portadora de la mutación 1 en comparación con los individuos salvajes. En lo que refiere a la línea que lleva la mutación 2, si bien pareció mostrar una tendencia en el mismo sentido, el incremento no resultó estadísticamente significativo (Fig. 25).

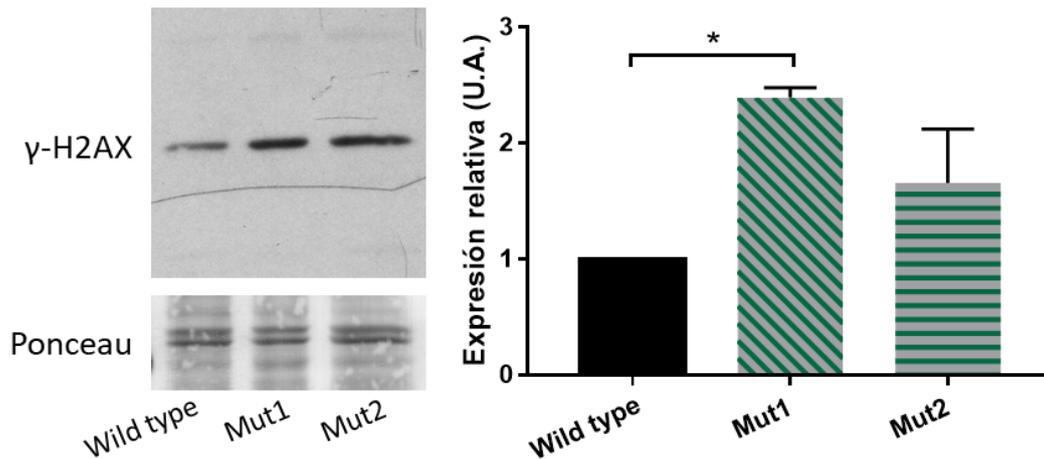


Figura 25. Expresión diferencial de γ -H2AX en líneas mutantes para *higd1a*. Western blot contra γ -H2AX a partir de proteínas totales extraídas de *pools* de larvas de 5 dpf *wild type*, portadoras de la mut1 y portadoras de la mut2. Se muestra el promedio y desvío estándar de dos ensayos. * $p = 0,04$.

V. DISCUSIÓN

*V.1- El patrón de expresión de *Higd1a*, ROS y su relación con eventos del desarrollo*

Resultados previos de experimentos de PCR en tiempo real han mostrado que *higd1a* se expresa desde etapas tempranas del desarrollo del pez cebra y hasta entrada la etapa larval, con niveles especialmente elevados en el período de 24 – 48 hpf (Fig. 4.B; Sosa, I., 2014). Estos hallazgos van en línea con lo obtenido a partir de los análisis recientes de *single-cell RNAseq* (Fig. 9; Wagner et al, 2018; Farrell et al., 2018), así como con lo que fue observado en este trabajo a través de ensayos de western blot (Fig. 12).

A su vez, los altos niveles de ARNm de *higd1a* y *higd2a* en las etapas más tempranas del desarrollo (Figs. 4 y 9) son consistentes con la participación en procesos de diferenciación celular que ha sido propuesta para los miembros de la familia HIG en diferentes especies. En el pez cebra en particular, uno de los primeros dominios celulares que se determinan, hacia el inicio de la etapa de blástula, es la capa envolvente (EVL), que consiste en una monocapa de células epiteliales superficiales que “envuelven” al embrión. Por debajo de ella, se encuentran varias capas de células profundas (DC) y la capa sincicial del vitelo (YSL). Durante la gastrulación, estos grupos celulares migran y se re-arreglan transformando al embrión en una estructura elongada, con los ejes definidos (Kimmel et al., 1995; Conway, G., 1995). Los ya mencionados estudios de *single-cell RNAseq* mostraron que *higd1a* se expresa tempranamente en las células de la EVL (Fig. 9). En relación a esto, Mendieta-Serrano y colaboradores han descrito una particular abundancia de mitocondrias en dicha capa celular, marcándolas con la sonda fluorescente MitoTracker. Ese mismo trabajo comprueba que las especies reactivas del oxígeno (ROS) están presentes en los espacios intersticiales de las células profundas del embrión, desde la etapa de escudo y casi hasta el fin de la epibolia. Más aún, muestran una particular señal en forma de anillo en el margen del blastodermo, que se encuentra contenida por la señal mitocondrial de las células de la EVL, en una posición más adelantada que la marca de ROS (Fig. 26). Al inhibir farmacológicamente la producción de ROS, los autores observan un retraso significativo de la epibolia y proponen, entonces, que las especies reactivas del oxígeno estarían liderando el frente de avance de este movimiento celular (Mendieta-Serrano et al., 2019).

Es interesante que *bcl2-like10*, otro gen anti-apoptótico (miembro de la familia de proteínas Bcl-2), se ha identificado como un factor importante para que ocurra el movimiento de epibolia, en particular vinculándolo a las ondas de Ca^{2+} que participan de este proceso (Bruce, A., 2016).

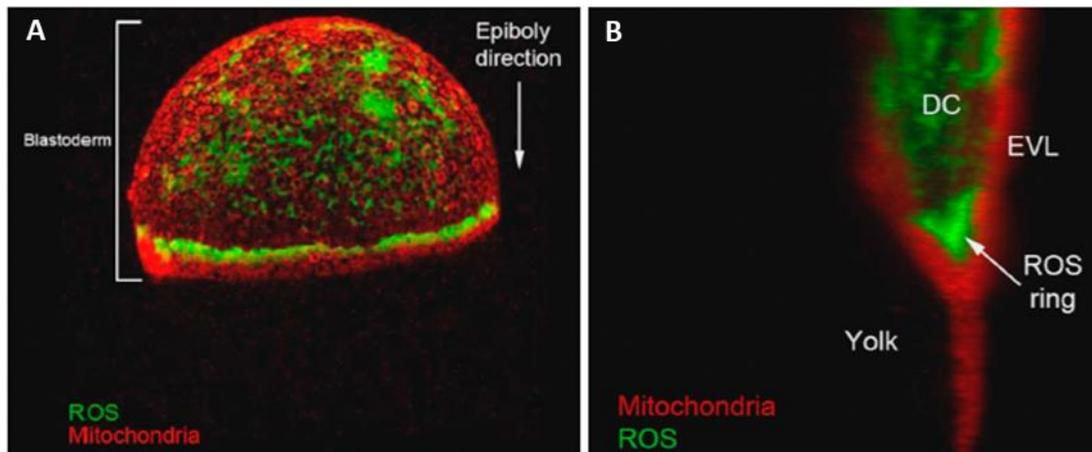


Figura 26. Disposición mitocondrial y de especies reactivas del oxígeno durante la epibolia del pez cebra. Los embriones fueron incubados con la sonda CM-H2DCFDA (verde) para marcar ROS y con MitoTracker (rojo) para marcar mitocondrias. Ambas señales parecen liderar la progresión de la epibolia (A). A mayor magnificación puede apreciarse que las mismas no se solapan y que el cinturón mitocondrial se halla más avanzado en el movimiento que la señal para ROS (B). *Extraído de Mendieta-Serrano et al., 2019.*

El rol de ROS durante el desarrollo embrionario temprano también fue evidenciado por una investigación de Gauron y colaboradores. Midiendo los niveles de H_2O_2 , los autores constataron que los mismos se vuelven detectables por primera vez al comienzo de la gastrulación y luego, hacia la etapa de 20 somites (aproximadamente 19 hpf), se elevan dramáticamente, especialmente en la cabeza y en la región más caudal de la cola. Siguiendo el transcurso del desarrollo, la señal de H_2O_2 disminuye en todos los tejidos, con excepción del tejido cardíaco y neural. A las 48 hpf tiene lugar un nuevo incremento, especialmente en el tectum óptico, la médula espinal y la notocorda. Finalmente, para las 72 hpf, la mayoría de los órganos exhiben muy bajos niveles de H_2O_2 , permaneciendo así hasta la adultez (Gauron et al., 2016).

Curiosamente, es posible establecer un paralelismo entre estos hallazgos y los niveles de *higd1a*, habiendo observado que los mismos se mantienen elevados desde el ovocito hasta las primeras horas de las embriogénesis, y mostrando otro pico más tardío entre las 24 hpf y las 48 hpf. Estas evidencias serían consistentes con una participación de Higd1a en la diferenciación y determinación de linajes celulares en el desarrollo del pez cebra, y sumadas a la influencia sobre la modulación de ROS que ha sido propuesta para Higd1a (Ameri et al., 2015; Guerra-Castellano et al., 2018), sugieren la posibilidad de que la participación de la proteína en estos eventos del desarrollo se halle vinculada al rol señalizador de las especies reactivas del oxígeno.

Al ingresar al estadio comprendido entre las 24 y las 48 hpf, denominado faríngrula, los embriones ya presentan una organización bilateral definida, con la notocorda bien desarrollada y el juego de somites completo, mientras que el sistema nervioso continúa siendo una estructura hueca y expandida anteriormente, con vesículas encefálicas que empiezan a hacerse visibles. El nombre del período refiere a los arcos faríngeos, que comienzan a desarrollarse a partir de una región primordial derivada de la cresta neural. Los arcos más anteriores son el mandibular y hioideo, que darán lugar a la mandíbula y al opérculo; y los posteriores corresponden a los arcos

branquiales, que formarán las branquias respiratorias. Estas estructuras, junto a las aletas, cuya morfogénesis también se inicia en la etapa de faríngrula, poseen importantes contribuciones de tejido cartilaginoso (Kimmel et al., 1995). Como ya fue mencionado, los cartílagos también se incluyen dentro de los derivados de la cresta neural. La diferenciación comienza al final del estadio, alrededor de las 48 hpf, cuando la proteína Higd1a mostró niveles particularmente elevados. En este sentido, se conoce que las placas de crecimiento condrocíticas constituyen tejidos avasculares y de por sí hipóxicos, donde la presencia de HIF1 resulta imprescindible para el desarrollo normal (Rajpurohit et al., 1996; Schipani et al., 2001). En las placas de crecimiento, los condrocitos pasan por una serie de etapas bien controladas de proliferación celular, diferenciación, hipertrofia y apoptosis. Una vez concluida esta secuencia, se produce la invasión de los vasos sanguíneos y el reemplazo de la matriz cartilaginosa por matriz ósea trabecular. Se ha demostrado que existe un gradiente fisiológico de oxígeno desde la zona proliferativa a la zona hipertrófica, evidenciando el importante rol señalizador del oxígeno en este tejido. Vinculado a esto, también se ha documentado el rol de HIF1 como regulador clave de la función de osteoblastos y osteoclastos, participando en el desarrollo óseo, el modelado y la regeneración (Wang et al., 2007; Wan et al., 2008; Shen et al., 2009).

Por otra parte, en el estadio de faríngrula se diferencian las células pigmentarias. Las primeras en hacerlo, cerca de las 24 hpf, son las células del epitelio pigmentario de la retina y los melanóforos. Más tarde, alrededor de las 42 hpf comienzan a aparecer los xantóforos y los iridóforos, volviéndose más claramente apreciables a partir de las 48 hpf. Con excepción del epitelio de la retina, los otros tres tipos celulares también son derivados de cresta neural. (Kimmel et al., 1995; Quigley & Parichy, 2002).

Otros eventos importantes que caracterizan este período del desarrollo son la formación del sistema circulatorio y la migración del primordio de la línea lateral, que a medida que avanza va dejando atrás las células que formarán el ganglio del nervio lateral y los neuromastos (Kimmel et al., 1995).

En definitiva, el patrón cambiante de la expresión de los dos miembros de la familia *hig* en el transcurso de la embriogénesis del pez cebra, y en particular el de *higd1a*, cuyo ARNm mostró ser especialmente abundante en las primeras horas del desarrollo, parecen indicar que, así como se ha sugerido para otras especies, estos genes tendrían un rol sobre procesos celulares importantes para el desarrollo normal de *Danio rerio*.

En vista de los importantes cambios que ocurren entre las 24 y las 48 hpf, resulta interesante que Higd1a presente un aumento en este período. Más aún, teniendo en cuenta que muchos de estos cambios se encuentran asociados a la cresta neural y sus derivados, y considerando la alta expresión del ARNm de *higd1a* que ha sido encontrada en este linaje celular (Fig. 9). Contrariamente a lo esperado, en ensayos de inmunofluorescencia, no registramos una correlación apreciable entre la inmunorreactividad con el anticuerpo anti-Higd1a y el marcador de cresta neural Sox10 (Anexo II). Por un lado, dadas las dudas que presenta la fiabilidad de la

reactividad de este anticuerpo, la falta de correlación podría explicarse porque la señal observada no corresponda a la proteína Higd1a. Si bien esta hipótesis es la más probable, vale la pena puntualizar que la línea transgénica utilizada no permite visualizar la totalidad de las células de la cresta neural. De hecho, Kwak y colaboradores han demostrado que las líneas *foxd3:GFP* y *sox10:mRFP*, usualmente empleadas para marcar la cresta neural, muestran diferentes señales; e inclusive dos líneas transgénicas para Sox10, *sox10:mRFP* y *sox10:eGFP*, no presentan una señal idéntica; así por ejemplo, los autores observaron que mientras la primera marcaba la placoda ótica desde etapas tempranas y mantenía la señal hasta pasada la formación del otocisto, la fluorescencia de *sox10:eGFP* sólo se manifestaba en una pequeña fracción de las células óticas (Kwak et al., 2013). En este sentido, podría ser informativo evaluar en un futuro otros marcadores de cresta neural, como *foxd3*, *crestin* o el factor de transcripción tipo “homeobox” *dlx2*, que permite monitorear la morfogénesis de los arcos faríngeos (Luo et al., 2001; Akimenko et al., 1994; Neuhauss et al., 1996).

En lo que refiere al patrón espacial de Higd1a, no se pudo establecer de manera certera su distribución. Hay algunos elementos que podrían hacer pensar que la señal registrada en los ensayos de inmunofluorescencia correspondería a la proteína, es así que algunos de los tejidos que presentaron mayor inmunoreactividad con el anticuerpo anti-Higd1a coinciden con lo que surge al explorar las bases de datos generadas por los estudios de *single-cell RNAseq* (kleintools.hms.harvard.edu/paper_websites/wagner_zebrafish_timecourse2018/mainpage; portals.broadinstitute.org/single_cell/study/single-cell-reconstruction-of-developmental-trajectories-during-zebrafish-embryogenesis). A su vez, los resultados serían consistentes con lo que ha sido encontrado en otras especies; por ejemplo, el anticuerpo reveló una fluorescencia especialmente intensa en tejido muscular (congruente con los resultados de Thisse et al., 2001), células epiteliales y en grupos neuronales asociados a la función auditiva (similar a lo reportado por López et al., 2018). Adicionalmente, en algunas regiones pudo apreciarse claramente que la señal consistía en partículas discretas, y específicamente en el músculo, adoptaba una disposición regular y ordenada. Estos indicios podrían apuntar a que se trata de una señal mitocondrial. No obstante, como se comentó en IV.IV, también existen evidencias de que proteínas vinculadas al citoesqueleto presentan una distribución similar a la señal encontrada, tanto en el músculo como en las células epiteliales (Kim & Ingham, 2009; Gurung et al., 2017; Tang & Briehner, 2012), e incluso, la acumulación de la marca observada con anti-Higd1a en la periferia citoplásmica de las células epiteliales podría sugerir que este segundo escenario es el más plausible. Es así que para poder comprobar la hipótesis de una señal mitocondrial para el anticuerpo anti-Higd1a, deberían realizarse experimentos de co-localización con marcadores mitocondriales conocidos.

Pese a las evidencias arriba mencionadas, la señal presente en embriones y larvas que habían sido genotipados como homocigotas mutantes para *higd1a* (tanto para la mutación 1 como para la mutación 2), junto con las múltiples bandas de alta intensidad que se visualizan en los ensayos

de western blot, imposibilitan extraer resultados concluyentes respecto al patrón de distribución de la proteína.

V.II- Aportes a la regulación de la expresión de *higd1a*

Trabajos anteriores han presentado indicios de una posible regulación post-transcripcional de *higd1a* en otras especies. Por un lado, las bases de datos predicen la existencia de transcritos antisentido en mamíferos. Experimentalmente, Bedó y colaboradores mostraron la expresión de un ARN antisentido en ratas, a través de ensayos de hibridación *in situ* y PCR (Bedó et al., 2005; 2012). Asimismo, un estudio bioinformático a partir de bases de datos humanas, donde se analizaban pares de genes/pseudogenes diferencialmente expresados en distintas enfermedades neurodegenerativas, encontró que *HIGD1A/HIGD1AP14* constituía uno de los 49 pares diferencialmente expresados en la enfermedad de Huntington; y se determinó además, que ambos genes poseen en común 16 (74%) sitios de unión a microARNs (Costa et al., 2012). En acuerdo con la teoría de los “ARNs endógenos competidores” (*ceRNAs*; Salmena et al., 2011), los autores postulan que estos transcritos no codificantes actuarían como “pseudoblanco”, secuestrando a los microARNs e impidiendo que ejerzan sus funciones reguladoras normales sobre sus “blancos legítimos”. Se sugiere que el desbalance en el *pool* de microARNs originado por estas vías podría estar involucrado en la etiología de enfermedades neurodegenerativas y también de cáncer (Du & Pertsemelidis, 2011; Poliseno et al., 2010; Costa et al., 2012).

A diferencia de estos antecedentes, en *Danio rerio*, nuestros experimentos han mostrado que los niveles de proteína Higd1a en las diferentes etapas del desarrollo acompañan el curso temporal del ARNm; y hasta la fecha tampoco existen en las bases de datos reportes de un transcrito antisentido para esta especie.

En lo que refiere a la regulación por bajos niveles de oxígeno, no encontramos que *higd1a* se viera inducido bajo nuestras condiciones experimentales. Por el contrario, se observó una expresión levemente más baja tras los dos tiempos de hipoxia ensayados, aunque la misma no fue significativamente diferente de la expresión del gen en condiciones normales. Un trabajo llevado adelante hace unos años por Manchenkov y colaboradores con el propósito de identificar genes inducidos por hipoxia, posibles candidatos a la protección otorgada por el precondicionamiento hipóxico, podría estar en línea con nuestros hallazgos. En esa investigación, los autores realizaron un análisis transcriptómico de embriones incubados durante 2 horas con 0,3% de oxígeno en dos etapas distintas del desarrollo: gástrula (escudo) y segmentación (8 somites). Los resultados mostraron una activación transcripcional significativa de solamente dos genes de la vía de HIF, *irs2* y *egln3*. Esto, a su vez, apoyaría otras evidencias previas que sugieren que la vía de HIF contribuye poco a la respuesta protectora contra la hipoxia en el desarrollo temprano del pez cebra (Mendelsohn & Gitlin, 2008; Robertson et al., 2014), y los autores sugieren que la inducción de *irs2* y de *egln3* ocurriría de manera independiente de HIF (Manchenkov et al., 2015).

En el mismo sentido, otro equipo realizó un estudio relevando los sitios de respuesta HRE presentes en el genoma de *Danio rerio*, y los genes que son regulados por la vía de HIF. Para esto utilizaron una línea mutante *knockout* para *vhl*, gen que codifica para la proteína de von Hippel Lindau. En condiciones de normoxia, Vhl se encarga de dirigir constantemente la subunidad HIF1- α al proteosoma, impidiendo la dimerización del factor y la activación de la vía de HIF. Como consecuencia, los mutantes homocigotas de esta línea imitarían los efectos de una respuesta hipóxica crónica. Utilizando larvas de 4 dpf, los investigadores determinaron los cambios en la expresión génica que eran provocados por la mutación. Encontraron 295 genes inducidos y 442 genes cuya expresión disminuía, lo cual resultó llamativo, puesto que normalmente en otros modelos HIF no ha sido asociado a la represión transcripcional. Dentro de las listas de genes diferencialmente regulados se incluyen tanto *higd1a* como *higd2a*, reportándose que su expresión baja levemente, lo cual es consistente con lo observado en nuestros experimentos. Los autores argumentan que algunas de las diferencias observadas respecto a estudios en otros modelos (la mayoría de ellos, cultivos celulares con exposición aguda a hipoxia) pueden ser explicadas, por un lado, por la acción de *vhl* sobre vías independientes de HIF, y por otro, por el abordaje experimental utilizado, con las implicancias que tiene emplear un organismo entero que lleva activada una respuesta hipóxica durante varios días, lo cual podría desatar cambios transcripcionales adicionales (Greenald et al., 2015). En este sentido, se conoce que la exposición a distintos grados de estrés hipóxico puede devenir en la estimulación de diferentes vías metabólicas y de señalización. Sobre este aspecto se profundizará más adelante.

Sumado a lo anterior, el ya mencionado estudio de Ameri y colaboradores puso de manifiesto que en varias líneas de células cancerosas, HIGD1A no es inducido por hipoxia, pese a existir un aumento de HIF1- α . En particular, realizando experimentos *in vivo* con xenoinjertos de cáncer de mama, se observó que las células tumorales circulantes derivadas de esos xenoinjertos -y de las que se ha reportado una especial resistencia a anoxia- exhiben mayores niveles basales de HIGD1A, pero que no son inducibles por hipoxia. Sin embargo, los autores hallan evidencias de que cuando se combina hipoxia con privación de glucosa, la expresión de HIGD1A efectivamente se incrementa. A raíz de este y otros resultados, la investigación sugiere que la proteína juega un rol en la biología del cáncer, que consistiría en inhibir la proliferación tumoral en condiciones de estrés metabólico severo (esto es, la conjunción de hipoxia y falta de glucosa), y promovería el ingreso en un estado “dormante”, posiblemente obedeciendo a una estrategia adaptativa de supervivencia (Ameri et al., 2015). Los mecanismos para lograr la adaptación de las células en este contexto de estrés podrían estar vinculados a la capacidad de HIGD1A para modular la actividad de la enzima Citocromo oxidasa y la producción mitocondrial de ATP (Hayashi et al., 2015; Guerra-Castellano et al., 2018).

De cierto modo, se pueden establecer semejanzas entre estos hallazgos y las evidencias que existen en el pez cebra, en el que *Higd1a* presenta altos niveles en etapas tempranas y aproximadamente hasta el período en que los embriones muestran una notable capacidad de

tolerar la falta de oxígeno, pero esos niveles no serían inducibles por hipoxia. Sería interesante ensayar si, tal como ocurre en las células cancerosas, la exposición a un estrés metabólico más severo, combinando hipoxia y privación de nutrientes, es capaz de regular la transcripción de *higd1a*.

Vinculado a este punto, vale la pena añadir que en la literatura se han descrito varios vínculos entre el comportamiento de las células cancerosas y procesos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario. Así por ejemplo, algunos de los mecanismos que utilizan las células tumorales para adaptarse y ser exitosas en ambientes hipóxicos se relacionan con los programas genéticos que usan normalmente las células durante el desarrollo. En particular, la metástasis del cáncer y la migración de células de la cresta neural comparten varios rasgos celulares y moleculares. Tanto células de la cresta neural como células malignas atraviesan una transición de epitelio a mesénquima que es controlada por genes de las familias *Snail*, *Sox*, *Twist* y *Ets* (Hill et al., 2009; Theveneau & Mayor, 2011). Además, algunas moléculas que guían la migración de la cresta neural también se ven involucradas en el *homing* de células cancerígenas hacia tejidos específicos (Kucia et al., 2005). Por otra parte, el rol del factor HIF1- α sobre la regulación del metabolismo tumoral, la proliferación y la metástasis ha sido extensamente documentado (Semenza, G.L., 2002; Gupta & Massagué, 2006; Kim et al., 2007; Vander Heiden et al., 2009; entre otros), en tanto que en embriones de pez cebra se han identificado tres isoformas de Hif- α (Hif-1, -2 y -3) y se ha visto que todas ellas están presentes desde los comienzos del desarrollo (Kajimura et al., 2006; Rojas et al., 2007; Zhang et al., 2012). Más aún, se ha demostrado que Hif1- α constituye un regulador clave de la transición epitelio-mesénquima en *Danio rerio* y en *Xenopus laevis*, así como de los fenómenos quimiotácticos que dirigen la migración de la cresta neural durante el desarrollo embrionario (Barriga et al., 2013).

La región promotora de *higd1a* contiene, además de un elemento canónico de respuesta a hipoxia (HRE), dos secuencias CRE (cAMP response element), los cuales constituyen sitios de unión para CREB (CRE-binding protein) (Sosa, I., 2014; Greenald et al., 2015).

La necesidad de la correcta expresión de CREB para el desarrollo embrionario normal ha sido comprobada tanto en modelos mamíferos (Long et al., 2001; Bleckmann et al., 2002; Xia et al., 2015) como en vertebrados inferiores. En *Xenopus laevis*, se demostró que CREB es heredado en el ovocito y su presencia en etapas tempranas resulta esencial para la gastrulación, la determinación de células mesodérmicas y de células del linaje cardíaco, y más adelante también para la correcta expresión de derivados neurales y somíticos (Lutz et al., 1999; Sundaram et al., 2003). Por su parte, la interferencia de la expresión de CREB durante la embriogénesis del pez cebra, resultó en alteraciones de la proliferación celular en el cerebro y del desarrollo de varias estructuras neurales; en particular, se evidenciaron defectos en el límite cerebro medio/cerebro posterior, en la extensión del eje corporal y en la morfogénesis de los somites (Dworkin et al., 2007).

Adicionalmente, se han descrito varios vínculos entre las vías de HIF1 y de CREB. Por ejemplo, algunos blancos de HIF1 también son susceptibles a la regulación por CREB (Firth et al., 1995;

Kajimura et al., 2006) y, además, ambos factores comparten un mismo coactivador, la proteína CBP/p300 (Arany et al., 1996; Kallio et al., 1998). También existen referencias que asocian la acción de CREB y HIF1 a la neuroprotección frente al daño hipóxico-isquémico (Zhu et al., 2004; Mendoza-Paredes et al., 2008; Mu et al., 2011).

Asimismo, se ha reportado que CREB y algunas proteínas relacionadas son blanco de activación por AMPK (Thomson et al., 2008; McGee & Hargreaves, 2008). En particular, en el sistema vascular, se ha descrito una interdependencia entre las vías de AMPK y de CREB, asociándolas a la citoprotección y a la angiogénesis; es interesante que otro de los blancos de AMPK, que posee un conocido rol protector en las células endoteliales, es HIF1 (Hamdulay et al., 2014).

Tal como fue relatado en I.VI, experimentos realizados con fibroblastos cultivados en ausencia de glucosa mostraron que HIGD1A protege a las células del daño causado por niveles exacerbados de ROS, y que este efecto es mediado por la activación de AMPK (Ameri et al., 2015).

En síntesis, si bien los resultados obtenidos hasta el momento en el pez cebra no han mostrado una activación transcripcional de *higd1a* en respuesta a hipoxia, la presencia de elementos HRE y CRE en el promotor del gen plantean la posibilidad de una regulación vinculada a las vías arriba nombradas. La exposición de embriones a otros tipos de estrés metabólico, distintos de la hipoxia, podrían ser informativos en este aspecto. Alternativamente, estas vías podrían ser importantes en la respuesta a estrés en etapas más tardías de la vida del pez cebra, pero actuar de forma diferente durante la embriogénesis; es decir, durante este período podrían ser vías vinculadas a la señalización en procesos fisiológicos del desarrollo y no necesariamente a la respuesta frente a condiciones de estrés.

V.III- Obtención de la línea mutante para *higd1a*

En cumplimiento con el segundo objetivo específico propuesto para este trabajo, se logró implementar con éxito la metodología CRISPR/Cas9 y se pudo establecer una línea de pez cebra mutante para nuestro gen de interés. Para generar la línea estable se realizaron dos rondas de cruzamientos por individuos salvajes (*outcross*), hasta alcanzar una F₂ compuesta por individuos heterocigotas, todos ellos portando una mutación idéntica. Si bien se han reportado bajos efectos *off-target* para la metodología CRISPR/Cas9 aplicada a *Danio rerio*, la realización de los cruces mencionados posibilita la segregación de eventuales mutaciones inespecíficas no ligadas, y de este modo reduce el riesgo de observar efectos *off-target* (Varshney et al., 2015). Últimamente, con las mejoras que se han ido incorporando para maximizar la eficiencia de la mutación con CRISPR/Cas9, resulta viable en algunos casos evaluar el fenotipo en los propios embriones inyectados (F₀), lo cual representa un ahorro significativo de los costos y tiempos experimentales (Burger et al., 2016; Wu et al., 2018). Sin embargo, el análisis fenotípico en F₀ debe ser realizado con cierta cautela, en particular en aquellos casos en que se desconoce el fenotipo esperado. Uno de los motivos para tener estos cuidados es que -tal como se mencionó

más arriba- existe una mayor probabilidad de encontrar efectos inespecíficos en la generación inyectada que en la línea estable. Pero también, debido a que los individuos inyectados constituyen un mosaico, donde algunas células llevan mutación, mientras que otras permanecen como *wild type*, y donde cada individuo alberga un espectro de mutaciones diferentes. Además, en términos estadísticos, un tercio de las *indels* provocadas por el corte y reparación de la secuencia de ADN se encontrarían en línea con el marco de lectura normal del gen, lo cual las hace mutaciones potencialmente silenciosas o hipomórficas, dependiendo del sitio de la secuencia donde ocurran. Esto, sumado a las complicaciones que acarrea el mosaicismo genético -por ejemplo, por posible competencia o compensación entre células y tejidos- puede conducir a interpretaciones equivocadas del fenotipo en la generación inyectada, en particular corriendo el riesgo de asignar como falsos negativos la ausencia de fenotipo (Shah et al., 2015; Teboul et al., 2017).

En nuestro caso, uno de los dos ARNs guía utilizados (sgRNA2) presentó muy baja eficiencia en las condiciones ensayadas, y casi la totalidad de las mutaciones registradas se ubicaron en el sitio de reconocimiento del sgRNA1. Al realizar la traducción *in silico* de las secuencias resultantes, se obtiene un producto *wild type* hasta aproximadamente un tercio de la proteína normal, cerca del fin del primer dominio transmembrana. Si bien las células poseen mecanismos para reconocer moléculas de ARNm que llevan mutaciones y existen distintas vías de degradación a las que esos ARNm pueden ser dirigidos (Akimitsu N., 2007; Harigaya & Parker, 2010; Lykke-Andersen & Jensen, 2015), no se puede descartar la posibilidad de que la primera porción de Higd1a se traduzca normalmente y exista alguna función residual en las líneas mutantes. En relación a este aspecto, a pesar de que varias de las funciones de la proteína parecerían estar asociadas a la porción N-terminal (An et al., 2011, 2014; Hayashi et al., 2012; Guerra-Castellano et al., 2018), aún no hay una clara definición de sus dominios funcionales y, en consecuencia, de qué regiones sería más importante anular. Tampoco se ha descrito ningún fragmento de la secuencia que actúe como péptido señal y se desconoce cómo es que la proteína arriba a la membrana mitocondrial interna.

Utilizando el anticuerpo anti-Higd1a se pudo obtener confirmación de la disminución de la proteína, o al menos del polipéptido completo, en *pools* de muestras de 5 dpf provenientes de cruces entre heterocigotas. Sin embargo, en muestras de 48 hpf no se evidenció una disminución de la proteína para ninguna de las dos mutaciones generadas, mutación 1 y mutación 2 (Fig. 20.A, B). Por un lado, esto podría explicarse por el hecho de que las muestras proteicas no provienen exclusivamente de individuos mutantes, sino de una progenie compuesta -en promedio- por 50% de heterocigotas y 25% de cada genotipo homocigota; por tanto, podría esperarse que la dosis de la proteína se redujera a aproximadamente la mitad de la dosis presente en las muestras enteramente *wild type*. Curiosamente, al realizar el mismo ensayo con individuos *knockdown*, sólo se detectó una baja sutil en los niveles de la proteína inyectando altas dosis de morfolino, y cuando se analizó el producto de *higd1a* a nivel del ARNm, se observó

una disminución del mismo recién a las 48 hpf, con lo cual el descenso en los niveles proteicos podría evidenciarse aún más tardíamente.

Una posibilidad para dar cuenta de estos resultados, sería que el ARNm y la proteína de *higd1a* fueran particularmente estables y los productos maternos, heredados en el ovocito, aún permanezcan en ciertos niveles en estas etapas avanzadas. Sin embargo, este escenario parece poco probable. Aunque existen evidencias de que habría distintas cohortes de mensajeros maternos que decaerían con cinéticas diferentes luego de la fertilización, ha sido descrito que incluso los transcritos más estables se encontrarían degradados para las 8 hpf (Tadros & Lipshitz, 2009; Despic & Neugebauer, 2018). En este sentido, el perfil temporal de expresión de *higd1a* determinado a partir de Real Time PCR sería consistente (Fig. 4.B): la caída luego de las 4 hpf podría corresponderse con la degradación del ARNm materno y el aumento posterior entre las 24 - 48 hpf sería atribuible a la transcripción del genoma cigótico, cuya activación comienza en el estadio de 64 células y culmina previo a la gastrulación (4,3 hpf) (Lee et al., 2014; Jukam et al., 2017).

Asimismo, la menor abundancia de proteína Higd1a en la etapa de 16 hpf en comparación con las edades más avanzadas (Fig. 12), indicarían que, de existir cierta cantidad de proteína materna, sería degradada varias horas antes de las 48 hpf.

En conclusión, resulta improbable que los niveles de proteína Higd1a observados en la progenie de las líneas mutantes en la etapa de 48 hpf correspondan a elementos maternos heredados por el cigoto, y parecería más plausible que representen la cantidad de proteína aportada por los animales salvajes y heterocigotas incluidos dentro de los *pools* que conforman las muestras. Eventualmente, la repetición de estos experimentos utilizando progenies provenientes de cruces entre homocigotas mutantes, donde no haya contribución materna de ARNm o proteína Higd1a, sería esclarecedora.

*V.IV- Análisis preliminar del fenotipo en líneas mutantes para *higd1a**

Como ya fue comentado, no se detectaron alteraciones en el aspecto externo de los individuos portadores de cualquiera de las dos mutaciones para *higd1a*. En concordancia, trabajos previos de mutagénesis a gran escala realizados en pez cebra, describen que la mayoría de los genes anulados no ocasionan un fenotipo evidente (Kettleborough et al., 2013; Varshney et al., 2015).

El único rasgo observable fue cierta alteración en el nado y la motilidad de algunas larvas. Efectivamente, al realizar pruebas experimentales, se comprobó que los animales con la mutación 1, tanto homocigotas como heterocigotas, mostraron una tasa de motilidad significativamente más alta que sus pares salvajes. Aunque sin alcanzar la significancia estadística, presumiblemente debido a la dispersión de los datos, el resto de los parámetros medidos presentó la misma tendencia entre grupos (Fig. 21.A).

En el caso de la progenie conteniendo la mutación 2, si bien las medias de todos los parámetros presentaron la misma tendencia que en el caso anterior, la alta variabilidad inter-individual no permite afirmar que haya diferencias sustanciales entre los grupos (Fig. 21.B).

A pesar de que los experimentos se realizaron con hermanos provenientes de una misma puesta, para tratar de hacer más comparables las medidas entre grupos, la dispersión de los datos fue alta, incluso entre animales *wild type*. Una posibilidad para sortear este problema sería modificar el diseño experimental, evaluando actividad motora en respuesta a un estímulo. En este sentido, Robinson y colaboradores han publicado recientemente un protocolo de evaluación de la función motora en respuesta a estímulos lumínicos. Los autores describen, además, que es posible aplicarlo en etapas más tempranas del desarrollo, a las 48 hpf (Robinson et al., 2018). Sería interesante en un futuro, evaluar los efectos de la mutación de *higd1a* implementando esta metodología y en esta edad, donde la expresión del gen parece ser relevante.

Con el fin de contrastar resultados previos obtenidos con una aproximación de *knockdown*, se analizó la morfología de los cartílagos cefálicos en larvas que albergaban alguna de las dos mutaciones para *higd1a*. Nuevamente, los experimentos fueron realizados con hermanos de la misma puesta, intentando alcanzar la mayor homogeneidad intra-grupo. No obstante, la dispersión resultó elevada, y otra vez, la progenie con la mutación 2 mostró una mayor variabilidad. Aún así, para la medida del ancho craneal, los individuos portadores de la mutación 2 presentaron diferencias significativas con respecto al control *wild type*; y, en la medición del ángulo ceratohial, los individuos homocigotas mutantes exhibieron una amplitud mayor y cercana a la significancia estadística ($p = 0,06$). Estas diferencias deben ser consideradas con cautela debido al bajo número de muestras, en particular dentro del grupo de homocigotas mutantes.

En lo que refiere a la mutación 1, los resultados son más confiables en razón de que los valores fueron más reproducibles. En este caso no se registraron diferencias para las medidas de ninguno de los cartílagos cráneo-faciales. Solamente la amplitud del cartílago ceratohial presentó una media algo más elevada en los individuos homocigotas mutantes respecto a los otros dos grupos, y similar a lo observado con la mutación 2.

En suma estos resultados contrastan con los ensayos previos de *knockdown*, en los que se había registrado una alteración notoria de los cartílagos cefálicos (Fig. 5.C, D). Ha sido reportado que los efectos inespecíficos de los morfolinós a menudo se manifiestan como anomalías en la morfología de los cartílagos cráneo-faciales (Robu et al., 2007; Boer et al., 2016). Sin embargo, en este caso, dado que la expresión de *higd1a* parecería estar relacionada con la cresta neural y sus derivados, cabe la posibilidad de que el fenotipo observado en los animales morfantes sea de carácter específico. Las discrepancias entre ambas aproximaciones, *knockdown* y *knockout*, podrían también explicarse por la activación de mecanismos de compensación genética en los animales mutantes, aspecto que se discutirá más adelante.

Como se comentó antes, en vista de que los animales analizados en estos experimentos son producto de cruzamientos entre parentales heterocigotas, inclusive los individuos homocigotas mutantes poseen durante el inicio del desarrollo, ARNm y proteína Higd1a heredados por vía materna. A su vez, los altos niveles de *higd1a* indicarían que su expresión sería importante en estas etapas tempranas. Por lo tanto, no se puede descartar que el fenotipo que mostraron los individuos mutantes se encuentre en cierta medida enmascarado por la contribución materna de *higd1a*. Así por ejemplo, estudiando el papel de la Metalotioneína 2 (*mt2*) sobre la angiogénesis durante el desarrollo, Schauermann y colaboradores encontraron que mutantes homocigotas, hijos de cruces entre heterocigotas mostraban un fenotipo muy leve. Por el contrario, al criar esos homocigotas mutantes hasta la adultez y cruzarlos entre ellos, observaron en las progenies un fenotipo mucho más pronunciado, que se asimilaba al fenotipo exhibido por los embriones inyectados con morfolino (Schauermann et al., 2015).

De ser viable mantener las líneas mutantes para *higd1a* en homocigosis, sería interesante entonces, poder analizar los efectos de la ausencia de proteína Higd1a en embriones que sean tanto mutantes cigóticos como maternos. Además de elucidar posibles contribuciones del ARNm y proteína maternos durante las etapas tempranas, esos experimentos facilitarían evaluar un mayor número de individuos y evitar así posibles sesgos ocasionados por un bajo número de muestras. En este sentido, la necesidad de realizar el genotipado de los embriones en los experimentos llevados a cabo durante este trabajo constituyó una limitación para el análisis de un amplio número de muestras, debido a que se trata de un procedimiento engorroso y que insume un tiempo considerable; en este punto cabe añadir que en varias ocasiones, las proporciones genotípicas en las progenies de padres heterocigotas no se ajustaban a los valores mendelianos (probablemente a causa de un tamaño muestral insuficiente), y se hacía necesario genotipar un gran número de individuos para llegar a tener representados los tres grupos experimentales.

En lo que respecta a la tolerancia a falta de oxígeno, el *knockout* de *higd1a* arrojó resultados llamativos. A priori, se podría hipotetizar que la ausencia de la proteína estaría asociada a una reducción en la tolerancia de los embriones frente a este tipo de estrés. Sin embargo, tras exposición prolongada a anoxia, las progenies mutantes mostraron una mayor sobrevivencia que los embriones salvajes (Fig. 24.D). Notoriamente, no se registraron muertes en los embriones de la línea con la mutación 2, mientras que la línea con la mutación 1, aunque algo mayor, mostró un porcentaje de supervivencia más cercano al grupo *wild type*. Las discrepancias observadas entre ambas mutaciones pueden explicarse, por un lado, por diferencias entre las proporciones genotípicas dentro de cada grupo experimental. Para la realización de estos ensayos se tomaron, al azar, 40 embriones en el mismo estadio del desarrollo (24 hpf) que provenían de cruzamientos entre heterocigotas para cada una de las mutaciones (*incross*) y de cruzamientos de animales salvajes. En este caso, no se contó con el genotipo de los embriones de las líneas mutantes, por tanto, es posible que hubiesen desvíos de las proporciones esperadas y que, por ejemplo, el grupo experimental “mutación 2” se hallase constituido por un mayor

número de mutantes. Una vez más, para terminar de responder a estas interrogantes, sería necesario realizar nuevos experimentos con las progenies de animales homocigotas mutantes para cada una de las dos mutaciones.

Por otra parte, las consecuencias de la hipoxia sobre el metabolismo celular, y la respuesta transcripcional frente a este tipo de estrés varían según la gravedad y la duración del insulto hipóxico. Así por ejemplo, se ha visto que la hipoxia puede resultar en la estabilización del supresor tumoral p53 en determinadas condiciones y no en otras. Si bien no está del todo claro cómo ocurre esta regulación diferencial, parecería que la exposición a hipoxia severa provoca un aumento de p53, posiblemente a través de mecanismos de respuesta al daño en el ADN, y esto a su vez deviene en la activación de una serie de cambios en la señalización celular y en el metabolismo (Fig. 27; Eales et al., 2016).

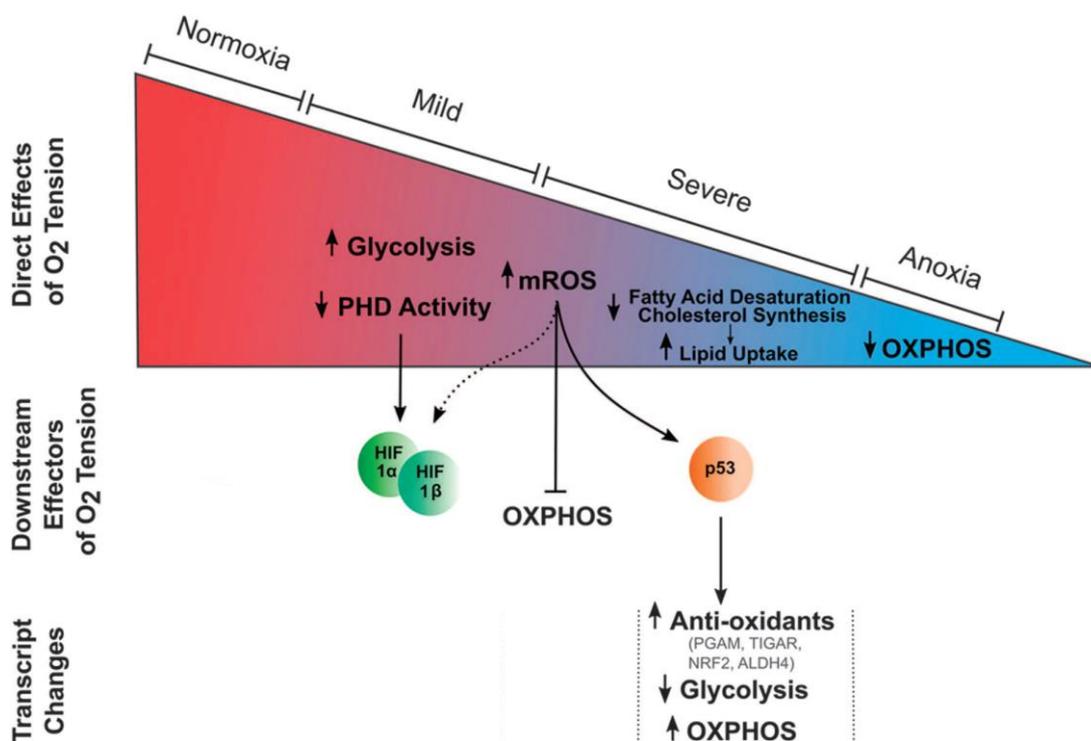


Figura 27. La tensión decreciente de oxígeno promueve una graduación de cambios en el metabolismo celular. De acuerdo a las características del estrés hipóxico, se ponen en marcha distintos mecanismos que pueden resultar en la activación de diferentes efectores y moléculas señalizadoras. Adaptado de Eales et al., 2016.

Vinculado a esto, se ha establecido que el pre-condicionamiento hipóxico puede ser beneficioso para sobreponerse al daño causado por la falta de oxígeno. Este fenómeno de pre-condicionamiento consiste en la protección otorgada por exposición a hipoxia leve o durante períodos de tiempo breves, frente a un insulto hipóxico posterior y de carácter más severo. La existencia de estos efectos ha sido demostrada en varias especies -incluyendo *Danio rerio*- y en varios tipos de tejido diferentes (Murry et al., 1986; Gidday et al., 2006; Chang & Bergmann, 2008; Zhou et al., 2008; Azad et al., 2012; Manchenkov et al., 2015). Si bien los mecanismos de

este fenómeno aún no se hallan completamente elucidados, se ha propuesto que las especies reactivas del oxígeno juegan un papel clave. Por un lado, se ha evidenciado que las mismas pueden disminuir el umbral necesario para que ocurra la activación de HIF1, y esto, por intermedio de la inducción de Eritropoietina y de las vías NF- κ B y Jak2-Stat5 ejercería un efecto neuroprotector (Liu et al., 2005). Kopp y colaboradores han propuesto que la aclimatación de larvas de pez cebra a un ambiente hipóxico incrementa la eficiencia metabólica de los organismos y, a nivel molecular, se refleja en un importante aumento de los niveles de AMPK (Kopp et al., 2014). Este hecho sería consistente con los antecedentes ya mencionados, que refieren a la gran capacidad que muestra el pez cebra durante su desarrollo para adaptarse a concentraciones variables de oxígeno ambiental (Braunbeck & Lammer, 2006).

Como se retomará más adelante, una posible explicación para los resultados observados en nuestros experimentos, sería que la ausencia de Higd1a resulte en cambios de la expresión de otras proteínas, cuyos efectos puedan de alguna manera, imitar los del pre-condicionamiento hipóxico.

Por último, como un primer acercamiento a evaluar posibles cambios en los niveles de estrés oxidativo ocasionados por la ausencia de Higd1a, se midió por western blot la expresión de la histona H2AX fosforilada (γ -H2AX). La cuantificación indicó que en las muestras procedentes de las dos líneas mutantes, γ -H2AX presentaba mayores niveles, aunque el aumento sólo fue estadísticamente significativo en la línea portadora de la mutación 1.

Como fue mencionado, la función de la versión fosforilada de H2AX ha sido tradicionalmente asociada a la reparación de cortes en el ADN como consecuencia de daño oxidativo. Sin embargo, también se ha visto que γ -H2AX puede desempeñar otras funciones, más allá de ese rol canónico. Entre ellas, se ha reportado la participación en el mantenimiento y la proliferación de células madre embrionarias, y también en la neurogénesis, tanto en etapas embrionarias como en el tejido adulto (Turinetto & Giachino, 2015). Recientemente, Weyemi y colaboradores han mostrado que H2AX es capaz de regular el comportamiento motor en ratones y, adicionalmente, que ayuda a mantener el balance redox a través de la regulación transcripcional de blancos específicos, entre los que se destaca Nrf2 (Weyemi et al., 2018).

Está bien establecido que enzimas de la familia de Fosfatidilinositol 3 kinasas (PI3K) son las responsables de la fosforilación de H2AX, principalmente ATM, ATR y protein kinasas dependientes de ADN (DNA-PK) (Wang et al., 2005; Chanoux et al., 2009; Park et al., 2003). A su vez, se ha descrito que la vía relacionada de PI3K/Akt también es capaz de modular los niveles de γ -H2AX (Kao et al., 2007; An et al., 2010). Y, vinculado a esto, resulta interesante que se han documentado varios puntos de contacto entre la vía de señalización PI3K/Akt y el metabolismo redox celular. Estas evidencias fueron integradas por Koundouros & Poulgiannis en una revisión reciente. En ella los autores describen un doble rol de la vía PI3K/Akt: por un lado, la capacidad de inducir directamente la generación de ROS, a través de la modulación de la bioenergética mitocondrial y de la activación de NADPH oxidasas; y, por otra parte, un papel en la activación de mecanismos antioxidantes. En conjunto, se propone que la vía de PI3K/Akt estaría

involucrada en la regulación fina de la homeostasis redox, ubicándose dentro de una intrincada red de señalización (Fig. 28; Koundouros & Poulogiannis, 2018).

En un futuro, podría ser interesante analizar en las líneas mutantes para *higd1a*, si existen cambios en la expresión de algunas proteínas involucradas en estas vías, como AMPK, NF- κ B o Nrf2; y de ese modo, aproximarnos a elucidar la posible ubicación de la función de Higd1a dentro de esta red.

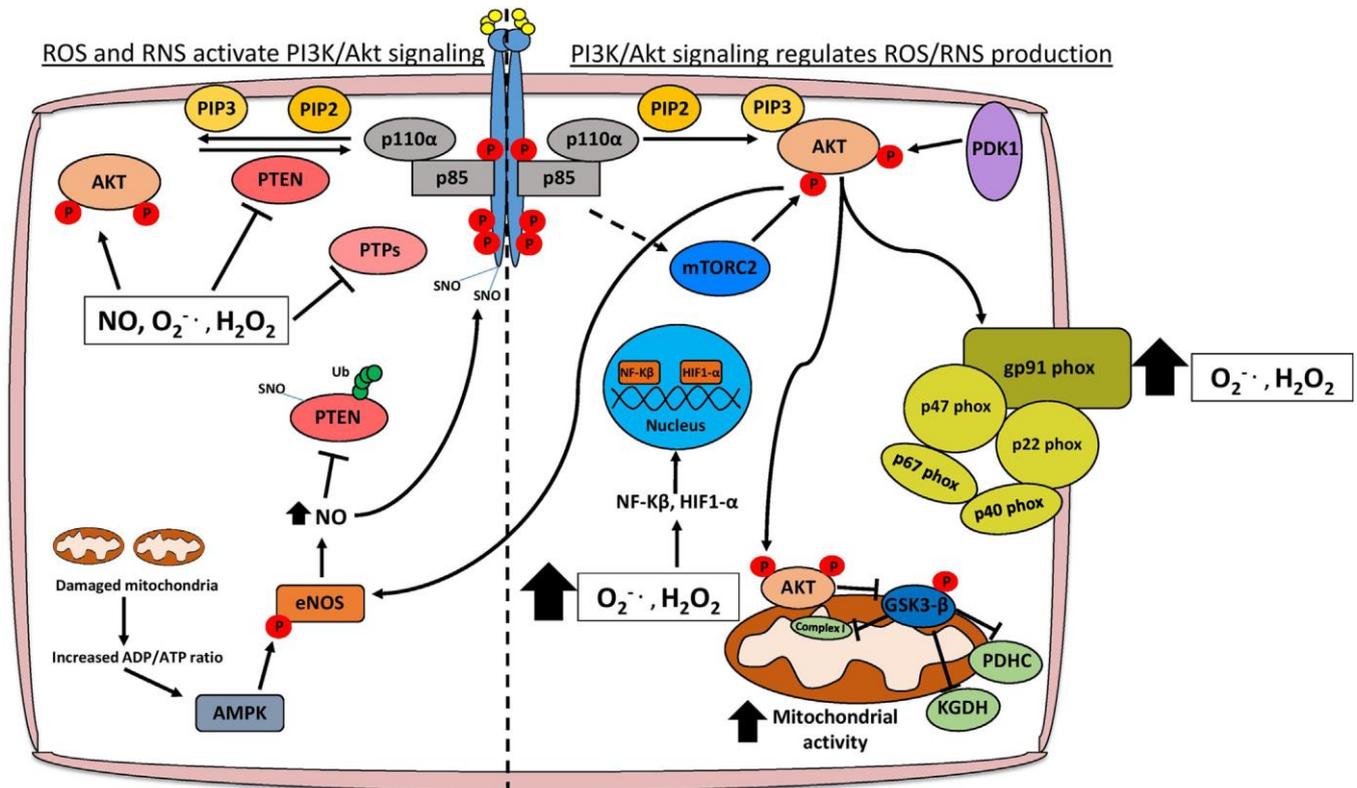


Figura 28. Representación esquemática de la interrelación entre la señalización por PI3K/Akt y el estrés oxidativo. La activación de la vía PI3K/Akt ocurre luego de la estimulación de receptores tirosin-quinasa o de receptores acoplados a proteínas G. Akt puede regular positivamente la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS/RNS) a través de la modulación directa de la bioenergética mitocondrial y de la activación de NADPH oxidasas. Los niveles celulares de ROS también pueden potenciar la cascada de PI3K, por activación directa de Akt, por estimulación de receptores a través de SNO (S-nitrosilación), o por inhibición de distintas proteínas supresoras de tumores (PTEN y PTPs). Además, niveles elevados de ROS promueven la translocación nuclear de NF- κ B y HIF1- α , que regulan transcripcionalmente varios genes involucrados en la protección contra el estrés oxidativo. *Extraído de Koundouros & Poulogiannis, 2018.*

V.V- Discrepancias fenotípicas y compensación genética

Una posible explicación para los resultados descritos es la potencial activación de mecanismos de compensación genética como consecuencia de la mutación de *higd1a*. Algunos de los primeros reportes de la puesta en marcha de este tipo de mecanismos como respuesta a mutaciones deletéreas fueron publicados en 2015 (Rossi et al., 2015; Schauermaun et al., 2015), y desde entonces vienen siendo una preocupación creciente en trabajos que abordan la

generación de líneas mutantes. Rossi y colaboradores demostraron para dos genes vinculados con el desarrollo vascular, *egfl7* y *vegfaa*, que la introducción de mutaciones deletéreas originaba la inducción transcripcional de genes relacionados: en el caso de *egfl7*, genes de la familia de las *emilinas*, las cuales poseen un dominio funcional común con *egfl7*; y en el caso de *vegfaa*, el parólogo *vegfab*. Realizando experimentos con dos aproximaciones de *knockdown* distintas, morfolino y CRISPR interferente, se comprobó que estos genes sólo eran inducidos en los organismos mutantes. Además, mientras los mutantes mostraban un fenotipo leve, los individuos morfantes para *egfl7* presentaban defectos vasculares severos, y éstos pudieron ser rescatados al sobre-expresar dos de las *emilinas*, indicando que posiblemente estos genes eran responsables de contrarrestar los efectos de la mutación (Rossi et al., 2015). En la misma línea, otras dos investigaciones, una de ellas estudiando mutantes del gen de actina *actc1b*, y la otra, mutantes de un miembro de la familia de factores de transcripción Snail, registraron un fenómeno similar. Ambos trabajos describen discrepancias entre los fenotipos mutantes y morfantes, siendo el primero indetectable, o mucho más leve que el segundo; y además, los dos trabajos reportan una expresión incrementada de genes de la misma familia que el gen anulado en las líneas mutantes, hecho que no sucede en los individuos inyectados con morfolino. Se propone entonces, que el aumento en la expresión de esos genes estaría mediando los efectos compensatorios (Sztal et al., 2018; Bickers et al., 2018). En una revisión reciente, El-Brolosy & Stainier compilan una serie de casos que involucran la inducción de compensación genética en varias especies de eucariotas superiores, y proponen posibles mecanismos subyacentes a dicho fenómeno. Entre ellos, destacan las vías de “vigilancia” de ARN mensajeros, que son activadas por los distintos efectos que pueden tener las mutaciones sobre las moléculas de ARNm; éstos son: la aparición de un codón STOP prematuro (vía de *nonsense-mediated decay*), la formación de estructuras secundarias que obstaculizan la translocación ribosomal (vía de *no-go decay*) o la carencia de codón STOP (vía de *no-stop decay*). Se hipotetiza que los fragmentos de ARNm resultantes de la activación de estas vías actuarían regulando la expresión de genes potencialmente compensatorios, por ejemplo, hibridando con transcritos antisentido de genes emparentados en secuencia. Otro modo sería a través de proteínas de unión a ARN, que pueden modular múltiples blancos funcionalmente relacionados; en este caso, la eliminación de sitios de unión para dichas proteínas en los ARNm mutados permitiría que se hallen más disponibles para unirse y estabilizar la expresión de genes compensatorios (El-Brolosy & Stainier, 2017). Schauermann y colaboradores aportaron interesantes evidencias en este aspecto, al encontrar que dos mutaciones diferentes, localizadas en el mismo exón de la Metalotioneína 2, resultaban en un distinto grado de severidad fenotípica. Los investigadores pudieron comprobar que estas diferencias obedecían a una activación desigual de la vía *nonsense-mediated decay* (Schauermann et al., 2015).

Los antecedentes relatados abren nuevas perspectivas para la interpretación de los resultados observados en nuestros experimentos con las líneas mutantes para *higd1a*. En particular,

teniendo en cuenta la presencia de una proteína estrechamente relacionada, como lo es Higd2a, y cuya existencia no había sido confirmada hasta luego de comenzar este trabajo.

En lo referente a la morfología de los cartílagos cráneo-faciales, hubo incongruencias entre los efectos que mostraron los individuos inyectados con morfolino para *higd1a* (Fig. 5.C, D; Sosa, I., 2014) y lo registrado en las líneas mutantes, siendo prácticamente nulos en estas últimas. Se presentan como posibles dos alternativas: por un lado, que el fenotipo observado en los ensayos de *knockdown* sea consecuencia de efectos inespecíficos del morfolino; y por otro, que vías de compensación genética activadas en los individuos mutantes rescaten el fenotipo y enmascaren la función de Higd1a. Una estrategia que se ha utilizado para discriminar entre estos posibles escenarios es la inyección de morfolino en líneas mutantes. Embriones mutantes que tuviesen un aumento en la expresión de genes potencialmente compensatorios, podrían mostrar una sensibilidad disminuida frente al *knockdown* con morfolino y, por consiguiente, exhibir un fenotipo más atenuado (Rossi et al., 2015; Sztal et al., 2018).

Asimismo, en el contexto de los hallazgos arriba citados, se podría hipotetizar que los mayores niveles basales de γ -H2AX y el aumento de la supervivencia frente al estrés anóxico que mostraron los individuos de las líneas mutantes para *higd1a*, podrían ser originados por una inducción de vías compensatorias ante la pérdida de función de la proteína. En particular, por una inducción de vías de señalización como la de PI3K/Akt, que resulten en un aumento crónico de los niveles de ROS, lo cual podría, en cierto modo, simular los efectos protectores de un precondicionamiento hipóxico.

En este sentido, sería interesante evaluar si los individuos mutantes para *higd1a* poseen una expresión diferencial en alguno de los genes asociados a los mecanismos de precondicionamiento hipóxico.

Adicionalmente, los resultados de varios de los experimentos muestran, en la comparación con los controles salvajes, que ambas líneas mutantes siguen tendencias similares; esto es, una actividad motora exacerbada, una mayor sobrevida tras exposición a anoxia y mayores niveles basales de histona H2AX fosforilada. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la magnitud de las diferencias no fue la misma, hecho que podría explicarse sencillamente por la variabilidad entre individuos y por sesgos a causa de tamaños muestrales insuficientes. Aún así, en vista de lo reportado por Shauermann y colaboradores, cabría la posibilidad de que estas diferencias observadas puedan deberse a una activación diferencial de mecanismos compensatorios. Más aún, considerando el hecho que la mutación 2 introduce un codón STOP prematuro, mientras que la mutación 1 no lo hace; por lo cual, de activarse los mencionados mecanismos de “vigilancia” del ARNm, es posible que las dos mutaciones resulten en la inducción de vías diferentes.

VI. CONCLUSIONES & PERSPECTIVAS

En un balance general y respondiendo a los objetivos planteados al inicio, en el presente de trabajo se logró generar una línea de pez cebra *knockout* para el gen *higd1a*, implementando exitosamente el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9. Creemos que esto constituye una valiosa herramienta para continuar profundizando en el estudio particular de la función del gen, y destacamos como un capital adquirido el conocimiento y manejo de este abordaje experimental.

Globalmente, las evidencias recogidas en cuanto a los niveles cambiantes de expresión de la proteína durante el desarrollo, parecen apuntar a un rol potencialmente importante de la proteína Higd1a en esta etapa de la vida del organismo. No obstante, su distribución espacial en los diferentes tejidos y también a escala subcelular deben aún ser definidos con precisión.

Una primera aproximación al análisis del fenotipo mutante ha dado indicios de la participación de Higd1a sobre el control del sistema locomotor y sobre el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno, que se traducirían en modificaciones en la tolerancia de los embriones frente al estrés anóxico. Asimismo, los resultados observados sugieren una posible activación de mecanismos potencialmente compensatorios en respuesta a la mutación de *higd1a*, y abren interesantes perspectivas en cuanto a la exploración de este tipo de estrategias celulares, cuyo conocimiento es aún incipiente.

Como perspectivas a corto plazo, nos proponemos evaluar la viabilidad de la mutación *higd1a* en homocigosis, en animales adultos. De confirmarse su viabilidad y la capacidad reproductiva de los animales, se repetirán los experimentos realizados con las progenies de esos individuos, con el fin de evaluar la mutación de *higd1a* tanto a nivel materno como cigótico, así como de lograr ampliar el número de casos (N) para los distintos análisis.

Además, pretendemos analizar en muestras proteicas extraídas de los individuos sujetos a la exposición anóxica, posibles marcadores moleculares diferencialmente expresados, que ayuden a comprender los mecanismos subyacentes a los resultados observados. En particular, sería interesante analizar factores vinculados a la apoptosis, como Caspasa 3 activada, así como también factores involucrados en conocidas vías protectoras, como AMPK y Nrf2.

A mediano y largo plazo, tenemos como meta analizar la expresión de *higd2a*, tanto en embriones *wild type*, como en individuos de las líneas mutantes generadas en este trabajo. Consideramos también importante ensayar el *knockdown* de ese gen, como un primer abordaje a examinar posibles mecanismos compensatorios de la función de *higd1a*. Asimismo, en una aproximación más global, resultaría sumamente interesante realizar análisis transcriptómico y proteómico de los individuos mutantes para detectar la posible activación de vías que puedan

estar involucradas en el metabolismo redox y en la tolerancia a la depleción de oxígeno. También sería de interés examinar con más detalle los niveles y distribución de ROS en embriones de las líneas mutantes, utilizando diferentes sondas fluorescentes, de uso común en este tipo de experimentos.

Agradecimientos

Agradezco muy especialmente a mis orientadores, los Dres. Gabriela Bedó y Flavio Zolessi, por la responsabilidad y el respeto con que asumen ese rol, por su carácter docente y la siempre buena disposición con que lo ejercen.

También al tribunal, los Dres. Celia Quijano, José Badano y Uriel Koziol, por la buena voluntad que mostraron al ser invitados para corregir esta tesis.

A todos los compañeros de las secciones Genética Evolutiva y Biología Celular de Facultad de Ciencias.

A los integrantes del LBCDN del Insitut Pasteur de Montevideo y allegados, con quienes compartimos el grupo de Seminarios.

Especialmente a Gisell y a Casandra, por cuidar y haber cuidado de los peces.

Al Dr. Gustavo Salinas y la Mag. Cecilia Martínez por poner a disposición la cámara de hipoxia.

A familiares y amigos.

Por último, agradezco a las instituciones que han colaborado en financiar este trabajo: la Agencia Nacional de Investigación e Innovación y la Comisión Académica de Posgrado, a través de becas, y PEDECIBA, a través de financiación de cursos en el exterior.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ablain, J., Durand, E. M., Yang, S., Zhou, Y., & Zon, L. I. (2015). A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish. *Developmental cell*, 32(6), 756-764.
- Akimenko, M. A., Ekker, M., Wegner, J., Lin, W., & Westerfield, M. (1994). Combinatorial expression of three zebrafish genes related to distal-less: part of a homeobox gene code for the head. *Journal of Neuroscience*, 14(6), 3475-3486.
- Akimitsu, N. (2007). Messenger RNA surveillance systems monitoring proper translation termination. *Journal of biochemistry*, 143(1), 1-8.
- Aldridge, G. M., Podrebarac, D. M., Greenough, W. T., & Weiler, I. J. (2008). The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *Journal of neuroscience methods*, 172(2), 250-254.
- Ameri, K., Jahangiri, A., Rajah, A. M., Tormos, K. V., Nagarajan, R., Pekmezci, M., ... & Jeffrey, S. S. (2015). HIGD1A regulates oxygen consumption, ROS production, and AMPK activity during glucose deprivation to modulate cell survival and tumor growth. *Cell reports*, 10(6), 891-899.
- Ameri, K., Rajah, A. M., Nguyen, V., Sanders, T. A., Jahangiri, A., DeLay, M., ... & Jeffrey, S. S. (2013). Nuclear localization of the mitochondrial factor HIGD1A during metabolic stress. *PLoS One*, 8(4), e62758.
- An, H. J., Cho, G., Lee, J. O., Paik, S. G., Kim, Y. S., & Lee, H. (2013). Higd-1a interacts with Opa1 and is required for the morphological and functional integrity of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(32), 13014-13019.
- An, H. J., Shin, H., Jo, S. G., Kim, Y. J., Lee, J. O., Paik, S. G., & Lee, H. (2011). The survival effect of mitochondrial Higd-1a is associated with suppression of cytochrome C release and prevention of caspase activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(12), 2088-2098.
- An, J., Huang, Y. C., Xu, Q. Z., Zhou, L. J., Shang, Z. F., Huang, B., ... & Zhou, P. K. (2010). DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC molecular biology*, 11(1), 18.
- Andermann, P., Ungos, J., & Raible, D. W. (2002). Neurogenin1 defines zebrafish cranial sensory ganglia precursors. *Developmental biology*, 251(1), 45-58.
- Angeloni, C., Spencer, J. P. E., Leoncini, E., Biagi, P. L., & Hrelia, S. (2007). Role of quercetin and its in vivo metabolites in protecting H9c2 cells against oxidative stress. *Biochimie*, 89(1), 73-82.
- Aoyama, T., Takeshita, K., Kikuchi, R., Yamamoto, K., Cheng, X. W., Liao, J. K., & Murohara, T. (2009). γ -Secretase inhibitor reduces diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 383(2), 216-221.
- Appelhoff, R. J., Tian, Y. M., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., ... & Gleadle, J. M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38458-38465.
- Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., ... & Livingston, D. M. (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23), 12969-12973.
- Arumugam, T. V., Chan, S. L., Jo, D. G., Yilmaz, G., Tang, S. C., Cheng, A., ... & Mughal, M. R. (2006). Gamma secretase-mediated Notch signaling worsens brain damage and functional outcome in ischemic stroke. *Nature medicine*, 12(6), 621.
- Azad, P., & Haddad, G. G. (2013). Genetic animal models of preconditioning. *Translational stroke research*, 4(1), 51-55.

- Barrallo-Gimeno, A., Holzschuh, J., Driever, W., & Knapik, E. W. (2004). Neural crest survival and differentiation in zebrafish depends on mont blanc/ tfap2a gene function. *Development*, 131(7), 1463-1477.
- Barriga, E. H., Maxwell, P. H., Reyes, A. E., & Mayor, R. (2013). The hypoxia factor Hif-1 α controls neural crest chemotaxis and epithelial to mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 201(5), 759-776.
- Bedó, G., Lagos, P., & Agrati, D. (2012). Temporal distribution of Hig-1 (hypoxia-induced gene 1) mRNA and protein in rat spinal cord: changes during postnatal life. *Journal of Molecular Neuroscience*, 47(3), 666-673.
- Bedo, G., Vargas, M., Ferreiro, M. J., Chalar, C., & Agrati, D. (2005). Characterization of hypoxia induced gene 1: expression during rat central nervous system maturation and evidence of antisense RNA expression. *International Journal of Developmental Biology*, 49(4), 431-436.
- Bickers, C., Española, S. D., Grainger, S., Pouget, C., & Traver, D. (2018). Zebrafish snai2 mutants fail to phenocopy morphant phenotypes. *PloS one*, 13(9), e0202747.
- Blanco, Valentina. 2017. "El gen inducido por hipoxia, Hig (Hypoxia induced gene): análisis del patrón tisular y temporal de la expresión de sus diferentes formas.": 1-58.
- Bleckmann, S. C., Blendy, J. A., Rudolph, D., Monaghan, A. P., Schmid, W., & Schütz, G. (2002). Activating transcription factor 1 and CREB are important for cell survival during early mouse development. *Molecular and cellular biology*, 22(6), 1919-1925.
- Boer, E. F., Jette, C. A., & Stewart, R. A. (2016). Neural crest migration and survival are susceptible to morpholino-induced artifacts. *PloS one*, 11(12), e0167278.
- Braunbeck, T., & Lammer, E. (2006). Fish embryo toxicity assays. *German Federal Environment Agency*, 298.
- Bruce, A. E. (2016). Zebrafish epiboly: spreading thin over the yolk. *Developmental Dynamics*, 245(3), 244-258.
- Buetler, T. M., Krauskopf, A., & Ruegg, U. T. (2004). Role of superoxide as a signaling molecule. *Physiology*, 19(3), 120-123.
- Burger, A., Lindsay, H., Felker, A., Hess, C., Anders, C., Chivacci, E., ... & Robinson, M. D. (2016). Maximizing mutagenesis with solubilized CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Development*, 143(11), 2025-2037.
- Carroll, D. (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188(4), 773-782.
- Chang, A. J., & Bargmann, C. I. (2008). Hypoxia and the HIF-1 transcriptional pathway reorganize a neuronal circuit for oxygen-dependent behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(20), 7321-7326.
- Chanoux, R. A., Yin, B., Urtishak, K. A., Asare, A., Bassing, C. H., & Brown, E. J. (2009). ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *Journal of Biological Chemistry*, 284(9), 5994-6003.
- Chanrion, M., Negre, V., Fontaine, H., Salvétat, N., Bibeau, F., Mac Grogan, G., ... & Darbon, J. M. (2008). A gene expression signature that can predict the recurrence of tamoxifen-treated primary breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(6), 1744-1752.
- Chen, L., Fink, T., Zhang, X. Y., Ebbesen, P., & Zachar, V. (2005). Quantitative transcriptional profiling of ATDC5 mouse progenitor cells during chondrogenesis. *Differentiation*, 73(7), 350-363.
- Chen, Y. H., Wang, Y. H., Yu, T. H., Wu, H. J., & Pai, C. W. (2009). Transgenic zebrafish line with over-expression of Hedgehog on the skin: a useful tool to screen Hedgehog-inhibiting compounds. *Transgenic research*, 18(6), 855.
- Chen, Y., & Gibson, S. B. (2008). Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy?. *Autophagy*, 4(2), 246-248.
- Conway, G. (1995). A novel gene expressed during zebrafish gastrulation identified by differential RNA display. *Mechanisms of development*, 52(2-3), 383-391.

- Costa, V., Esposito, R., Aprile, M., & Ciccodicola, A. (2012). Non-coding RNA and pseudogenes in neurodegenerative diseases: “The (un) Usual Suspects”. *Frontiers in genetics*, 3, 231.
- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., & Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active?. *Developmental biology*, 320(1), 1-11.
- Cox, J. A., McAdow, A. R., Dinitz, A. E., McCallion, A. S., Johnson, S. L., & Voigt, M. M. (2011). A zebrafish SKIV2L2-enhancer trap line provides a useful tool for the study of peripheral sensory circuit development. *Gene Expression Patterns*, 11(7), 409-414.
- Denko, N., Schindler, C., Koong, A., Laderoute, K., Green, C., & Giaccia, A. (2000). Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research*, 6(2), 480-487.
- Despic, V., & Neugebauer, K. M. (2018). RNA tales—how embryos read and discard messages from mom. *J Cell Sci*, 131(5), jcs201996.
- Di Donato, V., De Santis, F., Auer, T. O., Testa, N., Sánchez-Iranzo, H., Mercader, N., ... & Del Bene, F. (2016). 2C-Cas9: a versatile tool for clonal analysis of gene function. *Genome research*, 26(5), 681-692.
- Ding, Y., Li, H., Chen, L. L., & Xie, K. (2016). Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9. *Frontiers in plant science*, 7, 703.
- Du, L., & Pertsemlidis, A. (2011). Cancer and neurodegenerative disorders: pathogenic convergence through microRNA regulation. *Journal of molecular cell biology*, 3(3), 176-180.
- Dworkin, S., Heath, J. K., Hogan, B. M., Lieschke, G. J., Malaterre, J., Ramsay, R. G., & Mantamadiotis, T. (2007). CREB activity modulates neural cell proliferation, midbrain–hindbrain organization and patterning in zebrafish. *Developmental biology*, 307(1), 127-141.
- Eales, K. L., Hollinshead, K. E. R., & Tennant, D. A. (2016). Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*, 5(1), e190.
- El-Brolosy, M. A., & Stainier, D. Y. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS genetics*, 13(7), e1006780.
- Farrell, J. A., Wang, Y., Riesenfeld, S. J., Shekhar, K., Regev, A., & Schier, A. F. (2018). Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. *Science*, 360(6392), eaar3131.
- Firth, J. D., Ebert, B. L., & Ratcliffe, P. J. (1995). Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *Journal of Biological Chemistry*, 270(36), 21021-21027.
- Garlich, J., Strecker, V., Wittig, I., & Stuart, R. A. (2017). Mutational analysis of the QRRQ motif in the yeast Hig1 type 2 protein Rcf1 reveals a regulatory role for the cytochrome c oxidase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 292(13), 5216-5226.
- Gauron, C., Meda, F., Dupont, E., Albadri, S., Quenech’Du, N., Ipendey, E., ... & Vríz, S. (2016). Hydrogen peroxide (H₂O₂) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Developmental biology*, 414(2), 133-141.
- Gavriouchkina, D., Fischer, S., Ivacevic, T., Stolte, J., Benes, V., & Dekens, M. P. (2010). Thyrotroph embryonic factor regulates light-induced transcription of repair genes in zebrafish embryonic cells. *PLoS One*, 5(9), e12542.
- Gidday, J. M. (2006). Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(6), 437.
- Greenald, D., Jeyakani, J., Pelster, B., Sealy, I., Mathavan, S., & van Eeden, F. J. (2015). Genome-wide mapping of Hif-1 α binding sites in zebrafish. *BMC genomics*, 16(1), 923.
- Guerra-Castellano, A., Díaz-Quintana, A., Pérez-Mejías, G., Elena-Real, C. A., González-Arzola, K., García-Mauriño, S. M., ... & Díaz-Moreno, I. (2018). Oxidative stress is tightly regulated by cytochrome c phosphorylation and respirasome factors in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(31), 7955-7960.

- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, *127*(4), 679-695.
- Gurung, R., Ono, Y., Baxendale, S., Lee, S. L. C., Moore, S., Calvert, M., & Ingham, P. W. (2017). A zebrafish model for a human myopathy associated with mutation of the unconventional myosin MYO18B. *Genetics*, *205*(2), 725-735.
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (1993). Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide. *Cell*, *75*(6), 1039-1042.
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2013). Mitochondrial metabolism as a regulator of keratinocyte differentiation. *Cellular logistics*, *3*(2), ra8.
- Hamdulay, S. S., Wang, B., Calay, D., Kiprianos, A. P., Cole, J., Dumont, O., ... & Hoong, C. (2014). Synergistic therapeutic vascular cytoprotection against complement-mediated injury induced via a PKC α -, AMPK-, and CREB-dependent pathway. *The Journal of Immunology*, *192*(9), 4316-4327.
- Harigaya, Y., & Parker, R. (2010). No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *1*(1), 132-141.
- Harrison, M. M., Jenkins, B. V., O'Connor-Giles, K. M., & Wildonger, J. (2014). A CRISPR view of development. *Genes & development*, *28*(17), 1859-1872.
- Hayashi, H., Nakagami, H., Takeichi, M., Shimamura, M., Koibuchi, N., Oiki, E., ... & Maeda, A. (2012). HIG1, a novel regulator of mitochondrial γ -secretase, maintains normal mitochondrial function. *The FASEB Journal*, *26*(6), 2306-2317.
- Hayashi, T., Asano, Y., Shintani, Y., Aoyama, H., Kioka, H., Tsukamoto, O., ... & Kato, H. (2015). Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(5), 1553-1558.
- Hernández-García, D., Wood, C. D., Castro-Obregón, S., & Covarrubias, L. (2010). Reactive oxygen species: a radical role in development?. *Free Radical Biology and Medicine*, *49*(2), 130-143.
- Higashijima, S. I., Hotta, Y., & Okamoto, H. (2000). Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the islet-1 promoter/enhancer. *Journal of Neuroscience*, *20*(1), 206-218.
- Hill, R. P., Marie-Egyptienne, D. T., & Hedley, D. W. (2009, April). Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. In *Seminars in radiation oncology* (Vol. 19, No. 2, pp. 106-111). WB Saunders.
- Hirayama, J., Cho, S., & Sassone-Corsi, P. (2007). Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(40), 15747-15752.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... & McLaren, S. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, *157*(6), 1262-1278.
- Hu, P., Liu, M., Zhang, D., Wang, J., Niu, H., Liu, Y., ... & Chen, L. (2015). Global identification of the genetic networks and cis-regulatory elements of the cold response in zebrafish. *Nucleic acids research*, *43*(19), 9198-9213.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., ... & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, *31*(3), 227.
- Jao, L. E., Wente, S. R., & Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(34), 13904-13909.
- Jeon, S. M., Chandel, N. S., & Hay, N. (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*, *485*(7400), 661.
- Jin, K., Mao, X. O., Eshoo, M. W., Del Rio, G., Rao, R., Chen, D., ... & Greenberg, D. A. (2002). cDNA microarray analysis of changes in gene expression induced by neuronal hypoxia in vitro. *Neurochemical research*, *27*(10), 1105-1112.
- Jukam, D., Shariati, S. A. M., & Skotheim, J. M. (2017). Zygotic genome activation in vertebrates. *Developmental cell*, *42*(4), 316-332.

- Kajimura, S., Aida, K., & Duan, C. (2005). Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) mediates hypoxia-induced embryonic growth and developmental retardation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(4), 1240-1245.
- Kajimura, S., Aida, K., & Duan, C. (2006). Understanding hypoxia-induced gene expression in early development: in vitro and in vivo analysis of hypoxia-inducible factor 1-regulated zebra fish insulin-like growth factor binding protein 1 gene expression. *Molecular and cellular biology*, *26*(3), 1142-1155.
- Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., & Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *The EMBO journal*, *17*(22), 6573-6586.
- Kao, G. D., Jiang, Z., Fernandes, A. M., Gupta, A. K., & Maity, A. (2007). Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(29), 21206-21212.
- Kettleborough, R. N., Busch-Nentwich, E. M., Harvey, S. A., Dooley, C. M., de Bruijn, E., van Eeden, F., ... & Fényes, F. (2013). A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*, *496*(7446), 494.
- Kim, H. R., & Ingham, P. W. (2009). The extracellular matrix protein TGFBI promotes myofibril bundling and muscle fibre growth in the zebrafish embryo. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, *238*(1), 56-65.
- Kim, J. W., Gao, P., & Dang, C. V. (2007). Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer and Metastasis Reviews*, *26*(2), 291-298.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, *203*(3), 253-310.
- Kimmel, C. B., Miller, C. T., Kruze, G., Ullmann, B., BreMiller, R. A., Larison, K. D., & Snyder, H. C. (1998). The shaping of pharyngeal cartilages during early development of the zebrafish. *Developmental biology*, *203*(2), 245-263.
- Klammt, C., Maslennikov, I., Bayrhuber, M., Eichmann, C., Vajpai, N., Chiu, E. J. C., ... & Pieper, U. (2012). Facile backbone structure determination of human membrane proteins by NMR spectroscopy. *Nature methods*, *9*(8), 834.
- Kok, F. O., Shin, M., Ni, C. W., Gupta, A., Grosse, A. S., van Impel, A., ... & DeSantis, D. F. (2015). Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Developmental cell*, *32*(1), 97-108.
- Kopp, R., Bauer, I., Ramalingam, A., Egg, M., & Schwerte, T. (2014). Prolonged hypoxia increases survival even in zebrafish (*Danio rerio*) showing cardiac arrhythmia. *PLoS One*, *9*(2), e89099.
- Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2018). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling and redox metabolism in cancer. *Frontiers in oncology*, *8*.
- Kucia, M., Reza, R., Miekus, K., Wanzeck, J., Wojakowski, W., Janowska-Wieczorek, A., ... & Ratajczak, M. Z. (2005). Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem cells*, *23*(7), 879-894.
- Kwak, J., Park, O. K., Jung, Y. J., Hwang, B. J., Kwon, S. H., & Kee, Y. (2013). Live image profiling of neural crest lineages in zebrafish transgenic lines. *Molecules and cells*, *35*(3), 255-260.
- Lattanzi, W., Bernardini, C., Gangitano, C., & Michetti, F. (2007). Hypoxia-like transcriptional activation in TMT-induced degeneration: microarray expression analysis on PC12 cells. *Journal of neurochemistry*, *100*(6), 1688-1702.
- Law, S. H., & Sargent, T. D. (2014). The serine-threonine protein kinase PAK4 is dispensable in zebrafish: identification of a morpholino-generated pseudophenotype. *PLoS one*, *9*(6), e100268.
- Lee, M. T., Bonneau, A. R., & Giraldez, A. J. (2014). Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annual review of cell and developmental biology*, *30*, 581-613.

- Liu, J., Narasimhan, P., Yu, F., & Chan, P. H. (2005). Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin. *Stroke*, 36(6), 1264-1269.
- Liu, Q., Dalman, M. R., Sarmah, S., Chen, S., Chen, Y., Hurlbut, A. K., ... & Marrs, J. A. (2011). Cell adhesion molecule cadherin-6 function in zebrafish cranial and lateral line ganglia development. *Developmental Dynamics*, 240(7), 1716-1726.
- Long, F., Schipani, E., Asahara, H., Kronenberg, H., & Montminy, M. (2001). The CREB family of activators is required for endochondral bone development. *Development*, 128(4), 541-550.
- López, L., Zuluaga, M. J., Lagos, P., Agrati, D., & Bedó, G. (2018). The Expression of Hypoxia-Induced Gene 1 (Higd1a) in the Central Nervous System of Male and Female Rats Differs According to Age. *Journal of Molecular Neuroscience*, 66(3), 462-473.
- Lowrie, M. B., & Lawson, S. J. (2000). Cell death of spinal interneurons. *Progress in neurobiology*, 61(6), 543-555.
- Luo, R., An, M., Arduini, B. L., & Henion, P. D. (2001). Specific pan-neural crest expression of zebrafish Crestin throughout embryonic development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 220(2), 169-174.
- Lutz, B., Schmid, W., Niehrs, C., & Schütz, G. (1999). Essential role of CREB family proteins during *Xenopus* embryogenesis. *Mechanisms of development*, 88(1), 55-66.
- Lykke-Andersen, S., & Jensen, T. H. (2015). Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(11), 665.
- Manchenkov, T., Pasillas, M. P., Haddad, G. G., & Imam, F. B. (2015). Novel genes critical for hypoxic preconditioning in zebrafish are regulators of insulin and glucose metabolism. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5(6), 1107-1116.
- McCurley, A. T., & Callard, G. V. (2008). Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC molecular biology*, 9(1), 102.
- McGee, S. L., & Hargreaves, M. (2008). AMPK and transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, 3022-3033.
- Mendelsohn, B. A., & Gitlin, J. D. (2008). Coordination of development and metabolism in the pre-midblastula transition zebrafish embryo. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(7), 1789-1798.
- Mendelsohn, B. A., Kassebaum, B. L., & Gitlin, J. D. (2008). The zebrafish embryo as a dynamic model of anoxia tolerance. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(7), 1780-1788.
- Mendelson, B. (1986). Development of reticulospinal neurons of the zebrafish. I. Time of origin. *Journal of Comparative Neurology*, 251(2), 160-171.
- Mendelson, B. (1986). Development of reticulospinal neurons of the zebrafish. II. Early axonal outgrowth and cell body position. *Journal of Comparative Neurology*, 251(2), 172-184.
- Mendieta-Serrano, M. A., Mendez-Cruz, F. J., Antúnez-Mojica, M., Schnabel, D., Alvarez, L., Cárdenas, L., ... & Salas-Vidal, E. (2019). NADPH-Oxidase-derived reactive oxygen species are required for cytoskeletal organization, proper localization of E-cadherin and cell motility during zebrafish epiboly. *Free Radical Biology and Medicine*, 130, 82-98.
- Mendoza-Paredes, A., Liu, H., Schears, G., Yu, Z., Markowitz, S. D., Schultz, S., ... & Wilson, D. F. (2008). Resuscitation with 100%, compared with 21%, oxygen following brief, repeated periods of apnea can protect vulnerable neonatal brain regions from apoptotic injury. *Resuscitation*, 76(2), 261-270.
- Moens, C. B., Yan, Y. L., Appel, B., Force, A. G., & Kimmel, C. B. (1996). Valentino: a zebrafish gene required for normal hindbrain segmentation. *Development*, 122(12), 3981-3990.

- Moreno-Mateos, M. A., Vejnar, C. E., Beaudoin, J. D., Fernandez, J. P., Mis, E. K., Khokha, M. K., & Giraldez, A. J. (2015). CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nature methods*, 12(10), 982.
- Mu, J., Krafft, P. R., & Zhang, J. H. (2011). Hyperbaric oxygen therapy promotes neurogenesis: where do we stand?. *Medical gas research*, 1(1), 14.
- Mueller, T., & Wullimann, M. F. (2002). Expression domains of neuroD (nrd) in the early postembryonic zebrafish brain. *Brain research bulletin*, 57(3-4), 377-379.
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124-1136.
- Nasevicius, A., & Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature genetics*, 26(2), 216.
- Nery, L. R., Eltz, N. S., Martins, L., Guerim, L. D., Pereira, T. C., Bogo, M. R., & Vianna, M. R. (2014). Sustained behavioral effects of lithium exposure during early development in zebrafish: involvement of the Wnt- β -catenin signaling pathway. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 55, 101-108.
- Nery, L. R., Silva, N. E., Fonseca, R., & Vianna, M. R. M. (2017). Presenilin-1 Targeted Morpholino Induces Cognitive Deficits, Increased Brain A β 1-42 and Decreased Synaptic Marker PSD-95 in Zebrafish Larvae. *Neurochemical research*, 42(10), 2959-2967.
- Neuhaus, S. C., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Zwartkruis, F., Stemple, D. L., Malicki, J., ... & Driever, W. (1996). Mutations affecting craniofacial development in zebrafish. *Development*, 123(1), 357-367.
- Padilla, P. A., & Roth, M. B. (2001). Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7331-7335.
- Park, E. J., Chan, D. W., Park, J. H., Oettinger, M. A., & Kwon, J. (2003). DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic acids research*, 31(23), 6819-6827.
- Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O. M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G. M., & Mazoyer, S. (2002). The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Human molecular genetics*, 11(23), 2805-2814.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST[©]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36.
- Podhorecka, M., Skladanowski, A., & Bozko, P. (2010). H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. *Journal of nucleic acids*, 2010.
- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W. J., & Pandolfi, P. P. (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465(7301), 1033.
- Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P. E., & Zolessi, F. R. (2014). A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and cell biology*, 142(3), 335-345.
- Quigley, I. K., & Parichy, D. M. (2002). Pigment pattern formation in zebrafish: a model for developmental genetics and the evolution of form. *Microscopy research and technique*, 58(6), 442-455.
- Raible, D. W., & Kruse, G. J. (2000). Organization of the lateral line system in embryonic zebrafish. *Journal of Comparative Neurology*, 421(2), 189-198.
- Rajpurohit, R., Koch, C. J., Tao, Z., Teixeira, C. M., & Shapiro, I. M. (1996). Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. *Journal of cellular physiology*, 168(2), 424-432.
- Richards, J. G., Farrell, A. P., & Brauner, C. J. (Eds.). (2009). *Fish physiology: hypoxia* (Vol. 27). Academic Press. Chapter 3, 105-115 pp.

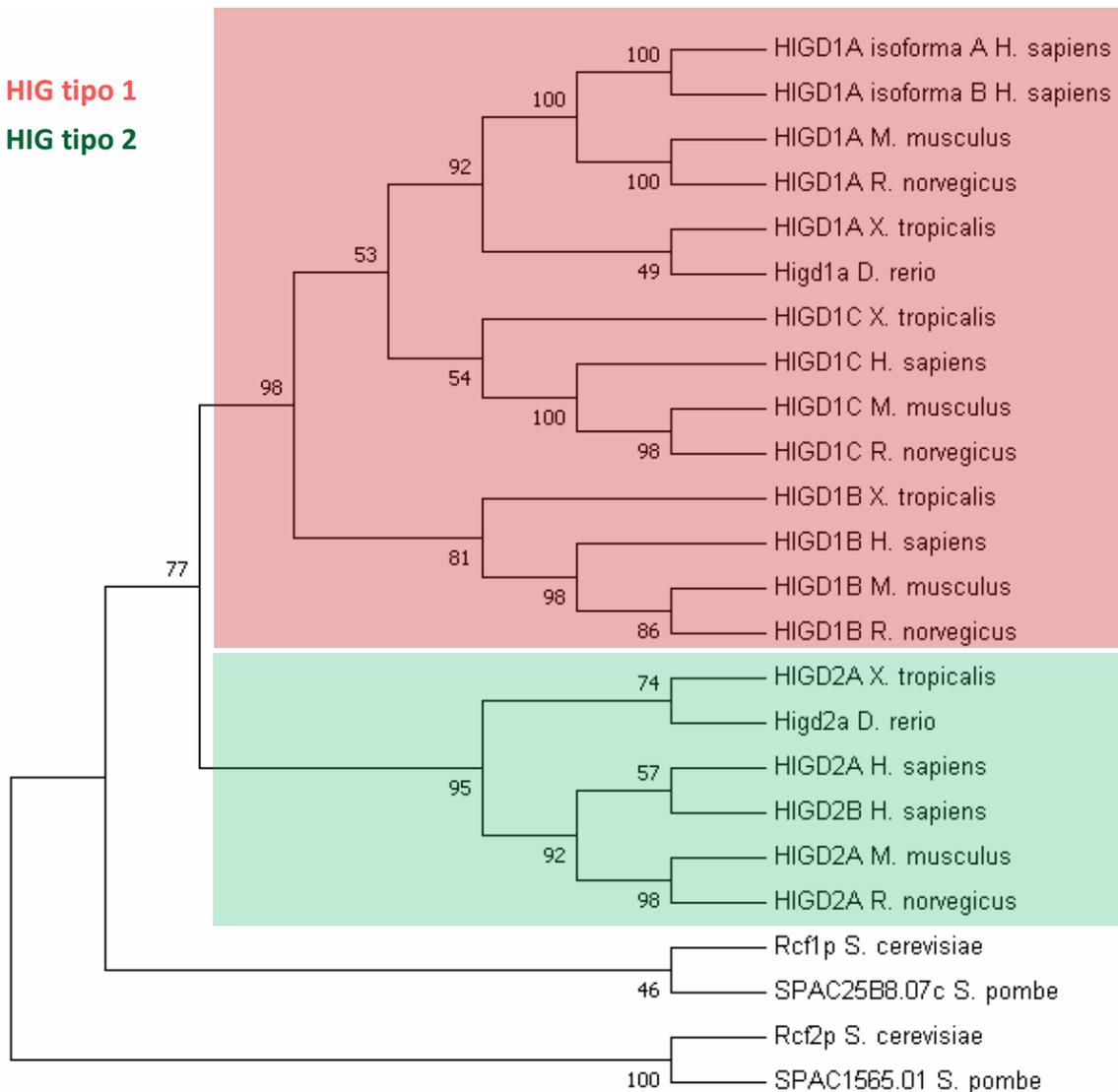
- Robertson, C. E., Wright, P. A., Köblitz, L., & Bernier, N. J. (2014). Hypoxia-inducible factor-1 mediates adaptive developmental plasticity of hypoxia tolerance in zebrafish, *Danio rerio*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1786), 20140637.
- Robinson, K. J., Yuan, K. C., Don, E. K., Hogan, A. L., Winnick, C. G., Tym, M. C., ... & Atkin, J. D. (2018). Motor Neuron Abnormalities Correlate with Impaired Movement in Zebrafish that Express Mutant Superoxide Dismutase 1. *Zebrafish*, 16(1), 8-14.
- Robu, M. E., Larson, J. D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S. A., & Ekker, S. C. (2007). p53 activation by knockdown technologies. *PLoS genetics*, 3(5), e78.
- Rodriguez, A., Zhang, H., Klaminder, J., Brodin, T., Andersson, P. L., & Andersson, M. (2018). ToxTrac: a fast and robust software for tracking organisms. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(3), 460-464.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of biological chemistry*, 273(10), 5858-5868.
- Rojas, D. A., Perez-Munizaga, D. A., Centanin, L., Antonelli, M., Wappner, P., Allende, M. L., & Reyes, A. E. (2007). Cloning of hif-1 α and hif-2 α and mRNA expression pattern during development in zebrafish. *Gene expression patterns*, 7(3), 339-345.
- Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., & de Medina, F. S. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical biochemistry*, 401(2), 318-320.
- Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., & Stainier, D. Y. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*, 524(7564), 230.
- Royer, C., Lachuer, J., Crouzoulon, G., Roux, J. C., Peyronnet, J., Mamet, J., ... & Dalmaz, Y. (2000). Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of Glut3 and Glut4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid hormone receptors in developing rat brain. *Brain research*, 856(1-2), 119-128.
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?. *Cell*, 146(3), 353-358.
- Salnikow, K., Davidson, T., Zhang, Q., Chen, L. C., Su, W., & Costa, M. (2003). The involvement of hypoxia-inducible transcription factor-1-dependent pathway in nickel carcinogenesis. *Cancer research*, 63(13), 3524-3530.
- Sander, J. D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R. T., Joung, J. K., & Yeh, J. R. J. (2011). Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nature biotechnology*, 29(8), 697.
- Santhakumar, K., Judson, E. C., Elks, P. M., McKee, S., Elworthy, S., van Rooijen, E., ... & van Eeden, F. J. (2012). A zebrafish model to study and therapeutically manipulate hypoxia signaling in tumorigenesis. *Cancer research*, 72(16), 4017-4027.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Tinevez, J. Y. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676.
- Schipani, E., Ryan, H. E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., & Johnson, R. S. (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes & development*, 15(21), 2865-2876.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671.
- Schuermann, A., Helker, C. S., & Herzog, W. (2015). Metallothionein 2 regulates endothelial cell migration through transcriptional regulation of vegfc expression. *Angiogenesis*, 18(4), 463-475.
- Schultz-Rogers, L. E., Almeida, M. P., Kool, M., & McGrail, M. (2018). Retinoblastoma binding protein 4 maintains cycling neural stem cells and prevents DNA damage and Tp53-dependent apoptosis in rb1 mutant neural progenitors. *BioRxiv*.
- Semenza, G. L. (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 8(4), S62-S67.
- Shah, A. N., Davey, C. F., Whitebirch, A. C., Miller, A. C., & Moens, C. B. (2015). Rapid reverse genetic screening using CRISPR in zebrafish. *Nature methods*, 12(6), 535.

- Shen, X., Wan, C., Ramaswamy, G., Mavalli, M., Wang, Y., Duvall, C. L., ... & Gilbert, S. R. (2009). Prolyl hydroxylase inhibitors increase neoangiogenesis and callus formation following femur fracture in mice. *Journal of orthopaedic research*, 27(10), 1298-1305.
- Shih, I. M., & Wang, T. L. (2007). Notch signaling, γ -secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer research*, 67(5), 1879-1882.
- Sosa, Ileana. 2014. "Patrón de expresión y efecto de la pérdida de función de *hig-1* en el desarrollo del pez cebra.": 1-56.
- Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J., & Stuart, R. A. (2012). Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc1-cytochrome c oxidase supercomplex. *Molecular and cellular biology*, 32(8), 1363-1373.
- Sundaram, N., Tao, Q., Wylie, C., & Heasman, J. (2003). The role of maternal CREB in early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Developmental biology*, 261(2), 337-352.
- Sztal, T. E., McKaige, E. A., Williams, C., Ruparelia, A. A., & Bryson-Richardson, R. J. (2018). Genetic compensation triggered by actin mutation prevents the muscle damage caused by loss of actin protein. *PLoS genetics*, 14(2), e1007212.
- Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, 136(18), 3033-3042.
- Tanaka, T., Halicka, H. D., Huang, X., Traganos, F., & Darzynkiewicz, Z. (2006). Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell cycle*, 5(17), 1940-1945.
- Tang, V. W., & Briehner, W. M. (2012). α -Actinin-4/FSGS1 is required for Arp2/3-dependent actin assembly at the adherens junction. *J Cell Biol*, 196(1), 115-130.
- Teboul, L., Murray, S. A., & Nolan, P. M. (2017). Phenotyping first-generation genome editing mutants: a new standard?. *Mammalian genome*, 28(7-8), 377-382.
- Theveneau, E., & Mayor, R. (2011). Collective cell migration of the cephalic neural crest: the art of integrating information. *genesis*, 49(4), 164-176.
- Thisse, B., Pflumio, S., Fürthauer, M., Loppin, B., Heyer, V., Degraeve, A., ... & Thisse, C. (2001). Expression of the zebrafish genome during embryogenesis. *ZFIN direct data submission*.
- Thomson, D. M., Herway, S. T., Fillmore, N., Kim, H., Brown, J. D., Barrow, J. R., & Winder, W. W. (2008). AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *Journal of applied physiology*.
- Trevarrow, B., Marks, D. L., & Kimmel, C. B. (1990). Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron*, 4(5), 669-679.
- Turinetto, V., & Giachino, C. (2015). Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic acids research*, 43(5), 2489-2498.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*, 324(5930), 1029-1033.
- Varshney, G. K., Pei, W., LaFave, M. C., Idol, J., Xu, L., Gallardo, V., ... & Harper, U. (2015). High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Genome research*, 25(7), 1030-1042.
- Vendelin, M., Béraud, N., Guerrero, K., Andrienko, T., Kuznetsov, A. V., Olivares, J., ... & Saks, V. A. (2005). Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a "crystal-like" pattern. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(3), C757-C767.
- Wagner, D. E., Weinreb, C., Collins, Z. M., Briggs, J. A., Megason, S. G., & Klein, A. M. (2018). Single-cell mapping of gene expression landscapes and lineage in the zebrafish embryo. *Science*, 360(6392), 981-987.
- Wagner, E., & Lykke-Andersen, J. (2002). mRNA surveillance: the perfect persist. *J Cell Sci*, 115(15), 3033-3038.
- Wan, C., Gilbert, S. R., Wang, Y., Cao, X., Shen, X., Ramaswamy, G., ... & Einhorn, T. A. (2008). Activation of the hypoxia-inducible factor-1 α pathway accelerates bone regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2), 686-691.

- Wang, H., Wang, M., Wang, H., Böcker, W., & Iliakis, G. (2005). Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *Journal of cellular physiology*, 202(2), 492-502.
- Wang, J., Cao, Y., Chen, Y., Chen, Y., Gardner, P., & Steiner, D. F. (2006). Pancreatic β cells lack a low glucose and O₂-inducible mitochondrial protein that augments cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(28), 10636-10641.
- Wang, Y., Wan, C., Deng, L., Liu, X., Cao, X., Gilbert, S. R., ... & Haase, V. H. (2007). The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *The Journal of clinical investigation*, 117(6), 1616-1626.
- Wang, Z., Ishihara, Y., Ishikawa, T., Hoshijima, M., Odagaki, N., Hlaing, E. E. H., & Kamioka, H. (2018). Screening of key candidate genes and pathways for osteocytes involved in the differential response to different types of mechanical stimulation using a bioinformatics analysis. *Journal of bone and mineral metabolism*, 1-13.
- Weyemi, U., Paul, B. D., Snowman, A. M., Jailwala, P., Nussenzweig, A., Bonner, W. M., & Snyder, S. H. (2018). Histone H2AX deficiency causes neurobehavioral deficits and impaired redox homeostasis. *Nature communications*, 9(1), 1526.
- Wilusz, C. J., Wormington, M., & Peltz, S. W. (2001). The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(4), 237.
- Wu, R. S., Lam, I. I., Clay, H., Duong, D. N., Deo, R. C., & Coughlin, S. R. (2018). A rapid method for directed gene knockout for screening in G0 zebrafish. *Developmental cell*, 46(1), 112-125.
- Xia, W., Liu, Y., & Jiao, J. (2015). GRM7 regulates embryonic neurogenesis via CREB and YAP. *Stem cell reports*, 4(5), 795-810.
- Zhang, P., Lu, L., Yao, Q., Li, Y., Zhou, J., Liu, Y., & Duan, C. (2012). Molecular, functional, and gene expression analysis of zebrafish hypoxia-inducible factor-3 α . *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.
- Zhou, D., Xue, J., Lai, J. C., Schork, N. J., White, K. P., & Haddad, G. G. (2008). Mechanisms underlying hypoxia tolerance in *Drosophila melanogaster*: hairy as a metabolic switch. *PLoS genetics*, 4(10), e1000221.
- Zhu, D. Y., Lau, L., Liu, S. H., Wei, J. S., & Lu, Y. M. (2004). Activation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(25), 9453-9457.

VIII. ANEXOS

Anexo I: Relaciones evolutivas de proteínas Hig de *Danio rerio*

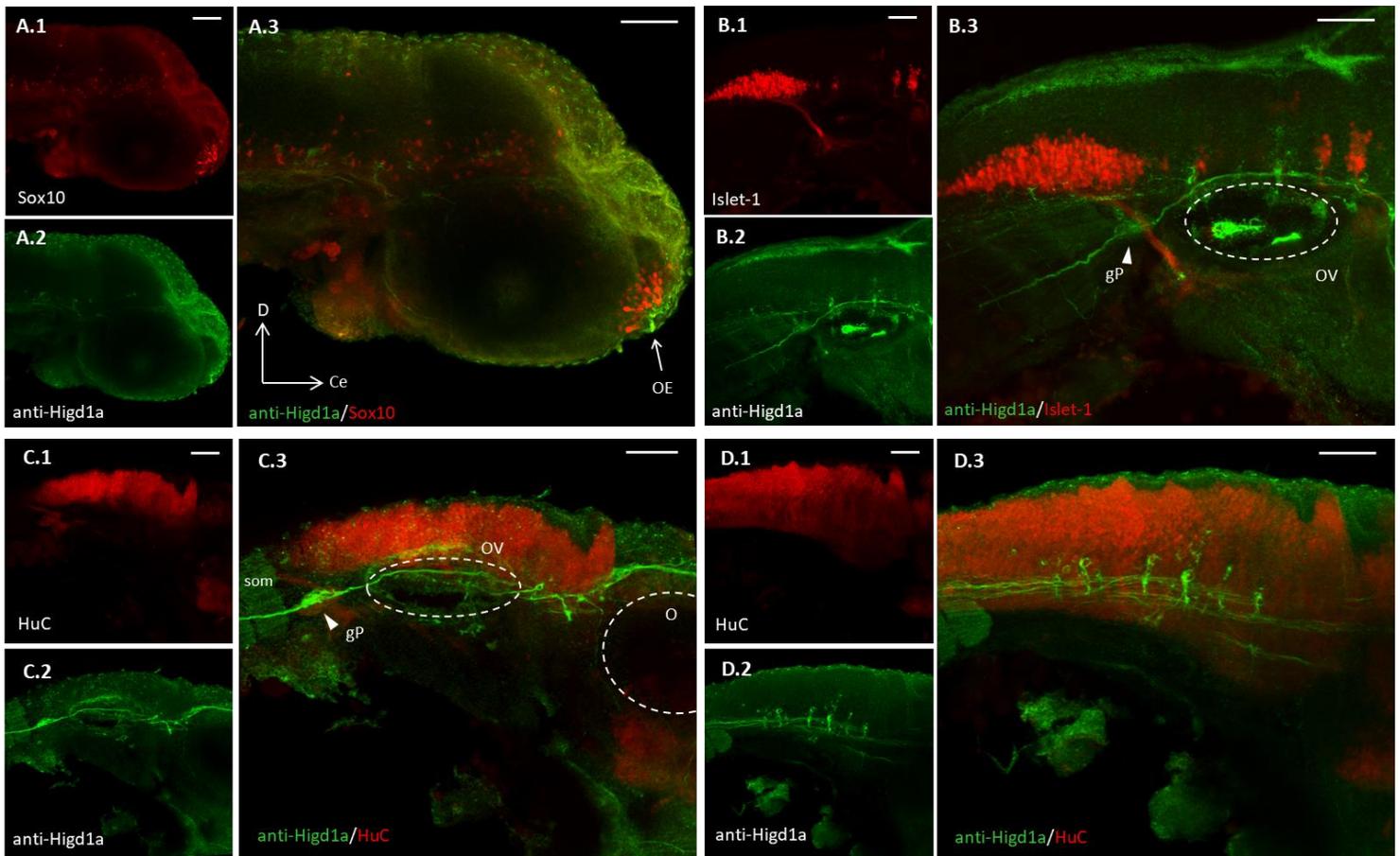


Anexo I. Filogenia de integrantes de la familia de proteínas HIG de vertebrados. Secuencias proteicas obtenidas de la base de datos GenBank fueron alineadas con ClustalW y se realizó la búsqueda del modelo de sustitución aminoacídica que mejor se ajustaba al conjunto de datos, resultando en el modelo LG+G+I (Le & Gascuel, 2008)¹; seguidamente, se construyó un árbol de máxima verosimilitud. Todos los análisis fueron implementados en el software MEGA7.

A modo de grupo externo se incluyeron secuencias homólogas de dos especies de levaduras. Las secuencias de Higd1a y Higd2a del pez cebra agruparon con proteínas HIG1 y HIG2 de otras especies, respectivamente. De este modo, fueron verificadas las relaciones de ortología entre los integrantes de cada clase (HIG tipo 1 y HIG tipo 2).

1. Le, S. Q., & Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1307-1320.

Anexo II: Búsqueda de co-localización de la señal del anticuerpo anti-Higd1a con marcadores neurales



Anexo II. Ensayos de inmunofluorescencia en embriones de 48 hpf provenientes de líneas transgénicas con diferentes marcadores neurales. En verde: señal del anticuerpo anti-Higd1a; rojo: señal del marcador, especificado en cada caso (Sox10 – cresta neural, Islet-1 y HuC – marcadores de distintos tipos neuronales). Todas las imágenes corresponden a vistas laterales, con la misma orientación: dorsal, hacia arriba; cefálico, hacia la derecha (ejes: D = dorsal, Ce = cefálico). Se señalan algunas regiones de interés: O = ojo, OE = epitelio olfatorio, OV = vesícula ótica, gP = ganglio posterior de la línea lateral, som = somites. Barras de escala = 50 μ m.