



Aportes a la caracterización funcional de Higd1a mediante el análisis de mutantes de pérdida de función en el pez cebra

Tesina de Grado para la obtención del título en la Licenciatura en Ciencias Biológicas,
Facultad de Ciencias, Udelar, 2024

Florencia González Zurbrück

Tutora: Dra. Gabriela Bedó

Co-tutor: Dr. Flavio Zolessi

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN.....	4
NOMENCLATURA.....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
A. Antecedentes de la función de Higd1a.....	6
Higd1a participa en el mantenimiento de la estructura y función mitocondrial.....	6
Función adaptativa de Higd1a durante la hipoxia: ¿muerte celular o proliferación?.....	7
Hipoxia: regulador clave de procesos morfogénicos.....	8
B. Patrón de expresión de <i>higd1a</i>	9
C. Higd2a: nuevo miembro de la familia Hig.....	9
D. El uso del pez cebra (<i>Danio rerio</i>) para el estudio del desarrollo embrionario.....	9
Líneas de pez cebra <i>higd1a</i> -KO utilizadas y antecedentes del grupo de trabajo.....	10
E. Degradación del ARNm y compensación genética: <i>Nonsense-mediated decay</i> como disparador de regulación a nivel transcripcional.....	11
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
Hipótesis.....	13
Objetivos generales.....	13
Objetivos específicos.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
A. Embriones de pez cebra.....	14
B. Análisis de los niveles de ARNm de <i>higd1a</i> y <i>higd2a</i>	14
Obtención de muestras.....	14
Extracción de ARN.....	14
Retrotranscripción.....	15
PCR a tiempo final.....	15
Cuantificación por qPCR.....	16
C. Alteraciones fenotípicas: observación de estructuras cartilaginosas.....	17
D. Ensayos proteómicos comparativos.....	19
Extracción de proteínas: puesta a punto.....	19
Electroforesis.....	22
E. Análisis estadísticos.....	23
RESULTADOS.....	24
Análisis de niveles de expresión de genes <i>higd1a</i> y <i>higd2a</i>	24
Alteraciones fenotípicas: observación de estructuras cartilaginosas.....	25
Ensayos proteómicos comparativos.....	28
Extracción de proteínas: puesta a punto.....	28



DISCUSIÓN.....	29
La ausencia de la proteína funcional Higd1a se acompaña en algunos casos de disminución de su ARNm, pero no se ve compensada por un aumento en la expresión del gen <i>higd2a</i>	29
La mutación de pérdida de función del gen <i>higd1a</i> en el pez cebra causa efectos fenotípicos en las estructuras cartilagosas cefálicas.....	29
Puesta a punto del ensayo proteómico.....	31
CONCLUSIONES.....	32
PERSPECTIVAS.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34
ANEXO.....	37
Protocolo: Direct-zol TM RNA MiniPrep.....	37
Resultados del segundo ensayo de medición de cartílagos.....	38



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero transmitir mi más sincero agradecimiento y admiración a mis tutores, Gabriela y Flavio. Me han sabido transmitir no sólo su sabiduría sino una pasión contagiosa por lo que hacen. Gracias por el tiempo que hemos compartido, por cada corrección, por cada ánimo y por haber confiado en mí para participar de este proyecto que se ha transformado en mi tesina de grado.

Al tribunal, María José y Néstor, por haber leído con atención mi trabajo e hicieron críticas por lo más constructivas. A mis compañeros de Genética Evolutiva y ahora amigos que gracias a ustedes mis mañanas y tardes en el laboratorio no hubieran sido tan amenas y divertidas.

Quiero agradecer a mis padres que creyeron en mí. Sin su constante amor y apoyo nada hubiera sido posible.

A las amigas y amigos que he hecho dentro de esta hermosa Facultad. Gracias por estar ahí, por escuchar mis ideas y mis quejas, por compartir pasiones que hoy se transforman en profesión. Por recordarme que también hay que descansar y por celebrar conmigo cada pequeño logro en el camino. Su compañía es y será un pilar fundamental en mi vida.

A mis compañeros del LMS, que siempre estuvieron dándome ánimos y energías constantes para poder concluir con esta etapa. Gracias por el camino recorrido y el que estamos recorriendo hoy.

Finalmente, a la Facultad de Ciencias, quiero expresar mi agradecimiento por brindarme el espacio y los recursos para desarrollar mi proyecto. Esta institución no solo me formó académicamente, sino que también me permitió crecer como profesional y como persona.

Cada uno de ustedes dejó una huella imborrable en esta etapa tan importante de mi vida. Este logro no es solo mío, sino de todos los que me acompañaron en el camino.



El gen *higd1a* (hypoxia-induced gene domain protein-1a) fue descrito por su inducción en condiciones de hipoxia y baja concentración de glucosa. La proteína resultante se ubica en la membrana mitocondrial interna y se ha evidenciado que cumple roles fundamentales en la biogénesis de la cadena respiratoria y en el mantenimiento de la morfología mitocondrial. Higd1a se ha vinculado en numerosos trabajos con la supervivencia celular, promoviendo la proliferación y evitando la apoptosis en situaciones de hipoxia y estrés oxidativo. El gen descrito en numerosas especies, tiene una expresión modulada de forma compleja, siendo también blanco del factor HIF-1. En nuestro laboratorio se ha observado que su expresión cambia durante el desarrollo en rata, en particular durante la remodelación del sistema nervioso central. Por otra parte, embriones de pez cebra (*Danio rerio*) que carecen de la proteína Higd1a funcional mostraron varias alteraciones y una supervivencia aumentada en condiciones de hipoxia-anoxia. Recientemente, se ha reportado una proteína de la membrana mitocondrial interna con funciones similares y complementarias a las de Higd1a durante la biogénesis de la cadena respiratoria, la proteína Higd2a. Se postuló que la mayor supervivencia en los mutantes que carecen de Higd1a podría deberse a una compensación génica, que podría explicarse por un aumento en Higd2a.

En este trabajo nos propusimos profundizar en la función de la proteína Higd1a y su participación en el desarrollo embrionario en pez cebra, utilizando mutantes *knockout* (KO) para *higd1a*. Se utilizaron dos líneas *knockout* para el gen *higd1a*, una contiene una mutación que cambia el marco de lectura (línea *higd1a*-KO Mut 1) y otra, de pérdida de sentido, introduce un codón de terminación prematuro (línea *higd1a*-KO Mut 2). Como parte de la caracterización funcional de *higd1a*, se realizó la observación de las estructuras cartilagosas cefálicas en embriones salvajes y mutantes a los 5 dpf mediante tinción con Alcian Blue. Estos ensayos arrojaron la presencia de alteraciones fenotípicas en ambos mutantes siendo más pronunciadas en la línea *higd1a*-KO Mut 2 que Mut 1. Esto sugiere que el gen *higd1a* podría tener un rol en el desarrollo del tejido cartilaginoso.

Se caracterizaron los niveles de expresión de los genes *higd1a* y *higd2a* mediante cuantificación de ADNc a las 24 hpf y 48 hpf utilizando qPCR. La expresión del gen *higd1a* disminuyó en la línea *higd1a*-KO Mut 2 a ambas edades mientras que en Mut 1, aunque presentaba una tendencia a la baja, no mostraba cambio significativo. La expresión del gen *higd2a* no varió significativamente en ningún mutante, por lo que no se pudo observar una compensación génica en los mutantes carentes de la proteína Higd1a funcional por parte de Higd2a. La disminución del ARNm de *higd1a* en la línea *higd1a*-KO Mut 2 podría ser explicada por el mecanismo de *nonsense-mediated decay*, proceso de vigilancia de ARNm donde aquellos que presentan un codón de terminación prematuro son detectados y degradados rápidamente.

Con el fin de aproximarnos a un análisis proteómico comparativo que arroje luz sobre los mecanismos de compensación génica que puedan estar ocurriendo en los mutantes se puso a punto un protocolo de extracción de proteínas de embriones de pez cebra de 24 hpf. El mismo fue implementado en un ensayo exploratorio en condiciones de hipoxia, resultando muy satisfactorio.



NOMENCLATURA

A lo largo del trabajo se adoptará la nomenclatura propuesta por International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice and the Mouse Genomic Nomenclature Committee (MGNC), Mouse Genome Informatics (MGI) Resource, The Jackson Laboratory para referirnos al gen y a la proteína, utilizando en cada caso la nomenclatura según el modelo animal o celular citado.

Ratón o rata

Gen: *Higd1a*

Proteína: HIGD1A

Humanos

Gen y proteína: HIGD1A

Pez cebra

Gen: *higd1a*

Proteína: Higd1a



El gen *higd1a* (hypoxia-induced gene domain protein-1a) codifica para una proteína con funciones adaptativas frente a diferentes tipos de estrés, viéndose inducido en condiciones de hipoxia y baja concentración de glucosa (Ameri et al., 2015; Denko et al., 2000; Jin et al., 2002). La proteína codificada por este gen, se ubica en la membrana mitocondrial interna, presenta dos dominios transmembrana (Wang et al., 2006) (Figura 1) y se ha evidenciado que cumple roles fundamentales en la biogénesis de la cadena respiratoria (Timón-Gómez et al., 2020^a; 2020^b) y en el mantenimiento de la morfología mitocondrial (An et al., 2013).

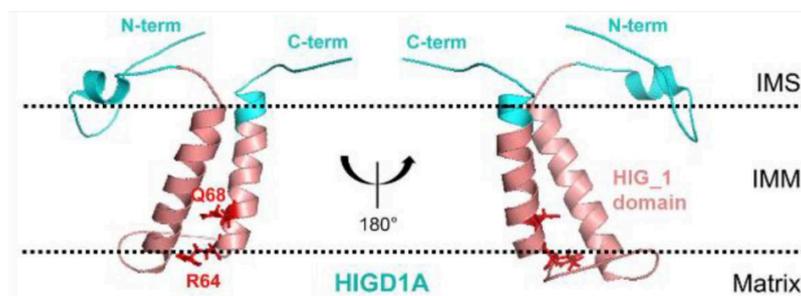


Figura 1. Estructuras de RMN en solución de HIGD1A humana. Diagrama de cinta de la estructura de HIGD1A, con el dominio HIG_1 en rosado. HIGD1A pertenece a la familia del dominio génico inducible por hipoglucemia/hipoxia (HIGD) de tipo 1, siendo homólogo del factor supercomplejo respiratorio 1 de levadura (Rcf1). Los miembros de la familia HIGD se caracterizan por tener dos hélices alfa hidrofóbicas que podrían tender a formar un bucle tipo horquilla a través de la bicapa lipídica (Bedó et al., 2005; Wang et al., 2006). IMS, espacio intermembrana. IMM, membrana mitocondrial interna. CI, complejo I. CIII 2, dímero del complejo III. CIV, complejo IV. Figura tomada y adaptada de Timón-Gómez (2020^a).

A. Antecedentes de la función de Higd1a

Si bien su función no ha sido completamente dilucidada, algunas evidencias en diferentes modelos se resumen a continuación. Algunas de éstas se vinculan con su participación en eventos de muerte y proliferación celular, así como con la homeostasis mitocondrial en condiciones de hipoxia. Por otra parte, algunos elementos en su patrón de expresión sugieren un rol en el desarrollo normal sobre el que aún no hay mucha información.

Higd1a participa en el mantenimiento de la estructura y función mitocondrial

Las mitocondrias participan activamente en la respiración, la fosforilación oxidativa, la homeostasis del calcio y la apoptosis, siendo orgánulos altamente dinámicos sujetos a continuos procesos de fusión y fisión que son esenciales para mantener su morfología y actividad. La proteína HIGD1A es necesaria para el mantenimiento de la estructura y función mitocondrial normal en condiciones fisiológicas. An y colaboradores (2013) observaron que el agotamiento de HIGD1A, en células HEK293T, conduce a la fragmentación mitocondrial, pérdida severa del ADN mitocondrial y un retraso en el crecimiento celular como consecuencia de la escisión de OPA1, proteína clave en la

fusión mitocondrial y la organización de las crestas de la membrana interna. La sobreexpresión de HIGD1A respecto al fenotipo salvaje fue capaz de aliviar el estrés oxidativo celular al retrasar la escisión de OPA1 y mantener la morfología mitocondrial, debido a la inhibición de la liberación del Citocromo C y la reducción de la actividad de caspasas que protege a la isoforma OPA1L de ser escindida. Esto, a su vez, lleva a que las células experimenten una disminución en la apoptosis.

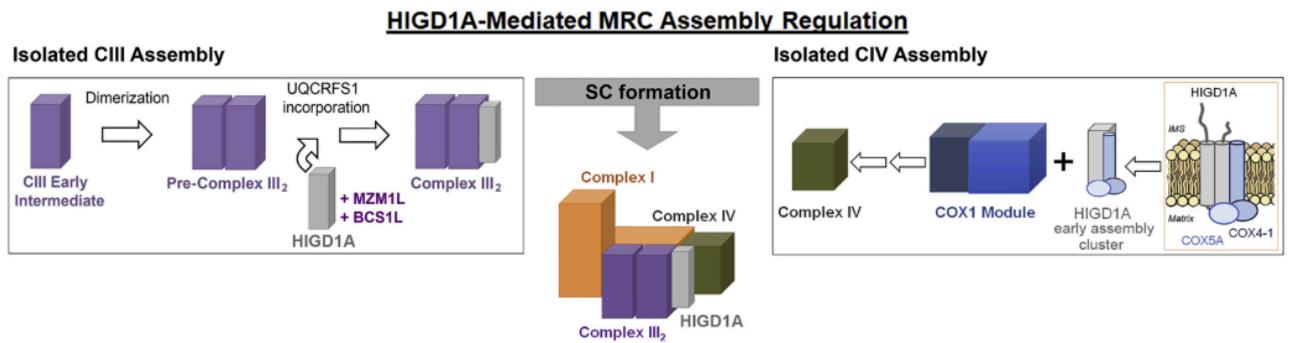
Se cree que la interacción entre HIGD1A y OPA1 es específica, y se ha observado que la región N-terminal de 26 aminoácidos de HIGD1A es necesaria para la interacción con OPA1 y su actividad en la fusión mitocondrial. Esta región incluye algunos aminoácidos básicos altamente conservados y está presente en el espacio intermembrana mitocondrial (An et al., 2013).

La proteína HIG1 ha sido relacionada también con la regulación de la proteína γ -secretasa mitocondrial y del péptido β -amiloide (Hayashi et al., 2012). En condiciones de hipoxia, los niveles de γ -secretasa y de la proteína β -amiloide se vio incrementada en células neuronales, lo cual lleva a la sobre-producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la disfunción mitocondrial. Hayashi y colaboradores demostraron que en aquellas células que expresaban HIG1 en forma estable la actividad de γ -secretasa estaba regulada negativamente, previniendo la acumulación de β -amiloide. Esto permitió mantener la correcta estructura funcional y mitocondrial. Mientras que el *knockdown* de Higd1a resultó en un aumento de ROS, incluso en condiciones normóxicas, y en alteración del funcionamiento mitocondrial.

Por otro lado, estudios en células HEK293T humanas HIGD1A-KO (*knockout*) se logró evidenciar que HIGD1A interactúa con el complejo respiratorio III₂ y promueve las últimas etapas de su maduración al incorporar UQCRCFS1 a la estructura del pre-CIII₂, paso clave que convierte a la enzima en catalíticamente activa (Figura 2) (Timón-Gómez, 2020^b). Además, la proteína interactúa con el complejo III en condiciones de privación de glucosa e hipoxia (Ameri et al., 2015), viéndose aumentada su expresión. Timón-Gómez y colaboradores (2020^b) también observaron que HIGD1A interactúa directamente en la biogénesis de la enzima citocromo c oxidasa (COX) o complejo IV de la cadena respiratoria, formando un grupo de ensamblaje temprano con las subunidades COX₄-1 y COX₅A, incluso en condiciones hipóxicas mejorando su actividad catalítica (Figura 2). Al promover la biogénesis de los complejos III y IV, HIGD1A también facilita el ensamblaje y estabilización del complejo I.



a.



b.

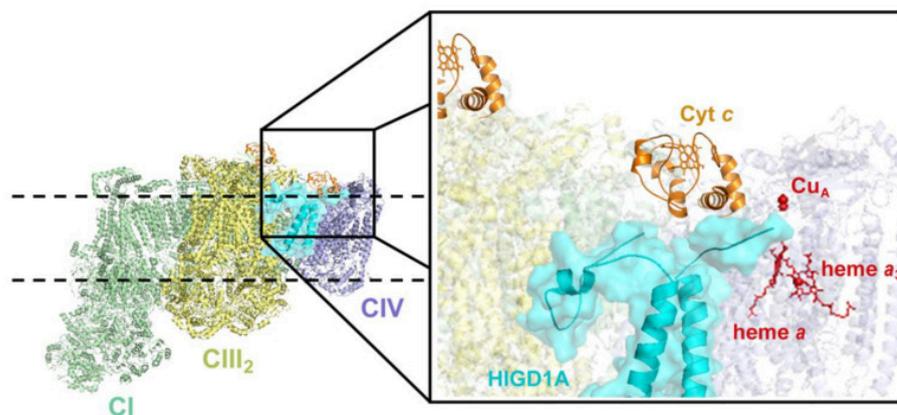


Figura 2. La proteína HIGD1A participa en el ensamblaje de la cadena respiratoria. (A) Modelo simplificado de las funciones pleiotrópicas de HIGD1A en el ensamblaje y regulación de la cadena respiratoria mitocondrial. A la izquierda se muestra el rol de HIGD1A en la incorporación de UQCFS1 al complejo III₂, y a la derecha, la incorporación de COX5A y COX4-1 al complejo IV o citocromo *c* oxidasa. (B) La proteína HIGD1A interacciona con el complejo respiratorio IV (CIV) mejorando su actividad catalítica al interactuar con el citocromo C (Cyt *c*) y producir un cambio estructural en el centro activo del hemo *a* de CIV. Figuras tomadas y adaptadas de Timón-Gómez (2020^b) y Timón-Gómez (2020^a), respectivamente.

Función adaptativa de Higd1a durante la hipoxia: ¿muerte celular o proliferación?

A lo largo de los últimos años han surgido evidencias de la participación de Higd1a en procesos de muerte celular y proliferación en distintos modelos celulares y animales, si bien por el momento los resultados son variados y a veces contradictorios.

An y colaboradores observaron que Higd1a inhibe la apoptosis inducida por hipoxia al inhibir la liberación del citocromo C y al reducir la actividad de las caspasas en múltiples modelos celulares (2011; 2013). Además, Higd1a aumenta la producción de ATP en condiciones hipóxicas aumentando la actividad del citocromo C oxidasa y preservando la fuerza protón-motriz bajo estrés celular hipóxico (Hayashi et al., 2015). Ensayos de coimmunoprecipitación realizados por Guerra-Castellano et al. (2018) volvieron a mostrar la interacción entre citocromo C y HIGD1A

(Figura 2b). Se postula que la región N-terminal jugaría un rol fundamental en el efecto de supervivencia de HIGD1A (An et al., 2011; 2013) ya que, al ubicarse en el espacio intermembrana (Figura 1), sería capaz de interactuar con varios factores solubles relacionados con la muerte celular, como el citocromo C, factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G y segundo activador de caspasas derivado de mitocondria (Smac) (An et al., 2011).

También ha sido estudiada su participación en distintos tipos de células tumorales. Éstas desarrollan mecanismos para adaptarse y ser exitosas en ambientes hipóxicos. Se ha observado la participación del factor HIF1- α en la regulación del metabolismo tumoral, la proliferación y la metástasis (Jun et al., 2017), y en los mismos procesos ha sido descrita la participación de Higd1a (Ameri et al., 2015). Estos autores demuestran que Higd1a promovería la dormancia en tumores bajo condiciones de estrés metabólico severo

Por otra parte, en células de glioma, el agotamiento de HIGD1A es capaz de inhibir la proliferación y promover la apoptosis al verse aumentados los niveles de proteínas proapoptóticas como Caspasa-3 y BAX, además de verse disminuida la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-2 (Cheng et al., 2020).

En cambio, un estudio realizado en muestras de pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC) examinó los niveles de HIGD1A en tejidos hepáticos tumorales y no tumorales, observando un aumento en los niveles tanto de la proteína HIGD1A como su ARNm en los primeros (Zhang et al., 2024). La eliminación de HIGD1A en CHC aumentó los niveles de CASPASA-3 escindida e inhibió su capacidad proliferativa en condiciones de normoxia, lo que se vio profundizado en condiciones de hipoxia, y se observó una disminución de células migratorias e invasoras como de las proteínas de adhesión epitelial N-cadherina y E-CADHERINA.

Hipoxia: regulador clave de procesos morfogenéticos

En los animales, ha sido posible proponer a la hipoxia como un regulador clave de los procesos morfogenéticos. Varias investigaciones sugieren que el oxígeno y sus vías de señalización se relacionan con el desarrollo normal en vertebrados, y en estos casos, la mayoría de las respuestas transcripcionales están mediadas por HIF-1 (Jun et al., 2017). Este factor de transcripción funcionaría como un factor adaptativo que puede promover la supervivencia celular, o desencadenar la muerte vía sus genes blancos, siendo uno de los principales mediadores de la respuesta hipóxica. Asimismo, el gradiente fisiológico de oxigenación en la placa de crecimiento cartilaginosa es necesaria para la diferenciación del tejido en ratones (Lafont, 2010). Este gradiente ha llegado a correlacionarse con la expresión de HIF-1 en los condrocitos, siendo no solo esencial su expresión para la supervivencia de las células hipóxicas en el tejido cartilaginoso avascular, sino para su proliferación, diferenciación y detención del crecimiento de los condrocitos (Schipani et al., 2001; Lafont, 2010). Se ha descrito la inducción de varios genes que son blanco de regulación por HIF-1 durante la diferenciación condrogénica estimulada por insulina, entre los que se cita Higd-1a (Chen et al., 2005). Sumado a esto, la vía de señalización de HIF-1 y de respuesta a la hipoxia participan en la mecano-transducción de osteocitos, y Higd1a es uno de los genes regulados



diferencialmente e identificados como claves (Wang et al., 2019). 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.

No solamente la hipoxia, sino que también las especies reactivas del oxígeno (ROS) han sido descritas en varios procesos durante el desarrollo (Covarrubias et al., 2008; Hamanaka et al., 2010; Hernández-García et al., 2010). Existen estudios que muestran que la expresión de Higd1a se ve promovida por ROS al inducir a HIF-1 y PGC-1a, inductores de Higd1a (Li et al., 2019).

Como puede deducirse de estas evidencias, Higd1a estaría vinculada a diversas funciones que han sido analizadas en varios sistemas, fundamentalmente en células en cultivo. Sin embargo, su función no ha sido totalmente dilucidada, y son pocos los estudios realizados *in vivo*.

B. Patrón de expresión de *higd1a*

En trabajos previos del laboratorio se ha demostrado que, en el sistema nervioso de rata, la proteína HIGD1A es abundante y tiene un patrón particular de distribución. Los niveles de expresión aumentan durante los primeros días de vida y pasa de ser muy abundante en neuronas a expresarse también en niveles altos en células gliales, sugiriendo una importancia funcional aún no totalmente dilucidada (Bedó et al., 2005; 2012; López et al., 2018).

En el pez cebra se ha mostrado, también en nuestro laboratorio, un importante aumento de la proteína de Higd1a entre las etapas de 24 y 48 horas post-fecundación (hpf) (Sosa, 2019), fase en que comienzan a desarrollarse los arcos faríngeos y las aletas, conjuntamente con la diferenciación a tejido cartilaginoso. Este patrón de expresión también fue observado en ensayos de hibridación *in situ* realizados por Thisse y colaboradores (2001) durante la embriogénesis del pez cebra mostrando una distribución ubicua de *higd1a* hasta las 30 hpf aproximadamente, y luego una señal que se concentra en las regiones de la cabeza, arcos branquiales y aletas pectorales. Análisis de transcriptómica de una sola célula en el pez cebra también confirman la expresión de *higd1a* desde etapas muy tempranas (Wagner et al., 2018).

C. Higd2a: nuevo miembro de la familia Hig

Recientemente, se ha focalizado también la atención en una proteína de la membrana mitocondrial interna con funciones similares a HIGD1A, la proteína HIGD2A (hipoxia-induced domain family member 2A) (Denko et al., 2000). La misma es inducida en condiciones de hipoxia y bajos niveles de glucosa, así como por el factor HIF-1 (Salazar et al., 2019), y posee funciones similares y complementarias a las de HIGD1A durante la biogénesis de la cadena respiratoria (Salazar et al., 2019; Timón-Gómez, Garlich et al., 2020).

La proteína HIGD2A participa en la biogénesis del complejo IV canónico y supercomplejos alternativos ensamblando la subunidad COX y asociando los complejos III y IV. La falta de HIGD2A en células HEK293 lleva a la desregulación de la dinámica mitocondrial, disminución de la actividad del complejo IV y la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Timón-Gómez, Garlich et

al., 2020; Hock et al., 2020). Además, la ausencia de HIGD2A, como la ausencia de HIGD1A, retrasa la proliferación de células cancerosas al comprometer la función mitocondrial y reducir la producción de ATP (Huang et al., 2023). La vía MAPK/ERK (Moon et al., 2021) y la proteína BCL2L1 (Gabellini et al., 2017) son capaces de promover la supervivencia y proliferación de células tumorales. La eliminación de HIGD2A en líneas celulares CHC no sólo inhibió la proliferación, sino que inhibió la activación de la vía MAPK/ERK y la expresión de BCL2L1 que, según los autores, podría promover la apoptosis (Huang et al., 2023).

D. El uso del pez cebra (*Danio rerio*) para el estudio del desarrollo embrionario

El embrión de pez cebra provee un sistema ideal para el estudio genético y molecular del desarrollo de los vertebrados. Posee un corto tiempo de generación, desarrollo y fecundación externa y se pueden obtener entre 100 y 200 embriones a partir de un solo cruce. A su vez, actualmente se conoce el genoma y proteoma completo del pez cebra, además de grandes volúmenes de información acerca de los fenómenos celulares y moleculares que tienen lugar durante el desarrollo temprano.

A su vez, los embriones de *Danio rerio* poseen una alta resistencia a la depleción de oxígeno durante su desarrollo, siendo capaces de sobrevivir hasta 24 hs de anoxia hasta la edad de 25 hpf. Pese a que logran sobrevivir largas exposiciones de anoxia, los individuos ingresan en un estado de detención del desarrollo (Richards et al., 2009), siendo reversible cuando los embriones son devueltos a normoxia (Kajimura et al., 2005). Por estas razones, *Danio rerio* es una especie propicia para realizar ensayos en condiciones de hipoxia y evaluar su implicancia en el desarrollo embrionario.

Líneas de pez cebra *higd1a*-KO utilizadas y antecedentes del grupo de trabajo

En nuestro laboratorio se obtuvieron, mediante edición genómica con el sistema CRISPR-Cas9, varias líneas mutantes para el gen *higd1a*, de las cuales dos líneas, portadoras de la mutación 1 y mutación 2, fueron mantenidas y establecidas en homocigosis. Ambas mutaciones consisten en deleciones que provocan un corrimiento en el marco de lectura (Figura 1) (Sosa, 2019). En este trabajo ambas líneas *higd1a*-KO fueron utilizadas debido a que ambas mutaciones tienen como producto traduccional proteínas no funcionales. Además, la mutación 2 causa también la introducción de un codón *stop* prematuro en la secuencia aminoacídica, posible disparador de mecanismos de degradación.



observados en la formación de los cartílagos craneales durante el desarrollo, que sería importante confirmar.

E. Degradación del ARNm y compensación genética: *Nonsense-mediated decay* como disparador de regulación a nivel transcripcional

Nonsense-mediated decay (NMD) es un proceso de vigilancia de ARNm dependiente de la traducción mediante el cual aquellos ARNm que llevan un codón de terminación prematura (PTC) son detectados y degradados rápidamente (Ma & Chen, 2020). Un PTC es un codón de parada en fase con el codón de inicio de la traducción y ubicado en cualquier lugar aguas arriba del codón de parada fisiológica. Se presume que coexisten dos patrones de activación de NMD en las células (Lejeune, 2022). Uno relaciona la posición del PTC con la presencia de al menos un evento de empalme aguas abajo: la presencia del complejo de unión exón (EJC, por su nombre en inglés) conduciría al reclutamiento de factores para el NMD al alcanzar el ribosoma el lugar del PTC. El otro patrón de activación se basa en un modelo independiente de EJC. Aquí, la distancia entre el primer codón de parada encontrado por el ribosoma y las proteínas de unión a poliA C1 (PABPC1) determina si este codón es prematuro o no; mientras mayor sea la distancia, mayor será la probabilidad de inducción de NMD (Lejeune, 2022).

En el pez cebra, el mecanismo mayormente estimulado de NMD es cuando los límites exón-exón se encuentran aguas abajo de un PTC, siendo muy similar a las vías de NMD en mamíferos y plantas (Ma & Chen, 2020). En esta vía, el complejo de unión exónica (EJC) se une directamente a la proteína 3 de desplazamiento del marco de lectura hacia arriba (Upf3), que sirve como un adaptador que recluta a Upf2 y Upf1 para iniciar la degradación del ARNm aberrante/mutante.

En estudios realizados en genes con mutaciones que involucran la presencia de un PTC y la degradación de su ARNm se ha reportado la presencia de una regulación positiva a nivel transcripcional de genes parálogos a este gen mutado o de la misma familia (El-Brolosy & Stainier, 2017; Rossi et al., 2015; Ma & Chen, 2020). Varios autores explican este fenómeno a través de NMD, habiendo observado, por ejemplo, que si se induce la ausencia de Upf1 y se reduce la degradación del ARNm mutante, se produce la pérdida de la adaptación transcripcional (El-Brolosy & Stainier, 2017). Ma y colaboradores (2019) postulan que el ARNm fragmentado y factores de NMD, como Upf3, son translocados al núcleo junto al complejo COMPASS, donde son capaces de activar la expresión génica por metilación de histonas en genes homólogos y promover la transcripción de genes compensatorios.

En vista de la observación de Sosa (2019) de una tolerancia aumentada a la hipoxia de las líneas mutantes respecto a la salvaje y considerando que la mutación 2 genera un codón de terminación prematuro, podemos pensar que el fenotipo observado en los mutantes puede ser explicado por algún mecanismo compensatorio que produzca un aumento de la proteína Higd2a como consecuencia de la activación del mecanismo de NMD, o también un cambio en la expresión de otras proteínas para poder mantener la homeostasis mitocondrial conllevando un aumento en la tolerancia hipóxica.

En este trabajo se buscó profundizar en el conocimiento del rol de Higd1a durante el desarrollo del pez cebra y su rol en la supervivencia celular. Se contribuyó también a la puesta a punto de un ensayo de análisis proteómico para aportar a la comprensión de la participación de las proteínas con dominio Hig en la tolerancia a la hipoxia y otras vías protectoras, o dilucidar mecanismos compensatorios en ausencia de Higd1a.

Hipótesis

La proteína Higd1a está involucrada en el desarrollo normal del pez cebra en particular en la formación de los cartílagos.

La presencia de mutaciones *knockout* en el gen *higd1a* desencadena la disminución de ARNm de este gen.

El gen *higd2a* es inducido al alza en ausencia de la proteína Higd1a como mecanismo compensatorio.

Objetivos generales

Este trabajo se propuso profundizar en el conocimiento de la función de la proteína Higd1a y su participación en el desarrollo embrionario y la tolerancia a la hipoxia en embriones de pez cebra (*Danio rerio*), utilizando mutantes *knockout* para *higd1a*.

Objetivos específicos

1. Determinar los efectos fenotípicos de la ausencia funcional de la proteína Higd1a en la formación de estructuras cartilaginosas.
2. Determinar si existe una vinculación funcional entre Higd1a y la proteína Higd2a, analizando los niveles de ARNm de Higd2a en mutantes *knockout* para *higd1a*.
3. Determinar si los procesos de homeostasis de ARNm se manifiestan en los individuos *knockout higd1a* pudiendo ser señal de mecanismo compensatorios.
4. Poner a punto la extracción de proteínas y eliminación de Vitelogenina en embriones de 24 hpf para un futuro análisis proteómico que permita identificar proteínas diferencialmente expresadas en individuos salvajes y mutantes, en normoxia e hipoxia.

A. Embriones de pez cebra

Se utilizó la línea de peces salvaje TAB-5 (Tübingen/AB) y dos líneas *knockout* para el gen *higd1a*, generadas por edición genómica con el sistema CRISPR-Cas9 en nuestro laboratorio. Una contiene una mutación que cambia el marco de lectura (mutación 1 o “Mut1”) y otra, de pérdida de sentido, introduce un codón de terminación (mutación 2 o “Mut2”) (Figura 3) (Sosa, 2019). Tanto las dos líneas mutantes como la salvaje son mantenidas en un sistema semi-automatizado (“*stand alone*” modelo Zebtec, Tecniplast SPA, Italia), con parámetros fisicoquímicos constantes: pH 7.5; 500 μ S/cm²; 28 °C; ciclo luz/oscuridad de 14/10 horas, en instalaciones del Institut Pasteur de Montevideo (IPMont.). Los peces son alimentados diariamente con ración seca y alimento vivo (*Artemia salina*). Los embriones fueron incubados hasta la etapa de interés en incubadora a temperaturas entre 24 y 32 °C, y datados según Kimmel y col. (1995).

La manipulación y cruzamiento de los peces adultos se hizo en forma de servicio por el IPMont. A su vez, en el diseño experimental propuesto, todos los abordajes experimentales se realizaron sobre embriones de menos de 5 dpf, los cuales fueron provistos bajo la modalidad de Servicio por el Laboratorio de Zebrafish del IPMont, que cuenta con el aval de los protocolos correspondientes y el personal acreditado. Protocolo: “Manejo, Mantenimiento y obtención de embriones de la especie *Danio rerio* (pez cebra) para diversos usos en protocolos de experimentación”, aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Institut Pasteur, según lo establecido por la Ley 18.611.

B. Análisis de los niveles de ARNm de *higd1a* y *higd2a*

Obtención de muestras

Para cuantificar la cantidad de ARNm de los genes *higd1a* y *higd2a* se utilizaron embriones homocigotos de 24 y 48 hpf de las líneas TAB-5, *higd1a*-KO Mut1 y Mut2.

La cuantificación de los niveles de un ARNm específico se realizó por PCR en tiempo real. Para ello se siguieron los siguientes pasos: extracción de ARN de *pool* de las diferentes situaciones con su réplica biológica; obtención de ADN copia de cada una de las muestras (*pools*) de ARN total, por retrotranscripción; PCR en tiempo real utilizando como molde este ADNc.

Extracción de ARN

Las extracciones de ARN se realizaron mediante el reactivo TriZol[®], seguido de un paso de purificación con kit comercial Direct Zol Miniprep de Zymo Research, ambos de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante (ver anexo). Los ARN resultantes se cuantificaron por fluorimetría con un equipo Invitrogen[™] Qubit[™] 4 Fluorometer, con el kit Qubit[™] RNA BR Assay Kit de Invitrogen. Se verificó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa 1% con el

intercalante GoodView mediante un transiluminador. Las muestras fueron mantenidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Retrotranscripción

Para realizar la retrotranscripción se probaron tres enzimas: el kit NZY RT de Nzytech, DNA synthesis Sensifast (Meridian) y Superscript II Reverse Transcriptase de Invitrogen. Se optó finalmente, para los datos definitivos, por la Superscript de Invitrogen debido a que arroja datos con una mayor reproducibilidad. Las reacciones de retrotranscripción se realizaron siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Figura 4). En los tres casos se incluyó $1\text{ }\mu\text{g}$ de ARN y se utilizaron *random primers* y oligo(dT). El ADNc se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

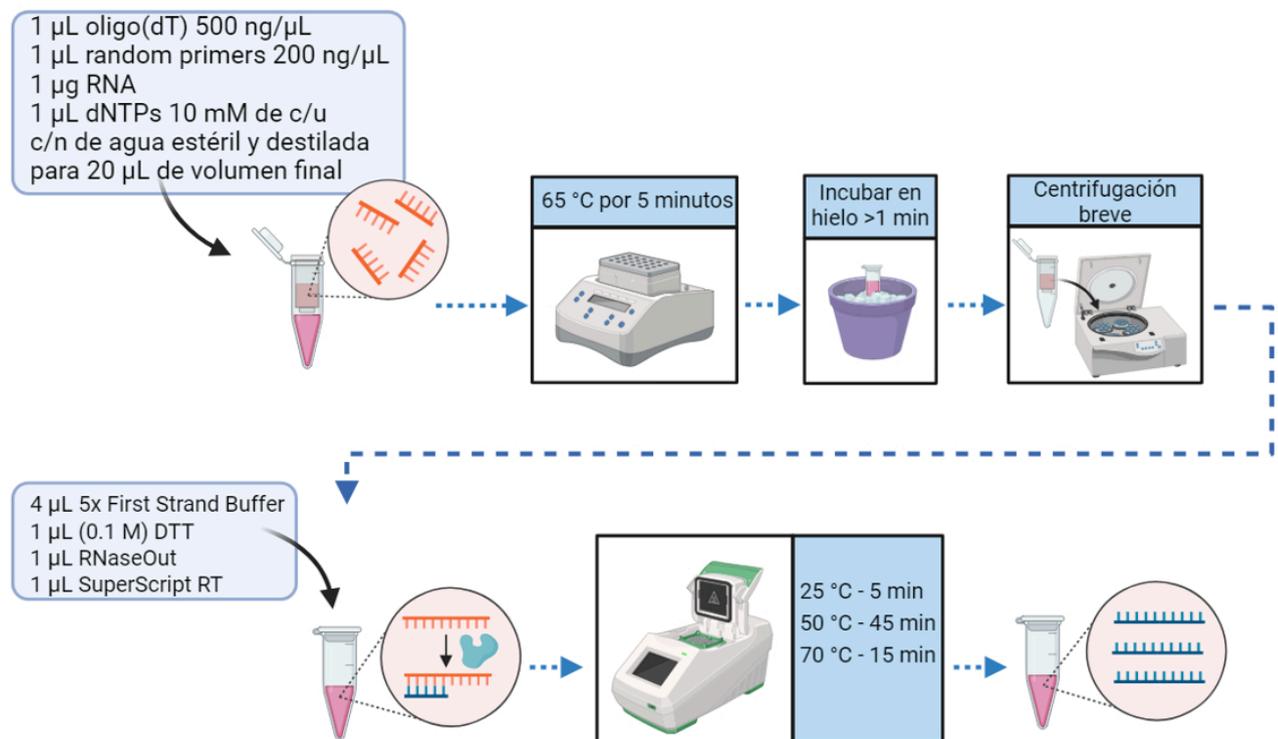


Figura 4. Esquema del protocolo de retrotranscripción mediante la enzima Superscript II Reverse Transcriptase. Concentraciones para una muestra.

PCR a tiempo final

Se utilizó PCR a tiempo final con el objetivo de probar la calidad de los ADNcs obtenidos en la reacción de retrotranscripción. La misma se realizó con la enzima DreamTaq de ThermoFisher, siguiendo las instrucciones del fabricante, y utilizando $2\text{ }\mu\text{L}$ de una dilución $1/5$ de ADNc (Tabla 1 y 2). Los *primers* utilizados fueron los mismos que en las reacciones de qPCR (detallados a continuación). Los productos de PCR fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y el intercalante de ADN GelRed de Biotium.

Tabla 1. Mix utilizado para la amplificación por PCR a tiempo final con la enzima DreamTaq. Concentraciones para 1 muestra y volumen final de 15 μ L.

Protocolo DreamTaq: Mix para una muestra (15 μ L total)	
10x DreamTaq Buffer	1,5 μ L
dNTPs Mix (10 mM)	0,3 μ L
<i>Primer Forward</i> (10 μ M)	0,3 μ L
<i>Primer Reverse</i> (10 μ M)	0,3 μ L
Agua	10,52 μ L
Dream Taq DNA polymerase	0,08 μ L
cDNA	2,0 μ L

Tabla 2. Protocolo de ciclado para la amplificación por PCR a tiempo final

Protocolo de ciclado para PCR a tiempo final		
Desnaturalización inicial	3 minutos a 95 °C	
Desnaturalización	30 segundos a 95 °C	30 ciclos
Hibridización	30 segundos a 60 °C	
Extensión	30 segundos a 72 °C	
Extensión final	3 minutos a 72 °C	

Cuantificación por qPCR

Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron utilizando el kit Sensifast Sybr Lo-Rox kit de Bioline (que contiene tanto la enzima, los dNTPs, el buffer y el fluoróforo SybrGreen) siguiendo el protocolo del fabricante (Tabla 3 y 4), y el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Para cada reacción se utilizaron 2 μ L de ADNc de una dilución de ADNc $1/5$. Como genes normalizadores se utilizaron el factor de inicio de la traducción eucariota *ef1a* y la proteína ribosomal *l13a*. Los *primers* a utilizar se tomaron de Sosa (2014) fueron los siguientes:

Primers *higd1a*

Forward 5' - ATGAGAAAAATCAAGCAGAATCC - 3'

Reverse 5' - TTGAACAGTCTGTACGCCACA - 3'

Como parte de la puesta a punto del análisis de expresión de *higd1a* y *higd2a*, se diseñó un segundo *primer reverse* con el programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) debido a que el anterior caía cercano a las mutaciones realizadas.

Nuevo *Reverse* 5' - GTGTCTCCTCGGCTCTTCAGC - 3'

Primers higd2a

Forward 5' - GGGCTTCAGTCCTACTTCGC - 3'
Reverse 5' - CCTGCTGTTCCCAAACAACCTAT - 3'

Primers ef1a

Forward 5' - CTACCTACCCTCCTCTTGGTCG - 3'
Reverse 5' - ACACGCCGCAACCTTTGGAA - 3'

Primers l13a

Forward 5'-TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC -3'
Reverse 5'- TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC -3'

Tabla 3. Mix utilizado para la amplificación por PCR a tiempo real con la enzima Sensifast. Concentraciones para 1 muestra y volumen final de 15 µL.

Protocolo Sensifast: Mix para una muestra (15 µL total)	
Sensifast Mix	7,5 µL
<i>Primer Forward</i> (10 µM)	0,6 µL
<i>Primer Reverse</i> (10 µM)	0,6 µL
Agua	4,6 µL
cDNA	2,0 µL

Tabla 4. Protocolo de ciclado para la amplificación por PCR a tiempo real

Protocolo de ciclado para qPCR		
Desnaturalización inicial	2 minutos a 95 °C	
Desnaturalización	10 segundos a 95 °C	30 ciclos
Hibridización	15 segundos a 60 °C	
Extensión	30 segundos a 72 °C	
Curva de desnaturalización	95 °C	
	1 minuto a 60 °C	
	Rampa de desnaturalización de 60 a 95 °C	

C. Alteraciones fenotípicas: observación de estructuras cartilagosas

Se observaron los cartílagos cefálicos en embriones salvajes, *higd1*-KO Mut1 y Mut2 de 5 dpf utilizando la tinción Alcian Blue (Kimmel et al, 1998; Neuhauss et al., 1998), con ligeras modificaciones puestas a punto en nuestro laboratorio. Embriones de 5 dpf (previamente despigmentados con una solución de 1-fenil-2-thiourea (PTU) 0,2 mM, 24 hpf fueron fijados y teñidos *overnight* 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 minutos a temperatura ambiente. A continuación, fueron rehidratados incubándolos durante 5 minutos en una serie de soluciones decrecientes de etanol - ác. clorhídrico/agua destilada, como sigue: 1) 75% HCl-EtOH y 25% H₂O, 2) 50% HCl-EtOH y 50% H₂O, 3) 25% HCl-EtOH y 75% H₂O, 4) 100% H₂O. Los embriones fueron guardados hasta su observación en glicerol 50% - KOH 0,5% a 4 °C.

Las imágenes fueron tomadas bajo una lupa estereoscópica Nikon SMZ-800 con iluminación diascópica y equipado con una cámara digital Canon T3i. Para ello, los embriones fueron montados en metil celulosa 3% sobre un portaobjetos.

Para el análisis de cartílagos se utilizaron larvas provenientes de dos cruces por línea utilizada (salvaje, *higd1a*-KO Mut 1 y Mut 2), y se midieron entre 6 y 11 larvas por pool. Se realizó la comparación de diferentes medidas tales como:

- Ángulo del cartílago ceratohial (CH)
- Ángulo CH-PQ
- Ángulo de cartílagos de Meckel (Me)
- Ángulo PQ-Me
- Longitud del cartílago CH
- Largo y ancho craneal
- Relación ancho/largo craneal

Cada una de estas medidas fue protocolizada con detalles de referencias para asegurarse la homogeneidad de las medidas. Las medidas se realizaron sobre el *software* FIJI (<https://imagej.net/Fiji>; Schindelin et al., 2012), convirtiendo posteriormente la medida de pixeles a milímetros y los ángulos se expresaron en grados. Las medidas se encuentran esquematizadas en la figura 5.

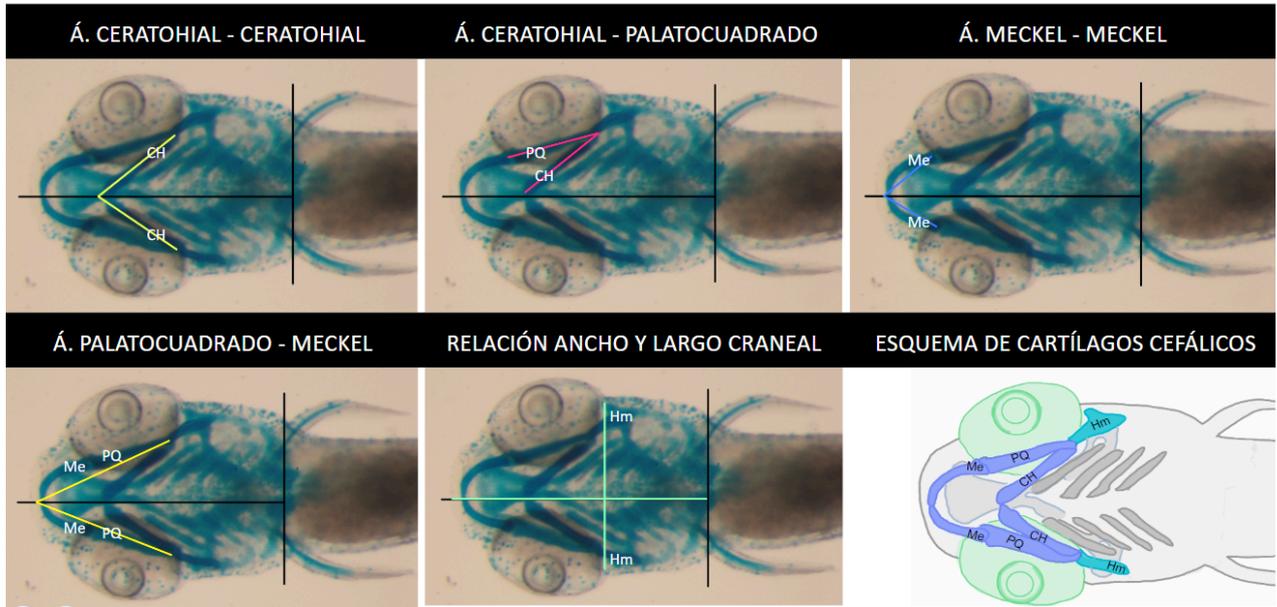


Figura 5. Esquema de las medidas tomadas para el análisis de alteraciones fenotípicas: ángulo CH-CH, ángulo CH-PQ, ángulo Me-Me, ángulo PQ-Me, largo y ancho craneal, esquema de cartílagos cefálicos.

D. Ensayos proteómicos comparativos

Previo a la realización de los ensayos proteómicos, y en base a resultados previos, fue necesario poner a punto un protocolo para asegurar la mayor eliminación posible de la abundante proteína Vitelogenina. Para ello se realizaron distintas estrategias, detalladas a continuación.

Extracción de proteínas: puesta a punto

Con el objetivo de poner a punto la extracción de proteínas provenientes de embriones de pez cebra de 24 hpf, se implementó un protocolo de extracción de proteínas según Sosa (2019) en embriones de 24 hpf en líneas salvajes y mutantes, el cual denominamos “*Protocolo Previo*”, y se estimó la cantidad de proteína Vitelogenina mediante espectrometría de masa LC-MS/MS. Este consistió en decoronar manualmente y en el uso de PBS y uso de pipeta automática para la disrupción del vitelo. Debido a que éstos indicaron niveles altos de la misma, lo que puede llevar a un posible enmascaramiento de proteínas menos abundantes, se decidió poner a punto un nuevo protocolo de extracción. Este nuevo protocolo debía cumplir con 1) un buen rendimiento de proteínas totales (no degradadas y sin contaminación con queratina) y 2) niveles bajos de la proteína Vitelogenina.

En primera instancia, se realizó el “*Protocolo 1*” utilizando un *buffer* de baja osmolaridad (*deyolking buffer*) para la disrupción del vitelo y la remoción el mismo del embrión, mediante, varios lavados y “pipeteos”. A la par del *Protocolo 1*, se realizó el “*Protocolo 2*”, que sigue el mismo procedimiento que el *Protocolo 1* pero en vez de utilizar embriones enteros se decidió diseccionar las cabezas de los embriones dejando por fuera de éstos la totalidad del vitelo.

Dado que el *Protocolo 1* no logró eliminar el vitelo del interior del cuerpo, permaneciendo una cantidad similar de Vitelogenina al *Protocolo Previo*, se decidió seguir con el *Protocolo 2*, el cual tenía como objetivo eliminar totalmente el vitelo de forma manual. Tanto para el *Protocolo 1* y *2* se utilizaron aproximadamente 200 embriones. Se realizó finalmente un "*Protocolo 3*" que incluye la disección de cabezas de embriones (Figura 4) y procedimientos que disminuyan la degradación de las proteínas presentes.

Para el *Protocolo 3* se utilizaron 30 embriones, diseccionando rápido y sobre hielo. Este número de embriones fue evaluado mediante el número de *Spectral Counts* en un ensayo proteómico exploratorio y se definió que este número era suficiente y disminuía el tiempo de manipulación y, por lo tanto, el riesgo de degradación de proteínas. Tampoco se utilizó pronasa para decorionar. A su vez, este protocolo se dividió en dos, una de las muestras pasó por *deyolking buffer* (*Protocolo 3* con *deyolking buffer*) y la otra pasó directamente a buffer de lisis (*Protocolo 4* sin *deyolking buffer*). Los cambios implementados en cada protocolo se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Tabla comparativa de los protocolos implementados para la extracción de proteínas desde embriones de 24 hpf.

Tabla comparativa de protocolos implementados					
	<i>Protocolo previo</i>	<i>Protocolo 1</i>	<i>Protocolo 2</i>	<i>Protocolo 3</i>	<i>Protocolo 4</i>
Decorionado	sin pronasa	con/sin pronasa	con pronasa	sin pronasa	sin pronasa
Desvitelinización	<i>sin deyolking buffer</i>	<i>con deyolking buffer</i>	<i>con deyolking buffer</i>	<i>con deyolking buffer</i>	<i>sin deyolking buffer</i>
	sin disección	sin disección	con disección	con disección	con disección
N° embriones utilizados	100 embriones	200 embriones	50 embriones	30 embriones	30 embriones

El *Protocolo Previo* fue realizado según Sosa (2019) con 100 embriones de 24 hpf, como se detalla a continuación (Tabla 6):

Tabla 6. *Protocolo Previo* de extracción de proteínas.

Protocolo Previo - Extracción de proteínas	
1	Decorionado manual de embriones
2	Desvitelinización en PBS 70% mantenidos en hielo
3	Embriones son colocados en 200 µL de buffer de lisis
4	Muestras fueron homogeneizadas e incubadas en hielo por 5 minutos
5	Centrifugación por 5 minutos a 20.000 g, recuperando el sobrenadante, siendo almacenado a -20 °C hasta su uso.

Soluciones utilizadas
<u>Buffer de lisis:</u> Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 0.15 M, Tritón X-100 0.5%; suplementado antes de usar con PSMF 0.2 mM, Cocktail de inhibidor de proteasas 1/10000 y EDTA 25 mM, concentraciones finales. Realizado en cámara libre de queratina.

El *Protocolo 1* fue realizado según Link y colaboradores (2006) con modificaciones utilizando 200 embriones de 24 hpf, el mismo se detalla a continuación (Tabla 7):

Tabla 7. *Protocolo 1* de extracción de proteínas.

Protocolo 1 - Extracción de proteínas			
Decorionado con pronasa		Decorionado sin pronasa	
1a	Incubación de embriones en solución con pronasa por 15 a 30 min	1b	En solución E2, el corión es abierto mediante pinzas y/o agujas entomológicas
2a	Intenso lavado con solución E2	2b	Embriones pasan a solución E2 limpia
Disolución del vitelo			
3	Los embriones se pasan de placa a un tubo de 1,5 mL con 1mL de <i>deyolking buffer</i> y se realiza el pipeteado por pasteur afinada y redondeada		
4	Se agita por 5 minutos a 1100 rpm en Thermomixer		
5	Se centrifuga a 300 g por 30 segundos y se descarta sobrenadante		
6	Se realizan dos lavados con 1 mL de buffer de lavado agitando 2 minutos a 1100 rpm, centrifugado y removiendo el sobrenadante		
Lisis celular			
7	Se resuspende el pellet en 100 µL de buffer de lisis con PMSF, EDTA y <i>cocktail</i> de inhibidores de proteasas.		
8	Se homogeniza con homogeneizador eléctrico, se deja 5 minutos en hielo y se centrifuga 5 minutos a 20.000 g guardando el sobrenadante.		
Soluciones utilizadas			
<u>Solución con pronasa:</u> 2 mg/ml Pronase (Roche Applied Science) en E2 (15 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 2.7 mM CaCl ₂ , 1 mM MgSO ₄ , 0.7 mM NaHCO ₃ , 0.15 mM KH ₂ PO ₄ , 0.05 mM Na ₂ HPO ₄) a 37 °C			
<u>Deyolking buffer:</u> 55 mM NaCl, 1.8 mM KCl, 1.25 mM NaHCO ₃			
<u>Buffer de lisis:</u> idem. <i>Protocolo Previo</i>			
<u>Buffer de lavado:</u> 110 mM NaCl, 3.5mM KCl, 2.7 mM CaCl ₂ , 10 mM Tris/Cl pH8.5			

El *Protocolo 2* fue realizado de forma idéntica al *Protocolo 1* (Tabla 7), utilizando Pronasa para decorionar e implementando la disección de los embriones (Figura 6). Se utilizaron 50 embriones.

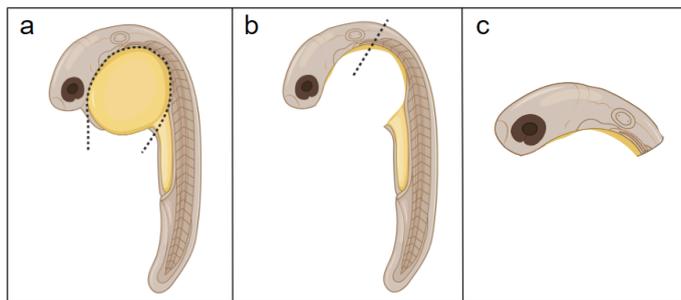


Figura 6. Disección de embriones de 24 hpf para posterior análisis proteómico. Se elimina el vitelo mediante pinzas y agujas (a), para separar la zona cefálica del resto del cuerpo (b), obteniendo la cabeza sin vitelo del embrión (c).

El *Protocolo 3 y 4* se encuentra resumido a continuación (Tabla 8). Para los mismos, se utilizó la misma técnica de disección que en el *Protocolo 2* (Figura 6).

Tabla 8. Protocolo 3 y 4 de extracción de proteínas con y sin *deyolking buffer*.

Protocolo 3/4 - Extracción de proteínas	
Decorionado y disección manual	
1	Embriones pasan a placa de Petri con buffer de lavado frío y son decorionados manualmente con pinzas finas y/o agujas entomológicas.
2	Se disecan los embriones separando la parte anterior del cuerpo de aquella con vitelo bajo lupa, y son depositados inmediatamente en buffer de lavado limpio y puestos en hielo.
3	Embriones diseccionados se pasan a un tubo de 1,5 mL con 1 mL de buffer de lavado fresco (o <i>deyolking buffer</i> , paralelamente) y son pipeteados por punta de 200 µL.
4	Se centrifuga a 300 g por 30 segundos y se descarta sobrenadante
Lisis celular	
5	Se resuspende el pellet en 100 µL de buffer de lisis con PMSF, EDTA y cocktail de inhibidores de proteasas.
6	Se homogeniza con motor, se deja 5 minutos en hielo y se centrifuga 5 minutos a 20.000 g sacando el sobrenadante.
Soluciones utilizadas	
<u>Solución con pronasa:</u> idem. <i>Protocolo 1</i>	
<u>Deyolking buffer:</u> idem. <i>Protocolo 1</i>	
<u>Buffer de lisis:</u> Tris 50 mM, NaCl 0,15M, Tritón 0,5%, pH 7,4; por cada 400 µL de buffer se adicionan: 20 µL EDTA 0,5 M, 2 µL PMSF 20 mM, 4 µL de cocktail de inhibidores de proteasas 100x.	
<u>Buffer de lavado:</u> idem. <i>Protocolo 1</i> .	

Electroforesis

Para observar la calidad de la extracción de proteínas de los diferentes protocolos implementados se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando el marcador de peso molecular Page Ruler Plus de ThermoFisher Scientific.

Para el gel de *stacking* se utilizó acrilamida 3,75%, Tris pH 6,8 0,126M, SDS 1%, APS 1% y Temed 0,1%. Para el gel separador acrilamida 12%, tris pH 8,8 0,375M, SDS 1%, APS 1%, Temed 0,05%. La intensidad de corriente fue de 25 mA.

E. Análisis estadísticos

Los datos de qPCR se analizaron con la hoja de cálculo REST-MCS© basada en el método de Pfaffl (2001). *Relative Gene Expression Tool* (REST©) es una herramienta de software que permite calcular la relación de expresión relativa basándose en la eficiencia de la PCR en tiempo real y los Ct de las reacciones. Este programa utiliza la siguiente ecuación (Figura 7) para el cálculo de la expresión relativa de los genes (Pfaffl et al., 2002).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Figura 7. Ecuación para el cálculo de la expresión relativa de genes implementada por la hoja de cálculo REST-MCS. Tiene en cuenta la eficiencia de las reacciones del gen de referencia (E_{ref}) y del gen de interés (E_{target}), y el umbral de ciclos o *cycle threshold* del gen de referencia (CP_{ref}) y del gen de interés (CP_{target}).

A su vez, este utiliza un método de *randomizing* y *bootstrapping* integrados para definir la significancia estadística de los valores de expresión relativa calculados, considerando $p < 0.05$ como significativo. Este test de randomización llamado "*Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test*" toma repetidamente y al azar datos de Ct del gen de referencia y del gen de interés, y los "relocaliza" entre las muestras control y tratadas y para cada uno calcula la expresión relativa. En base a la proporción de valores de expresión relativa calculadas y al valor de expresión relativa de nuestros datos es que calcula el valor P, utilizando la hipótesis nula de que el tratamiento no tiene efecto, y que las diferencias observadas se deben solo al azar.

Para los análisis estadísticos en los ensayos de cartílagos se utilizó ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey para observar cambios significativos en los datos, mediante el programa GraphPad Prism 8.3.0.

Análisis de los niveles de expresión de los genes *higd1a* y *higd2a*

Se realizó la cuantificación del ADNc mediante qPCR de los genes *higd1a* y *higd2a* a las 24 y 48 hpf de las líneas salvajes y mutantes. Los resultados se muestran graficados en la Figura 8 y 9. La expresión de *higd1a* no varió significativamente a nivel de ARNm en los embriones *higd1-KO* Mut 1 respecto a los embriones salvajes a ningún tiempo medido (Figura 8 y Tabla 9). Mientras que en los embriones *higd1-KO* Mut 2, a 24 hpf y 48 hpf, observamos una disminución significativa del ARNm de *higd1a* respecto a la línea salvaje con un “fold change” (veces de cambio) promedio de 0.366 y 0.430, respectivamente (Figura 8 y Tabla 9). Respecto a la expresión del gen *higd2a*, no se observaron cambios significativos en ninguna línea mutante, a ninguna de las dos edades estudiada mediante qPCR (Figura 9 y Tabla 10).

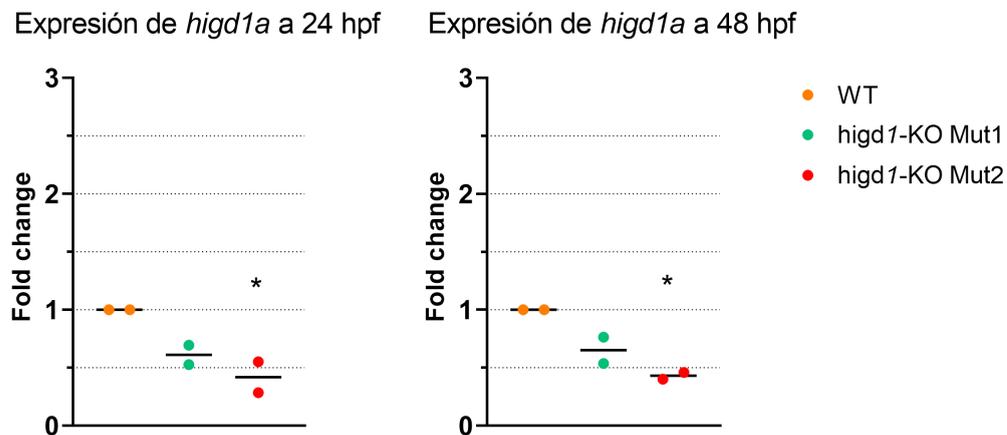


Figura 8. Cambios en la expresión génica de *higd1* en embriones salvajes (WT), *higd1-KO* Mut 1 y *higd1-KO* Mut 2 a 24 hpf y 48 hpf cuantificados mediante qPCR. En cada condición, cada punto en el gráfico representa el cálculo de una réplica biológica (dos réplicas biológicas por condición). Cada réplica biológica tuvo tres réplicas técnicas, cada una proveniente de un pool de 40 embriones. Los valores de WT se usaron como valor “control” por lo que arrojaron un resultado de 1. Los asteriscos indican cambios significativos con un p-valor <0.05 respecto a embriones salvajes (WT).

Tabla 9. Promedios y significancia estadística de los cambios en la expresión génica de *higd1a* en embriones salvajes, *higd1-KO* Mut 1 y *higd1-KO* Mut 2 a 24 hpf y 48 hpf, cuantificados mediante qPCR. Se utilizó la hoja de cálculo REST-MCS© basada en el método de Pfaffl (2001) para el cálculo del *fold change* y p-valor. Los asteriscos indican cambios significativos con un p-valor <0.05.

Cambio de la expresión de <i>higd1a</i>				
	24 hpf		48 hpf	
	<i>Fold change</i>	<i>p-valor</i>	<i>Fold change</i>	<i>p-valor</i>
<i>higd1-KO</i> Mut 1 vs salvaje	0,532	0,127	0,640	0,719
<i>higd1-KO</i> Mut 2 vs salvaje	0,366	0,018	0,430	0,008

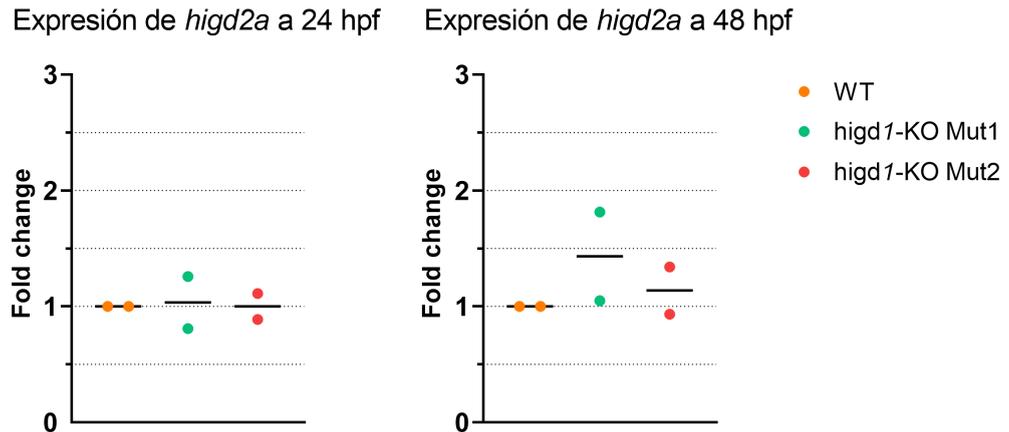


Figura 9. Cambios en la expresión génica de *higd2* en embriones salvajes (WT), *higd1*-KO Mut 1 y *higd1*-KO Mut 2 a 24 hpf y 48 hpf. Se cuantificó mediante qPCR. Los valores corresponden al cálculo para cada una de las dos réplicas biológicas cada una con sus réplicas técnicas y proveniente en cada caso de un *pool* de 40 embriones. Los valores de WT se usaron como valor “control” por lo que arrojaron un resultado de 1.

Tabla 10. Promedios y significancia estadística de los cambios en la expresión génica de *higd2a* en embriones salvajes, *higd1*-KO Mut 1 y *higd1*-KO Mut 2 a 24 hpf y 48 hpf, cuantificados mediante qPCR de ADNc. Se utilizó la hoja de cálculo REST-MCS© basada en el método de Pfaffl (2001) para el cálculo del *fold change* y p-valor.

Cambio de la expresión de <i>higd2a</i>				
	24 hpf		48 hpf	
	<i>Fold change</i>	<i>p-valor</i>	<i>Fold change</i>	<i>p-valor</i>
<i>higd1</i> -KO Mut 1 vs salvaje	1,113	0,899	1,530	0,964
<i>higd1</i> -KO Mut 2 vs salvaje	1,065	0,791	1,188	0,288

Alteraciones fenotípicas: observación de estructuras cartilagosas

La observación de las estructuras cartilagosas cefálicas llevó a encontrar que existían alteraciones fenotípicas de las mismas tanto en *higd1*-KO Mut 1 como Mut 2, pero en diferente grado (Figura 10, 11 y 12). No se observaron cambios significativos en los ángulos entre los cartílagos palatoc cuadrado y de Meckel (PQ-Me), en ningún mutante (Figura 10). Los resultados promedios fueron 41,9 ° en embriones salvajes, 46,2 ° en embriones *higd1*-KO Mut 1 (p-valor: 0,151) y 43,0° en embriones *higd1*-KO Mut 2 (p-valor: 0,864).

En cambio, el ángulo entre los cartílagos ceratohial y palatoc cuadrado (CH-PQ) aumentó significativamente en el mutante *higd1*-KO Mut 2 (Figura 10). Los resultados promedio fueron 15,0° para embriones salvaje, 18,5° para embriones *higd1*-KO Mut 1 (p-valor: 0,303) y 21,0° para embriones *higd1*-KO Mut 2 (p-valor: 0,015).

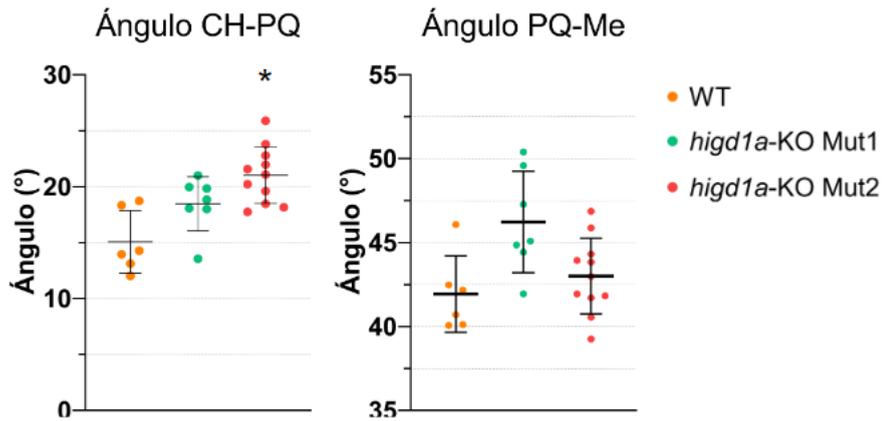


Figura 10. Variación en los ángulos CH-PQ y PQ-Me en embriones *higd1*-KO Mut 1 (verde) y *higd1*-KO Mut 2 (rojo) respecto a embriones salvajes (WT) (naranja). Se midieron los ángulos formados por los cartílagos PQ, CH y Me observados por tinción Alcian Blue en embriones de 5 dpf. Se utilizó el test estadístico de comparaciones múltiples Tukey con p-valor <0,05. El asterisco (*) indica cambio significativo respecto al fenotipo salvaje (WT).

El ángulo entre ambos ceratohiales (CH-CH) y ambos cartílagos de Meckel (Me-Me) aumentó significativamente en ambos mutantes (Figura 11). Para el ángulo CH-CH, los resultados promedio fueron 58,2° en embriones salvajes, 68,0° en embriones *higd1*-KO Mut 1 (p-valor: 0,0001) y 66,0° en embriones *higd1*-KO Mut 2 (p-valor: 0,0009). Para el ángulo Me-Me, los resultados promedio fueron 65,8° en embriones salvajes, 73,2° en embriones *higd1*-KO Mut 1 (p-valor: 0,0051) y 75,6 en embriones *higd1*-KO Mut 2 (p-valor: <0,0001).

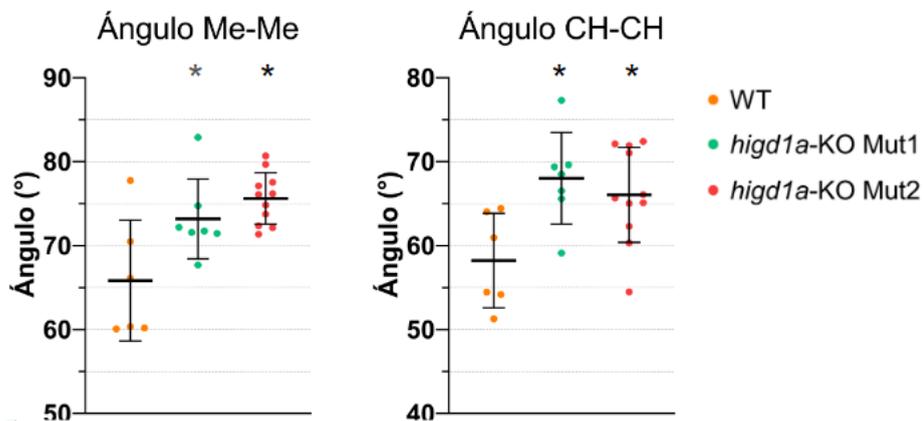


Figura 11. Variación en los ángulos CH-CH y Me-Me en embriones *higd1*-KO Mut 1 (verde) y *higd1*-KO Mut 2 (rojo) respecto a embriones salvajes (WT) (naranja). Se midieron los ángulos formados por los cartílagos CH y Me observados por tinción Alcian Blue en embriones de 5 dpf. Se utilizó el test estadístico de comparaciones múltiples Tukey con p-valor <0,05. El asterisco (*) indica cambio significativo respecto al fenotipo salvaje (WT).

En cuanto a las medidas de tamaño, el largo y ancho de la cabeza varió significativamente solo en el mutante *higd1*-KO Mut 2, disminuyendo en ambos casos (Figura 13). En promedio, el largo de la cabeza en embriones salvajes fue de 1,39 mm, 1,39 mm en *higd1*-KO Mut 1 (p-valor: 0,949) y 1,30 mm en *higd1*-KO Mut 2 (p-valor: <0,0001). Mientras que el ancho de la cabeza en embriones

salvajes fue de 1,03 mm, 1,00 mm en embriones *higd1-KO Mut 1* (p-valor: 0,492) y 0,95 mm en embriones *higd1-KO Mut 2* (p-valor: 0,0002)

La relación ancho/largo y largo del cartílago ceratohial (CH) no varió de forma significativa en ningún mutante (Figura 12), sugiriendo una disminución general del tamaño de la cabeza. En promedio, la relación ancho/largo fue de 0,55 en embriones salvajes, 0,53 en embriones *higd1-KO Mut 1* (p-valor: 0,151) y 0,53 en embriones *higd1-KO Mut 2* (p-valor: 0,435). El largo CH, en promedio, fue de 0,55 mm en embriones salvajes, 0,54 mm en embriones *higd1-KO Mut 1* (p-valor: 0,627) y 0,48 mm en embriones *higd1-KO Mut 2* (p-valor: 0,516)

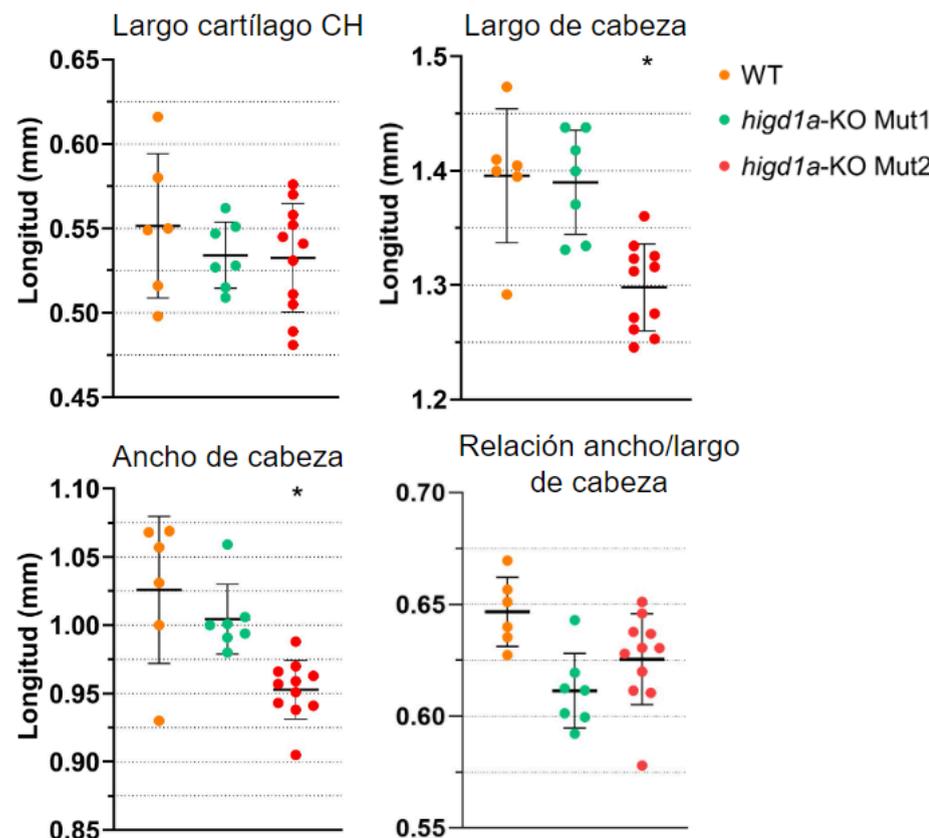


Figura 12. Variación en las longitudes cefálicas y del cartílago CH en embriones *higd1-KO Mut 1* (verde) y *higd1-KO Mut 2* (rojo) respecto a embriones salvajes (naranja). Se midieron las longitudes del ancho y largo de la cabeza en embriones de 5 dpf, así como el largo del cartílago CH. La observación se realizó mediante tinción con Alcian Blue. Se utilizó el test estadístico de comparaciones múltiples Tukey con p-valor <0.05. El asterisco (*) indica cambio significativo respecto al fenotipo salvaje (WT).

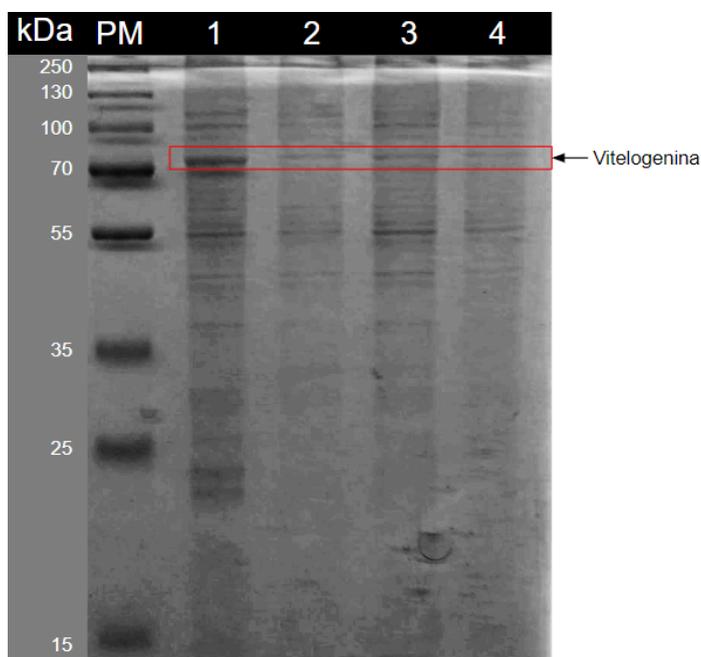
En otros ensayos realizados (ver anexo, Figura 14 y 15) se repitió esta tendencia para el ángulo Me-Me, el largo y ancho cefálico y el largo del cartílago CH, viéndose disminuidos en los mutantes respecto al salvaje. Además, la relación entre el ancho y el largo de la cabeza no varió entre embriones mutantes y salvajes.

Ensayos proteómicos comparativos

Extracción de proteínas: puesta a punto

La puesta a punto de la extracción de proteínas a partir de embriones de pez cebra de 24 hpf implicó la aplicación de cuatro protocolos, cada uno con leves variaciones. La efectividad de los protocolos se calificó según la cantidad de proteínas extraídas y la disminución de la proteína Vitelogenina en el extracto final visualizado por medio de electroforesis SDS-PAGE (Figura 13) y, en algunos casos, los resultados de ensayos proteómicos preliminares (Tabla 11). El *Protocolo 1* con *deyolking buffer*, aunque tuvo una baja degradación de proteínas, no consiguió una disminución relevante en Vitelogenina respecto al *Protocolo Previo* sin *deyolking buffer*. El *Protocolo 2*, en el cual se implementó el uso del *deyolking buffer* y la disección del vitelo junto a la remoción del tronco y cola, tuvo una alta degradación de proteínas totales (Tabla 11). Aún así, la cantidad relativa de Vitelogenina era menor que en protocolos anteriores, significando un avance en la puesta a punto. El *Protocolo 3* y *4* significó la mayor disminución en Vitelogenina de los cuatro. La aplicación del *Protocolo 4*, similar al 3 pero sin *deyolking buffer* resultó en un mayor rendimiento de proteínas y poca Vitelogenina a juzgar por la electroforesis (se observa una banda tenue donde se ubicaría la Vitelogenin) y por los resultados de *Spectral Counts*. De esta forma, se eligió este último protocolo como posible protocolo final. Con este protocolo se obtuvieron muestras de embriones salvajes y embriones mutantes Mut2, sometidos a normoxia y a un protocolo de hipoxia, generando muestras para un ensayo proteómico completo

Figura 13. Visualización de Vitelogenina presente en embriones salvajes de 24 hpf utilizando protocolos diferentes para la puesta a punto de la extracción de proteínas. Se realizó un SDS-PAGE (visualizado con azul de Coomassie) de la extracción de proteínas mediante el *Protocolo 1* (1), *Protocolo 2* (2), *Protocolo* sin *deyolking buffer* (3) y *Protocolo 4* con *deyolking buffer* (4); peso molecular (PM).



3

Tabla 11. Resultados de *Spectral Counts* obtenidos de ensayo proteómico por espectrometría de masa LC-MS/MS.

	N° de proteínas	Vitelogenina
<i>Protocolo previo</i>	1320	27%
<i>Protocolo 4</i>	3600	7,7 - 2,4 %

La ausencia de la proteína funcional Higd1a se acompaña en algunos casos de disminución de su ARNm, pero no se ve compensada por un aumento en la expresión del gen *higd2a*

Existen observaciones que evidencian que a través de un mecanismo denominado *nonsense-mediated decay* (NMD) se puede inducir la expresión de otros genes que compensen la pérdida del ARNm sin sentido (El-Brolosy & Stainier, 2017; Rossi et al., 2015; Ma & Chen, 2020). El mecanismo de NMD es un mecanismo de vigilancia que reconoce y degrada selectivamente los ARNm con codones de terminación prematuros. Esto último concuerda con lo observado en el ensayo de cuantificación de ADNc mediante qPCR, donde el mutante *higd1a*-KO Mut 2, que genera un ARNm que presenta un condón de terminación prematuro, presentó una disminución significativa en la expresión génica del gen *higd1a* a las 24 hpf y 48 hpf, mientras que el mutante *higd1a*-KO Mut 1, que no presentaba un codón *stop* sino un cambio en el marco de lectura, no presentó una disminución significativa de la expresión del gen.

A su vez, se postula que el ARNm fragmentado y factores de NMD son capaces de ser translocados al núcleo junto a modificadores y/o remodeladores de histonas, como COMPASS, donde son capaces de activar la expresión de genes homólogos (Ma et al., 2019). Este no fue el caso para *higd2a* donde no se observó en ningún mutante el aumento de la expresión génica de *higd2a*, aunque no se descarta que este mecanismo pueda estar ocurriendo. Se hipotetizaba que la ausencia de la proteína Higd1a podría desencadenar una respuesta compensatoria que indujera un aumento en el nivel de ARNm de *higd2a*, y así, sustituir ciertas funciones de Higd1a que son solapantes entre ambos. Esta respuesta no se observó en ningún mutante a las edades analizadas.

De esta forma, una aproximación mediante análisis proteómico sería capaz de esclarecer qué cambios ocurren a nivel de las proteínas en embriones *higd1a*-KO que permitan explicar la compensación observada, en particular la ausencia de un fenotipo severo, así como una mayor tolerancia a la hipoxia. Además, se podrán identificar vías con expresión diferencial entre embriones salvajes y mutantes, que aporten a las implicancias de la proteína Higd1a en el desarrollo embrionario y, en particular, en condiciones de hipoxia.

La mutación de pérdida de función del gen *higd1a* en el pez cebra causa efectos fenotípicos en las estructuras cartilagosas cefálicas

Mediante la observación de las estructuras cartilagosas cefálicas pudimos observar alteraciones sutiles en las mismas. La línea *higd1a*-KO Mut 1 presentó un aumento en los ángulos CH-CH y Me-Me, mientras que en la línea *higd1a*-KO Mut 2 se observó un aumento en los ángulos CH-CH, Me-Me y CH-PQ, junto a la disminución de la cabeza sin perder sus proporciones. La línea *higd1a*-KO Mut 2 presentó los cambios más severos en la morfología de las estructuras cartilagosas cefálicas, siendo aquella con una mutación que genera un codón de terminación

prematureo. Por otro lado, la línea *higd1a*-KO Mut 1 genera una proteína Higd1a trunca y dado que la literatura ha resaltado la importancia funcional de la región N-terminal en la misma (An et al., 2013), la menor severidad en la morfología de los cartílagos cefálicos sugieren investigar si el mutante Mut 1 genera alguna región N-terminal de Higd1a.

El tejido cartilaginoso es originado a partir de la cresta neural cefálica, cuyas células migran para producir el mesénquima craneofacial y luego diferenciarse en cartílago, entre otros tejidos (Gilbert, 2005). Las células de la cresta neural cefálica se agregan y diferencian en condrocitos a las 48 hpf y 60 hpf, respectivamente, momento en el cual se ha observado un pico de expresión del gen *higd1a* (Sosa, 2019). Asimismo, Sosa había observado que el *knockdown* de *higd1a* provoca alteraciones y retrasos en el desarrollo normal del pez cebra, y un aumento de muerte celular en tejidos de la cresta neural donde residen los progenitores del tejido cartilaginoso. Esto respalda las observaciones presentadas en este trabajo, donde se pudo evidenciar que las líneas *higd1a*-KO presentan alteraciones en las estructuras cartilaginosas cefálicas a los 5 dpf.

A su vez, el cartílago es un tejido crónicamente hipóxico encontrándose fuertemente regulado por la hipoxia, no solo en células en diferenciación sino en condrocitos ya diferenciados (Lafont, 2010). Como se mencionó anteriormente, el rol de Higd1a ha sido vinculado en numerosos trabajos con la supervivencia celular, promoviendo la proliferación y evitando la apoptosis en situaciones de hipoxia y estrés oxidativo. Sumado a esto, *higd1a* ha sido reportado como blanco de HIF-1 durante la diferenciación condrogénica estimulada por insulina, encontrándose altamente regulado (Chen et al., 2005). Estas evidencias podrían relacionarse con la observación de que la pérdida de función de Higd1a cause los cambios morfológicos descritos a nivel de los cartílagos. Nuestros resultados sumados a los antecedentes podrían indicar que la proteína Higd1a participa de la remodelación en el tejido cartilaginoso cefálico, modulando la sobrevivencia celular durante la diferenciación y/o migración del tejido cartilaginoso.

Sería interesante realizar ensayos para confirmar la afectación de las células de la cresta neural tempranamente, y evaluar la tasa de proliferación y muerte celular a partir de las 48 hpf, momento en que las células de la cresta neural comienzan a agregarse y existe un pico de expresión de *higd1a*. De esta forma, esperaríamos que en las líneas mutantes haya un menor número de células proliferativas, ya sea por una disminución de precursores dentro del tejido al verse promovida la apoptosis o por inhibición de la tasa de proliferación sin cambios en el número de eventos apoptóticos.

Las alteraciones en la morfología de los cartílagos cefálicos de embriones *knock out* podrían tener correspondencia con un atraso en el desarrollo embrionario, encontrándose la cabeza del embrión sub-desarrollada y por ello no corresponder su morfometría con los embriones salvajes carentes de mutación. Esto último también podría explicar la disminución del largo y ancho de la cabeza observada en los mutantes. Actualmente se está analizando el tamaño global de los individuos para tratar de discernir si las líneas mutantes presentan alteraciones de los cartílagos, una alteración del tamaño de la cabeza o un atraso en el desarrollo.

Puesta a punto de ensayo proteómico

En este trabajo se logró la puesta a punto de una preparación de extractos de proteínas totales de pez cebra para embriones de 24 hpf, para ser empleadas en ensayos de análisis proteómico. En un ensayo proteómico previo utilizando el *Protocolo Previo* se determinó que esta preparación de proteínas presentaba varias dificultades, en particular la gran abundancia de la proteína Vitelogenina, que compromete la identificación de proteínas expresadas diferencialmente, en especial proteínas de baja abundancia relativa. Para disminuir la proporción de la Vitelogenina, problemática a la cual varios autores ya se han enfrentado (Link et al., 2006; Tay et al., 2006; Lin et al., 2018), fue necesaria la implementación de varios protocolos. El protocolo diseñado debía cumplir con dos objetivos, un buen rendimiento e integridad de proteínas totales y niveles bajos de Vitelogenina. El *Protocolo 4* que implica la disección del vitelo y sin *deyolking buffer*, en un procesamiento rápido cumplió de forma muy satisfactoria con estos dos objetivos.

Este protocolo, a su vez, implicó el menor uso de embriones agilizando la manipulación y optimizando el uso innecesario de los mismos, y la disección del vitelo permitió la mayor extracción posible de Vitelogenina. La refrigeración durante el decorionado sin uso de pronasa y el uso de pocos embriones fue clave para impedir la degradación de proteínas luego de disecado el tejido. Además, la omisión del *deyolking buffer* significó una mayor extracción de proteínas al disminuir el número de pasos hasta el *buffer* de extracción de proteínas.

Este protocolo fue implementado en un ensayo exploratorio en condiciones de normoxia e hipoxia junto a las líneas salvaje y mutantes para evaluar la eficiencia del mismo, y resultó sumamente satisfactorio al presentar el menor porcentaje de Vitelogenina dentro de la muestra total de proteínas. Por lo que, esperamos que el mismo sea de utilidad para futuros análisis de respuesta y tolerancia a la hipoxia en embriones de pez cebra, y en particular, para seguir aportando a la comprensión de la participación de las proteínas con dominio Hig en la tolerancia a la hipoxia y otras vías protectoras.

CONCLUSIONES

La mutación de pérdida de función del gen *higd1a* en el pez cebra causa alteraciones en las estructuras cartilagosas cefálicas a los 5 dpf, sugiriendo la participación de la proteína Higd1a en el desarrollo embrionario del pez cebra.

La línea *higd1a*-KO Mut 2 presenta una disminución en el ARNm de *higd1a* sugiriendo procesos de homeostasis de ARNm que afectan sus niveles. Este proceso podría estar ocurriendo por un mecanismo de *nonsense-mediated decay* regulando la expresión de *higd1a*, lo que podría conllevar a la compensación génica.

Mediante la cuantificación de los niveles de ARNm, no se pudo determinar que una posible compensación de la pérdida de Higd1a se diera por aumento Higd2a, por lo que tampoco se pudo determinar si la mayor supervivencia en condiciones de hipoxia observadas en trabajos previos es a causa de un aumento en la expresión de *higd2a*.

Fue posible poner a punto un método de extracción de proteínas que permitirá avanzar en los ensayos proteómicos para identificar proteínas diferencialmente expresadas en diferentes condiciones.

En este trabajo se consiguió poner a punto un ensayo de extracción de proteínas provenientes de embriones de pez cebra de 24 hpf, el cual resultó muy satisfactorio en un ensayo preliminar sobre líneas salvajes y mutantes en condiciones de normoxia e hipoxia. Futuros trabajos en esta línea podrán aplicar este protocolo de extracción y continuar con el abordaje proteómico para seguir profundizando en la comprensión de la función las proteínas de dominio Hig en la tolerancia a la hipoxia junto a otras vías protectorias y en el rol de Higd1a en el desarrollo.

Asimismo, actualmente se está realizando un nuevo ensayo de observación de estructuras cartilaginosas con el fin de discernir si las alteraciones fenotípicas observadas en los mutantes se deben a una disminución del tamaño de la cabeza o a un atraso en el desarrollo.

En un futuro esperamos poder determinar si existe una relación de Higd1a y Higd2a con la función mitocondrial y los niveles de especies reactivas del oxígeno.

Esperamos que los resultados obtenidos contribuyan a esclarecer la participación de la proteína Higd1a en el desarrollo, y de un modo más general aporten a la comprensión de los mecanismos de compensación génica en líneas *knockout* generadas mediante sistemas de edición genómica.

BIBLIOGRAFÍA

- Ameri, K., Jahangiri, A., Rajah, A. M., Tormos, K. V., Nagarajan, R., Pekmezci, M., Nguyen, V., Wheeler, M. L., Murphy, M. P., Sanders, T. A., Jeffrey, S. S., Yeghiazarians, Y., Rinaudo, P. F., Costello, J. F., Aghi, M. K., & Maltepe, E. (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.
- 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 of the United States of America*, 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*, 1813(12), 2088–2098.
- 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 : MN*, 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. *The International journal of developmental biology*, 49(4), 431–436.
- Chen, L., Fink, T., Zhang, X., Ebbesen, P., & Zachar, V. (2005). Quantitative transcriptional profiling of ATDC5 mouse progenitor cells during chondrogenesis. *Differentiation*, 73(7), 350–363.
- Cheng, Z., Wang, G., Zhu, W., Luo, C., & Guo, Z. (2020). LEF1-AS1 accelerates tumorigenesis in glioma by sponging miR-489-3p to enhance HIGD1A. *Cell death & disease*, 11(8), 690.
- 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.
- Denko, N., Schindler, C., Koong, A., Laderoute, K., Green, C. And Giaccia, A. (2000). Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 6: 480-7.
- El-Brolosy, M. A., & Stainier, D. Y. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS genetics*, 13(7), e1006780.
- Gabellini, C., Trisciuglio, D., & Del Bufalo, D. (2017). Non-canonical roles of Bcl-2 and Bcl-xL proteins: relevance of BH4 domain. *Carcinogenesis*, 38(6), 579–587
- Gilbert, S.; Barresi, M. (2016). *Developmental Biology*. (11. Oxford University Press)
- Guerra-Castellano, A., Díaz-Quintana, A., Pérez-Mejías, G., Elena-Real, C. A., González-Arzola, K., García-Mauriño, S. M., De la Rosa, M. A., & 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 of the United States of America*, 115(31), 7955–7960.
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in biochemical sciences*, 35(9), 505–513.
- Hayashi, T., Asano, Y., Shintani, Y., Aoyama, H., Kioka, H., Tsukamoto, O., Hikita, M., Shinzawa-Ittoh, K., Takafuji, K., Higo, S., Kato, H., Yamazaki, S., Matsuoka, K., Nakano, A., Asanuma, H., Asakura, M., Minamino, T., Goto, Y., Ogura, T., Kitakaze, M., ... Takashima, S. (2015). Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(5), 1553–1558.

- Hayashi, H., Nakagami, H., Takeichi, M., Shimamura, M., Koibuchi, N., Oiki, E., Sato, N., Koriyama, H., Mori, M., Araujo, R.G., Maeda, A., Morishita, R., Tamai, K. and Kaneda, Y. (2012), HIG1, a novel regulator of mitochondrial γ -secretase, maintains normal mitochondrial function. *The FASEB Journal*, 26: 2306-2317.
- Hernández-García, D., Wood, C. D., Castro-Obregón, S., & Covarrubias, L. (2010). Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free radical biology & medicine*, 49(2), 130–143.
- Hock, D. H., Reljic, B., Ang, C. S., Muellner-Wong, L., Mountford, H. S., Compton, A. G., Ryan, M. T., Thorburn, D. R., & Stroud, D. A. (2020). HIGD2A is Required for Assembly of the COX3 Module of Human Mitochondrial Complex IV. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 19(7), 1145–1160.
- Huang, K., Liu, Z., Xie, Z., Li, X., Zhang, H., Chen, Y., Wang, Y., Lin, Z., Li, C., Liu, H., & Zhang, X. (2023). HIGD2A silencing impairs hepatocellular carcinoma growth via inhibiting mitochondrial function and the MAPK/ERK pathway. *Journal of translational medicine*, 21(1), 253.
- Jin, K., Mao, X.O., Eshoo, M.W., Del Rio, G., Rao, R., Chen, D., Simon, R.P. and Greenberg, D.A. (2002). cDNA microarray analysis of changes in gene expression induced by neuronal hypoxia in vitro. *Neurochem Res* 27: 1105-12.
- Jun, J. C., Rathore, A., Younas, H., Gilkes, D., & Polotsky, V. Y. (2017). Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. *Current sleep medicine reports*, 3(1), 1–10.
- 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.
- 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.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), 253–310.
- Lafont J. E. (2010). Lack of oxygen in articular cartilage: consequences for chondrocyte biology. *International journal of experimental pathology*, 91(2), 99–106.
- Lejeune F. (2022). Nonsense-Mediated mRNA Decay, a Finely Regulated Mechanism. *Biomedicines*, 10(1), 141.
- Li, T., Xian, W. J., Gao, Y., Jiang, S., Yu, Q. H., Zheng, Q. C., & Zhang, Y. (2019). Higd1a Protects Cells from Lipotoxicity under High-Fat Exposure. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 6051262.
- Lin, H. D., Hsu, L. S., Chien, C. C., & Chen, S. C. (2018). Proteomic analysis of ametryn toxicity in zebrafish embryos. *Environmental toxicology*, 33(5), 579–586.
- Link, V., Shevchenko, A., & Heisenberg, C. P. (2006). Proteomics of early zebrafish embryos. *BMC developmental biology*, 6, 1.
- 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: MN*, 66(3), 462–473.
- Ma, Z., & Chen, J. (2020). Premature Termination Codon-Bearing mRNA Mediates Genetic Compensation Response. *Zebrafish*, 10.1089/zeb.2019.1824. Advance online publication.
- Ma, Z., Zhu, P., Shi, H., Guo, L., Zhang, Q., Chen, Y., Chen, S., Zhang, Z., Peng, J., & Chen, J. (2019). PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components. *Nature*, 568(7751), 259-263.

- Moon, H., & Ro, S. W. (2021). MAPK/ERK Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 13(12), 3026.
- Neuhauss, S. C., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Zwartkruis, F., Stemple, D. L., Malicki, J., Abdelilah, S., Stainier, D. Y., & Driever, W. (1996). Mutations affecting craniofacial development in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 123, 357–367.
- Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45.
- Richards, J. G., Farrell, A. P., & Brauner, C. J. (Eds.). (2009). *Fish physiology: hypoxia* (Vol. 27). Academic Press. Chapter 3, 105-115 pp.
- 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.
- Salazar, C., Elorza, A. A., Cofre, G., Ruiz-Hincapie, P., Shirihai, O., & Ruiz, L. M. (2019). The OXPHOS supercomplex assembly factor HIG2A responds to changes in energetic metabolism and cell cycle. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 17405-17419.
- 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-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes & development*, 15(21), 2865–2876.
- Sosa, I. La proteína Higd1a en el desarrollo del pez cebra: puesta a punto de un modelo de pérdida de función. [en línea] Tesis de maestría. Montevideo: Udelar. FC-PEDECIBA, 2019.
- Sosa, I. (2014) Patrón de expresión y efecto de la pérdida de función de hig-1 en el desarrollo del pez cebra.: 1-56.
- Tay, T. L., Lin, Q., Seow, T. K., Tan, K. H., Hew, C. L., & Gong, Z. (2006). Proteomic analysis of protein profiles during early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Proteomics*, 6(10), 3176–3188.
- Timón-Gómez, A., Bartley-Dier, E. L., Fontanesi, F., & Barrientos, A. (2020^a). HIGD-Driven Regulation of Cytochrome c Oxidase Biogenesis and Function. *Cells*, 9(12), 2620.
- Timón-Gómez, A., Garlich, J., Stuart, R. A., Ugalde, C., & Barrientos, A. (2020^b). Distinct Roles of Mitochondrial HIGD1A and HIGD2A in Respiratory Complex and Supercomplex Biogenesis. *Cell reports*, 31(5), 107607.
- Thisse, B., Pflumio, S., Fürthauer, M., Loppin, B., Heyer, V., Degrave, A., Woehl, R., Lux, A., Steffan, T., Charbonnier, X.Q. and Thisse, C. (2001) Expression of the zebrafish genome during embryogenesis (NIH R01 RR15402). ZFIN Direct Data Submission.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, 35(Web Server issue), W71–W74.
- 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 (New York, N.Y.)*, 360(6392), 981–987.
- Wang, Z., Ishihara, Y., Ishikawa, T., Hoshijima, M., Odagaki, N., Hlaing, E., Kamioka, H. (2019). Screening of key candidate genes and pathways for osteocytes involved in the differential response to different types of mechanical stimulation using a bioinformatics analysis. *J Bone Miner Metab* 37, 614–626.

- 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.
- Zhang, H., Li, X., Liu, Z., Lin, Z., Huang, K., Wang, Y., Chen, Y., Liao, L., Wu, L., Xie, Z., Hou, J., Zhang, X., & Liu, H. (2024). Elevated expression of HIGD1A drives hepatocellular carcinoma progression by regulating polyamine metabolism through c-Myc-ODC1 nexus. *Cancer & metabolism*, 12(1), 7.

Protocolo: Direct-zol™ RNA MiniPrep

Antes de Empezar:

- Limpiar bien la mesada
- Localizar: kit + jeringas + agujas + motor + *pestles* + bisturí + pinzas + alcohol 100% ARN
- Rotular: tubitos para tejido sobrante, numerar tubos para colocar tejido

Protocolo: (Todas las centrifugaciones se hacen a 12000 g por 30 segundos)

1. Colocar el tejido (40 mg) en Eppendorf de 1.5 ml
2. Lisar la muestra con 200 µl de TRI Reagent y homogenizar
3. Agregar 400 µl más de TRI Reagent y continuar homogenizando
4. Jeringuear 20 veces con aguja 18 G
5. Centrifugar el lisado por 3 minutos
6. Transferir el sobrenadante en un nuevo tubo RNase-free
7. Agregar 600 µl de etanol 95-100% a la muestra lisada en TRI Reagent y mezclar bien
8. Transferir mezcla a columna Zymo-spin IIC en un Tubo Colector y centrifugar (en dos pasos)
9. Descartar lo que paso
10. Agregar 400 µl de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugar
11. Preparar: 5 µl de DNase I y 75 µl de Buffer de Digestión (por columna)
12. Agregar la mezcla directamente a la matriz de la columna e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos
13. Agregar 400 µl de Direct-zol RNA PreWash a la columna y centrifugar
14. Agregar nuevamente 400 µl de Direct-zol RNA Pre Wash a la columna y centrifugar
15. Agregar 700 µl de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugar 2 minutos
16. Transferir la columna a un tubo RNase-free
17. Para eluir el RNA agregar 35 µl (20 a 40/ con punch 25) de agua DNase/RNase -free y centrifugar

El ARN puede ser usado inmediatamente o se guarda a -80°C



Resultados de segundo ensayo de medición de cartílagos

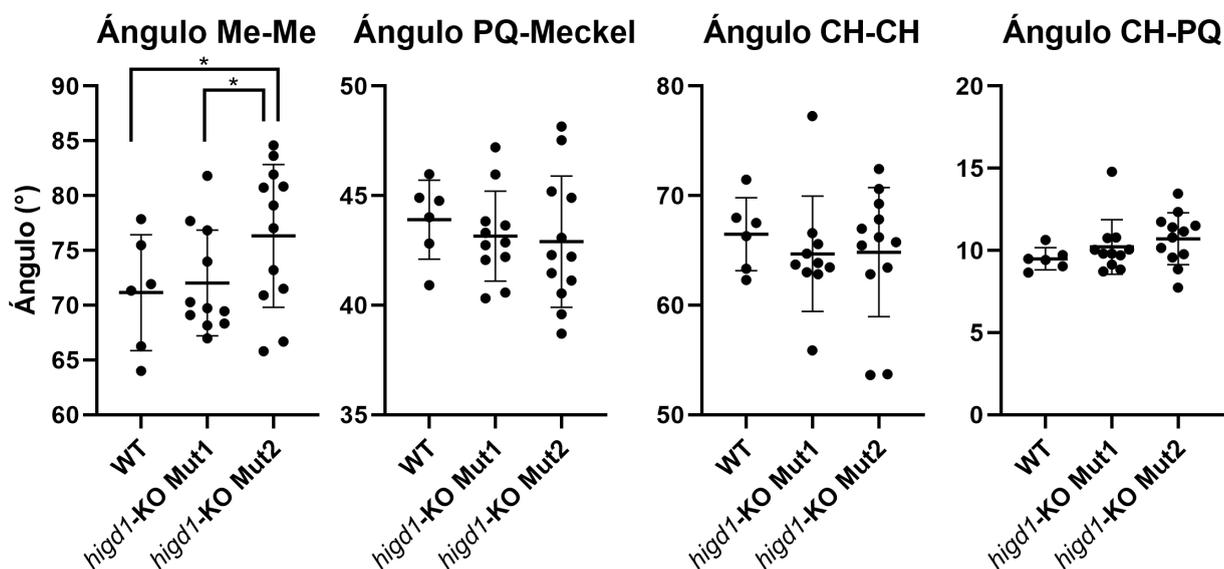


Figura 14. Variación en los ángulos formados por los cartílagos cefálicos en embriones *higd1-KO Mut1* y *higd1-KO Mut2* respecto a embriones salvajes (WT). Se midieron los ángulos formados por los cartílagos PQ, CH y Me observados por tinción Alcian Blue en embriones de 5 dpf. Se utilizó el test estadístico de comparaciones múltiples Tukey con p-valor <0.05. El asterisco (*) indica cambio significativo.

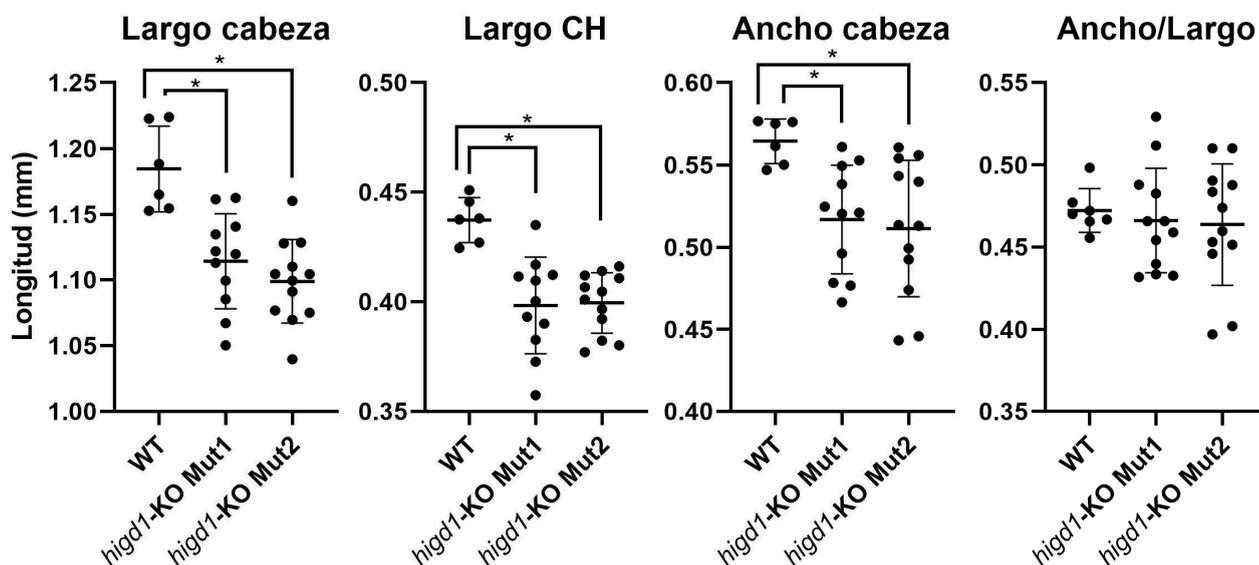


Figura 15. Variación en las longitudes cefálicas y del cartílago CH en embriones *higd1-KO Mut1* y *higd1-KO Mut2* respecto a embriones salvajes (WT). Se midieron las longitudes del ancho y largo de la cabeza en embriones de 5 dpf, así como el largo del cartílago CH. La observación se realizó mediante tinción con Alcian Blue. Se utilizó el test estadístico de comparaciones múltiples Tukey con p-valor <0.05. El asterisco (*) indica cambio significativo.