

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL FÁRMACO BIOCEN
128 EN EL DESARROLLO NEURONAL DEL PEZ CEBRA**
(DANIO RERIO)

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA**

ANGELA PIERINA BARTURÉN LARREA

LIMA, PERÚ

2019

ASESOR

Dr. Edward Málaga-Trillo

Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo

JURADO CALIFICADOR

Presidenta: Dra. María Rivera Chira

Vocal: Dra. Patricia Herrera Velit

Secretario: Dr. Raúl Loayza Muro

Dedicatoria

A mis padres y hermano, por su cariño y apoyo, y por ser mis grandes maestros. Gracias siempre por estar conmigo y llenarme de felicidad.

Agradecimientos

Al Prof. Edward Málaga, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, y por sus valiosos consejos para el desarrollo de esta tesis y mi vida profesional.

Al Dr. Claudio Rodríguez y su equipo, por su trabajo continuo con BioCen 128 y por generosamente proveernos de este fármaco.

A mis compañeros del laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, por los innumerables momentos de diversión y aprendizaje, y en especial a Marina, Brenda y Yerci, por el entrenamiento inicial en técnicas y uso del pez cebra.

A mis padres y hermano, por su cariño y paciencia, su guía y apoyo, y el ejemplo de esfuerzo y determinación que siempre me dan.

RESUMEN

La creciente incidencia del mal de Alzheimer (AD) en personas adultas mayores a nivel mundial pone de manifiesto la necesidad de descubrir fármacos que reviertan o disminuyan la progresión de esta enfermedad, utilizando diferentes modelos animales para estudios preclínicos. El ratón *Mus musculus* ha sido ampliamente utilizado en estudios farmacológicos para la identificación y validación de nuevos medicamentos; sin embargo, este modelo requiere de una gran inversión de tiempo y dinero. En este estudio se utilizó el embrión de pez cebra para evaluar un fármaco con potencial anti-Alzheimer. Una gran ventaja de este modelo es que posibilita el estudio de mecanismos celulares de la neurodegeneración, en particular de la neurotoxicidad de AD, desencadenada por la proteína amiloide beta y mediada por la cascada PrP/SFK (proteína prión/quinasas de la familia Src). Estudios de nuestro laboratorio demostraron que la vía PrP/SFK está presente en peces cebra, y que su alteración durante la embriogénesis altera la endocitosis de complejos proteicos de adhesión celular y neurorecepción; mecanismo similar a lo observado para la neurotoxicidad de AD. Esto posibilita el uso de embriones de peces cebra como excelentes modelos para el estudio del rol de la vía PrP/SFK durante la neurodegeneración, así como para la identificación de fármacos que afecten esta vía. En colaboración con el Centro Nacional de Biopreparados de Cuba (BioCen), nuestro laboratorio evaluó el fármaco BioCen 128, que posee propiedades anti-neurodegenerativas de acuerdo con estudios conductuales realizados en ratones envejecidos. Con el fin de conocer la actividad biológica de BioCen 128 y determinar si su efecto neuroprotector está potencialmente relacionado con la vía PrP/SFK, se estudió su farmacología y se evaluó su efecto sobre el desarrollo embrionario mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se encontró que la CL_{50} fue 22.5 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128, y el efecto tóxico de BioCen 128 fue un retraso, concentración dependiente, del desarrollo embrionario a partir de la gastrulación; el cual no fue reversible y no se asoció a la edad. También, se evidenció que bajas concentraciones de BioCen 128 (1-5 $\mu\text{g/ml}$) generan un menor tamaño de fascículos axonales del prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo; y afectan la navegación y crecimiento axonal de las neuronas motoras primarias caudales de la médula espinal. En suma, estos resultados sugieren que BioCen 128 podría modular la función motora y el ritmo circadiano. Se concluye que hay indicios que sugieren una asociación de BioCen 128 y la vía PrP/SFK.

PALABRAS CLAVE: Pez cebra, desarrollo embrionario, neurodegeneración, compuesto antineurodegenerativo, amiloide beta, proteína prión, quinasas Src.

ABSTRACT

The increasing incidence of Alzheimer's disease (AD) in elderly populations worldwide raises the need to discover new drugs to reverse or treat AD, using different animal models for preclinical studies. The mouse model has been widely used in pharmacological studies for the identification and validation of new drugs. However, this animal requires a large investment of time and money. In this study, we used the zebrafish embryo to evaluate a potential anti-Alzheimer drug. Zebrafish model enables the study of neurodegeneration-related cellular mechanisms, as the AD neurotoxicity triggered by the amyloid beta protein and mediated by the PrP/SFKs cascade (prion protein/Src family kinases). Previous studies have demonstrated that the PrP/SFKs pathway alteration during zebrafish embryogenesis affects the endocytosis of cell adhesion complexes and neuroreceptors via the same mechanism seen in AD neurotoxicity. For these reasons, zebrafish embryos are excellent models to study the role of PrP/SFKs pathway during neurodegeneration, as well as to identify new drugs that affect this pathway. In collaboration with the Cuban National Center for Biopreparations (BioCen), we evaluated BioCen 128 drug, which possess anti-neurodegenerative properties according to behavioral studies performed on aged mice. Our study aimed to know the biological activity of BioCen 128 and determine if its neuroprotective effect might be related to the PrP/SFKs pathway. To achieve that, we studied BioCen 128 pharmacology and its effects on embryonic development, using immunofluorescence and confocal microscopy. Our results show that the LC₅₀ was 22.5 µg/ml of BioCen 128. Moreover, the toxic effect of BioCen 128 was an irreversible concentration-dependent delay of embryonic development after gastrulation. Notably, a low dose range between 1-5 µg/ml of BioCen 128 induced a size reduction of axonal tracts in the forebrain, midbrain, and hindbrain, and affected the axonal growth and guidance of caudal primary motor neurons in the spinal cord of zebrafish embryo. These results strongly suggest that BioCen 128 might modulate the motor function and circadian rhythm. Altogether, our data suggest a potential relationship between BioCen 128 and the PrP/SFKs pathway.

KEYWORDS: Zebrafish, embryonic development, neurodegeneration, anti-neurodegenerative compound, amyloid beta, prion protein, Src kinases.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Impacto de las enfermedades neurodegenerativas	10
1.2 El mal de Alzheimer	10
1.3 Excitotoxicidad por glutamato	12
1.4 Cascada A β -PrPc-SFK	13
1.5 Elaboración de fármacos	14
1.6 <i>Danio rerio</i>	15
1.7 Cascada A β -PrPc-SFK en el pez cebra	19
1.8 Fármaco BioCen 128	20
II. HIPÓTESIS	21
III. OBJETIVOS	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Materiales	21
4.2 Métodos	25
V. RESULTADOS	36
5.1 Farmacología de BioCen 128	36
5.1.1 Identificación de concentraciones letales y subletales, y efectos generales en el desarrollo	36
5.1.2 Determinación de la CL ₅₀ de BioCen 128	41
5.1.3 Dinámica farmacológica de BioCen 128 al 1 y 2 dpf	43
5.2 Análisis morfológicos y celulares	57
5.2.1 Análisis utilizando anticuerpo SV2	57
5.2.2 Análisis utilizando anticuerpo ZN8	64
5.2.3 Análisis de tractos axonales en la línea Hb9::GFP	66
VI. DISCUSIÓN	70
VII. CONCLUSIONES	78
VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS	79
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

GLOSARIO

A β : Amiloide beta

CaP: Neuronas motoras primarias caudales de la médula espinal

CaS: Neuronas motoras secundarias caudales de la médula espinal

CL₅₀: Concentración letal media

Dpf: Día(s) post-fertilización

Hpf: Hora(s) post-fertilización

PMNs: Neuronas motoras primarias de la médula espinal

PrP: Proteína prión

SFKs: Quinasas de la familia Src

SMNs: Neuronas motoras secundarias de la médula espinal

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Impacto de las enfermedades neurodegenerativas

Durante las últimas décadas, los crecientes avances médicos y tecnológicos han producido un aumento de la esperanza de vida y por lo tanto del tamaño de adultos mayores a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud prevé que para el 2050, la población mundial mayor de 60 años se duplicará, pasará de 962 millones en 2017, a 2100 millones en 2050 (1). En consecuencia, el aumento de la longevidad está favoreciendo un incremento de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, como la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson (PD), la enfermedad de Huntington (HD), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y las enfermedades priónicas (2). Actualmente, más del 20% de las personas mayores de 60 años sufren de un trastorno mental o neurológico, siendo el más común la demencia (3). Se estima que alrededor de 50 millones de personas en el mundo sufren de demencia; y este número incrementará a más de 130 millones al 2050 (*Fig. 1.1*).

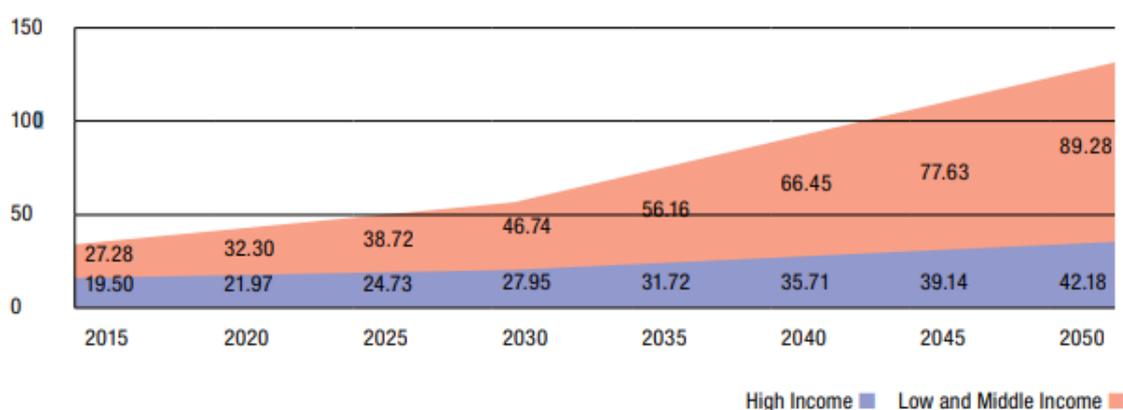


Figura 1.1. Crecimiento en el número de personas con demencia a nivel global. Se estimó el incremento del número de personas (millones) hasta el año 2050 que sufrirán de demencia en países de ingresos altos (celeste) y países de ingresos bajos y medios (rosado). Fuente: (4).

1.2 El mal de Alzheimer

El mal de Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés) afecta a más de 25 millones de personas en todo el mundo, y es el tipo más frecuente de demencia asociada al envejecimiento. Los síntomas se caracterizan por una pérdida de la memoria a corto plazo, disfunción cognitiva y trastorno de la personalidad; todo eso causado por la pérdida de neuronas del hipocampo y corteza cerebral. Estos síntomas se manifiestan

durante la fase tardía de la enfermedad, a partir de los 65 años; y se caracteriza por la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares (NTF) en el cerebro. Sin embargo, en este trabajo nos enfocaremos en la fase temprana de AD, que involucra dos cambios celulares y moleculares importantes: 1) el mal plegamiento y acumulación de oligómeros amiloide beta ($A\beta$) en los tejidos cerebrales, que más tarde dará origen a las placas seniles, y 2) la hiperfosforilación de la proteína citoplasmática asociada a microtúbulos, Tau, en el cerebro, que más tarde formará los NTF. Estos eventos tempranos desencadenan neurotoxicidad (daño neuronal causado por sustancias tóxicas) y muerte neuronal, y, décadas más tarde, el deterioro cognitivo evidente en la fase clínica de AD (5).

El péptido $A\beta$ se origina de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP), que es una proteína de membrana ubicada principalmente en la sinapsis neuronal (6). Dicha proteólisis está a cargo de un complejo de secretasas (7). La proteína APP es cortada primero por la β secretasa, y después por la γ secretasa, generando y liberando los péptidos tóxicos $A\beta$ en el espacio extracelular (*Fig. 1.2*). Otras proteínas involucradas en la degradación de APP y formación de péptidos $A\beta$ son la presenilina 1 y 2 (PS1 y PS2). Ambas cortan en el dominio transmembrana de APP, generando así fragmentos $A\beta$ (6).

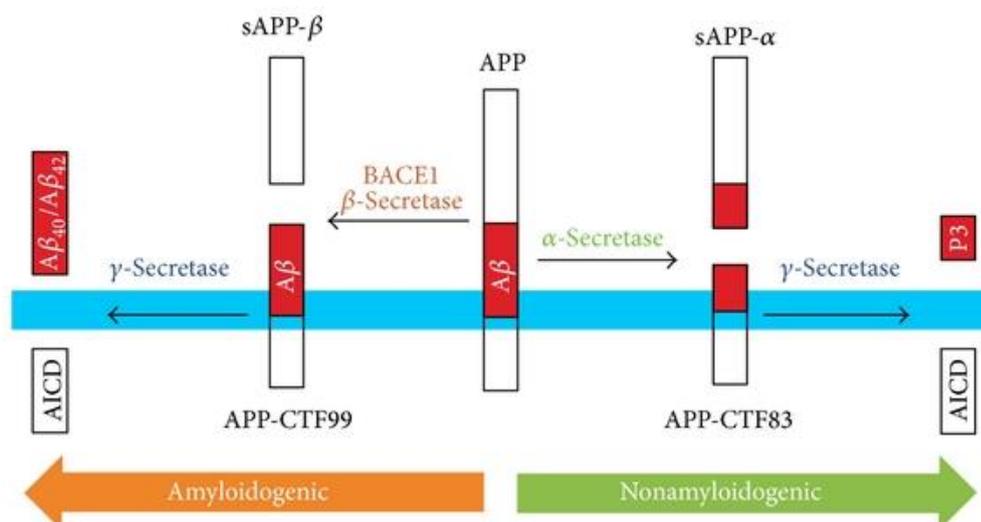


Figura 1.2. Diagrama del procesamiento de la proteína APP. La proteína transmembrana APP (barra celeste = membrana plasmática) puede ser procesada por dos vías: La vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. En la primera vía, la α -secretasa corta APP y genera dos productos: el fragmento soluble de APP (sAPP- α) y el fragmento C-terminal 83 de APP (APP-CTF83). Luego, la γ -secretasa corta el APP-CTF83 y genera como productos el dominio intracelular de APP (AICD) y el fragmento P3. En la segunda vía, la β -secretasa corta la APP y produce el fragmento soluble sAPP- β y el fragmento C-terminal 99 (APP-CTF99). Finalmente, la γ -secretasa corta el APP-CTF99 y da como productos los péptidos $A\beta$ 40, $A\beta$ 42 y AICD. Fuente: (7).

Por su parte, la proteína axonal Tau cumple un rol importante al modular la estabilización del citoesqueleto, y en consecuencia la morfología axonal. Sin embargo, durante la fase temprana de AD, ocurre un desequilibrio en la fosforilación y defosforilación de esta proteína, ya que se da una hiperfosforilación mediada por las quinasas GSK3 β y Cdk5. Esto impide que Tau se asocie a los microtúbulos, y, en consecuencia, se acumule y forme los NTF (8). También, se sabe que la acumulación de Tau hiperfosforilada se extiende a la región somatodendrítica, donde puede interactuar con tirosinas quinasas no receptoras, entre ellas Fyn (9). Además, se ha demostrado que Tau media el transporte de Fyn hacia las dendritas (10), en donde Fyn fosforila la subunidad 2 del receptor N-methyl-D-aspartate (NMDA), lo que resulta en la estabilización del receptor en la membrana y, por consiguiente, un incremento de la señalización neurotóxica mediada por glutamato. Por lo tanto, un aumento de Tau hiperfosforilada resulta en una mayor localización de Fyn en las dendritas, y en consecuencia una mayor neurotoxicidad mediada por glutamato, que refuerza la toxicidad de los oligómeros A β en las neuronas (10).

Se estima que entre 10 y 15% de los casos clínicos de AD son debido a factores genéticos (5). Entre ellos, mutaciones en el gen que codifica la proteína Apolipoproteína E (ApoE), un transportador de colesterol que cuenta con receptores en muchas neuronas; y mutaciones en genes involucrados en la producción de A β , tales como los genes que codifican para APP, PS1 y PS2. El 80-90% restante de casos corresponden a factores no hereditarios o esporádicos (11,12).

1.3 Excitotoxicidad por glutamato

Diversos estudios han demostrado que el estrés oxidativo es un mecanismo principal de neurotoxicidad en AD, ya que induce la formación de altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, ocasionando así un daño celular y apoptosis (8). Por otro lado, se sabe que en AD, la acumulación de oligómeros A β en la sinapsis induce la sobreactivación de canales iónicos activados por glutamato (*Fig. 1.3*), como el receptor NMDA, lo cual genera una liberación masiva de calcio intracelular, y con ello la activación de vías que promueven estrés oxidativo y muerte neuronal (13). La excitotoxicidad por glutamato inducida por los oligómeros A β es el mecanismo más relevante en AD.

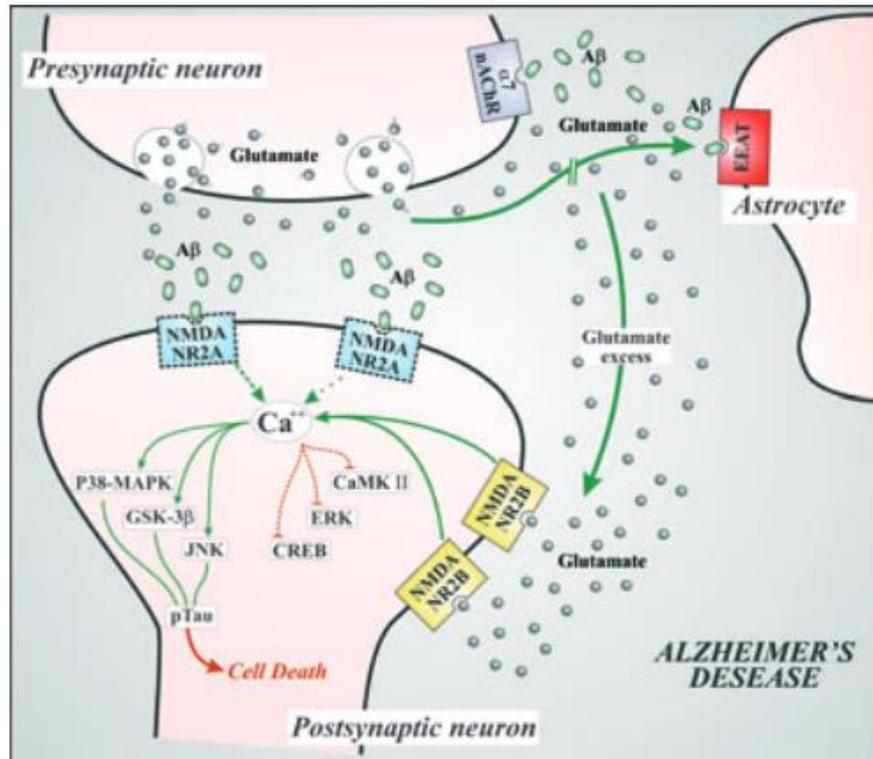


Figura 1.3. Mecanismo de la excitotoxicidad por glutamato presente en AD. Los oligómeros A β afectan la señalización mediada por los receptores NMDA, induciendo la internalización de las subunidades postsinápticas NR2A. Asimismo, A β bloquea los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT, por sus siglas en inglés) de células gliales, lo que aumenta la concentración de glutamato en el espacio sináptico. Además, A β se une a receptores alfa7-nicotínicos en neuronas presinápticas, lo que induce un aumento en los niveles de glutamato que es liberado al espacio sináptico. Este aumento de glutamato extracelular sobreactiva los receptores postsinápticos NR2B, lo que desencadena un incremento de los niveles de calcio intracelular y la activación de vías (ruta verde) que promueven el estrés oxidativo e inhibición de vías (ruta roja) de supervivencia celular; finalmente ocasionando la muerte neuronal. Fuente: (13).

1.4 Cascada A β -PrP^c-SFK

Recientes estudios han establecido que la proteína priónica celular (PrP^c) es un receptor de alta afinidad para los oligómeros A β , y media sus efectos tóxicos sobre la plasticidad sináptica (14,15), mediante una señal intracelular poco esclarecida. Este hallazgo hace crucial el estudio del rol de PrP^c en la neurotoxicidad desencadenada por A β , y con ello en el entendimiento de AD. Se sabe que PrP^c es una proteína transmembrana altamente expresada en el sistema nervioso central, que está asociada a procesos como supervivencia celular y adhesión celular. Diversos estudios han demostrado la participación de PrP^c en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) (5), y otras raras enfermedades neurodegenerativas que son causadas por la infección de priones (PrP^{sc}). Los priones son proteínas priónicas mal plegadas que tienen capacidad de autopropagación e infección, y que inducen el cambio conformacional de PrP^c a PrP^{sc},

lo que conlleva a la propagación de PrP^{sc} en el cerebro del sujeto infectado. En consecuencia, aparecen síntomas como disfunciones motoras, y otros similares a los presentes en AD, pero más severos. Diversos estudios han sugerido la participación de los priones en la patogénesis de AD. Ello debido a las similitudes moleculares y patológicas halladas entre AD y las enfermedades priónicas, tales como los hallazgos de que los oligómeros de A β actúan como una molécula o especie tóxica que se autopropaga en la sinapsis neuronal y que cuenta con un largo tiempo de incubación. Esto, sumado al hallazgo de que PrP^c es un receptor de A β , ponen en evidencia la importancia de entender el rol de PrP^c en AD. Estudios posteriores han establecido que la interacción A β -PrP^c activa la quinasa Fyn, de la familia Src (SFK) de tirosina quinasa no receptores, y esta activación es dependiente de la interacción de PrP^c con el receptor metabotrópico de glutamato (mGluR5) (16). La quinasa Fyn cuando es activada, induce la fosforilación y agregación tóxica de la proteína Tau, así como la fosforilación de la subunidad NR2B de los receptores NMDA, lo que altera la permanencia de estos receptores en la membrana celular. Esta alteración del tráfico de receptores NMDA conlleva a una alteración de la plasticidad neuronal, desencadenando excitotoxicidad por glutamato, pérdida de espinas dendríticas y muerte neuronal (17). Estos descubrimientos convierten a la cascada A β - PrP^c-SFK en un blanco importante para el tratamiento del mal de Alzheimer.

1.5 Elaboración de fármacos

La creación de un nuevo medicamento surge de la necesidad de tratar enfermedades o condiciones médicas que carecen de acceso a medicamentos adecuados y efectivos. El proceso de elaboración de fármacos es por lo tanto un proceso largo, costoso y complejo, donde intervienen la investigación científica, clínica y comercial (18).

Este proceso se divide en tres etapas: el descubrimiento y desarrollo de drogas (fase I), la investigación preclínica (fase II) y los estudios clínicos (fase III) (19). En la etapa de descubrimiento y desarrollo, se distinguen dos procesos, primero la investigación básica para identificar potenciales blancos terapéuticos y compuestos terapéuticos candidatos, y segundo la caracterización de sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas del potencial compuesto. Esta caracterización incluye optimizar la afinidad y selectividad del compuesto, con el fin de reducir los posibles efectos secundarios; y aumentar la

eficacia, estabilidad metabólica y biodisponibilidad del compuesto. Posteriormente, se da la investigación preclínica, donde se analiza la toxicología y eficacia de la droga en modelos *in vivo*. Esta etapa comprende la identificación de dosis seguras de la droga para iniciar los estudios en humanos. Finalmente, se dan los estudios clínicos. Estos incluyen la identificación de efectos adversos y dosis adecuadas para posteriores estudios, pruebas de eficacia del fármaco, así como estudios en una cohorte representativa de pacientes, donde se incluyen pruebas de eficacia y seguridad en una población con la enfermedad a tratar. Adicionalmente, se puede analizar interacciones medicamentosas e insuficiencias debido a condiciones médicas particulares (20).

Hoy en día, la investigación biomédica y la industria farmacéutica tienen como desafío acelerar el descubrimiento de blancos moleculares implicados en procesos neurodegenerativos, así como la identificación y validación de drogas que tengan como blanco estas moléculas. Sin embargo, muchas drogas potenciales que cumplen el efecto deseado en estudios con ratones no han sido capaces de replicar su óptimo efecto en ensayos clínicos en humanos. Esta extrapolación poco eficiente de hallazgos encontrados en ratones a estudios humanos ha generado la necesidad de aumentar la diversidad de modelos *in vivo* e *in vitro* para ser utilizados en evaluaciones farmacológicas. Este aspecto requiere de mayores avances, ya que el organismo modelo que se utiliza en la mayoría de los ensayos preclínicos en animales continúa siendo el ratón *Mus musculus*. Este modelo tradicional, si bien presenta grandes bondades como una gran similitud anatómica y fisiológica con el ser humano por ser un mamífero, su uso en ensayos farmacológicos a gran escala requiere de una elevada inversión de tiempo, dinero y recursos. Por ello, además del *Mus musculus*, modelos como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *Danio rerio* se han convertido en importantes fuentes de información, siendo este último un vertebrado y el sujeto de esta tesis.

1.6 *Danio rerio*

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pequeño pez tropical originario de Asia (21), que a lo largo de varias décadas ha sido incorporado como modelo experimental en muchos laboratorios de investigación biomédica y en la industria farmacéutica a nivel mundial debido a sus grandes ventajas.

El interés en el uso del pez cebra para la identificación y validación de fármacos ha crecido debido a varias razones: el pez cebra es pequeño (aprox. 4 cm de largo), barato de mantener, de fácil crianza en grandes cantidades y fácil manipulación genética. Además, posee un corto ciclo generacional (2-3 meses) y el número de embriones por cruce (alrededor de 400 embriones), así como la frecuencia de cruces (2-3 veces por semana) son altos. Sumado a esto, su desarrollo embrionario fuera del útero y transparencia durante la embriogénesis permiten el análisis visual y en tiempo real de los procesos de desarrollo tempranos y la morfología de los órganos fácilmente mediante el uso de microscopía óptica y de fluorescencia (22,23). Asimismo, el pez cebra posee una rápida embriogénesis que consiste en 72 horas post fertilización (hpf): a las 24 hpf ya se han formado estructuras como el prosencéfalo, mesencéfalo, romboencéfalo, tubo neural, y ya se ha iniciado la organogénesis primaria; y para las 72 hpf la mayoría de los órganos ya se han formado, incluyendo el sistema circulatorio y nervioso, y el embrión desarrolla comportamientos de evasión y búsqueda de alimento (24).

Además, en comparación con otros organismos modelo como la mosca de la fruta (*D. melanogaster*) y el gusano *C. elegans*, el pez cebra, al ser un vertebrado, posee importantes similitudes anatómicas y fisiológicas con los mamíferos, y comparte una fuerte conservación genética con los seres humanos. Se sabe que alrededor del 70% de genes expresados en el pez cebra, cuentan con genes ortólogos en el genoma humano (25), de los cuales 82% están asociados a enfermedades humanas (26). Es así como el alto grado de homología de secuencias entre el humano y el pez cebra, permite el uso de este último para estudios sobre la función de genes asociados al desarrollo, comportamiento y enfermedades humanas (27). También, diversos estudios han encontrado una gran similitud entre el sistema nervioso del pez cebra y el de mamíferos, así como una alta correlación del efecto de drogas sobre el sistema nervioso de ambos modelos (28). Esto, sumado a la amplia colección de mutantes disponibles, posicionan al embrión de pez cebra como un excelente modelo experimental para estudiar las bases celulares y moleculares de patologías del sistema nervioso (29,30), mediante análisis genéticos, bioquímicos y de biología celular; con alta reproducibilidad y valor estadístico en los experimentos (31). Así también, el pez cebra es considerado un excelente modelo farmacológico para el descubrimiento de drogas, debido a que es un

modelo más rápido, económico, informativo y de mayor procesividad que el del ratón (32).

1.6.1 Desarrollo embrionario

El pez cebra se caracteriza por tener una corta embriogénesis (0-72 hpf). Se han establecido siete períodos embrionarios: cigoto, clivaje, blástula, gástrula, segmentación, faríngrula y eclosión. Cada período incluye uno o más estadios del desarrollo (*Fig. 1.4*). En detalle, primero, el cigoto o huevo fertilizado comenzará a hacer mitosis (clivaje), para más tarde dar paso a la migración celular o epibolia (blástula y gástrula), en donde se formará el epiblasto y el hipoblasto, que más tarde formarán el mesodermo y endodermo, respectivamente. Seguidamente, se formarán los somites (segmentación), y los neurómeros que darán origen al sistema nervioso; e iniciará la organogénesis primaria. Luego, a partir de las 24 hpf (faríngrula), se desarrollará el sistema circulatorio, la pigmentación y las aletas. A partir de las 48 hpf (eclosión), se completará la organogénesis primaria y se desarrollará el cartílago. Finalmente, a las 72 hpf el embrión desarrollará la vejiga natatoria, y comportamientos de búsqueda de alimento y evasión; pasará a denominarse larva (24).

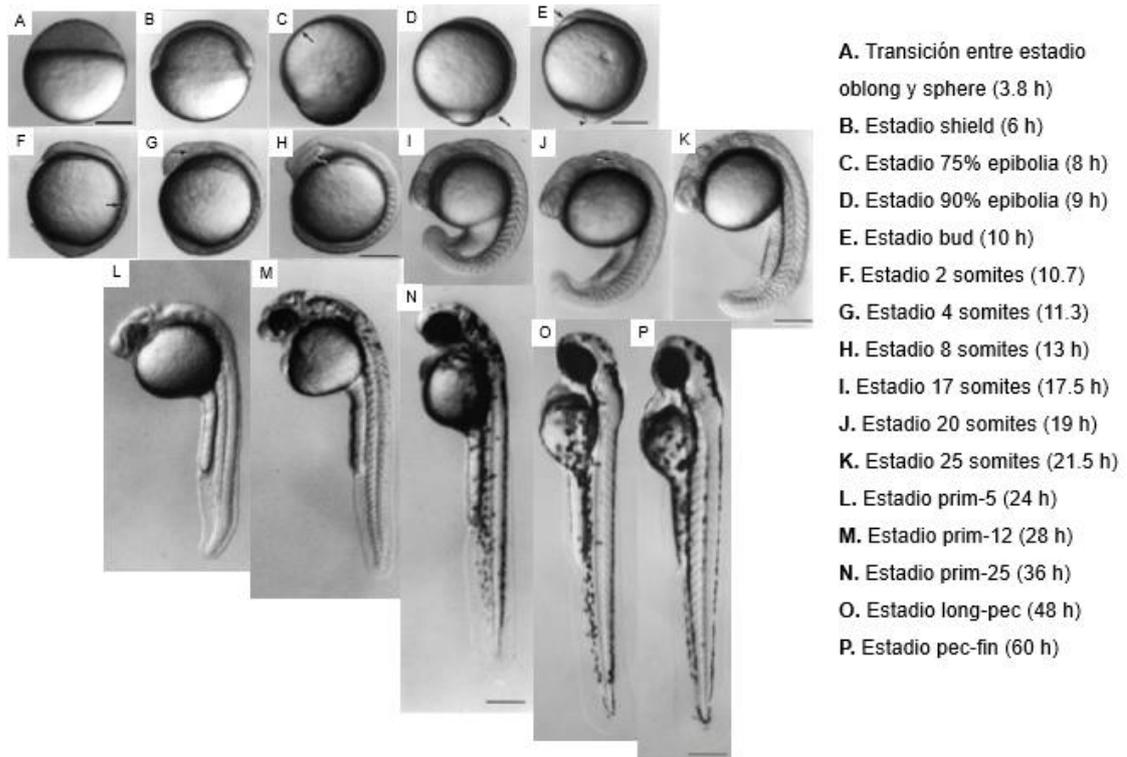


Figura 1.4. Glosario de estadios embrionarios del pez cebra. Compendio de imágenes representativas (vista lateral) de los estadios embrionarios que serán mencionados en este estudio. Escala: 250 μ m. **A:** Estadio perteneciente al período de blástula. **B-E:** Estadios pertenecientes al período de gástrula. **F-K:** Estadios pertenecientes al período de segmentación. **L-N:** Estadios pertenecientes al período de faríngrula. **O-P:** Estadios pertenecientes al período de eclosión. Fuente: (24).

1.6.1.1 Desarrollo neuronal

Diversos estudios han demostrado que el sistema nervioso del pez cebra guarda gran similitud con el de los mamíferos. Ambos modelos poseen un sistema nervioso central (CNS), conformado por un cerebro anterior o prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal; y un sistema nervioso periférico, conformado por células migratorias de la cresta neural y terminaciones nerviosas conectadas con los tejidos y órganos (33). Además, existen similitudes a nivel molecular; tanto el cerebro de mamíferos como el del pez cebra poseen circuitos glutamatérgicos (excitatorios), circuitos GABAérgicos (inhibitorios), receptores colinérgicos muscarínicos (34), y neurotransmisores como GABA, glutamato, dopamina, serotonina y acetilcolina. También, la diferenciación neuronal y desarrollo de redes neuronales en el CNS del pez cebra, requieren mecanismos moleculares conservados entre vertebrados (35,36). Sumado a ello, existen similitudes a nivel celular; ya que las células gliales, tales como astrocitos, microglía y oligodendrocitos, y algunas neuronas, como las células de Purkinje y neuronas motoras, son similares entre peces cebra y humanos (36).

El proceso que precede a la formación del CNS en el embrión de pez cebra es la formación de la placa neural durante la gastrulación (aprox. a las 10 hpf), la cual forma posteriormente el tubo neural. La neurogénesis primaria empieza aprox. a partir de las 16 hpf (estadios de 14-19 somites), con la formación de una red neuronal simple (35). A las 24 hpf, se distinguen claramente las principales subdivisiones cerebrales, como el prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, así como la médula espinal a lo largo del tronco y cola del embrión. Entre las 24 y 48 hpf, se establece un conjunto de neuronas motoras, sensoriales e interneuronas en cada subdivisión, formando redes neuronales a través de proyecciones axonales (**Fig. 1.5**) (37). Luego, entre el segundo y tercer día post fertilización (dpf), se da la neurogénesis secundaria, en donde se observa un crecimiento significativo del cerebro y pueden distinguir diferentes tipos de neuronas, tales como las neuronas GABAérgicas, glutamanérgicas, monoaminérgicas y colinérgicas (28,34).

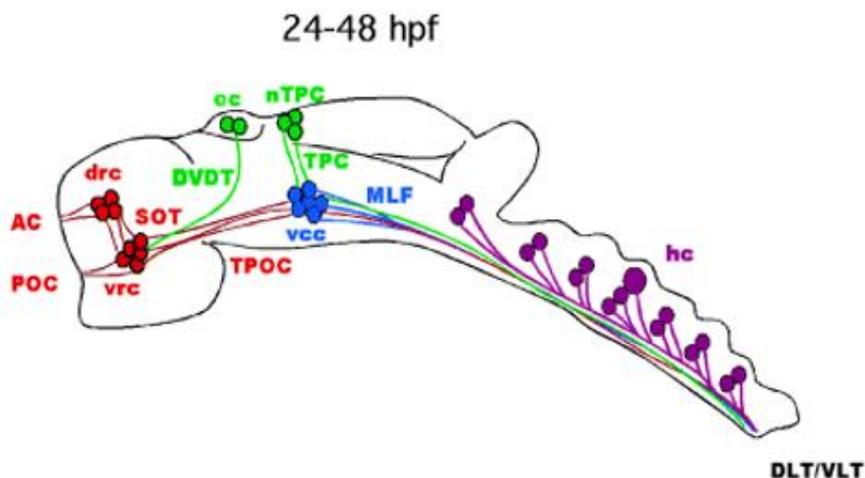


Figura 1.5. Neurogénesis primaria del pez cebra entre las 24 y 48 hpf. Esquema del cerebro en vista lateral donde se representa la mayoría de clusters o ganglios nerviosos y sus proyecciones axonales. Abreviaturas: drc, cluster dorsorostral; vrc, cluster ventrorostral; vcc, cluster ventrocaudal; hc, clusters del romboencéfalo; ec, cluster epifisial; nTPC, núcleo del tracto de la comisura posterior; AC, comisura anterior; POC, comisura postóptica; SOT, tracto supraóptico; DVDT, tracto del diencéfalo dorsoventral; MLF, fascículo longitudinal medial; DLT, tracto longitudinal dorsal; VLT, tracto longitudinal ventral; TPC, tracto de la comisura posterior; TPOC, tracto de la comisura postóptica. Fuente: figura y leyenda extraídas de (35).

1.7 Cascada A β -PrP^c-SFK en el pez cebra

Estudios de nuestro laboratorio establecieron y caracterizaron la vía A β -PrP^c-SFK en embriones de peces cebra, lo que demuestra la utilidad de este modelo para estudiar los eventos moleculares desencadenados por el amiloide beta humano, así como para

identificar y validar fármacos con potencial anti-neurodegenerativo, que puedan actuar modificando la cascada A β -PrP^c-SFK (38). En experimentos previos, se caracterizó la función de la proteína prión del pez cebra, su interacción con SFKs, y cómo éstas modulan la comunicación celular en diferentes estadios de la embriogénesis (39–41). Estudios subsiguientes demostraron que en el embrión de pez cebra, el amiloide beta humano es capaz de sobreactivar la cascada celular PrP/SFK y alterar la endocitosis, y por tanto la expresión de importantes moléculas de comunicación celular, como E-cadherina y β -catenina (38). El hallazgo de que los oligómeros A β humanos activan la vía PrP/SFK del pez cebra, plantea la posibilidad de utilizar embriones de peces cebra como un sistema experimental simple para estudiar las bases celulares y moleculares del mal de Alzheimer, mediante el esclarecimiento de los complejos roles de la vía PrP/SFK en el desarrollo embrionario, la fisiología neuronal y la enfermedad neuronal; así como para facilitar la identificación y validación de posibles fármacos anti-neurodegenerativos relacionados a esta cascada neurotóxica (42,43).

1.8 Fármaco BioCen 128

Existen muchos fármacos que se han producido a partir de bibliotecas sintéticas y/o productos naturales para ser evaluados en modelos de enfermedades neurodegenerativas, tal es el caso del fármaco BioCen 128. Recientemente, el Centro Nacional de Biopreparados de Cuba (BioCen) ha optimizado la preparación de este compuesto con potencial efecto anti-neurodegenerativo. Su identidad y composición están protegidas actualmente por un proceso de registro de patente. Estudios recientes han evaluado su efecto sobre la fisiología neuronal de ratones envejecidos a través de test conductuales (comunicación personal, Dr. Claudio Rodríguez, BioCen-Cuba). Lo que se encontró fue una mejora significativa de la capacidad cognitiva en ratones tratados con este fármaco con respecto a ratones control, actividad posiblemente asociada a su capacidad de mitigar la neurotoxicidad causada por la acumulación de amiloides tóxicos (comunicación personal, Dr. Claudio Rodríguez). Este hallazgo lo convierte en un potencial candidato para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y sugiere que su mecanismo de acción podría estar relacionado a las vías neurotóxicas que estudiamos en nuestro laboratorio. Para esclarecer esta posibilidad, y gracias a una colaboración entre el BioCen y nuestro laboratorio, la presente propuesta busca utilizar el embrión de pez cebra para estudiar los efectos del

fármaco BioCen 128 sobre el desarrollo embrionario y su posible relación con la cascada neurotóxica A β /PrP/SFK, cuya actividad en embriones de pez cebra ha sido demostrada por trabajos previos del laboratorio (38,39,42,43).

II. HIPÓTESIS

El fármaco BioCen 128 modula el desarrollo y la fisiología neuronal del embrión de pez cebra, de modo que posibilita el estudio de sus efectos biológicos y posible conexión con la vía de señalización PrP/SFK.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Evaluar los efectos del fármaco BioCen 128 sobre el desarrollo y la fisiología neuronal de embriones de pez cebra, como pre-requisito para analizar sus efectos sobre eventos celulares y moleculares asociados a neurodegeneración.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de BioCen 128.
- Identificar efectos morfológicos y celulares causados por BioCen 128, en el desarrollo y fisiología neuronal de embriones de pez cebra.
- Determinar una posible asociación de los efectos morfológicos y celulares causados por BioCen 128, con la vía de señalización PrP/SFK.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Organismo

Organismo	Cepa genética	Procedencia
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	Tab5	Zebrafish facility, Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), UPCH
	Wild type Konstanz (WT ^{Kn})	
	Hb9::GFP	

4.1.2 Crianza de peces

Equipo	Especificación	Procedencia
Sistema automatizado de acuarios	ZebTec Active Blue Stand Alone	Tecniplast, Italia
Tanques de apareamiento o cruces	ZebTec breeding tanks	Tecniplast, Italia
Incubadora	28.5°C	Thermo Fisher Scientific, USA

4.1.3 Materiales de plástico

Material	Especificación	Procedencia
Placas Petri	90 mm	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Placas multipocillo	24 pocillos (4x6)	Corning Inc., USA
Tubos Falcon	50 ml	Corning Inc., USA
Tubos de microcentrífuga	0.2, 1.5 y 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Micropipetas	-	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Puntas para micropipetas	10 µl, 20 µl, 200 µl y 1 ml	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Net para peces	-	Tecniplast, Italia
Colador para recolección de embriones	-	-

4.1.4 Materiales de vidrio

Material	Especificación	Procedencia
Probetas	100 ml y 250 ml	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Placas de vidrio	-	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Frascos de laboratorio	250 ml y 500 ml	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Láminas porta y cubreobjetos	Estándar	Greiner Bio-One GmbH, Alemania

4.1.5 Otros materiales

Material	Procedencia
Guantes de nitrilo	Cranberry, Malasia
Agujas y ganchos ultrafinos para micromanipulación	Greiner Bio-One GmbH Alemania
Grasa sólida	Greiner Bio-One GmbH Alemania

4.1.6 Hardware

Equipo	Especificación	Procedencia
Estereomicroscopio de disección	Stemi 508	Zeiss, Alemania
Microscopio de fluorescencia	Axiozoom v16	Zeiss, Alemania
Microscopio confocal	LSM 880	Zeiss, Alemania
Microcentrífuga	miniSpin	Eppendorf, Alemania
Vortex digital	-	Fisher Scientific, USA
pH-metro	HI 2210	Hanna Instruments, Romania
Refrigerador	4°C	-
Congelador	-20°C	-

4.1.7 Software

Software	Especificación	Procedencia
ZEN Microscope Software	ZEN 2.3 System	Zeiss, Alemania
Adobe Photoshop	CC 2017	Adobe Systems, USA
GraphPad Prism	Prism 7 para Windows	GraphPad Software Inc., USA
Stata	Versión 10.0	StataCorp, USA
Geogebra	Versión 5.0	Software libre, Austria
Microsoft Office 365	-	Microsoft Corporation, USA

4.1.8 Reactivos

Reactivo	Especificación	Procedencia
Cloruro de sodio (NaCl)	-	Merck KGaA, Alemania
Cloruro de potasio (KCl)	-	Merck KGaA, Alemania
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	-	Merck KGaA, Alemania
Paraformaldeído (PFA)	-	Merck KGaA, Alemania
Buffer fosfato salino (PBS)	-	Merck KGaA, Alemania
Tritón	-	Merck KGaA, Alemania
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Merck KGaA, Alemania
Glicerol 100%	-	Sigma-Aldrich, USA
Suero de cabra	-	Sigma G9023, USA
Anticuerpo primario SV2	Anticuerpo monoclonal producido en ratón	DSHB, USA
Anticuerpo primario ZN8	Anticuerpo monoclonal producido en ratón	DSHB, USA
Anticuerpo primario tubulina acetilada (acTUB)	Anticuerpo monoclonal producido en ratón	DSHB, USA
Anticuerpos secundario Alexa Fluor 488	Goat anti-Mouse IgG	DSHB, USA
Anticuerpos secundario Cy3	Goat anti-Mouse IgG	DSHB, USA

4.1.9 Soluciones

Solución	Composición
Medio embrionario (E3) stock 60X	300 mM NaCl, 10.2 mM KCl, 19.8 mM CaCl ₂ y 19.8 mM MgSO ₄
1L de medio embrionario (E3) stock 60X	17.2 g NaCl, 0.76 g KCl, 2.9 g CaCl ₂ × 2 H ₂ O y 2.39 g MgSO ₄
1 L de medio embrionario (E3) 1X:	16.7 ml de E3 stock 60X en 1 L de agua miliQ (autoclavada y ajustada a pH 7)
Solución de Tritón (PBS-T)	0.1% de Tritón en PBS
Solución de Dimetilsulfóxido + Tritón (PBS-DT)	1% de Dimetilsulfóxido + 0.1% de Tritón en PBS
Solución de Paraformaldehído en PBS (4% PFA)	4% de Paraformaldehído en PBS
Solución de Glicerol en PBS	25, 50 y 75% de Glicerol en PBS

4.1.10 Fármaco

Fármaco	Especificación	Procedencia
BioCen 128	Biopreparado de origen animal, concentración: 1.2 mg/ml de PBS	Generosamente provisto por Prof. Claudio Rodríguez, Centro Nacional de Biopreparados (BioCen), Cuba

4.2 Métodos

4.2.1 Pez cebra (*Danio rerio*)

4.2.1.1 Cepas genéticas utilizadas

Las cepas genéticas del pez cebra pueden clasificarse en tres categorías: silvestres o wild-type (WT), mutantes y líneas transgénicas. Las cepas silvestres son definidas como poblaciones de peces que no presenta mutaciones de expresión fenotípica. Las cepas mutantes son aquellas poblaciones que presentan mutaciones de expresión fenotípica; dichas mutaciones en las secuencias de ADN pueden ser inducidas de forma aleatoria o específica, a través de químicos, retrovirus, etc. Las líneas transgénicas son aquellas

poblaciones de peces que poseen ADN de otras especies, ya que ha sido insertado en su genoma; el transgén insertado se vuelve heredable y será expresado en cualquier progenie que exprese 1 o 2 copias del gen. En muchas de las líneas transgénicas se utilizan genes reporteros fluorescentes, como por ejemplo la proteína fluorescente verde (GFP); con el fin de marcar grupos celulares específicos (27); y de esta manera analizar dichos grupos *in vivo*, mediante microscopía de fluorescencia.

En el presente estudio, se utilizaron como modelo animal, embriones de las siguientes cepas: Tab5 y Wild type Konstanz (WT^{Kn}); y la línea transgénica: Hb9::GFP. Los peces Tab5, son híbridos del cruce de dos cepas muy utilizadas, Tübingen y AB. Por su parte, los peces WT^{Kn} provienen de cruces y retrocruces de la cepa AB con peces originarios de la ciudad Konstanz (Alemania). Ambas cepas, no emiten fluorescencia y poseen ventajas como buena fecundidad y variabilidad genética (44). Por su parte, la línea Hb9::GFP expresa la proteína verde fluorescente (GFP) bajo la expresión del factor de transcripción hb9, el cual se expresa de forma específica en las neuronas motoras primarias de la médula espinal, páncreas, y otras estructuras (45).

4.2.1.2 Crianza de peces

Todos los peces adultos fueron mantenidos en un sistema automatizado de acuarios (ZebTec Active Blue, Tecniplast) en el Bioterio del Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo en LID-UPCH. Dichos acuarios contaron con condiciones estables de temperatura, pH, conductividad y flujo de agua. Los peces fueron mantenidos a 28.5°C y pH 7, de acuerdo con procedimientos establecidos. El cuarto del Bioterio contó con iluminación artificial automatizada, lo que permitió simular 14 h día y 10 h noche. Los peces fueron alimentados dos veces al día con raciones de artemia (*Artemia salina*) y hojuelas.

4.2.1.3 Producción de embriones

4.2.1.3.1 Preparación de medio embrionario (E3)

Se utilizó un stock de medio E3 a 60X (17.2 g NaCl + 0.76 g KCl + 2.9 g CaCl₂ + 2.39 g MgSO₄, diluido en 1 L de agua miliQ autoclavada y ajustada a pH7), el cual se mantuvo almacenado a 4°C. Se preparó una dilución de E3 a 1X, proporción fue 16.6 ml de E3 60X para 1 L de agua miliQ (autoclavada y a pH7). A esta dilución se añadió azul de metileno al 1% (fungicida), a una proporción de 25 µl por 1 L de medio

completo, y se agitó la mezcla. Finalmente, el medio E3 1X se guardó a 28.5°C y fue preparado varias veces para experimentos, ya que su tiempo de duración es de una semana.

4.2.1.3.2 Cruces de peces adultos y recolección de huevos

Para la obtención de embriones de pez cebra, se hicieron cruces o apareamientos convencionales entre peces adultos y se recogieron los huevos producidos de los cruces. Primero, la tarde anterior al cruce, se colocaron un macho y una hembra por tanque de cruce (ZebTec breeding tanks, Tecniplast), previamente llenados con agua del sistema ZebTec (mantenida a 28.5°C). Los tanques de cruces estuvieron compuestos por una base externa, una base interna con rejillas en la parte inferior, un divisor y una tapa (*Fig. 4.1*). Se utilizó el divisor, que aisló a los peces, con el fin de aclimatarlos al nuevo tanque previo al inicio de los cruces. Además, para estimular los cruces se agregaron plantas artificiales. Después, a la mañana siguiente, se retiraron los divisores e iniciaron los cruces. La producción de huevos se dio en las primeras horas después de retirar los divisores, ello permitió estimar el tiempo del desarrollo embrionario para los experimentos. Los huevos producidos atravesaron la rejilla de los tanques y cayeron a la parte inferior de la base, de esta manera los huevos fueron aislados de los peces para evitar que se los coman. Finalizado los cruces, se devolvieron los peces adultos a los tanques del sistema ZebTec Active Blue. Finalmente, los huevos fueron colectados en placas Petri con medio E3. Para ello, se recogieron los huevos en un colador, e inmediatamente se transfirieron a placas Petri, enjuagándolos en medio E3.

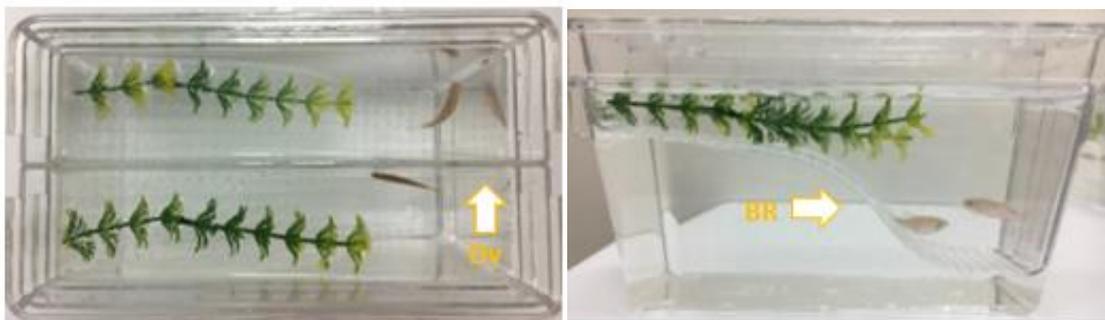


Figura 4.1. Tanque de cruces. La pareja de peces, hembra y macho, fueron separados con un divisor de plástico (Dv). A la mañana siguiente, se retiró la división para dar inicio al cruce. Los embriones engendrados cayeron y atravesaron las rejillas de la base interna (BR), protegiéndose así de ser comidos por los padres. Las plantas artificiales estimularon el apareamiento, al proporcionar refugio.

4.2.1.4 Manejo de embriones para experimentos

Los embriones colectados en las placas Petri, fueron inmediatamente revisados en el estereomicroscopio (Stemi 508, Zeiss). Se eliminaron los restos de suciedad; y se contabilizaron los embriones totales por placa, así como la proporción de embriones sanos, malformados, en lisis y no fertilizados; siendo los embriones malformados, en lisis y no fertilizados eliminados durante la limpieza de placas, utilizando una micropipeta P1000 con el tip cortado. Las placas fueron mantenidas en la incubadora a 28.5°C.

Para los experimentos, se examinaron cuidadosamente los embriones en el estereomicroscopio y se seleccionaron aquellos que se encontraban en estadio de 256 células y que no mostraban ningún déficit del desarrollo (24), para ser tratados con el fármaco. Los embriones fueron sacrificados colocando las placas Petri, donde estaban colectados, en hielo por 20 min.

4.2.2 Fármaco BioCen 128

4.2.2.1 Obtención del fármaco

El fármaco en solución de código BioCen 128 fue elaborado por el Centro Nacional de Biopreparados de Cuba (BioCen), y fue provisto al laboratorio de Neurobiología del Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia como parte de una colaboración de investigación liderada por el Prof. Edward Málaga-Trillo. Su identidad y composición están protegidas actualmente por un proceso de registro de patente. El fármaco fue proporcionado disuelto en buffer fosfato salino (PBS) a una concentración de 1.2 mg/ml, y fue almacenado a 4°C.

4.2.2.2 Administración del fármaco

4.2.2.2.1 Única concentración

En la mayoría de los experimentos, el fármaco fue administrado a los embriones por única vez entre los estadios de 256 y 512 células (aprox. 2.5 - 2.75 hpf), a través de diluciones seriadas o mediante administración directa en el medio E3. Se utilizaron diferentes tratamientos o concentraciones del fármaco (1, 2, 5, 10, 20, 25, 50 y 100 µg/ml de BioCen 128), y se evaluaron los efectos causados en el desarrollo a los 0, 1 y 2 dpf, utilizando un estereomicroscopio.

4.2.2.2 Doble concentración

En algunos experimentos, el fármaco fue administrado a los embriones en dos tiempos del desarrollo. Ello para determinar si el efecto de BioCen 128 era reversible en el tiempo (0-72 hpf). La primera administración se dio durante los estadios de 256-512 células, y la segunda administración durante los estadios de 2-4 somites (aprox. 10 hpf); ambas mediante administración directa del fármaco. Se utilizaron tratamientos de 5 y 10 µg/ml de BioCen 128, y se evaluaron los efectos causados en el desarrollo a los 0, 1 y 2 dpf, utilizando un estereomicroscopio.

4.2.2.3 Diluciones seriadas

Se hicieron diluciones seriadas del fármaco en placas multipocillos 4x6, a una concentración de 2X, y en un volumen total de 500 µl (**Fig. 4.2**). Cada pocillo representó un tratamiento o concentración de BioCen 128. Inmediatamente después se agregaron los embriones de 256 células a cada tratamiento, en un volumen de transferencia de 500 µl para llevar la concentración final a 1X (**Fig. 4.3**). En detalle, para hacer las diluciones seriadas a 2X, primero se calcularon (*Anexos*) y agregaron los volúmenes de E3 necesarios por pocillo para obtener las concentraciones deseadas de BioCen 128, así como el volumen de BioCen 128 (stock a 1.2 mg/ml) necesario para iniciar las diluciones seriadas. Para ello se utilizó la fórmula $C_i * V_i = C_f * V_f$, donde C_i es concentración inicial, V_i es volumen inicial, C_f es concentración final y V_f es volumen final. Segundo, se homogenizó la mezcla inicial de E3 y BioCen 128 mediante pipeteo, y se transfirió el volumen necesario de esa mezcla a un segundo pocillo con medio E3, para obtener una menor concentración del fármaco. Tercero, se homogenizó la mezcla y se transfirió un volumen del segundo pocillo a un tercer pocillo con medio E3 para diluir más el fármaco. Se repitieron estos pasos sucesivamente para los restantes pocillos, hasta culminar en el pocillo que contuvo la mínima concentración del fármaco. Por tanto, cada pocillo con 500 µl de volumen total, tuvo una concentración diferente del fármaco; y se hizo un pocillo control o vehículo con 500 µl de medio E3 (**Fig. 4.2**). Finalmente, se agregaron entre 30 y 40 embriones de 256 células a cada pocillo, en un volumen de transferencia de 500 µl por pocillo, dando como resultado un volumen final de 1000 µl y una solución 1X del fármaco (**Fig. 4.3**).

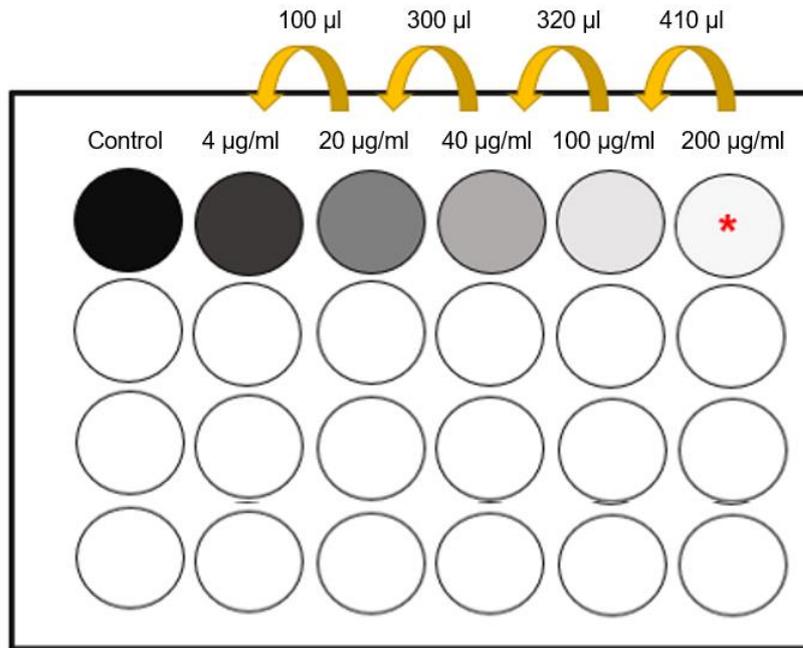


Figura 4.2. Ejemplo de diluciones seriadas de BioCen 128 a 2X. En una placa multipocillos 4x6 con medio E3 (ver volúmenes en *Anexos*), se agregó 151.66 µl de BioCen 128 (stock de 1.2 mg/ml) en el pocillo con el asterisco rojo. Seguidamente se homogenizó por pipeteo, y se tomó 410 µl de la mezcla y se transfirió al pocillo izquierdo vecino (flecha amarilla). Se continuó transfiriendo los volúmenes calculados (flechas amarillas), de un pocillo al siguiente inmediato, para obtener las concentraciones deseadas. Finalmente, todos los tratamientos quedaron con un volumen total de 500 µl, y se hizo un control con 500 µl de medio E3.

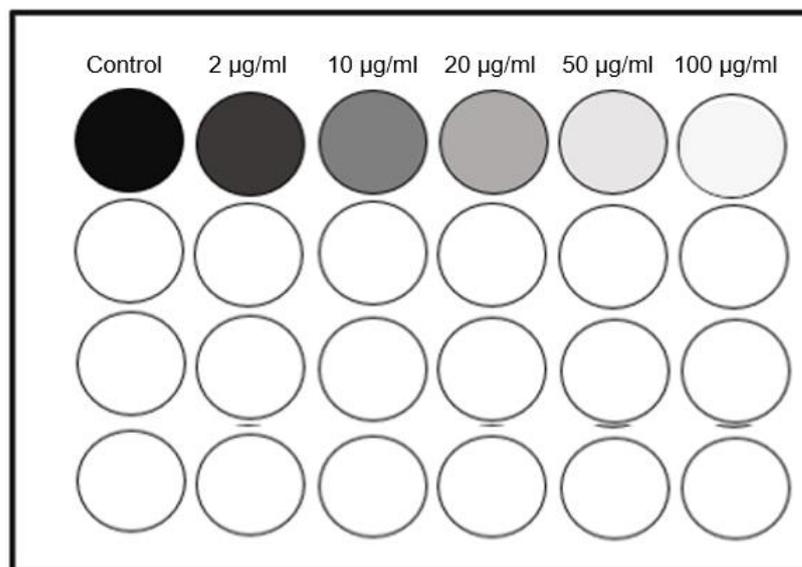


Figura 4.3. Ejemplo de tratamiento con diluciones seriadas de BioCen 128 a 1X. Entre 30-40 embriones en estadio 256 células (aprox. 2.5 hpf) fueron transferidos a cada pocillo, cada uno con diferentes concentraciones del fármaco (0, 4, 20, 40, 100, 200 µg/ml de BioCen 128); en un volumen de transferencia de 500 µl. Esto permitió llegar a concentraciones finales de 0, 2, 10, 20, 50 y 100 µg/ml de BioCen 128, y un volumen final de 1000 µl por pocillo. La placa multipocillos se mantuvo en la incubadora a 28.5°C y se hicieron evaluaciones periódicas de los embriones durante los 0, 1 y 2 dpf.

4.2.2.2.4 Administración directa

En experimentos posteriores, se utilizaron tratamientos de 1 y 5 µg/ml de BioCen 128. Debido a la menor cantidad de tratamientos, se optó por la administración directa de BioCen 128 para agilizar el proceso de administración. Para ello, se colocaron embriones de 256 células en una placa multipocillos, con un volumen de transferencia de 1000 µl por pocillo. Posteriormente, se añadieron directamente los volúmenes del fármaco (stock 1.2 mg/ml) necesarios para obtener estas concentraciones (**Tabla 4.1**). La mezcla se homogenizó mediante pipeteo suave, con la punta de micropipeta cortada para no dañar los embriones. Para los experimentos con doble concentración, también se utilizó el mismo procedimiento de administración del fármaco (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Ejemplo de volúmenes de BioCen 128 para administración directa. Utilizando la fórmula $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$, se calculó la concentración necesaria del fármaco (stock 1.2 mg/ml) para obtener dichos tratamientos. Abreviaturas: C_i , concentración inicial; V_i , volumen inicial; C_f , concentración final; V_f , volumen final.

Pocillo	Tratamiento	E3 (µl)	BioCen 128 (µl)
A1	Control	1000	0
A2	1 µg/ml	1000	0.83
A3	5 µg/ml	1000	4.16
A4	10 µg/ml	1000	8.33
A5	20 µg/ml	1000	16.66

4.2.3 Farmacología de BioCen 128

Para investigar la toxicología de BioCen 128 y determinar las concentraciones letales y subletales, se evaluaron los efectos sobre el desarrollo embrionario al administrar diferentes concentraciones del fármaco por única vez durante el estadio de blástula temprana (256 células, aprox. 2.5 hpf). Para ello, se hicieron diluciones seriadas del fármaco, en un rango de concentraciones de 1 a 100 µg/ml. Los embriones tratados con BioCen 128 fueron mantenidos a 28.5°C y se hicieron observaciones periódicas en el estereomicroscopio durante los tres días de embriogénesis. Las observaciones se realizaron cada dos horas durante el 0 dpf, cada ocho horas durante el 1 dpf y cada doce horas durante el 2 dpf. Se evaluó la letalidad, mediante el registro de supervivencia de embriones por tratamiento; y se analizaron efectos subletales sobre parámetros morfológicos como el tamaño y morfología del ojo, forma y tamaño del corazón, forma y ancho de la cola, tamaño de la cabeza en relación con el diámetro de la yema, ancho

del tronco y pigmentación (24). En base al porcentaje de supervivencia con respecto a la concentración del fármaco (curva concentración-respuesta) se calculó la concentración letal media o CL_{50} , que es la concentración que genera la muerte del 50% de los embriones al finalizar la embriogénesis (72 hpf). La determinación de la CL_{50} se realizó mediante la interpolación de la concentración de BioCen 128 y la supervivencia del 50% de los embriones en la curva concentración-respuesta.

Posteriormente, se midieron parámetros morfológicos representativos para determinar el estadio embrionario; tales como la longitud del embrión (EL), el ángulo entre cabeza y tronco (HTA), y la distancia entre ojo y vesícula ótica (OVL) (24). En detalle, se tomaron fotos en campo claro (Axiozoom v16, Zeiss) de los embriones en vista lateral, de cada pocillo o tratamiento; y utilizando herramientas de medición de ángulos y distancias del software ZEN (ZEISS ZEN Microscope Software), se calculó el valor promedio del EL, HTA y OVL para cada tratamiento. Luego, a partir de esos datos, se calculó el valor relativo de retraso del desarrollo (en porcentaje) según el EL, HTA y OVL para cada tratamiento. Para ello, primero se determinó el tiempo del desarrollo (en horas) estimado según los valores de EL, HTA y OVL (24) por tratamiento; después, se determinó la diferencia entre las hpf transcurridas y dicho tiempo del desarrollo, para obtener el retraso del desarrollo (en horas); finalmente, dicho retraso del desarrollo (en horas) se dividió entre el tiempo del desarrollo (en horas) de los embriones controles, y el valor resultante se multiplicó por 100 para obtener el valor relativo de retraso del desarrollo en porcentaje.

4.2.4 Análisis morfológicos y celulares

En los siguientes experimentos, se hicieron análisis morfológicos y celulares de muestras de embriones tratados con 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128, mediante microscopía de fluorescencia y confocal. A continuación, se describe el procedimiento de preparación de muestras para análisis en microscopio.

1) Fijación de embriones

Embriones tratados con BioCen 128 durante el estadio de 256 células, fueron sacrificados en estadios “prim-5” (24 hpf) y “long pec” (48 hpf) (24), e inmediatamente después fueron fijados en 4% PFA para su conservación y análisis en microscopio. En

detalle, primero se transfirieron los embriones a tubos eppendorf de 1.5 ml, mediante pipeteo. Segundo, se sacrificaron colocando los tubos en hielo por 20 min. Tercero, se removió el medio a cada tubo, y se añadió 100 µl de 4% PFA por tubo (volumen suficiente para máx. 50 embriones). Posteriormente, se incubaron toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, se removió el PFA y se hizo tres lavados con PBS a cada tubo, de cinco minutos cada lavado, y utilizando 1 ml de PBS por lavado. Finalmente, los tubos fueron almacenados a 4°C.

2) Inmunofluorescencia

Posterior al fijado y lavado con PBS, los embriones fueron teñidos con anticuerpos primarios SV2, ZN8 y tubulina acetilada. En detalle, se transfirieron los embriones a tubos eppendorf de 2 ml; donde embriones de 24 y 48 hpf, del mismo tratamiento, se colocaron en un mismo tubo. Cada tubo contuvo entre 30 y 50 embriones de un mismo tratamiento. Seguidamente, se removió el medio (PBS) a cada tubo y se hicieron tres lavados con 500 µl de PBS-T, de cinco minutos cada uno, en un agitador o shaker. Después, se removió el medio, y se hizo un lavado con 500 µl de PBS-DT por cinco minutos en shaker. Luego, se removió el medio y se añadió 100 µl de solución de bloqueo (10% suero de cabra en PBS-DT) a cada tubo, y se dejó incubando 3 horas en shaker. Para la preparación de la solución de bloqueo, el stock de suero de cabra fue previamente descongelado, vortexeado y centrifugado. Posteriormente, se preparó la solución del anticuerpo primario (SV2, ZN8 o tubulina acetilada), a una proporción de 1:500 en solución de bloqueo; para ello previamente se descongeló y centrifugó el stock de anticuerpo primario. Luego, se añadió 200 µl de la solución de anticuerpo primario a cada tubo o tratamiento. Finalmente, se incubaron los embriones a 4°C toda la noche (aprox. 15 h). Al día siguiente, se removió y guardó la solución de anticuerpo primario para ser reusada (hasta 2 veces), y se hicieron tres lavados con 500 µl de PBS-DT por cinco minutos cada uno, en shaker. Luego, se preparó la solución del anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 o Cy3), a una proporción de 1:1000 en solución de bloqueo; para lo cual previamente se descongeló y centrifugó el stock de anticuerpo secundario. Posteriormente, se removió el medio (PBS-DT) y se agregó a cada tubo 100 µl de la solución de anticuerpo secundario. Finalmente, se incubaron los embriones a 4°C toda la noche (aprox. 15 h); y al día siguiente, se hicieron tres lavados en PBS-T, de 5 min cada uno, en shaker.

3) Desyemado y preparación de embriones

Una vez fijados y teñidos los embriones, se procedió a removerles la yema, con la finalidad de facilitar la visualización en el microscopio. En detalle, primero se trasladaron los embriones a una placa Petri que contenía solución de PBS. Luego, utilizando ganchos ultrafinos de micromanipulación, se removió manualmente la yema a cada embrión. Posteriormente, se transfirieron los embriones desyemados a placas de vidrio y se hicieron tres lavados, de 5 minutos cada uno, con concentraciones crecientes de glicerol diluido en PBS (soluciones de 25%, 50% y 75% de glicerol, 1 ml por placa).

4) Montaje de embriones

Finalmente, se montaron los embriones en láminas portaobjetos para su visualización en el microscopio de fluorescencia y confocal. En detalle, primero se colocaron entre tres y cinco embriones por lámina, con la mínima cantidad posible de glicerol al 75%. Posteriormente, con ayuda de un estilete o aguja se posicionaron algunos embriones en vista lateral y otros en vista dorsal. Luego, se cubrieron los embriones con un cubreobjetos, previamente cubierto con grasa sólida en las esquinas para facilitar la adherencia. Después, se llenó lentamente con glicerol al 75% el espacio entre la lámina y el cubreobjetos, teniendo cuidado de no mover de posición los embriones. Finalmente, todas las láminas o montajes se almacenaron en fólderres a 4°C.

4.2.5 Microscopía de fluorescencia

Los embriones montados en láminas fueron analizados en el microscopio de fluorescencia (Axiozoom v16, Zeiss), como paso previo para la captura de imágenes en microscopio confocal. También, se tomaron fotografías en campo claro (modo contraste) a embriones vivos y embriones montados en láminas, utilizando el software ZEISS ZEN Microscope. Las fotografías fueron del cuerpo completo del embrión en vista lateral, utilizando objetivo de 40.0 X al 0 y 1 dpf, y 25.0 X al 2 dpf; se usó una misma iluminación para todos los embriones.

4.2.6 Microscopía confocal

Se analizaron en el microscopio confocal (LSM 880, Zeiss) los embriones controles y tratados con 1 y 5 µg/ml de BioCen 128, que fueron fijados a las 24 y 48 hpf, y teñidos con anticuerpos SV2, ZN8 y tubulina acetilada. Se utilizó el software ZEISS ZEN

Microscope para tomar fotografías bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D). Se tomaron fotografías de cabeza en vista dorsal y lateral, utilizando objetivo de 10X y 20X; y fotos del tronco en vista lateral, utilizando objetivo de 20X. Inicialmente, se utilizaron los mismos parámetros de brillo, contraste y exposición del láser para fotografiar embriones de diferentes tratamientos. Sin embargo, debido a limitaciones presentadas para visualizar con detalle la morfología neuronal en algunos embriones con poca fluorescencia, se procedió además a generar reconstrucciones alternativas con parámetros de brillo, contraste y exposición del láser óptimos para ayudar a la visualización. Asimismo, se excluyó estructuras fluorescentes como el neuroepitelio de las reconstrucciones 3D, con el fin de obtener una visualización más nítida de las estructuras de interés. El método de reconstrucción 3D empleado fue el de *Máximos* y *Mínimos*. Los valores de grosor escaneado y pinhole, utilizados para las reconstrucciones 3D, se muestran en la tabla correspondiente (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2. Parámetros utilizados en software ZEN para reconstrucciones 3D. Se muestran los valores de 1) grosor escaneado para análisis (eje Z), el cual es señalado como rango, ya que varía según el grupo de tratamiento (Control, 1 µg/ml y 5 µg/ml), y 2) apertura del pinhole (AU) y grosor del slice o tajada escaneada (µm section), usados para la obtención de imágenes 3D; todo ello de acuerdo con el láser y objetivo empleados, región del embrión, tiempo del desarrollo y vista del cuerpo. Asterisco: se utilizó un valor diferente de pinhole para los láseres empleados, señalados en paréntesis.

Línea/ inmunotinción	Láser (nm)	Objetivo	Región	Hpf	Vista	Grosor escaneado (µm)	Pinhole (AU/µm section)
WT ^{kn} /SV2	488	10X	Cabeza	24	Dorsal	50-55	1.01/5.5
					Lateral	30-40	
				48	Dorsal	40-47.5	
					Lateral	45-50	
		20X	Tronco	24	Lateral	27-35	1.01/1.5
				48		30-40	
WT ^{kn} /ZN8	488	10X	Cabeza	24	Dorsal	30-50	1.01/5.5
					Lateral	45-60	
				48	Dorsal	35-50	
					Lateral	50-75	
		20X	Tronco	24	Lateral	20-25	1.01/1.5
				48		30-35	
Hb9::GFP/ acTUB	488 y 561	10X	Cabeza	24	Dorsal	40-60	1.01/5.5 (488 nm) y 1.31/8 (561 nm)*
					Lateral	35-60	
				48	Dorsal	50-65	
					Lateral	60-70	
		20X	Tronco	24	Lateral	35-40	1.01/1.5 (488 nm) y 1/1.8 (561 nm)*
				48		40-60	

4.2.7 Análisis y procesamiento de datos

Los datos obtenidos en los experimentos farmacológicos fueron analizados estadísticamente y representados en gráficas utilizando los programas Microsoft Excel, GraphPad Prism 7, Stata 10.0 y Geogebra 5.0. Por su parte, las fotografías tomadas en campo claro y fluorescencia fueron editadas y organizadas en figuras utilizando el programa Photoshop 2017.

V. RESULTADOS

5.1 Farmacología de BioCen 128

5.1.1 Identificación de concentraciones letales y subletales, y efectos generales en el desarrollo

Es importante considerar que para la fase preclínica del desarrollo de un fármaco es indispensable analizar su toxicidad en diferentes modelos animales. Por tal motivo, en el presente trabajo se propuso no solo conocer el efecto beneficioso de BioCen 128, sino también conocer su efecto tóxico a altas concentraciones.

Con el objetivo de identificar las concentraciones subletales de BioCen 128, analizar su farmacología y verificar la especificidad de los efectos, inicialmente se evaluaron sus efectos sobre el desarrollo de embriones de la cepa Tab5. Se utilizaron como tratamientos concentraciones de 0 (control), 2, 10, 20, 50 y 100 µg/ml, administradas por única vez en el estadio de 256 células (2.5 hpf), a través del medio embrionario. Se eligió iniciar la exposición al fármaco a las 2.5 hpf, tomando en cuenta criterios farmacológicos de otros estudios (46, 47). Para cada tratamiento se utilizó 40 embriones de la cepa Tab5, ya que esta cepa posee una alta fecundidad y variabilidad genética. Los embriones fueron mantenidos a 28.5°C durante los tres días de embriogénesis, y durante ese plazo, se hicieron observaciones morfológicas periódicas en el estereomicroscopio de disección (a las 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 hpf).

Es importante recalcar que los estadios arriba mencionados son puntos de referencia, porque corresponden a procesos biológicos clave del desarrollo (**Fig. 1.4**). Durante las etapas iniciales del desarrollo (4, 6 y 8 hpf) no se observó diferencias morfológicas entre los embriones tratados con BioCen 128 y los embriones controles. Fue interesante

ver que, a las 10 hpf, cuando el proceso de epibolia se completa al 100% y aparece la yema (“bud”) que dará origen a la cola del embrión (24), se empezó a observar cambios morfológicos entre los embriones tratados con 20, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 y los embriones controles. El 100% de los embriones controles, embriones tratados con 2 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128, así como el 40% de los embriones tratados con 20 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128, se encontraron en estadio “bud” (aprox. 10 hpf, **Fig. 5.1**). Sin embargo, el 100% de los embriones tratados con 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128, así como el 60% de los embriones tratados con 20 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128, presentaron una morfología correspondiente al estadio de “90% epibolia” (aprox. 9 hpf, **Fig. 5.1**). En base al tiempo de desarrollo de los embriones controles, se estimó un retraso de 0.6 h para embriones tratados con 20 $\mu\text{g/ml}$, y de 1 h para embriones tratados con 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128.

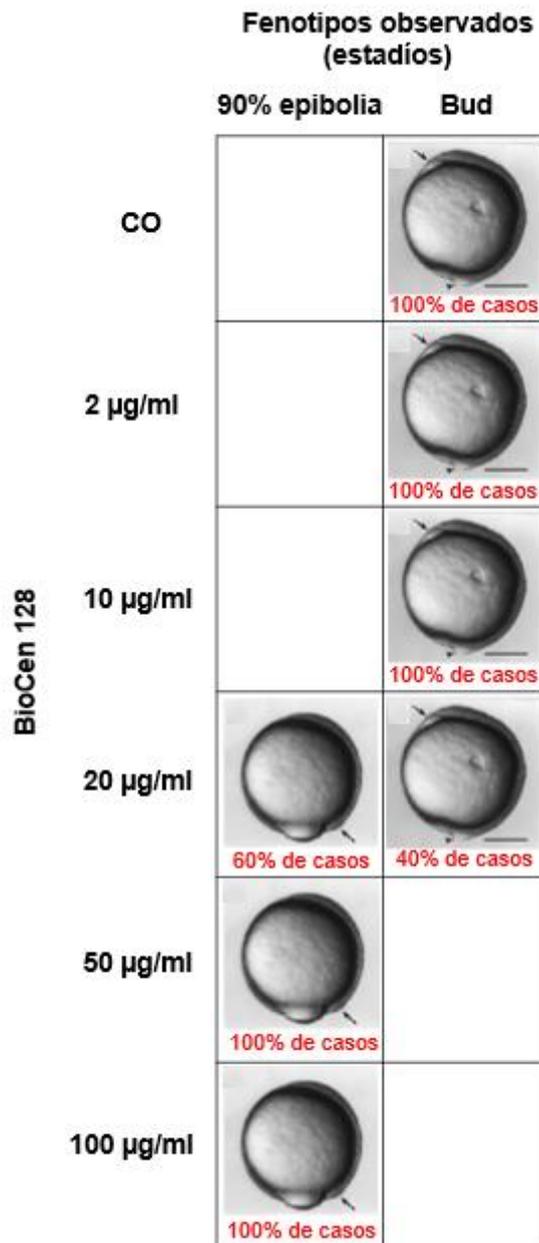


Figura 5.1. Efectos de BioCen 128 en el desarrollo embrionario, a las 10 hpf. Se analizaron 40 embriones Tab5 por tratamiento (n=40), utilizando un estereoscopio de disección. Se observó que el 100% de los embriones controles (CO), y tratados con 2 y 10 µg/ml de BioCen 128 se encontraban en estadio bud; el 40% y 60% de los embriones tratados con 20 µg/ml de BioCen 128 se encontraban en estadio bud y 90% epibolia, respectivamente (0.6 h de retraso del desarrollo); el 100% de los embriones tratados con 50 y 100 µg/ml de BioCen 128 se encontraban en estadio 90% epibolia (1 h de retraso del desarrollo). Imágenes extraídas de (24). Escala: 250 µm.

De manera similar, a las 12 hpf se mantuvo el retraso en el desarrollo observado a las 10 hpf. El 100% de los embriones controles, y tratados con 2 y 10 µg/ml de BioCen 128 se encontraban en estadios de 4-6 somites (aprox. 12 hpf, **Fig. 5.2**). Sin embargo, todos los embriones tratados con 50 y 100 µg/ml de BioCen 128, seguían en estadio de “90% epibolia”, es decir su retraso se incrementó a aprox. 3 h con respecto a los controles.

Asimismo, los embriones tratados con 20 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 presentaron un retraso en el desarrollo de aprox. 1.6 h con respecto a los controles, esto ya que el 40% se encontró en estadios de 2-3 somites (aprox. 11 hpf) y el 60% en estadio bud (*Fig. 5.2*).

**Fenotipos observados
(estadios)**

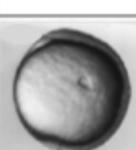
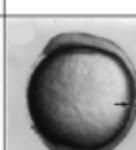
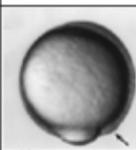
		90% epibolia	Bud	2-3 somites	4-6 somites
BioCen 128	CO				 100% de casos
	2 $\mu\text{g/ml}$				 100% de casos
	10 $\mu\text{g/ml}$				 100% de casos
	20 $\mu\text{g/ml}$		 60% de casos	 40% de casos	
	50 $\mu\text{g/ml}$	 100% de casos			
	100 $\mu\text{g/ml}$	 100% de casos			

Figura 5.2. Efectos de BioCen 128 en el desarrollo embrionario, a las 12 hpf. Se analizaron 40 embriones Tab5 por tratamiento (n=40), utilizando un estereoscopio de disección. Se observó que el 100% de los embriones controles (CO), y tratados con 2 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 se encontraban en estadios 4-6 somites; el 40% y 60% de los embriones tratados con 20 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 se encontraban en estadios 2-3 somites y bud, respectivamente (1.6 h de retraso del desarrollo); el 100% de los embriones tratados con 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 se encontraban en estadio 90% epibolia (3 h de retraso del desarrollo). Imágenes extraídas de (24). Escala: 250 μm .

En conclusión, estos resultados sugieren que, a concentraciones altas, BioCen 128 produce un leve retraso del desarrollo embrionario a partir de la gastrulación, y este retraso es dependiente de la concentración del fármaco.

A las 24 hpf, el desarrollo embrionario del pez cebra se caracteriza por haber iniciado la organogénesis primaria, haber desarrollado células pigmentarias y continuar la elongación de la cola (24). Asimismo, la neurogénesis primaria, que comenzó aprox. a las 16 hpf (Tropepe & Sive, 2003), continúa con el establecimiento de una red neuronal básica a lo largo de la médula espinal, y en el prosencéfalo, mesencéfalo, y romboencéfalo (**Fig 1.5**).

Notablemente, a las 24 hpf, se observó una mortalidad (lisis) del 100% de embriones tratados con concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 (**Fig. 5.3**). Por el contrario, no se registró mortalidad en embriones tratados con concentraciones de 2, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128. Es interesante ver que, se detectó un retraso del desarrollo en embriones tratados con 10 $\mu\text{g/ml}$, así como un mayor tiempo de retraso del desarrollo en embriones tratados con 20 $\mu\text{g/ml}$ en comparación al descrito previamente, en estadios pertenecientes a gastrulación y segmentación. Mientras los controles y tratados con 2 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron en estadio “prim-5” (aprox. 24 hpf, **Fig. 1.4**), 80% de los embriones tratados con 10 $\mu\text{g/ml}$ tuvieron una morfología aprox. de “26-somites” (aprox. 22 hpf, **Fig. 1.4**), y el 20% restante, así como el 100% de los tratados con 20 $\mu\text{g/ml}$ tuvieron una morfología aprox. de 18-21 somites (aprox. 18-19.5 hpf, **Fig. 1.4**). Por lo tanto, de acuerdo con el tiempo requerido para alcanzar estadios característicos, se estimó tiempos de retraso de 2.65 y 5.25 h para embriones tratados con 10 y con 20 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

En los siguientes puntos de observación, en estadios correspondientes a las 30, 36, 42, 48, 60 y 72 hpf, se continuó la evaluación de mortalidad de embriones. Se encontró una supervivencia del 100% de los embriones controles, y embriones tratados con 2, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 (**Fig. 5.3**). Además, se registró un efecto de retraso, concentración dependiente, del desarrollo en los embriones tratados con 2, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 durante toda la embriogénesis. La dinámica farmacológica del efecto retraso al 1 y 2 dpf, será descrita en la sección 5.1.3.

Estos resultados indican que las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 son letales (todos los embriones murieron) para el embrión de peces cebra, mientras que las concentraciones de 2, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ son subletales (ningún embrión murió), y se sugiere que el posible efecto tóxico de BioCen 128 a altas concentraciones, es un retraso del desarrollo a partir de la gastrulación.

5.1.2 Determinación de la CL₅₀ de BioCen 128

Con el fin de validar los hallazgos descritos previamente, y para determinar la concentración letal media de BioCen 128 (CL₅₀), se realizaron otros experimentos, utilizando como grupos de tratamiento: control, 1, 5, 10 y 25 µg/ml de BioCen 128. Es importante mencionar que se incluyó por primera vez la concentración de 25 µg/ml con el fin de reducir el rango de letalidad establecido a partir de 50 µg/ml. Nuevamente se utilizó 40 embriones Tab5, y una única administración del fármaco a las 2.5 hpf, a través del medio embrionario. Se hicieron observaciones periódicas a las 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 hpf.

En general las observaciones de estos experimentos recapitulan lo visto anteriormente. Por ejemplo, durante las observaciones a las 4, 6 y 8 hpf, no se detectó diferencias morfológicas entre los embriones controles y los tratados con BioCen 128. Como esperábamos de acuerdo con los experimentos anteriores, a las 10 y 12 hpf se observó un retraso del desarrollo en embriones tratados con 25 µg/ml de BioCen 128 con respecto a los controles; de 0.8 h y 1.8 h, respectivamente. Es interesante ver que, a las 24 hpf se encontró una mortalidad del 75% en los embriones tratados con 25 µg/ml, y este valor aumentó al 100% a las 48 hpf (**Fig. 5.3**). Además, se observó un retraso del desarrollo en los embriones tratados con 1, 5 y 10 µg/ml, durante el 1 y 2 dpf. La dinámica farmacológica del efecto retraso en 1 y 2 dpf será descrita en la sección 5.1.3.

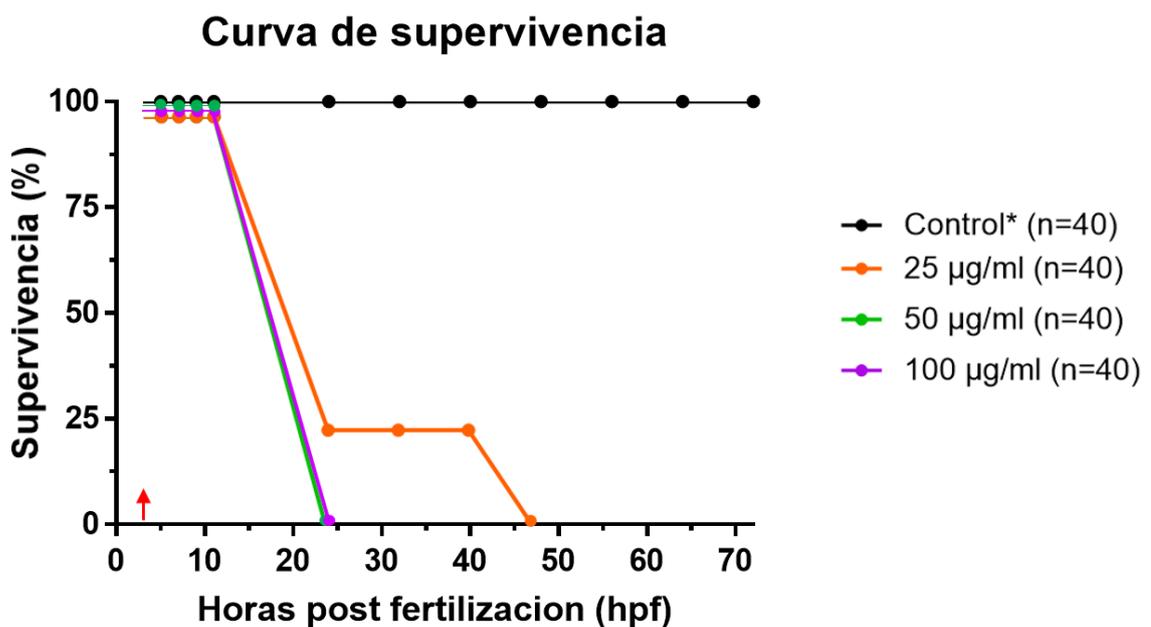


Figura 5.3. Curva de supervivencia de embriones tratados con diferentes concentraciones de BioCen 128. El porcentaje de supervivencia de embriones Tab5 (n=40 por tratamiento) se evaluó a partir de la administración del fármaco, a las 2.5 hpf (flecha roja), hasta el final de la embriogénesis (72 hpf). Los puntos de revisión (círculos) fueron a las 3, 5, 7, 9, 11, 24, 32, 40, 48, 56, 64 y 72 hpf. Asterisco en grupo control indica que los tratamientos con 1, 2, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 tuvieron el mismo porcentaje de supervivencia que el grupo control. Se concluye que 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 son concentraciones letales de fármaco (0% de supervivencia al final de la embriogénesis o 72 hpf).

Con la identificación de las concentraciones letales y subletales de BioCen 128, se calculó la CL_{50} (*ver Materiales y Métodos*), que es la concentración del fármaco que genera la muerte del 50% de los embriones. Se hizo una curva concentración-respuesta, y mediante la interpolación de la concentración de BioCen 128 y la supervivencia de los embriones, se determinó que la CL_{50} fue 22.5 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128, como se puede apreciar en el gráfico correspondiente (*Fig. 5.4*)

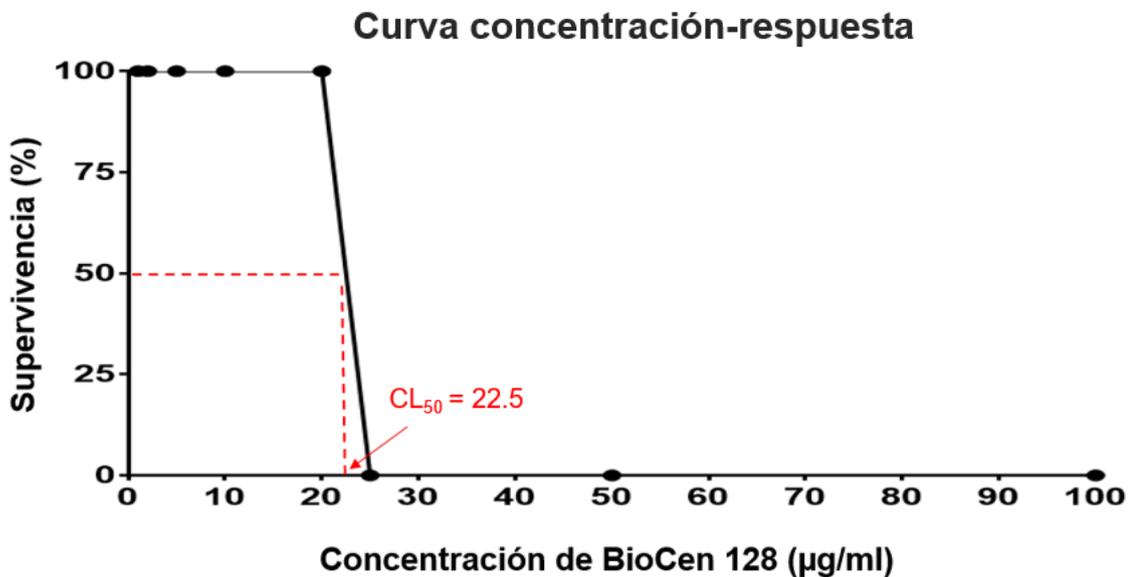


Figura 5.4. Curva concentración-respuesta y CL_{50} de BioCen 128. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de BioCen 128 (círculos) en la supervivencia de embriones Tab5 (n=40 por tratamiento). Se estimó la concentración letal media (CL_{50}) de BioCen 128, que es la concentración que genera la muerte del 50% de los embriones. Esta fue 22.5 $\mu\text{g/ml}$.

De acuerdo con lo descrito anteriormente, se concluye que 25 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128, al igual que 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$, es letal para el embrión de pez cebra. Además, estos resultados confirman que el efecto tóxico de BioCen 128 es un retraso, concentración dependiente, del desarrollo embrionario; y nos permite asignar un nuevo rango mínimo aproximado de letalidad a 25 $\mu\text{g/ml}$.

5.1.3 Dinámica farmacológica de BioCen 128 al 1 y 2 dpf

Después de identificar la CL_{50} de BioCen 128 nos propusimos cuantificar el retraso causado por la toxicidad del fármaco a concentraciones altas; en particular, descartar que estos efectos se deban a experimentos hechos utilizando una cepa genética en particular. Para ello, se utilizaron embriones de otra cepa wild type, con una constitución genética diferente: wild type Konstanz (WT^{Kn}). Se usaron 4 tratamientos: control, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128; se utilizaron 30 embriones WT^{Kn} por tratamiento; y se hicieron dos réplicas en total. Al igual que en los experimentos anteriores, se administró el fármaco por única vez a las 2.5 hpf, a través del medio embrionario.

Similar a lo observado en embriones Tab5, los embriones WT^{Kn} tratados con 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 no presentaron diferencias morfológicas con respecto a los controles durante la blastulación, gastrulación y primeros estadios de la segmentación (observaciones a las 4, 6, 8, 10, 12 y 14 hpf). Como se esperaba, se evidenció un retraso comparable del desarrollo en los embriones tratados con 20 $\mu\text{g/ml}$ a partir de las 10 hpf (**Fig. 5.5**). Con el objetivo de cuantificar de manera más precisa el retraso en estos embriones, en esta ronda de experimentos se comparó parámetros morfológicos específicos, tales como el desarrollo del polster (**Fig 5.5 G**; estructura que da origen a la glándula de eclosión, la cual secreta enzimas que degradan el córion), tamaño y forma del primordio ocular (**Fig 5.5 H-I**), número de somites (**Fig 5.5 H**), desarrollo de la cola, etc. (24); y se estimó el porcentaje de retraso relativo del desarrollo (*ver **Material**es y **Métodos***). A las 10 hpf, se encontró que los embriones tratados con 20 $\mu\text{g/ml}$ no desarrollaron el polster (**Fig. 5.5 A, D**), por lo que presentaron un valor relativo de retraso (*ver **leyenda de Fig. 5.5** y **Material**es y **Métodos***) aprox. del 10% con respecto a los controles. A las 12 hpf, estos embriones no habían desarrollado el primordio ocular, somites y yema de la cola (**Fig. 5.5 B, E**); por lo tanto, presentaron un valor relativo de retraso aprox. del 16.66% con respecto a los controles. A las 14 hpf, estos embriones tuvieron un notable menor tamaño del cerebro, en particular un menor desarrollo del primordio ocular, mesencéfalo y romboencéfalo, con respecto a los controles; por lo que presentaron un valor relativo de retraso aprox. del 14.28% (**Fig. 5.5 C, F**).

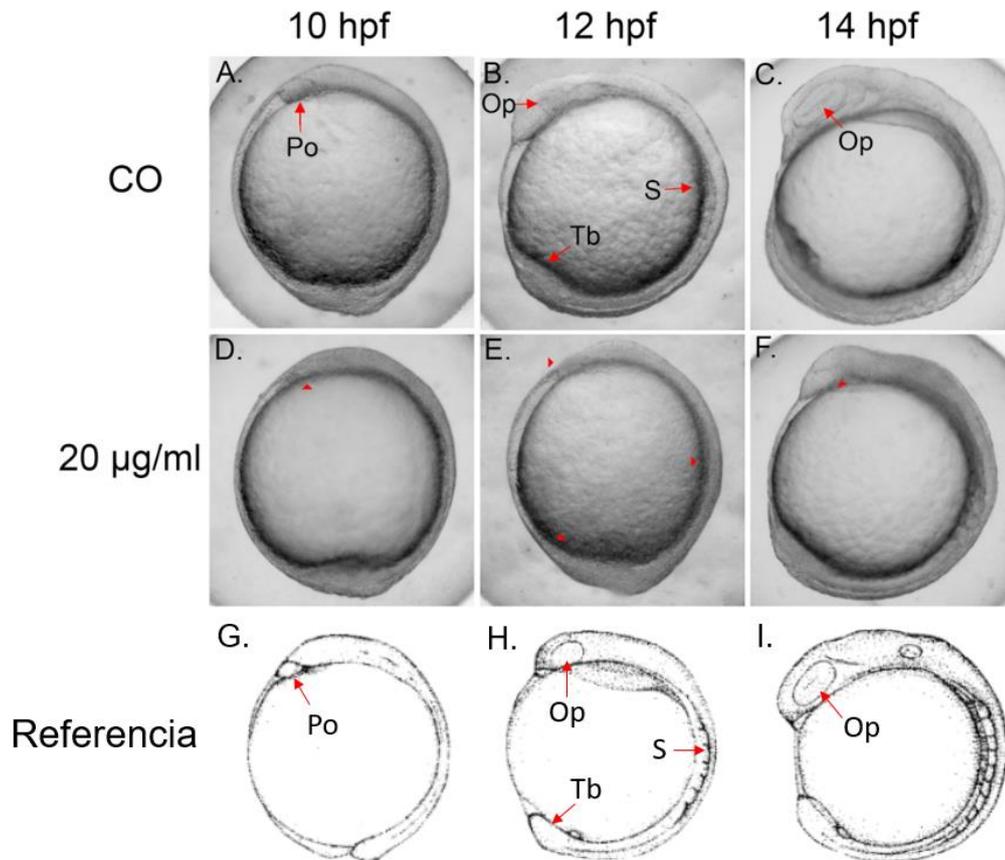


Figura 5.5. Efecto de BioCen 128 durante la segmentación. A partir de las 10 hpf, se evidencia un leve efecto de retraso del desarrollo en embriones tratados con 20 µg/ml de BioCen 128. (A-F) Se eligió aleatoriamente un embrión por tratamiento (n=40) para cada tiempo del desarrollo, y se fotografió en vista lateral (40X) y campo claro, mediante el uso de un Axiozoom v16 Zeiss. (G-I) Referencias extraídas de (24), vista lateral. A y G. Estadio bud. B y H. Estadio 6 somites. C e I. Estadio 10 somites. Abreviaturas: Po, polster; Tb, yema de la cola; S, somite; Op, primordio ocular. Flecha roja sin cola, señala efectos en estructuras correspondientes. Se determinó el valor relativo de retraso (%) = (retraso del desarrollo en horas / tiempo del desarrollo de embrión control en horas) *100. D. Valor de retraso relativo = (1/10) *100 o 10%. E. Valor de retraso relativo = (2/12) *100 o 16.66%. F. Valor de retraso relativo = (2/14) *100 o 14.28% (*ver Materiales y Métodos*).

A las 24 hpf, observamos un retraso esperado del desarrollo en embriones tratados con 5, 10 y 20 µg/ml de BioCen 128 (**Fig. 5.6**). A partir de las 24 hpf y hasta el final de la embriogénesis (72 hpf), incluimos parámetros morfológicos adicionales como la longitud del embrión (EL, embryo length, por sus siglas en inglés), el diámetro de la cabeza con respecto al diámetro de la yema, la morfología del ojo, la forma y tamaño del corazón, el ancho del tronco y la pigmentación. Gracias a estos análisis pudimos confirmar un retraso del desarrollo en embriones tratados con BioCen 128, el cual fue más severo a mayor concentración del fármaco (**Fig. 5.6**).

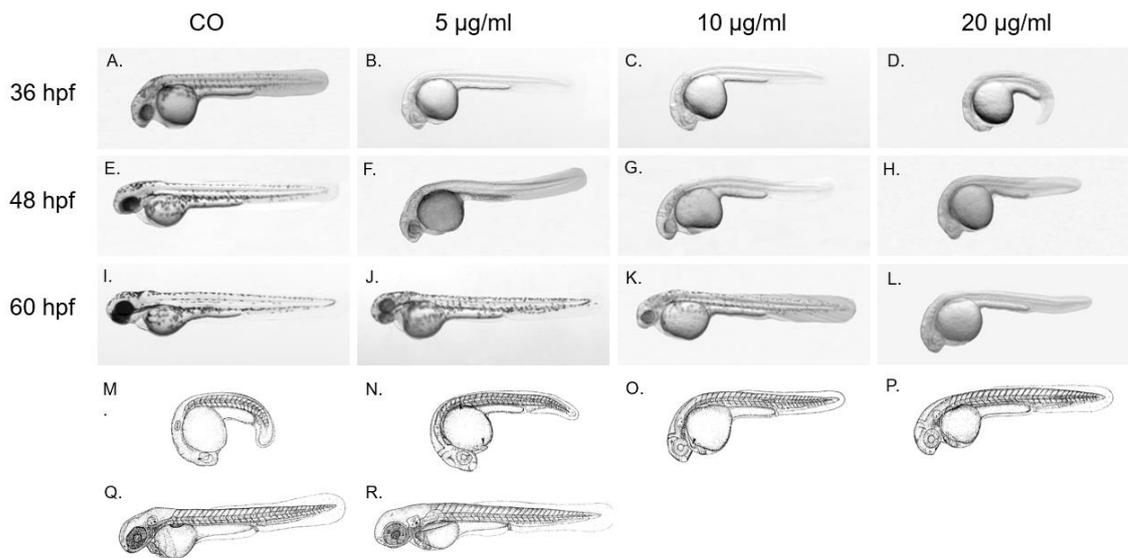


Figura 5.6. Efecto de BioCen 128 durante el segundo y tercer día del desarrollo embrionario. Se eligió aleatoriamente un embrión WT^{Kn} por tratamiento (n=30) para cada tiempo del desarrollo, y se fotografió en vista lateral y en campo claro, mediante el uso de un Axiozoom v16 Zeiss. Fotos de embriones de 36 hpf a objetivo 40X; fotos de embriones de 48 y 60 hpf a objetivo 25X. Se evidenció un retraso, concentración dependiente, del desarrollo embrionario. (M-S) Bosquejos referenciales de estadios del desarrollo (24): M. 21-somites. N. Prim-6. O. Prim-16. P. Prim-22. Q. Long pec. R. Pec fin.

Posteriormente, nos propusimos obtener un único índice cuantitativo del retraso ocasionado por la toxicidad de BioCen 128 a altas concentraciones. Para ello, integramos el parámetro de EL (embryo length) para ambas cepas, y añadimos otros indicadores del tiempo del desarrollo, tales como el ángulo entre la cabeza y tronco (HTA, head to trunk angle, por sus siglas en inglés) y la distancia entre el ojo y la vesícula ótica (OVL, otic vesicle length, por sus siglas en inglés) (*ver Materiales y métodos*). Debido a que la cabeza del embrión se endereza rápidamente durante el desarrollo, y la vesícula ótica se aproxima al ojo, también rápidamente durante el desarrollo; el HTA y el OVL son excelentes índices del estadio embrionario (24). De acuerdo con Kimmel et al., el valor de EL a las 25 hpf es 2 mm (milímetros) y a las 35 hpf aumenta a 2.6 mm (**Fig. 5.7**); por otro lado, el valor de HTA a las 25 hpf es 115.8° y a las 35 hpf disminuye a 78.3° (**Fig. 5.8**); por su parte, el valor de OVL a las 25 hpf es 4.7 unidades OVL y a las 35 hpf disminuye a 1.3 unidades OVL (**Fig. 5.9**).

En este experimento, se calculó los valores de EL, HTA y OVL promedio por tratamiento (n=30 embriones por tratamiento) para cada cepa, en los siguientes puntos de observación: 24, 30, 36, 48, 54, 60, 66 y 72 hpf; y se utilizaron en total 2 réplicas por cepa (*ver Anexos*). En congruencia con lo observado en la figura 5.6, se encontró una clara reducción del valor de EL en los embriones tratados con BioCen 128, en

comparación con los controles; y ese valor fue concentración dependiente como se puede apreciar en el gráfico correspondiente (*Fig. 5.7*).

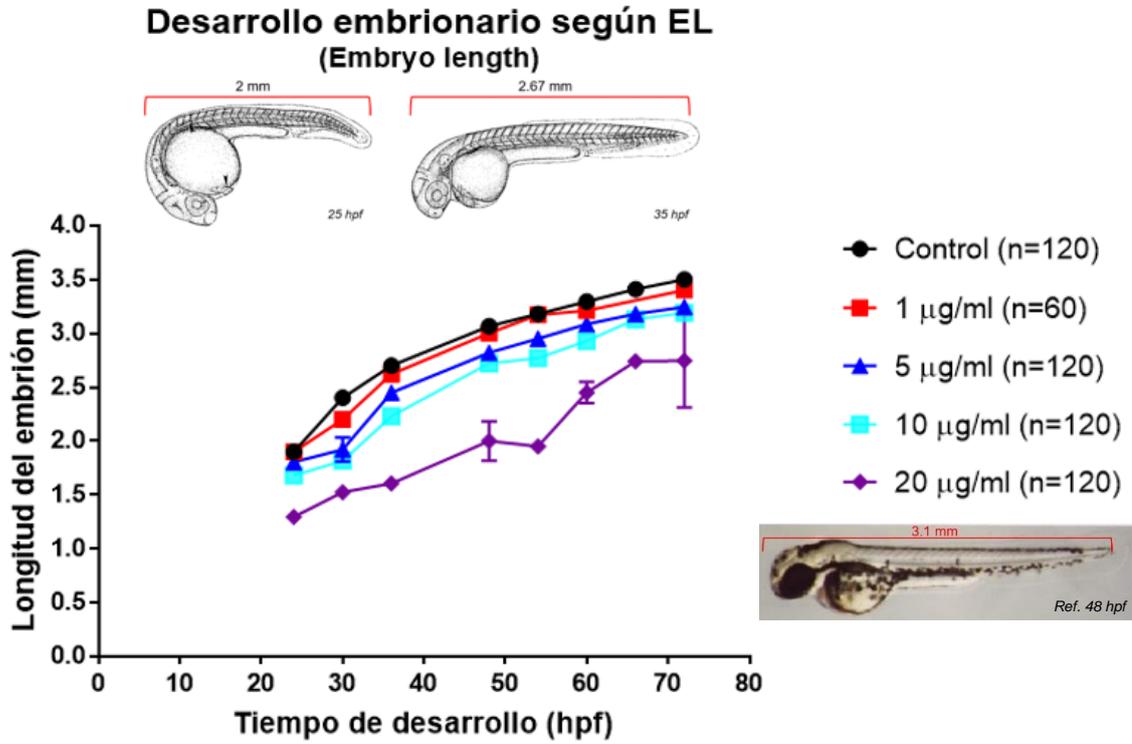


Figura 5.7. Efecto de BioCen 128 sobre la longitud del embrión. Embriones tratados con diferentes concentraciones subletales de BioCen 128, presentaron una menor longitud (milímetros = mm) en comparación a los embriones controles, durante los días 1 y 2 de embriogénesis (observaciones a las 24, 30, 36, 48, 54, 60, 66 y 72 hpf). Se evidenció un valor de EL dependiente de la concentración del fármaco. Dos dibujos y una foto de embriones en vista lateral ejemplifican el cálculo del EL para 3 estadios embrionarios (25, 35 y 48 hpf).

De manera similar, se encontró que los embriones tratados con BioCen 128 tuvieron valores más altos, tanto de HTA como de OVL, en comparación a los controles, y estos valores también fueron dependientes de la concentración del fármaco (*Fig. 5.8* y *Fig. 5.9*). En su conjunto, estos resultados nos permiten concluir que la toxicidad de BioCen 128 a concentraciones altas se manifiesta con un retraso del desarrollo embrionario, de acuerdo con índices del tiempo del desarrollo (EL, HTA y OVL); y este retraso es dependiente de la concentración de BioCen 128.

Desarrollo embrionario según HTA (Head-trunk angle)

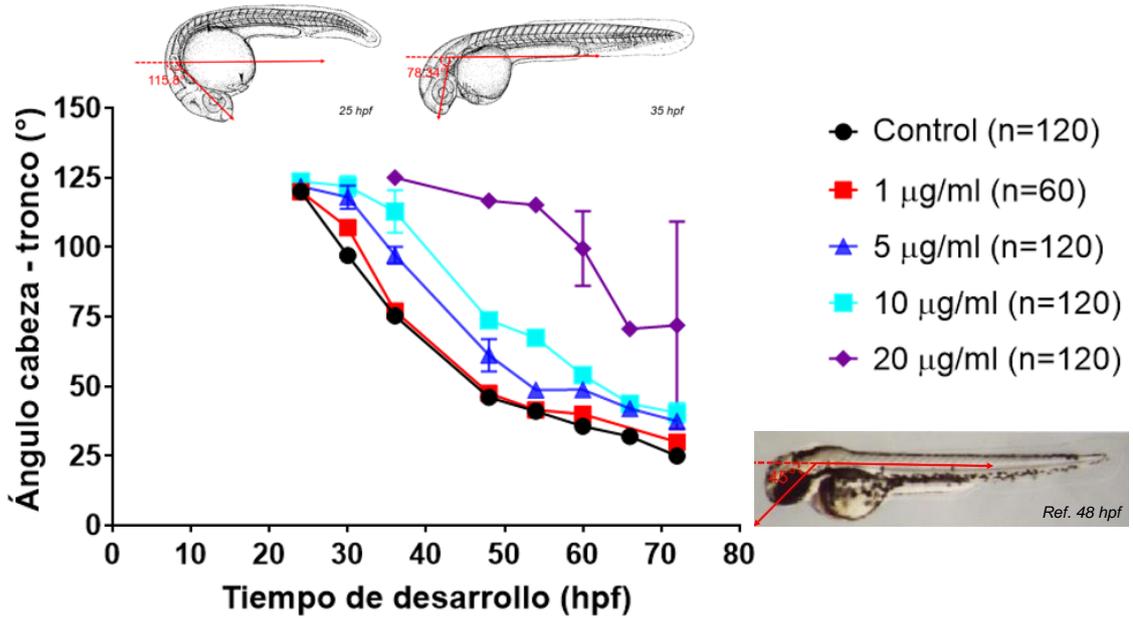


Figura 5.8. Efecto de BioCen 128 sobre el ángulo entre cabeza-tronco del embrión. Embriones tratados con diferentes concentraciones subletales de BioCen 128, presentaron un mayor ángulo entre cabeza-tronco (grados sexagesimales = °) en comparación a los embriones controles, durante los días 1 y 2 de embriogénesis (observaciones a las 24, 30, 36, 48, 54, 60, 66 y 72 hpf). Se evidenció un valor de HTA dependiente de la concentración del fármaco. Dos dibujos y una foto de embriones en vista lateral ejemplifican el cálculo del HTA para 3 estadios embrionarios (25, 35 y 48 hpf).

Desarrollo embrionario según OVL (Otic vesicle length)

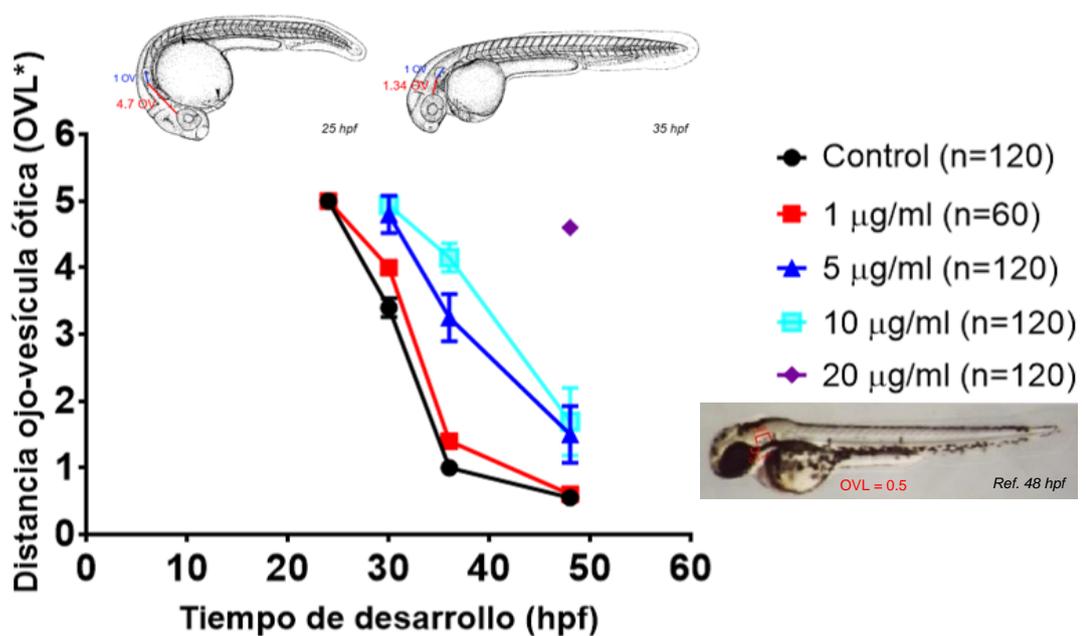


Figura 5.9. Efecto de BioCen 128 sobre la distancia entre ojo-vesícula ótica (OVL) del embrión. Embriones tratados con diferentes concentraciones subletales de BioCen 128, presentaron una mayor distancia entre ojo-vesícula ótica, en comparación a los embriones controles, durante los días 1 y 2 de embriogénesis (observaciones a las 24, 30, 36, 48, 54, 60, 66 y 72 hpf). Se evidenció un valor de OVL dependiente de la concentración del fármaco. Dos dibujos y una foto de embriones en vista lateral ejemplifican el cálculo del OVL para 3 estadios embrionarios (25, 35 y 48 hpf). (Asterisco) OVL es la distancia entre el ojo y la vesícula ótica, en unidades OVL. 1 OVL representa el diámetro de la vesícula ótica (OV), por tanto, el valor de OVL se traduce en el número de vesículas óticas que puede haber entre el ojo y la vesícula ótica (24).

Llegado a este punto, nos planteamos la posibilidad de que el efecto de retraso del desarrollo pueda ser reversible. Esto podría deberse a que el fármaco perdió efecto debido a que se degradó o metabolizó; o que el efecto sea específico sobre un proceso del desarrollo, como la migración celular, diferenciación y/o morfogénesis, y no se deba a otros procesos como la división celular, entre otros. Por ello, para decidir entre estas posibilidades, se hicieron pruebas con una doble administración o concentración (2D) de BioCen 128 (*ver Materiales y Métodos*); la primera concentración a las 2.5 hpf y la segunda concentración a las 10 hpf. Se utilizaron como concentraciones 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$, y se hicieron observaciones a las 24, 30, 36, 48, 54, 60, 66 y 72 hpf. En los tratamientos con doble administración (2D 5 $\mu\text{g/ml}$ y 2D 10 $\mu\text{g/ml}$) se encontró un retraso más severo con respecto a los tratamientos con una única administración (5 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$), durante el 1 y 2 dpf. Dicho efecto de retraso se estimó de acuerdo con los valores de EL, HTA y OVL, como se puede apreciar en las gráficas correspondientes (*Figura 5.10 – 5.12*). Estos resultados corroboran que el retraso del desarrollo embrionario causado por BioCen 128 no es reversible.

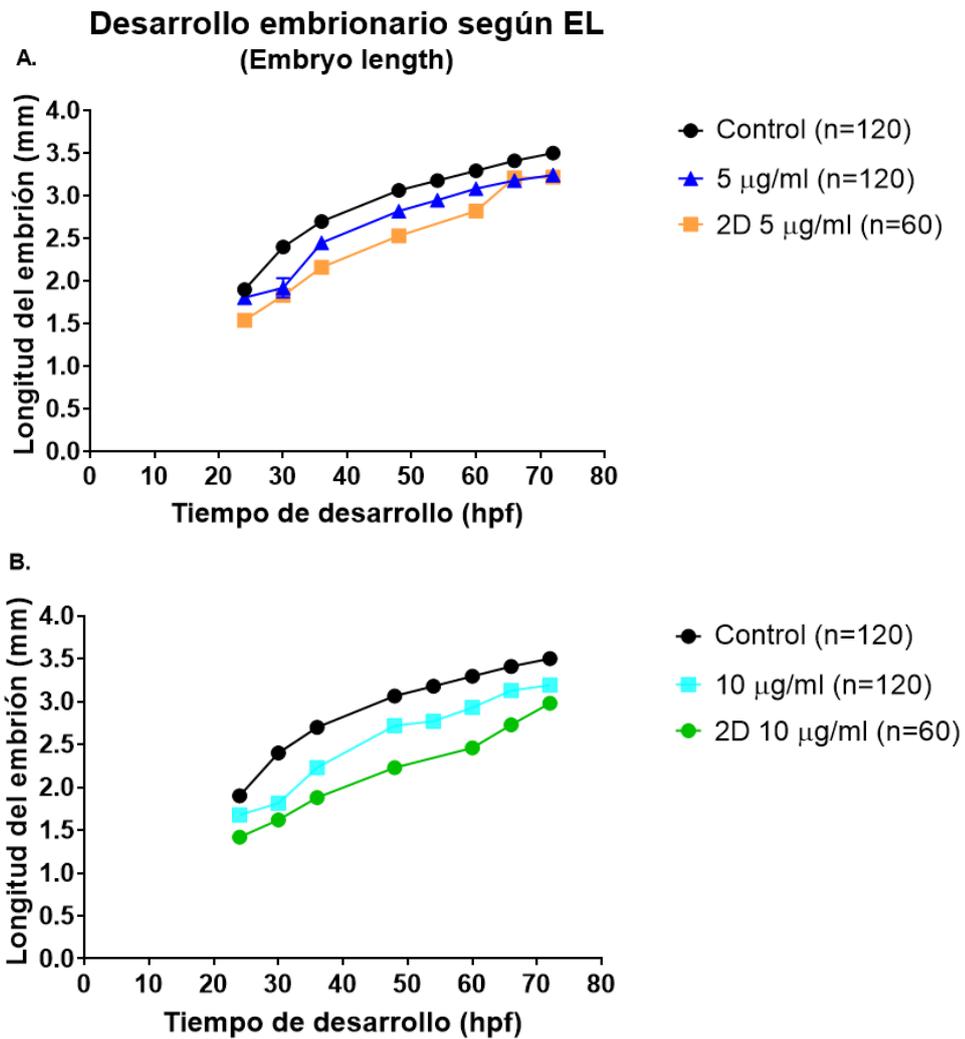


Figura 5.10. Efecto de doble concentración de BioCen 128 sobre la longitud del embrión. (A.) Embriones tratados con doble concentración de 5 (2D 5 µg/ml) y (B.) 10 µg/ml de BioCen 128 (2D 10 µg/ml), presentaron una menor longitud (mm) en comparación a los embriones controles y tratados con única administración de BioCen 128, durante los días 1 y 2 de embriogénesis.

Desarrollo embrionario según HTA (Head-trunk angle)

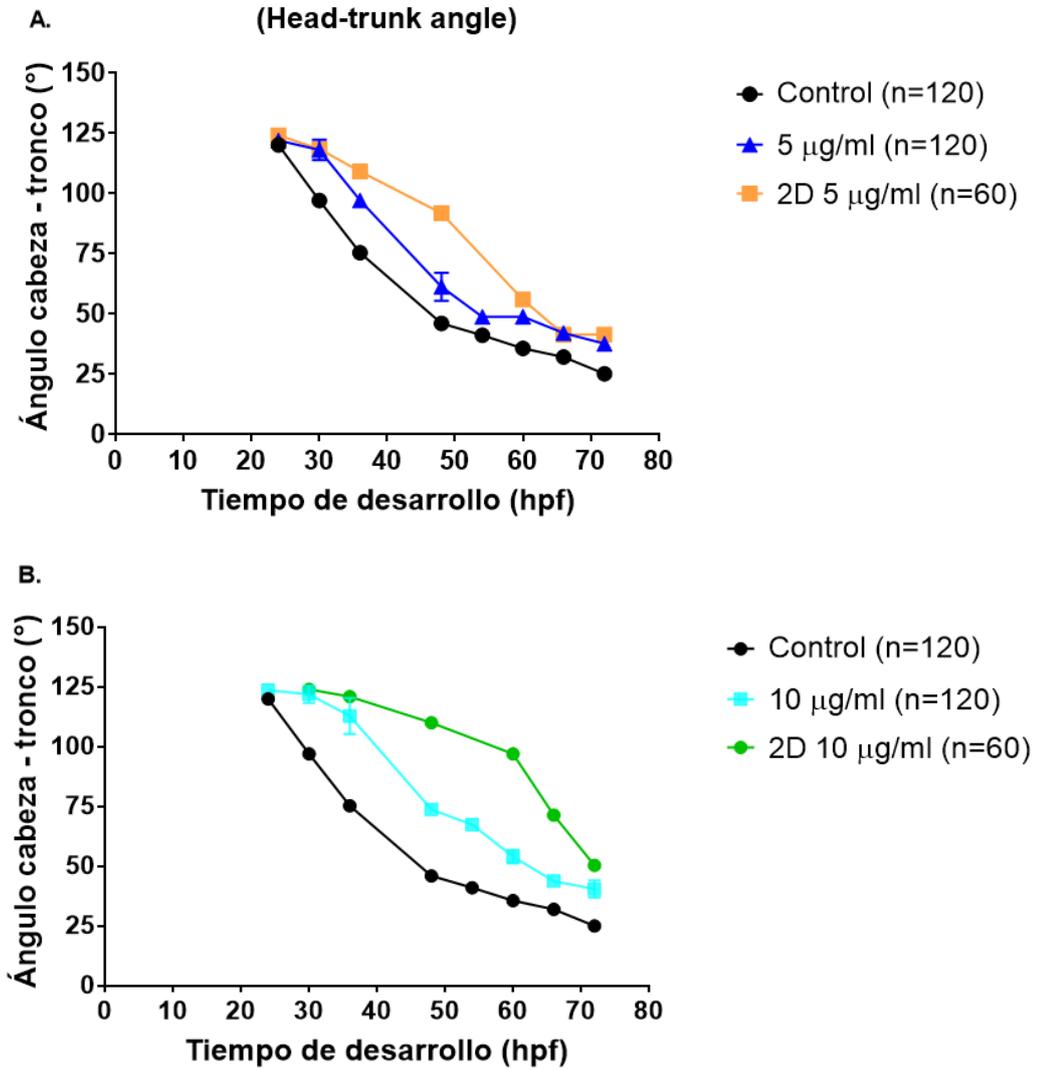


Figura 5.11. Efecto de doble concentración de BioCen 128 sobre ángulo cabeza-tronco del embrión. (A.) Embriones tratados con doble concentración de 5 (2D 5 µg/ml) y (B.) 10 µg/ml de BioCen 128 (2D 10 µg/ml), presentaron un mayor HTA en comparación a los embriones controles y con única administración de BioCen 128, durante los días 1 y 2 de embriogénesis.

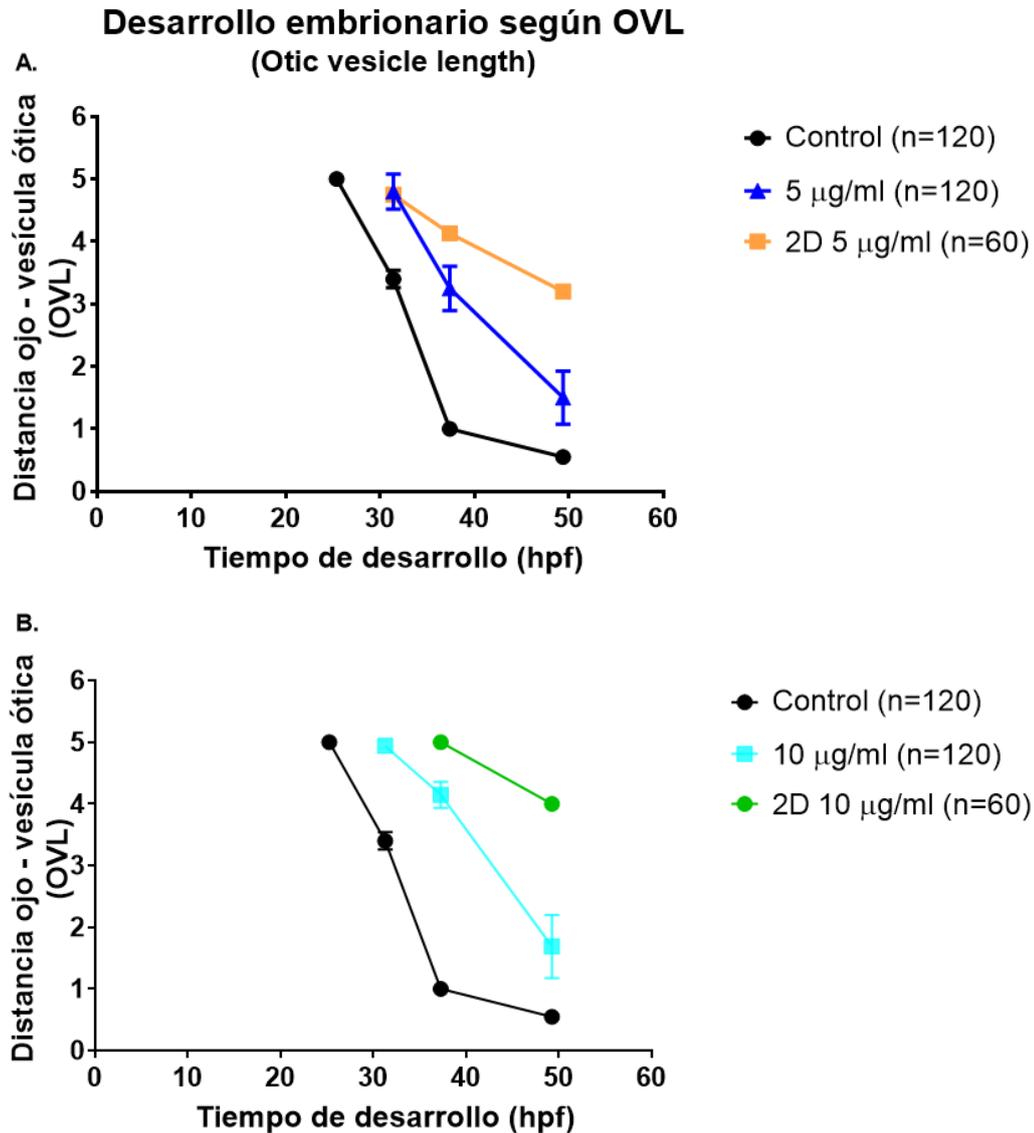
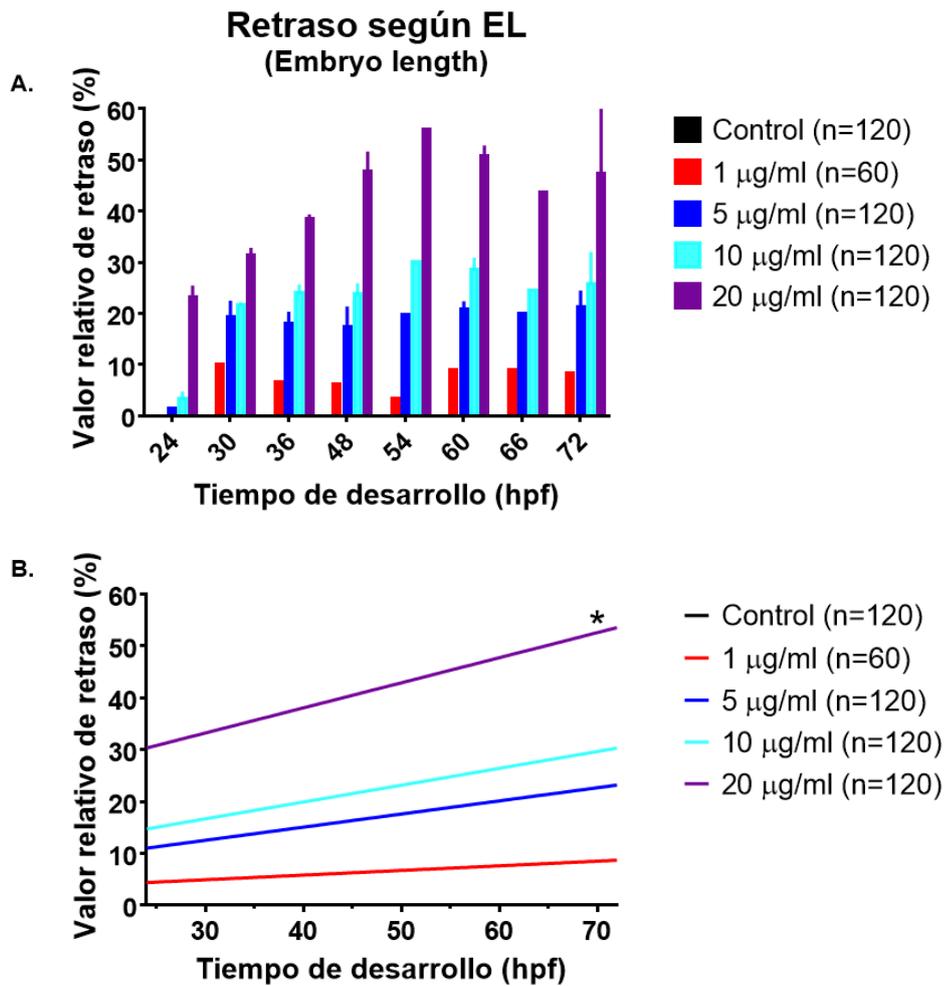


Figura 5.12. Efecto de doble concentración de BioCen 128 sobre distancia ojo-vesícula ótica del embrión. (A.) Embriones tratados con doble concentración de 5 (2D 5 µg/ml) y (B.) 10 µg/ml de BioCen 128 (2D 10 µg/ml), presentaron un mayor OVL en comparación a los embriones controles y con única administración de BioCen 128, durante los días 1 y 2 de embriogénesis.

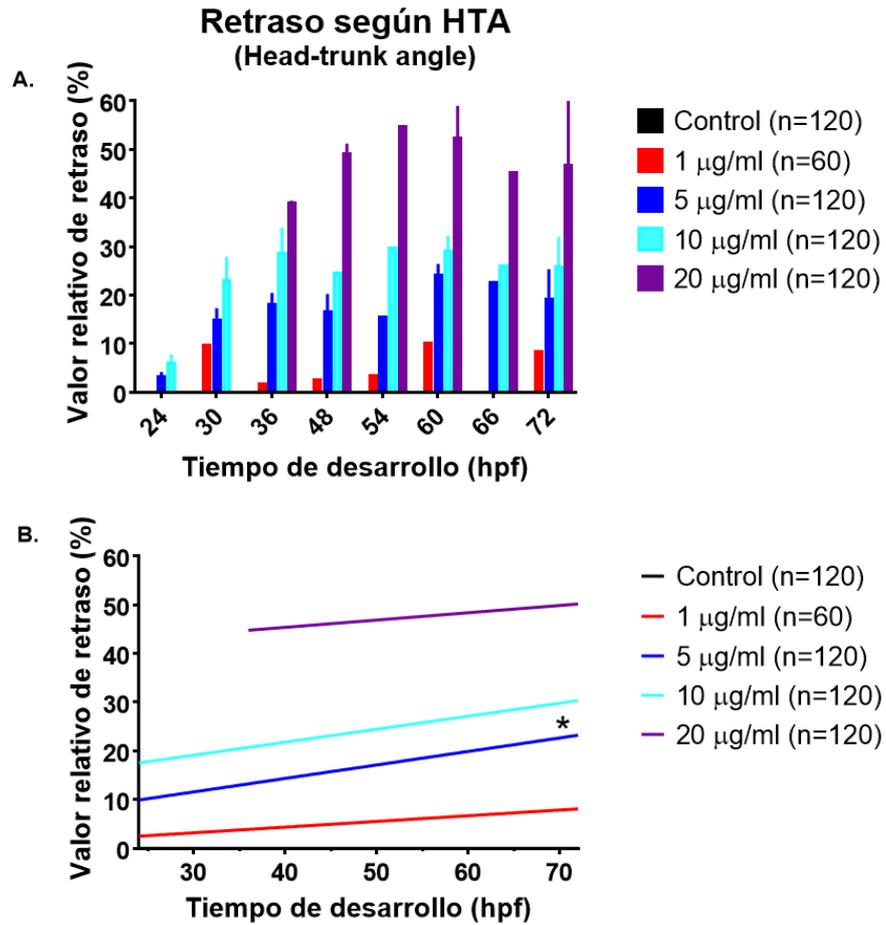
Finalmente, se utilizó los valores calculados de EL, HTA y OVL para obtener un índice cuantitativo general de retraso del desarrollo causado por la toxicidad de BioCen 128 a altas concentraciones. A partir de ellos, se calculó el valor relativo de retraso en porcentaje (*ver Materiales y Métodos*) para todos los tratamientos. En congruencia con lo descrito previamente, se encontró un retraso del desarrollo, según EL, HTA y OVL, en embriones tratados con BioCen 128; y este retraso fue dependiente de la concentración de BioCen 128 (*Fig. 5.13 – 5.15*). Además, se determinó que no existe una relación lineal positiva entre el retraso dentro de cada tratamiento y el tiempo del

desarrollo (*Fig. 5.13 – 5.15*). Asimismo, se halló que el retraso encontrado en el tratamiento con 1 $\mu\text{g/ml}$ fue significativamente menor al retraso encontrado en los tratamientos con 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$), mas no al encontrado con 5 $\mu\text{g/ml}$ ($p > 0.05$); de acuerdo a los parámetros de EL, HTA y OVL (*ver Anexos*); y que los retrasos encontrados en los tratamientos con 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ fueron significativamente menores al retraso encontrado en el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$), de acuerdo a los parámetros de EL y HTA (*ver Anexos*). Sumado a esto, se evidenció que los retrasos de acuerdo al EL, HTA y OVL, no difieren significativamente entre ellos ($p > 0.05$) (*ver Anexos*). Finalmente, se encontró que los retrasos fueron similares ($p > 0.05$) entre embriones de cepas Tab5 y WT^{Kn} (*ver Anexos*). Todo ello se concluye de hacer análisis estadísticos (test de Shapiro-Wilk, prueba de Suma de rangos de Wilcoxon, prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn) (*ver Anexos*). Por lo tanto, se concluye que tanto el parámetro EL, como HTA y OVL, son útiles para evaluar el efecto de retraso causado por BioCen 128.



Group	Equation	R-sq.	P value
Control (n=120)	%R = 0*Hpf + 0	1	-
1 µg/ml (n=60)	%R = 0.08963* Hpf + 2.248	0.2064	0.2582
5 µg/ml (n=120)	%R = 0.2532* Hpf + 4.952	0.4515	0.0680
10 µg/ml (n=120)	%R = 0.3245* Hpf + 6.944	0.4662	0.0620
20 µg/ml (n=120)	%R = 0.4836* Hpf + 18.73	0.6147	0.0213

Figura 5.13. Retraso del desarrollo según EL, en embriones tratados con BioCen 128. (A.) Se calculó el valor relativo de retraso (%) de acuerdo con los valores de EL, para cada tratamiento. Se encontró un mayor porcentaje de retraso a mayor concentración del fármaco. (B.) Además, regresiones lineales evidenciaron que no hay asociación entre el retraso y el tiempo de desarrollo para todos los tratamientos ($p > 0.05$), excepto para el tratamiento de 20 µg/ml (asterisco: $p < 0.05$). Asimismo, se determinó que el retraso en el tratamiento con 1 µg/ml difiere significativamente del retraso en los tratamientos con 10 y 20 µg/ml (*ver Anexos*); y el retraso en los tratamientos con 5 y 10 µg/ml difiere significativamente del retraso en el tratamiento con 20 µg/ml ($p < 0.05$) (*ver Anexos*).



Group	Equation	R-sq.	P value
Control (n=120)	$\%R = 0 * Hpf + 0$	1	-
1 µg/ml (n=60)	$\%R = 0.1168 * Hpf - 0.3161$	0.2351	0.2701
5 µg/ml (n=120)	$\%R = 0.277 * Hpf + 3.265$	0.5708	0.0302
10 µg/ml (n=120)	$\%R = 0.2669 * Hpf + 11.11$	0.3668	0.1115
20 µg/ml (n=120)	$\%R = 0.1494 * Hpf + 39.4$	0.1221	0.4972

Figura 5.14. Retraso del desarrollo, según HTA, en embriones tratados con BioCen 128. (A.) Se calculó el valor relativo de retraso (%) de acuerdo con los valores de HTA, para cada tratamiento. Se encontró un mayor porcentaje de retraso a mayor concentración del fármaco. (B.) Además, regresiones lineales evidenciaron que no hay una asociación entre el retraso y la edad de los embriones para todos los tratamientos ($p > 0.05$), excepto para el tratamiento con 5 µg/ml (asterisco: $p < 0.05$). Asimismo, se determinó que el retraso en el tratamiento con 1 µg/ml difiere significativamente del retraso en los tratamientos con 10 y 20 µg/ml (*ver Anexos*); y el retraso en los tratamientos con 5 y 10 µg/ml difieren significativamente del retraso en el tratamiento con 20 µg/ml ($p < 0.05$) (*ver Anexos*).

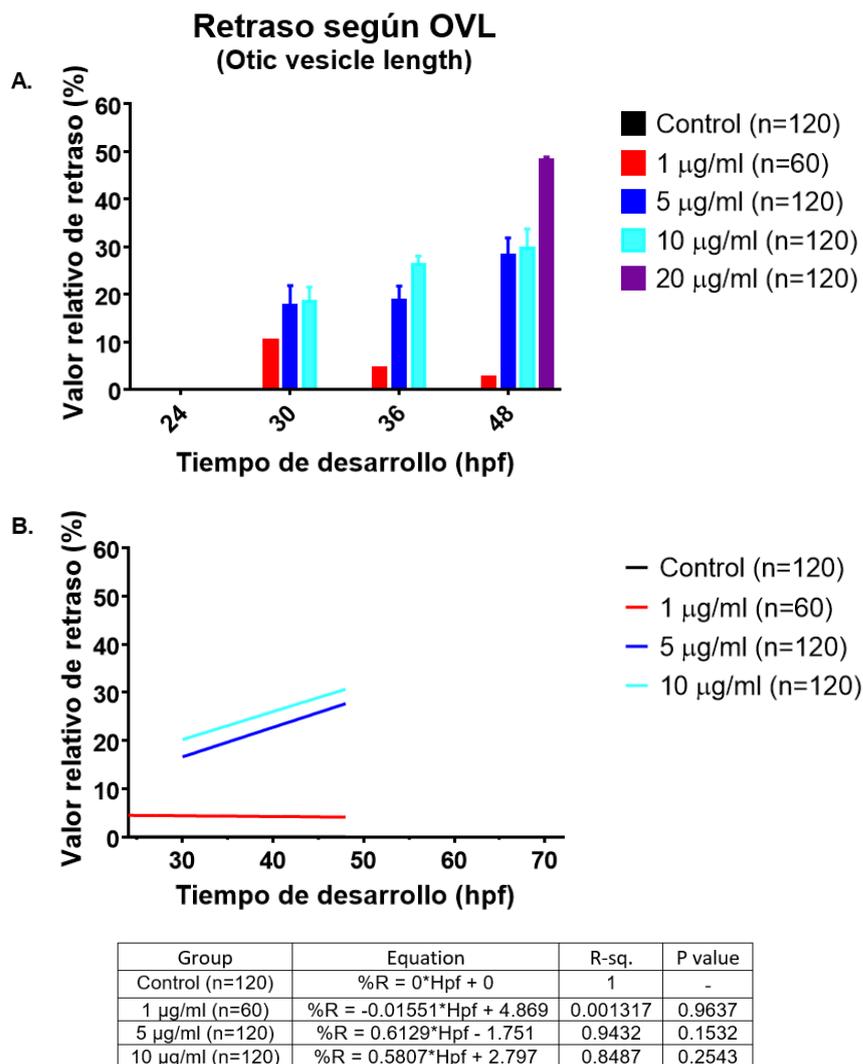
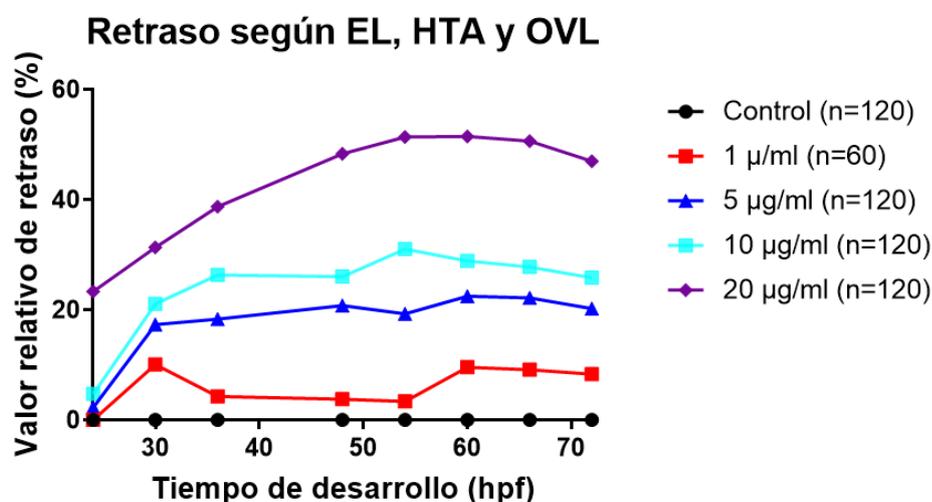


Figura 5.15. Retraso del desarrollo, según OVL, en embriones tratados con BioCen 128. (A.) Se calculó el valor relativo de retraso (%) de acuerdo con los valores de OVL, para cada tratamiento. Se encontró un mayor porcentaje de retraso a mayor concentración del fármaco. (B.) Además, regresiones lineales evidenciaron que no hay una asociación entre el retraso y la edad de los embriones para todos los tratamientos ($p > 0.05$). Asimismo, se determinó que el retraso en el tratamiento con 1 µg/ml difiere significativamente del retraso en los tratamientos con 10 y 20 µg/ml ($p < 0.05$) (*ver Anexos*).

Adicionalmente, hemos diseñado un índice integrado para medir el retraso del desarrollo, basado en estos 3 parámetros (EL, HTA y OVL). Para ello, primero se halló el promedio del retraso obtenido según los indicadores EL, HTA y OVL (*Fig. 5.16 A*). Después, se utilizó esta base de datos para hacer un análisis de regresión en el software Geogebra 5.0. Hicimos las pruebas de modelamiento matemático correspondientes (data no mostrada), y se determinó que el mejor modelo para medir el retraso del desarrollo, por cada tratamiento (1, 5, 10 y 20 µg/ml de BioCen 128), fue el modelo de regresión polinomial de grado 7, como se puede apreciar en las figuras correspondientes (*ver Anexos y Fig. 5.16 B.*); esto ya que nos dio un coeficiente de correlación (R^2) igual a 1.

De manera particular, en el tratamiento con 20 µg/ml de BioCen 128 se encontró un modelo adicional que dio un coeficiente de correlación igual a 1; es el caso del modelo de regresión sinusoidal. Por lo que también lo proponemos como alternativa al modelo de regresión polinomial grado 7 mencionado anteriormente. Por lo tanto, mediante el uso de las ecuaciones diseñadas (**Fig. 5.16 B.**), se puede estimar el retraso del desarrollo (variable “Y”: porcentaje de retraso dado en decimales) según la concentración, para un tiempo del desarrollo específico (variable “X”: tiempo del desarrollo dado en días).

A.



B.

Tratamiento	Modelo	Ecuación	Coef. de correlación (R ²)
1 µg/ml	Regresión polinomial de grado 7	$Y(x) = 1.96x^7 - 27.58x^6 + 163.62x^5 - 528.52x^4 + 1003.25x^3 - 1118.22x^2 + 677x - 171.51$	1
5 µg/ml	Regresión polinomial de grado 7	$Y(x) = 1.34x^7 - 18.99x^6 + 113.05x^5 - 366.39x^4 + 697.51x^3 - 779.61x^2 + 473.72x - 120.6$	1
10 µg/ml	Regresión polinomial de grado 7	$Y(x) = -1.63x^7 + 23.02x^6 - 135.97x^5 + 435.4x^4 - 814.62x^3 + 888.47x^2 - 521.68x + 127.06$	1
20 µg/ml	Regresión polinomial de grado 7	$Y(x) = -0.34x^7 + 4.77x^6 - 28.05x^5 + 89.69x^4 - 168.15x^3 + 184.5x^2 - 109.23x + 27.04$	1
20 µg/ml	Regresión sinusoidal	$Y(x) = 0.12 + 0.4 \text{ sen } (0.88x - 0.58)$	1

Figura 5.16. Diseño de ecuaciones para medir el retraso del desarrollo basado en los parámetros EL, HTA y OVL. (A.) Se promedió el valor relativo de retraso (%) según los valores de EL, HTA y OVL, para cada tratamiento; y se representó en una gráfica. (B.) Se utilizó el software Geogebra 5.0 para determinar el modelo matemático que mejor represente el comportamiento de los datos (previamente se adaptaron los datos obtenidos en A.: variable X pasó de hpf a dpf, y variable Y de porcentaje a decimales; esto debido a que pruebas previas mostraron coeficientes con valores muy altos). Se observó una correlación perfecta ($R^2=1$) con los modelos de regresión polinomial de grado 7 y regresión sinusoidal, para todos los tratamientos y tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (*ver Anexos*).

5.2 Análisis morfológicos y celulares

Después de cuantificar el efecto de retraso causado por BioCen 128, nos propusimos evaluar los posibles efectos del fármaco sobre el desarrollo neuronal, a nivel celular. Para ello, se recurrió a tinciones (whole-mount immunostainings) con tres anticuerpos primarios y una línea GFP reportera de peces cebra transgénicos, que permitieron analizar estructuras neuronales representativas mediante microscopía de fluorescencia y confocal (*ver Materiales y métodos*). Para este tipo de análisis, con el fin de descartar la posibilidad de que los efectos observados sean una consecuencia inespecífica de la toxicidad del fármaco a concentraciones altas, y no un efecto generado por él mismo; se utilizaron concentraciones bajas (<10 $\mu\text{g/ml}$). Por tanto, se escogió los tratamientos: control, 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128.

5.2.1 Análisis utilizando anticuerpo SV2

Inicialmente, se evaluó la integridad sináptica en el sistema nervioso utilizando un anticuerpo contra la proteína de la vesícula sináptica 2 (SV2, por sus siglas en inglés), bajo la premisa de que BioCen 128 podría estar involucrado en procesos de comunicación neuronal. Esta proteína es expresada en los terminales nerviosos presinápticos de casi todas las neuronas, específicamente en las membranas de las vesículas presinápticas, así como en la mayoría de los gránulos secretores endocrinos (37) (*ver Materiales y Métodos*). Por lo tanto, SV2 también permite un análisis detallado de la neuroanatomía del embrión de pez cebra. Debido a que SV2 también marca el neuroepitelio (piel) (Ono, F. et al., 2004) y se observó que no había una alteración del mismo en los embriones tratados con BioCen 128 (data no mostrada), se excluyó esta área en las imágenes tridimensionales (3D) obtenidas por microscopía confocal (*ver Materiales y Métodos*). Ello permitió distinguir con más nitidez estructuras internas como el neuropilo del encéfalo y médula espinal (*Fig. 5.16*).

A las 24 hpf, reconstrucciones 3D del tronco de embriones teñidos, en vista lateral, revelaron efectos sobre la morfología de los axones de las neuronas motoras primarias caudales de la médula espinal (CaP, por sus siglas en inglés), en embriones tratados con 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 (*Fig. 5.16 G, K*). Los axones de estas neuronas (CaP) normalmente navegan en dirección dorso ventral, y en la zona ventral giran dorsal y lateralmente (*Fig. 5.16 J*). En embriones tratados con 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$, se encontró que los axones CaP presentaban una navegación desorganizada, como se muestra en la figura correspondiente (*Fig. 5.16 G, K*). Además, imágenes 3D de la cabeza en vista lateral evidenciaron un efecto en el desarrollo de la epífisis, ya que se observó un menor tamaño de esta en embriones tratados con 1 $\mu\text{g/ml}$, y su casi ausencia en embriones tratados con 5 $\mu\text{g/ml}$ (*Fig. 5.16 F, J*). También, se encontró un ligero menor tamaño de los fascículos axonales que atraviesan el ojo (*Fig. 5.16 F, J*). Por otro lado, imágenes 3D de la cabeza en vista dorsal revelaron una reducción notable en el tamaño de estructuras fluorescentes como la comisura anterior, tracto de la comisura postóptica y fascículo longitudinal medial (*Fig. 5.16 A, E, I*). En suma, estos resultados sugieren efectos diversos y variados de BioCen 128 sobre el desarrollo neuronal. Por un lado, un efecto modulador sobre la función motora; por otro lado, una influencia sobre el ritmo circadiano; así también, un efecto sobre la morfología del ojo y sobre la diferenciación neuronal en el prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo. Cabe mencionar que la reducción del tamaño de estructuras positivas para tractos axonales del prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo, abre la posibilidad de un efecto modulador de BioCen 128 sobre el desarrollo de estas, ya sea por una disminución de la actividad presináptica, posiblemente a causa de alguna alteración en la distribución o concentración de SV2; y/o una menor cantidad de neuronas, posiblemente debido a una deficiencia en la diferenciación neuronal o la muerte de algunas de ellas.

SV2 (24 hpf WT^{Kn})

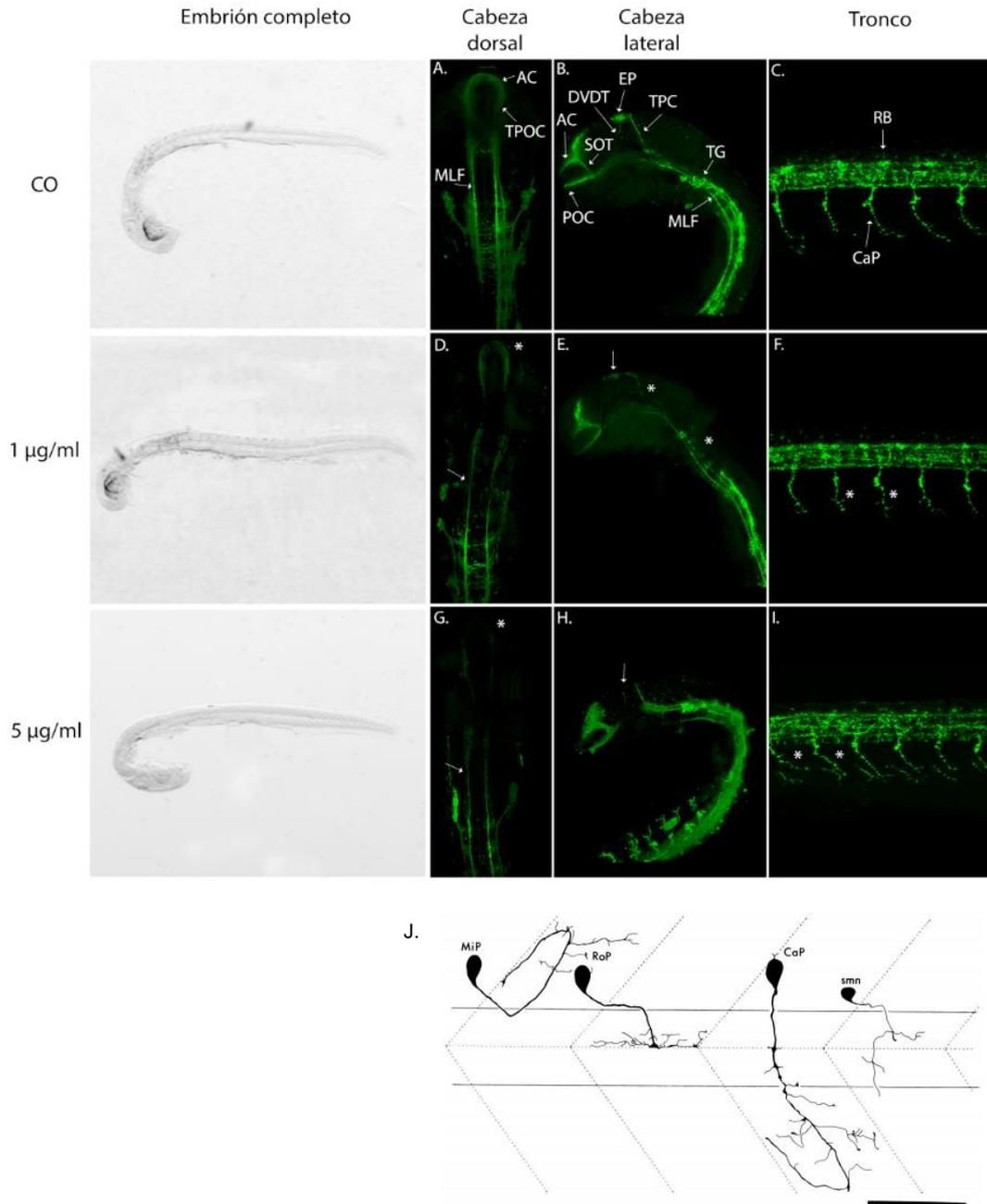


Figura 5.16. Efecto de BioCen 128 sobre la actividad sináptica en embriones de 24 hpf. Se muestran reconstrucciones 3D de cabeza (10X) y tronco (20X), de embriones WT^{Kn} tratados con BioCen 128 durante estadio de blástula temprana (2.5 hpf). Anticuerpo primario: SV2. Anticuerpo secundario: Alexa 488 (verde). Se evaluaron 10 embriones por tratamiento (n=10). Abreviaturas: AC, comisura anterior; TPOC, tracto de la comisura post óptica; MLF, fascículo longitudinal medial; EP, epífisis; POC, comisura post óptica; SOT, tracto supraóptico; DVDT, tracto del diencefalo dorsoventral; TPC, tracto de la comisura posterior; TG, ganglio trigémino; CaP, neuronas motoras primarias caudales de la médula espinal; RB, neuronas sensoriales Rohon-Beard. **(A, D, G)** Se observó menor tamaño del neuropilo en la AC, TPOC y MLF, en tratamientos con 1 y 5 µg/ml de BioCen 128. **(B, E, H)** Se evidenció menor tamaño de la EP en embriones tratados con BioCen 128, siendo casi ausente en tratamiento con 5 µg/ml. Además, se observó menor tamaño de fascículos axonales que atraviesan el ojo. **(C, F, I)** Se observó una morfología desorganizada de los axones CaP en embriones tratados con 1 y 5 µg/ml de BioCen 128 (asteriscos). **(J)** Imagen referencial de neuronas motoras: (48), escala 50 µm.

A las 48 hpf, de manera notable, se revirtió la alteración en la navegación de axones CaP, en embriones tratados con 1 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 (*Fig. 5.17 C, G*); de manera que no se observaban diferencias entre los controles y los tratados con el fármaco. Similar a lo observado a las 24 hpf, se encontró una clara reducción del tamaño de estructuras fluorescentes como la epífisis y la comisura anterior en embriones tratados con 5 $\mu\text{g/ml}$ (*Fig. 5.17 A, I*), así como una ligera reducción de estas estructuras en embriones tratados con 1 $\mu\text{g/ml}$ (*Fig. 5.17 A, E*). Sumado a ello, se detectó por primera vez una reducción del tamaño de estructuras fluorescentes para el tracto de la comisura posterior y la retina en embriones tratados con 5 $\mu\text{g/ml}$ (*Fig. 5.17 I, J*). En su conjunto, estos resultados podrían indicar que BioCen 128 fue metabolizado y perdió efecto, o que los embriones se recuperaron mediante mecanismos de autorregulación. Sin embargo, es más probable que se deba a un efecto de recuperación parcial del embrión y no a la degradación de la droga, ya que continuamos observando un efecto sobre la morfología axonal de las neuronas CaP (*Fig. 5.17 C, K*), así como el efecto sobre la comisura anterior y la epífisis, visto anteriormente. Por otro lado, se sugiere un efecto de BioCen 128 sobre la recepción de señales de luz a través de la retina.

SV2 (48 hpf, WT^{Kn})

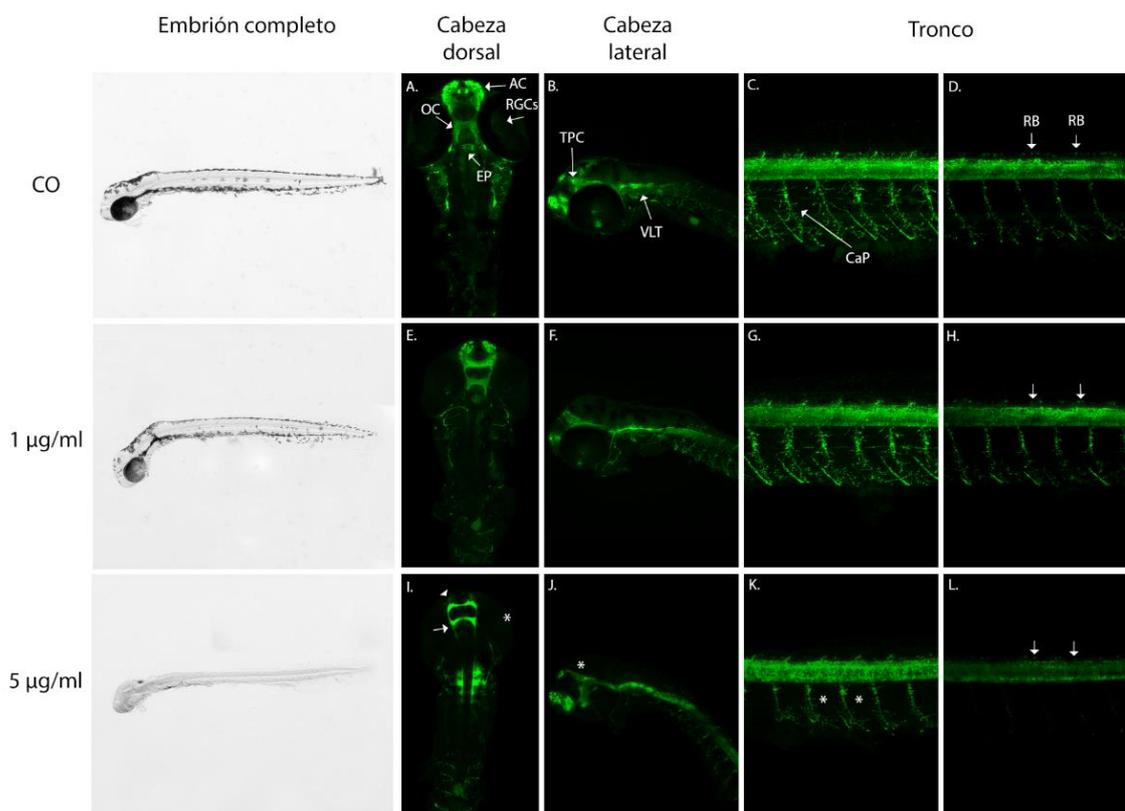


Figura 5.17. Efecto de BioCen 128 sobre la actividad sináptica en embriones de 48 hpf. Se muestran imágenes 3D de cabeza (10X) y tronco (20X), de embriones WT^{Kn} tratados con BioCen 128 durante estadio de blástula temprana. Anticuerpo primario: SV2. Anticuerpo secundario: Alexa 488 (verde). Se evaluaron 10 embriones por tratamiento (n=10). Abreviaturas: AC, comisura anterior; OC, quiasma óptico; RGCs, células ganglionares de la retina; EP, epífisis; TPC, tracto de la comisura posterior; VLT, tracto longitudinal ventral; CaP, neuronas motoras primarias caudales de la médula espinal; RB, neuronas sensoriales Rohon-Beard. (A, B, I, J) Se evidenció una ausencia de estructuras positivas para SV2 en la retina de embriones tratados con 5 µg/ml de BioCen 128 (asterisco). Además, se encontró un menor tamaño de tractos axonales del prosencéfalo y mesencéfalo en embriones tratados con 5 µg/ml de BioCen 128. (C, G, K) Se observó una menor longitud y arborización de los axones CaP en embriones tratados con 5 µg/ml de BioCen 128 (asteriscos), con respecto a embriones controles. Resulta interesante que, se observó una recuperación de la dirección de las proyecciones de los axones CaP, en embriones tratados con BioCen 128.

Para seguir analizando el efecto de BioCen 128 sobre el desarrollo del neuropilo del prosencéfalo (FB, forebrain, por sus siglas en inglés), mesencéfalo (MB, midbrain, por sus siglas en inglés) y romboencéfalo (HB, hindbrain, por sus siglas en inglés), se hicieron reconstrucciones 3D a estas estructuras a las 48 hpf, utilizando un objetivo de 20X (Fig. 5.18). Se evidenció una reducción notable en el tamaño de la comisura anterior y tracto supraóptico en embriones tratados con 1 y 5 µg/ml de BioCen 128, con respecto a embriones controles (Fig. 5.18 A, C, E). Además, se encontró una reducción significativa del tamaño del tracto longitudinal ventral en embriones tratados con 5 µg/ml de BioCen 128 (Fig. 5.18 B, D, F).

SV2 (48 hpf, WT^{Kn})

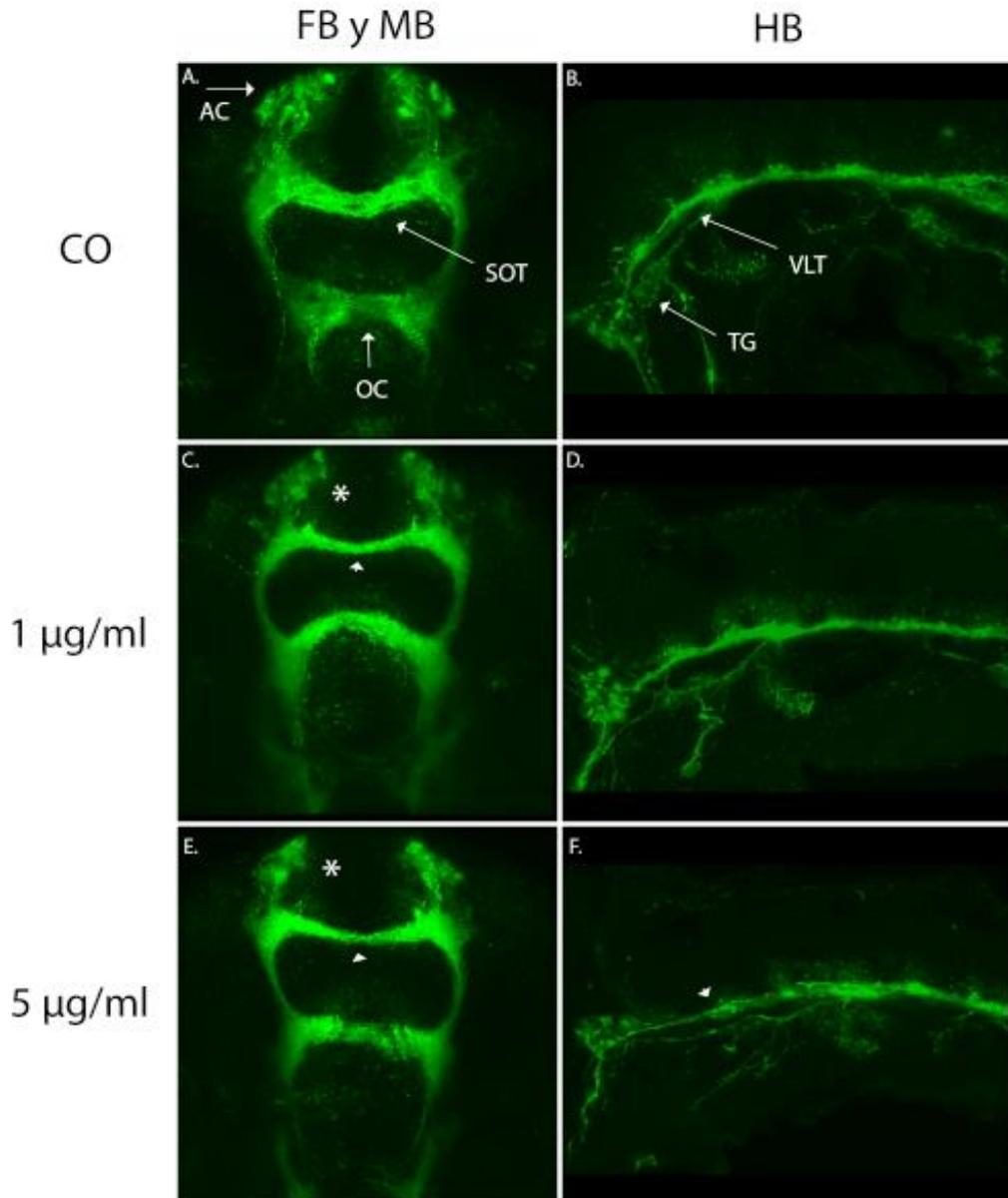


Figura 5.18. Efecto de BioCen 128 en la actividad sináptica del prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo. Se muestra reconstrucciones 3D (20X) de cabeza en vista dorsal (FB o prosencéfalo; MB o mesencéfalo) y lateral (HB o romboencéfalo). Embriones WT^{Kn} tratados con BioCen 128 a las 2.5 hpf, fueron fijados a las 48 hpf, y montados en láminas para análisis confocal (n=6 embriones por tratamiento). Anticuerpo primario: SV2. Anticuerpo secundario: Alexa 488 (verde). (**A, C, E**) En vista dorsal; abreviaturas: AC, comisura anterior; SOT, tracto supraótico; OC, quiasma óptico. Se encontró una reducción significativa en el tamaño de estructuras fluorescentes para la AC (asterisco) y SOT (cabeza de flecha) en embriones tratados con 1 y 5 µg/ml de BioCen 128. (**B, D, F**) En vista lateral; abreviaturas: TG, ganglio trigémino; VLT, tracto longitudinal ventral. Se observó una clara reducción en el tamaño del VLT (cabeza de flecha) en embriones tratados con 5 µg/ml de BioCen 128.

Con la finalidad de corroborar el efecto encontrado en el desarrollo de la epífisis (**Fig. 5.16 B, E, H**), se evaluó su morfología utilizando un objetivo de 20X. Como se puede

apreciar en los controles (*Fig. 5.19 A, B*) la epífisis es una estructura pequeña ubicada dorsalmente al ojo, en el epitálamo, que cumple un rol importante en la detección de luz y regulación del ritmo circadiano. De manera notable, se encontró un menor tamaño de estructuras fluorescentes para la epífisis en embriones tratados con 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$, con respecto a los controles, tanto a las 24 como a las 48 hpf (*Fig. 5.19 C-F*). Notablemente, se observó una morfología desorganizada de la epífisis en embriones tratados con 5 $\mu\text{g/ml}$ (*Fig. 5.19 F*), mas no en embriones tratados con 1 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados sugieren que BioCen 128 podría afectar el control nervioso de la detección de luz del ritmo circadiano. Además, se sugiere que el efecto de BioCen 128 sobre la retina (*Fig. 5.17*) podría compartir un mecanismo molecular en común con el efecto visto en la epífisis; esto ya que ambas estructuras comparten vías moleculares bajo el control del ritmo circadiano (Ben-Moshe Z. et al., 2014).

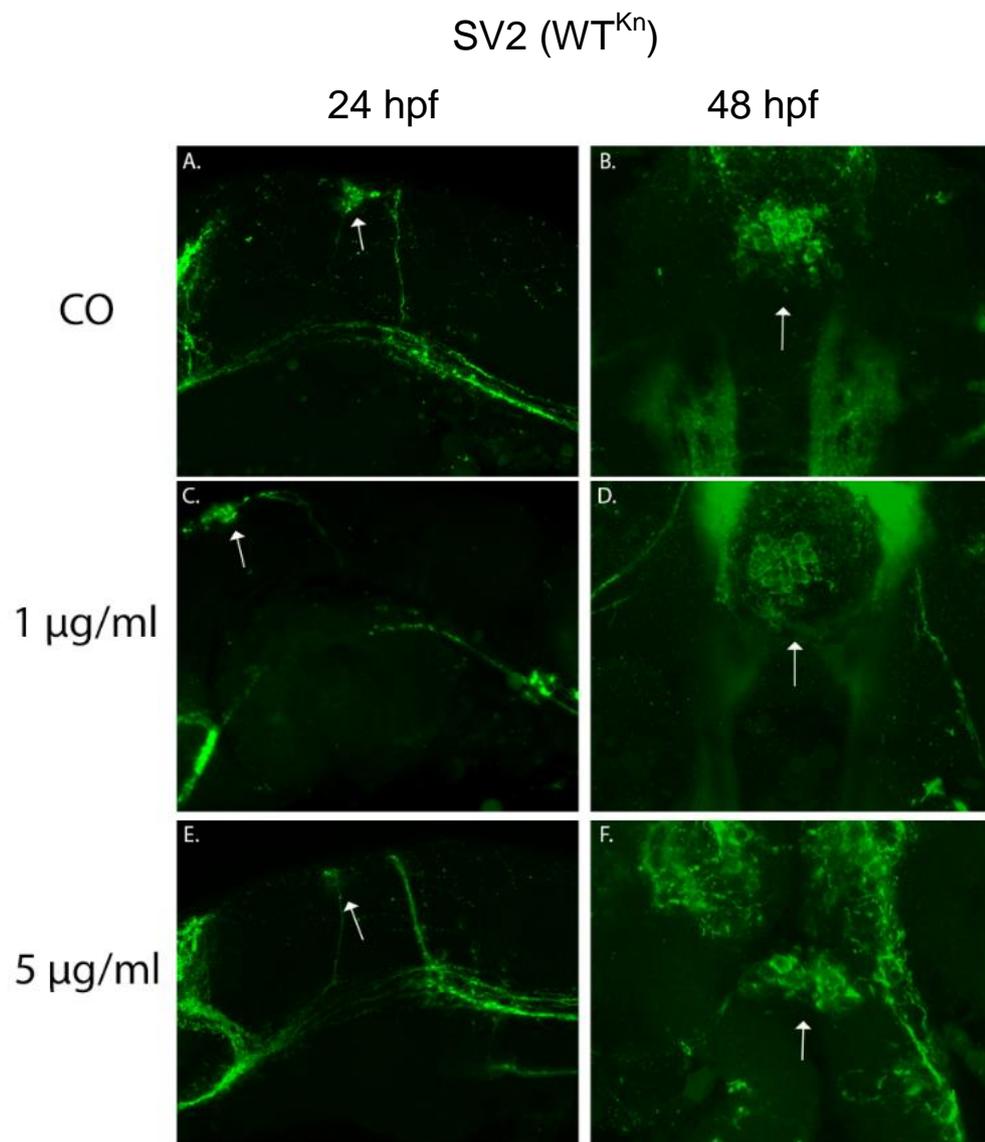


Figura 5.19. BioCen 128 induce una desorganización de la morfología de la epífisis. Embriones WT^{Kn} fueron tratados con BioCen 128 a las 2.5 hpf, posteriormente se fijaron a las 24 y 48 hpf, y se montaron en láminas para análisis confocal (n=6 embriones por tratamiento). Se hicieron reconstrucciones 3D (20X) del mesencéfalo. Anticuerpo primario: SV2. Anticuerpo secundario: Alexa 488 (verde). (A, C, E) En vista lateral; flechas señalan la epífisis. (B, D, F) En vista dorsal; flechas señalan la epífisis. Se encontró una reducción notable, concentración dependiente, del tamaño de la epífisis en embriones tratados con 1 y 5 µg/ml tanto a las 24 como 48 hpf; y una morfología desorganizada de la misma en embriones de 48 hpf tratados con 5 µg/ml de BioCen 128.

5.2.2 Análisis utilizando anticuerpo ZN8

Posteriormente, se utilizó un anticuerpo contra la proteína de membrana neurolina (ZN8). Neurolina es una proteína de adhesión celular que se expresa en células musculares, corazón y varios tipos de neuronas; y cumple un rol importante en el crecimiento y navegación axonal. Por ello, ZN8 marca estructuras como las neuronas motoras secundarias de la médula espinal (SMNs), las células ganglionares de la retina, la comisura del romboencéfalo, las neuronas sensoriales RB, la membrana plasmática del cerebro, y células no neuronales como las células cardíacas, los arcos faríngeos, entre otros (49) (*ver Materiales y Métodos*). Para estos experimentos, con la finalidad de obtener una visualización más completa y fina de las estructuras neuronales; y evaluar la morfología de las SMNs, bajo la premisa de que BioCen 128 podría causar un efecto en ellas, similar al encontrado en las neuronas motoras primarias de la médula espinal (PMNs) (*Fig. 5.16 y 5.17*), se utilizó embriones teñidos con el anticuerpo ZN8.

A las 24 hpf, se observó un menor tamaño de los tractos axonales de la comisura del romboencéfalo en embriones tratados con BioCen 128 (*Fig. 5.20 D, F*). Además, al igual que en embriones teñidos con SV2, no se encontró diferencias en la intensidad de la señal en las neuronas sensoriales RB (*Fig. 5.20 D, H, L*). Fue interesante que, se evidenció una menor intensidad de señal fluorescente en el “floor plate” de embriones tratados con 5 µg/ml de BioCen 128, con respecto a los controles (*Fig. 5.20 D, H, L*). Cabe mencionar que el “floor plate”, son células alineadas a lo largo del eje anterior-posterior, ubicadas ventralmente al tubo neural, que cumplen un importante rol de señalización en el patrón y guía de los axones ventrales del sistema nervioso (50). Por tanto, nuestros experimentos sugieren que el efecto de BioCen 128 sobre la navegación de los axones CaP (*Fig. 5.16 F, I*), podría involucrar una reducción de la expresión de neurolina en el floorplate. Sumado a esto, no se evidenció efectos del fármaco sobre las células cardíacas y arcos faríngeos (data no mostrada), por lo que fueron excluidos de las reconstrucciones 3D.

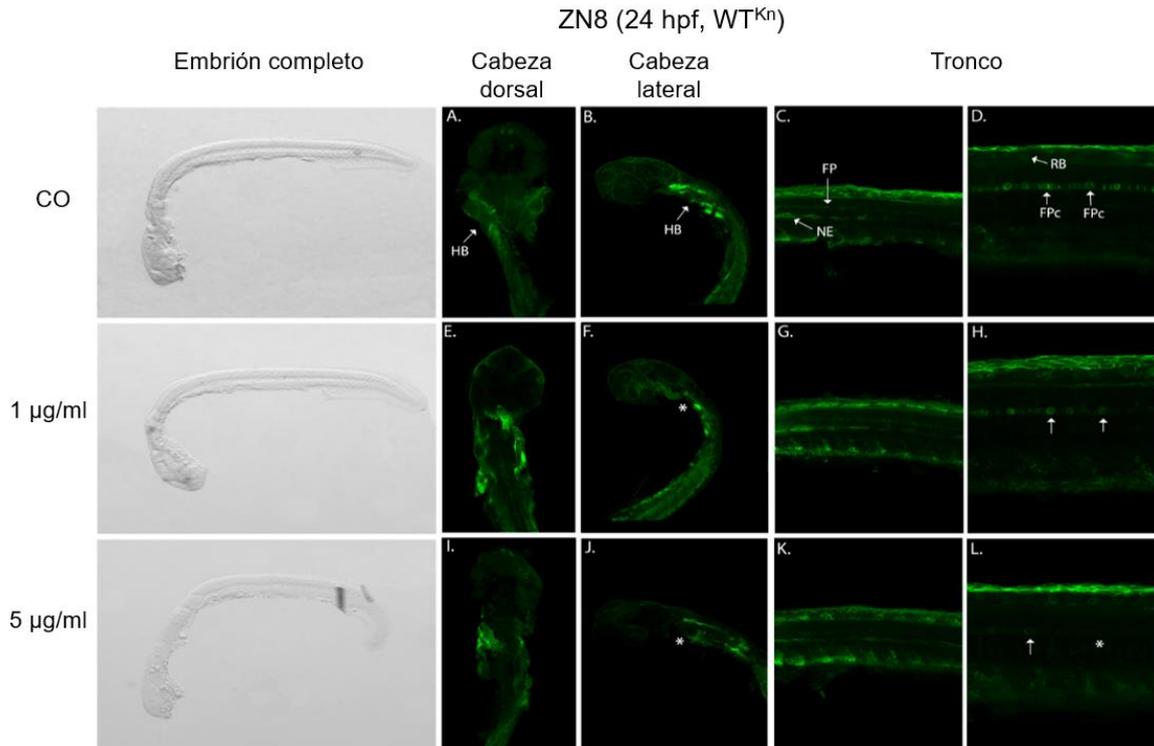


Figura 5.20. Efecto de BioCen 128 sobre expresión de neuropilina en embriones de 24 hpf. Se muestran reconstrucciones 3D de cabeza (10X) y tronco (20X), de embriones WT^{Kn} tratados con BioCen 128 a las 2.5 hpf. Los embriones fueron fijados a las 24 hpf y montados para análisis confocal (n=10 embriones por tratamiento). Anticuerpo primario: ZN8. Anticuerpo secundario: Alexa 488 (verde). Abreviaturas: HB, romboencéfalo; NE, neuroepitelio; FP, “floor plate” o placa de piso; FPc, células del “floor plate”; RB, neuronas sensoriales Rohon-Beard. (B, F, J). Se observó un menor tamaño de la comisura del HB en embriones tratados con BioCen 128. (D, L) Se evidenció una menor intensidad de señal para el FP en embriones tratados con 5 µg/ml de BioCen 128.

A las 48 hpf, se comparó la morfología de las SMNs y se encontró una ausencia de las primeras proyecciones axonales (caudales y rostrales), así como una menor fasciculación axonal en embriones tratados con 5 µg/ml de BioCen 128 (**Fig. 5.21 I**) con respecto a los controles. Además, se observó una reducción en el tamaño de estructuras fluorescentes para las células ganglionares de la retina (RGCs) en embriones tratados con 5 µg/ml de BioCen 128 (**Fig. 5.21 H**). Cabe mencionar, que las RGCs son las primeras neuronas que se diferencian durante la morfogénesis del ojo, aprox. a partir de las 30 hpf, y cumplen un rol fundamental en la recepción de señales visuales de luz. En suma, estos resultados sugieren por un lado que BioCen 128 podría modular la diferenciación y navegación axonal no solo de las PMNs, sino también de las SMNs; y, por otra parte, BioCen 128 podría tener un efecto en la diferenciación de las RGCs durante el desarrollo embrionario. Es importante mencionar que el efecto visto en las

RGCs y la epífisis (**Figura 5.19**) corroboran una influencia de BioCen 128 sobre el ritmo circadiano del embrión de pez cebra.

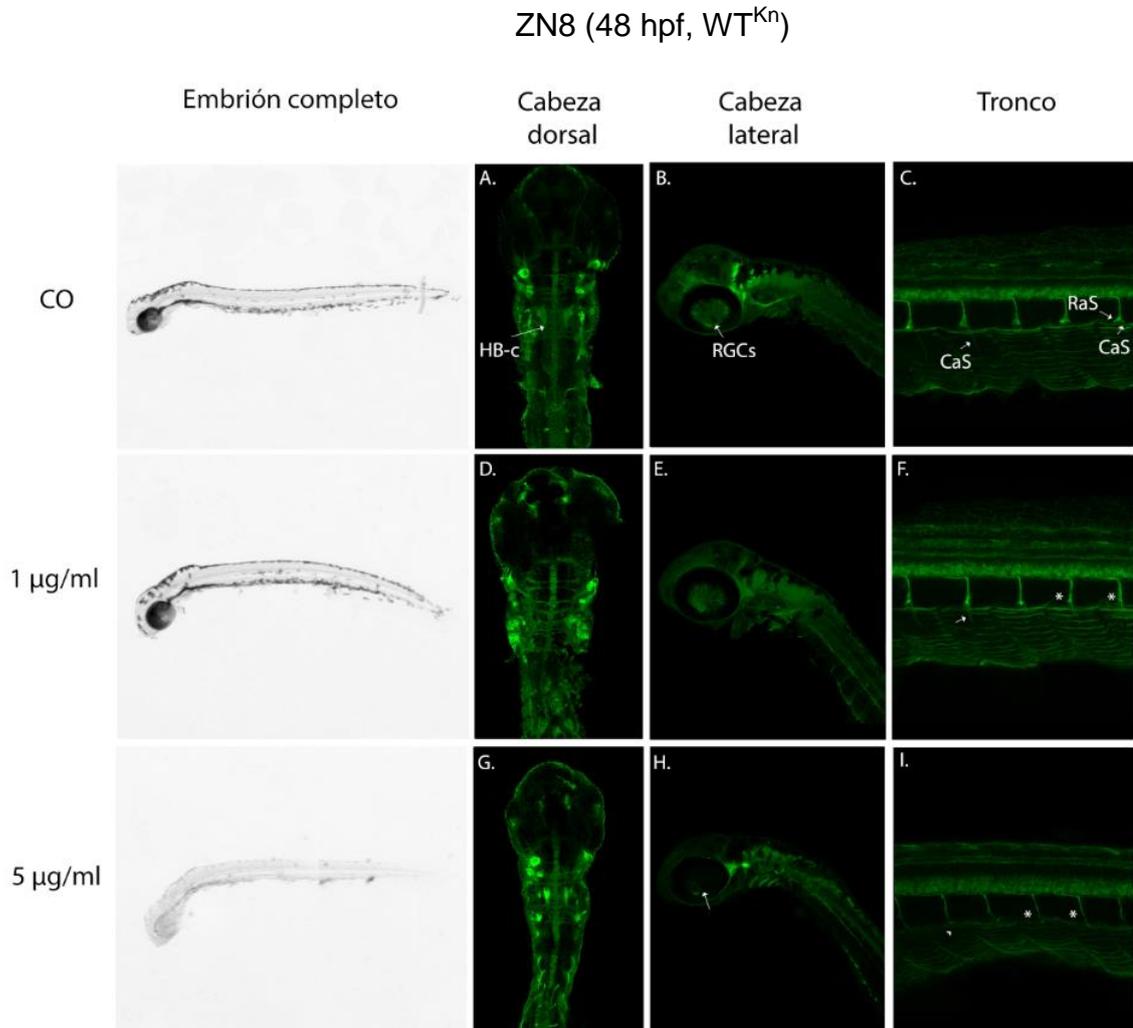


Figura 5.21. Efecto de BioCen 128 sobre expresión de neurolina en embriones de 48 hpf. Se muestran reconstrucciones 3D de cabeza (10X) y tronco (20X), de embriones WT^{Kn} tratados con BioCen 128 a las 2.5 hpf. Los embriones fueron fijados a las 48 hpf y montados para análisis confocal (n=10 embriones por tratamiento). Anticuerpo primario: ZN8. Anticuerpo secundario: Alexa 488 (verde). Abreviaturas: HB-c, comisura del romboencéfalo; RGCs, células ganglionares de la retina; CaS, axones de las neuronas motoras secundarias caudales de la médula espinal; RaS, axones de las neuronas motoras secundarias rostrales de la médula espinal. (**B, H**) Se observó un menor tamaño de estructuras positivas para las RGCs en embriones tratados con 5 µg/ml de BioCen 128 (flecha), con respecto a embriones controles. (**C, I**) Se evidenció una menor fasciculación axonal en las SMNs, y una ausencia de proyecciones axonales rostrales y caudales en las mismas (cabeza de flecha y asteriscos)

5.2.3 Análisis de tractos axonales en la línea Hb9::GFP

El siguiente objetivo fue validar el efecto de BioCen 128 en las PMNs (**Fig. 5.16 y 5.17**). Para ello, se utilizó la línea transgénica Hb9::GFP y el anticuerpo contra tubulina acetilada; los cuales muestran el patrón de crecimiento axonal de las PMNs. En el caso

de la línea Hb9::GFP, el factor de transcripción Hb9 se expresa en las PMNs a nivel citosólico, y por tanto marca verde fluorescente estas estructuras (*ver Materiales y Métodos*). Por su parte, la tubulina acetilada es una de las proteínas que conforman los microtúbulos, por lo que cumple un rol importante en el movimiento celular mediado por microtúbulos; entre ellos la migración axonal (51), (*ver Materiales y Métodos*). Por lo tanto, en nuestros experimentos el anticuerpo contra tubulina acetilada marca los neurofilamentos en rojo fluorescente. Cabe destacar que similar a SV2, tubulina acetilada también marca el neuropilo del encéfalo y la médula espinal, por lo que nos permitió corroborar los efectos encontrados con SV2.

A las 24 hpf, en congruencia con lo encontrado en las tinciones con SV2, se observó una reducción en el tamaño del neuropilo de la comisura anterior y tracto supraóptico, pero también en el quiasma óptico, en embriones tratados con 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 (*Fig. 5.22 A, C, E*). Además, se confirmó que las neuronas motoras CaP presentan un desorganizado crecimiento y navegación axonal en embriones transgénicos Hb9::GFP teñidos con tubulina acetilada, expuestos a 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 a las 2.5 hpf (*Fig. 5.23 A, B, C*); por lo que se corroboró este efecto visto en la sección 5.2.1.

A las 48 hpf, similar al efecto observado en las tinciones con SV2, se evidenció un menor tamaño de tractos axonales del romboencéfalo, mesencéfalo y prosencéfalo en embriones tratados con 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$, con respecto a los controles (*Fig. 5.22 H, J, L*). Además, continuamos observando una desorganizada navegación de los axones CaP y una menor fasciculación axonal en embriones tratados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128 (*Fig. 5.23 D, F*). Sorprendentemente, en los embriones Hb9::GFP tratados con 1 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128, la navegación de los axones CaP tomó una dirección anómala hacia al somite vecino anterior (*Fig. 5.23 D, E*), sugiriendo que la alteración de la navegación axonal en las PMNs podría ser dependiente del background genético, que es diferente entre embriones Hb9::GFP y los wild type utilizados para las tinciones con SV2. Adicionalmente, se encontró una menor migración de la línea lateral a lo largo de la cola (eje anterior-posterior), en embriones de 24 y 48 hpf, tratados con 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ (*Fig. 5.23*).

En general, vimos que BioCen 128 presenta efectos tóxicos como el retraso, concentración dependiente, del desarrollo embrionario a partir de la gastrulación. Asimismo, observamos que BioCen 128 a concentraciones bajas genera efectos variados sobre el desarrollo neuronal. Por ejemplo, modula el crecimiento y navegación

axonal de las neuronas motoras CaP, afecta el desarrollo de la epífisis, entre otros. Por lo tanto, BioCen 128 podría influenciar la actividad motora y el ritmo circadiano. En conclusión, los efectos observados en el embrión de pez cebra sugieren que BioCen 128 podría estar relacionado a la vía PrP/SFKs.

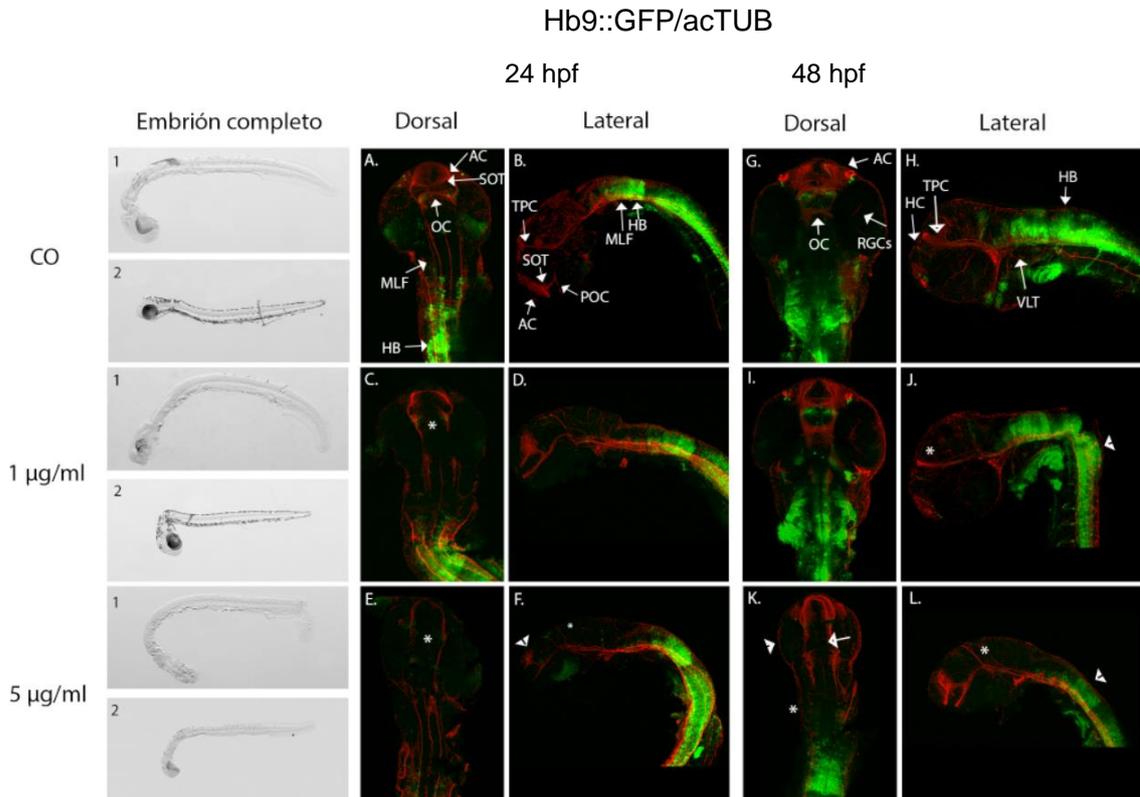


Figura 5.22. Efecto de BioCen 128 sobre expresión de hb9 y tubulina acetilada. Se muestran reconstrucciones 3D de la cabeza (10X), en vista dorsal y lateral, de embriones Hb9::GFP tratados con BioCen 128 a las 2.5 hpf. Los embriones fueron fijados a las 24 hpf, teñidos con tubulina acetilada y montados para análisis confocal (n=8 embriones por tratamiento). Anticuerpo primario: tubulina acetilada. Anticuerpo secundario: Cy3 (rojo). Abreviaturas: AC, comisura anterior; SOT, tracto supraóptico; OC, quiasma óptico; MLF, fascículo longitudinal medial; POC, comisura post óptica; TPC, tracto de la comisura posterior; VLT, tracto longitudinal ventral; HB, romboencéfalo; RGCs, células ganglionares de la retina. A la izquierda: fotos en campo claro de embriones en vista lateral: “1”, 24 hpf (40X); “2”, 48 hpf (25X). (A, C, E) A las 24 hpf, se observó un menor tamaño de estructuras positivas para la AC, SOT y OC en embriones tratados con 1 y 5 µg/ml. (H, J, L) A las 48 hpf, se evidenció un menor tamaño de estructuras positivas para el TPC en embriones tratados con 1 y 5 µg/ml (asteriscos); y en general un menor tamaño del romboencéfalo, mesencéfalo y prosencéfalo en embriones tratados con 5 µg/ml.

Hb9::GFP/acTUB

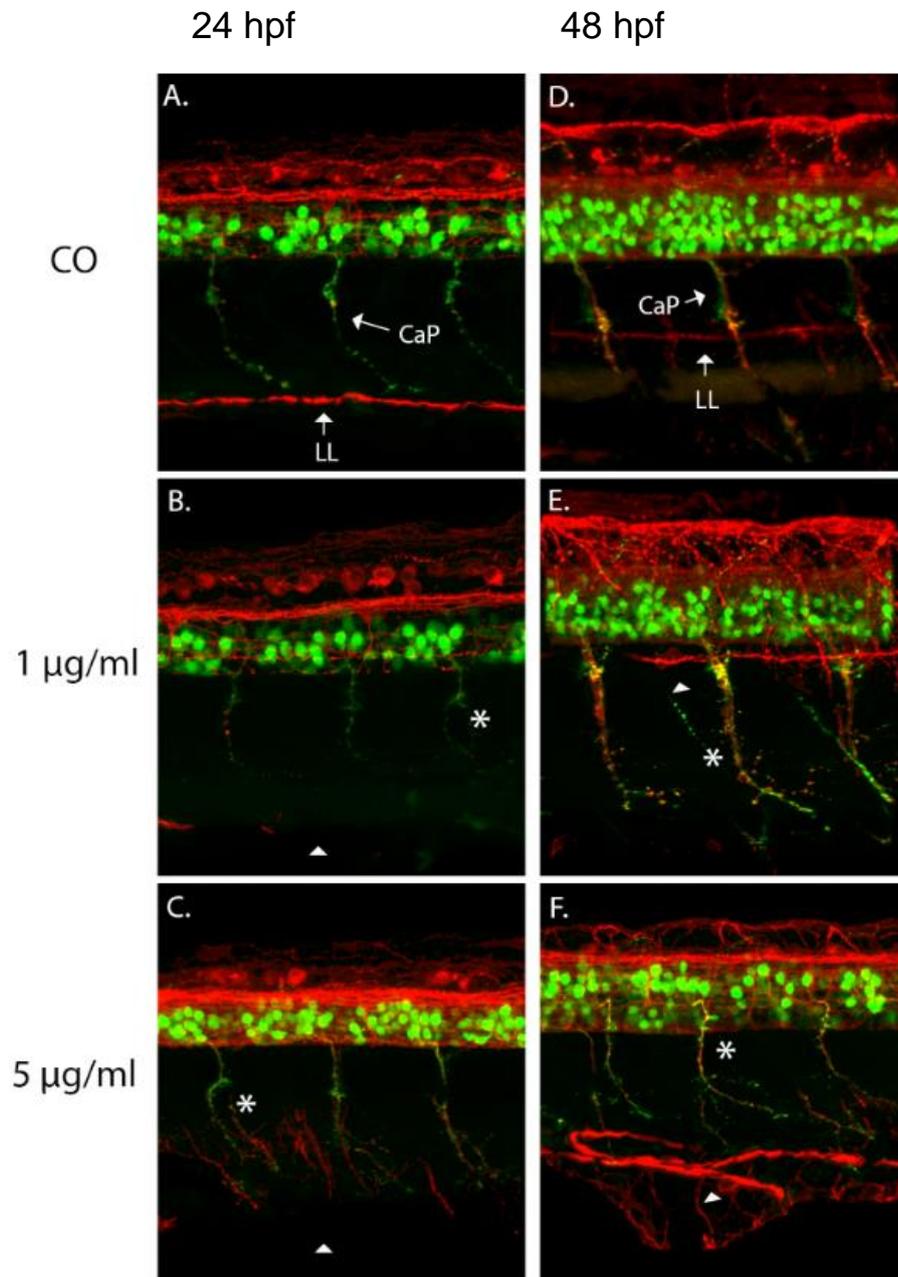


Figura 5.23. Efecto de BioCen 128 sobre el desarrollo de las neuronas motoras primarias caudales. Se muestran reconstrucciones 3D del tronco (20X) de embriones Hb9::GFP tratados con BioCen 128 a las 2.5 hpf. Embriones fueron fijados a las 48 hpf y montados para análisis confocal (n=6 embriones por tratamiento). Anticuerpo primario: tubulina acetilada. Anticuerpo secundario: Cy3 (rojo). Abreviaturas: CaP, neuronas motoras primarias caudales de la médula espinal; LL, línea lateral. **(A, B, C)** A las 24 hpf, se evidenció un efecto en la navegación de los axones CaP, en embriones tratados con 1 y 5 µg/ml (asteriscos). Además, se observó una menor migración de la línea lateral en estos embriones (cabeza de flecha). **(D, E)** A las 48 hpf, se observó una alteración en la dirección de navegación (hacia límite con somite vecino anterior) de los axones CaP, en embriones tratados con 1 µg/ml (asterisco). **(D, F)** También, se encontró una menor fasciculación axonal y desorganizada navegación de los axones CaP en embriones tratados con 5 µg/ml (asterisco). **(D, E, F)** Similar a lo visto a las 24 hpf, se evidenció una menor migración de la línea lateral a lo largo de la cola, en embriones tratados con 1 y 5 µg/ml.

VI. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo por objetivo analizar el efecto del fármaco BioCen 128 sobre el desarrollo embrionario del pez cebra con el fin de eventualmente identificar potenciales asociaciones a la vía neurotóxica PrP/SFK. Los resultados están divididos en dos secciones. La primera (5.1) abarca el análisis farmacológico de la actividad biológica de BioCen 128 sobre el desarrollo embrionario del pez cebra; y la segunda (5.2) describe el análisis morfológico y celular del efecto de BioCen 128 sobre el desarrollo y fisiología neuronal de embriones de pez cebra.

Es importante precisar, que la actividad biológica de BioCen 128 podría ser de forma extracelular o intracelular. En estos experimentos, el embrión fue expuesto a BioCen 128 de forma extracelular a través del medio embrionario. De acuerdo con ello, se pueden presentar dos escenarios: 1) que BioCen 128 interactúe con moléculas en la membrana celular. Por ejemplo, afectando a la proteína PrP. 2) que BioCen 128 sea introducido al citosol a través de procesos como endocitosis, fagocitosis, pinocitosis, etc. Ello implicaría que permanezca aislado por membranas de vesículas; o que posteriormente sea liberado al medio intracelular e interactúe con proteínas citosólicas, por ejemplo, con las quinasas Src, Fyn y Yes. En este estudio, se escogió el modo de acción extracelular del fármaco, debido a que al ser un biopreparado (*ver Materiales y Métodos*), es muy probable que esté compuesto de proteínas que difícilmente ingresan a la célula. Sin embargo, para discernir entre estas dos posibilidades, en futuros experimentos se sugiere administrar BioCen 128 en el citosol mediante microinyección.

De igual manera, se debe considerar que la administración de un fármaco a través del agua o medio embrionario tiene como limitación el no poder cuantificar de forma precisa la concentración del fármaco que es incorporada por el embrión (dosis) (36), así como conocer la absorción diferencial del fármaco en órganos y tejidos diversos. En este estudio se hizo diluciones seriadas del fármaco, las cuales se administraron en el medio embrionario por única vez a las 2.5 hpf. Además, no se hizo ningún recambio del medio durante los tres días de embriogénesis, ya que el volumen de la droga en solución no disminuyó significativamente durante este tiempo. Por lo tanto, para futuros estudios se sugiere determinar el tiempo de metabolización de BioCen 128 y/o su concentración real en cada pocillo de tratamiento durante los tres días de observación, por ejemplo,

mediante el método de espectrofotometría. Ello nos permitirá descartar alguna pérdida significativa del mismo. Alternativamente, se sugiere administrar el fármaco mediante microinyección, para precisar la concentración de este que es incorporada por el embrión, y descartar una absorción diferencial del mismo.

Como se mencionó, en nuestros experimentos elegimos administrar BioCen 128 a las 2.5 hpf. Diversos estudios sugieren administrar el compuesto de estudio aprox. a las 5 hpf (52), lo que corresponde al inicio de la gastrulación en el pez cebra (24). Ello, con el fin de extrapolar los estudios toxicológicos de embriones de pez cebra a mamíferos, ya que se sabe que en mamíferos la exposición de fármacos por vía materna se da a partir de la gastrulación temprana (46). Por otro lado, la OECD recomienda iniciar la exposición al compuesto lo más temprano posible después de la fecundación, para incluir en la evaluación todos los procesos biológicos pertenecientes a la embriogénesis (47). Teniendo en cuenta estos dos criterios farmacológicos, en nuestros experimentos elegimos administrar BioCen 128 en un tiempo del desarrollo intermedio (2.5 hpf). Esto nos permitió reducir al mínimo los casos de malformaciones congénitas en embriones seleccionados para experimento, ya que estas se visualizan principalmente durante las primeras horas post fertilización. Además, nos permitió incluir en nuestro análisis posibles efectos sobre la blastulación.

Después de haber revisado estas premisas, se analizará la primera sección (5.1), en donde se indentificó la concentración letal media (CL_{50}) de BioCen 128 y sus efectos generales en el desarrollo embrionario. Se determinó una CL_{50} de 22.5 $\mu\text{g/ml}$, al administrar el fármaco por única vez a las 2.5 hpf. También, se evidenció que en un rango de 1-20 $\mu\text{g/ml}$, BioCen 128 genera un retraso del desarrollo embrionario en el pez cebra, el cual es concentración dependiente. Además, se determinó que el retraso del desarrollo no difiere significativamente entre los indicadores del estadio embrionario evaluados (EL, HTA y OVL), ni entre las cepas utilizadas (Tab5 y WT^{Kn}). Asimismo, se encontró que el efecto retraso es irreversible durante la embriogénesis, y se identificó que altas concentraciones de BioCen 128 ($>10 \mu\text{g/ml}$) inducen un retraso del desarrollo a partir de la gastrulación (estadios de 90% *epibolia* y *bud*).

En nuestros experimentos observamos que BioCen 128 genera un retraso subletal del desarrollo embrionario a partir de la gastrulación. Una posible explicación para ello sería que este efecto es una consecuencia de la toxicidad de BioCen 128 a

concentraciones altas. Consistente con ello, otros estudios con fármacos administrados en estadíos tardíos de blastulación, han demostrado efectos similares al de BioCen 128. Por ejemplo, el ácido valproico, un fármaco utilizado para tratar episodios de epilepsia. Este fue administrado a las 4 hpf, y generó un retraso del desarrollo embrionario en el pez cebra, en la morfología en general y en el tiempo de eclosión; así como un menor desarrollo de la región craneofacial en la etapa larval (53). De manera similar, otro fármaco antiepiléptico administrado a las 4 hpf, el ácido metoxiacético, generó un retraso del desarrollo embrionario, de acuerdo con parámetros morfológicos como el HTA y EL (54). Otros fármacos administrados a las 3 hpf, ocasionaron una reducción de la longitud del embrión durante toda la embriogénesis, y un aumento de la frecuencia cardíaca; estos fueron la fluoxetina, diazepam y risperidona (55). Además, fármacos como el ibuprofeno y diclofenaco, cuando son administrados en altas concentraciones a las 6 hpf, producen un retraso en el tiempo de eclosión, así como una reducción de movimientos esporádicos y de la distancia de nado en los embriones (56). Por lo tanto, el retraso del desarrollo ocasionado por BioCen 128 parece no ser un efecto específico, debido a que otros fármacos, como los mencionados anteriormente, causan este tipo de efectos; y tal vez sea debido a una toxicidad inespecífica por concentraciones altas. De acuerdo con la literatura, no hay un mecanismo único que explique el retraso del desarrollo debido a la toxicidad de un compuesto. Algunos autores sugieren que podría estar relacionado a un menor consumo de la yema y/o una alteración en el metabolismo de lípidos, lo cual induce un retraso del desarrollo por bajos nutrientes (57).

Otra posible explicación para el retraso del desarrollo embrionario a partir de la gastrulación, ocasionado por BioCen 128, podría ser que el fármaco esté afectando la función de las quinasas Fyn y Yes de manera independiente a la vía $A\beta/PrP$ (*ver Anexos*), la cual corresponde a otro mecanismo. En concordancia con ello, vimos en la literatura que Fyn y Yes juegan un rol importante en los movimientos de extensión convergente durante la gastrulación en el embrión de pez cebra (58). La inhibición de estas quinasas desencadena un retraso en el desarrollo de la epibolia (proceso de migración celular que ocurre durante la gastrulación); así como una alteración en los movimientos de extensión convergente (59), mediante una vía que converge con la señalización Wnt no canónica (señalización activada por los ligandos Wnt, que promueve la polaridad dorsoventral y migración celular durante la gastrulación) (60). Sumado a ello, en condiciones fisiológicas, la expresión de la quinasa Yes aumenta al

inicio de la epibolia, y se sabe que una reducción de los niveles de Yes conlleva a un retraso del desarrollo de la epibolia (61). Asimismo, una inhibición de la expresión de las proteínas actina (citoesqueleto) y E-cadherina (uniones intercelulares), también genera un retraso y alteración de la epibolia en embriones de pez cebra (61). De manera similar, la disminución en la expresión de Yes reduce la liberación de calcio intracelular, el cual es un mecanismo importante para la regulación del citoesqueleto de actina durante la epibolia (61). Por lo tanto, el retraso del desarrollo a partir de la gastrulación podría estar relacionado a un efecto de BioCen 128 sobre las quinasas Src, Fyn y Yes.

Una tercera explicación para el retraso del desarrollo embrionario a partir de la gastrulación, generado por BioCen 128, sería que el fármaco podría estar afectando la proteína prión. Esto es particularmente interesante porque abre una posible conexión con la vía de señalización A β /PrP/SFK (*ver Introducción*), que es de interés de nuestro laboratorio, y que está expresada y funciona a partir de la gastrulación. De acuerdo con ello, vimos en la literatura que, en mamíferos, la proteína prión induce la neurodegeneración a través de las quinasas Src, entre ellas Fyn. Por otro lado, estudios con embriones de peces cebra han demostrado que PrP activa importantes vías de comunicación celular, a través de las quinasas Fyn y Yes (39). Además, cabe notar que, en concordancia con lo descrito en este trabajo, la pérdida de función de PrP en embriones de pez cebra, conlleva a un retraso del desarrollo durante la gastrulación (39). Sumado a ello, se ha demostrado que el A β humano activa la vía PrP/SFK y afecta la expresión de importantes moléculas de comunicación celular, tales como E-cadherina y β -catetina (38). Por lo tanto, ya que BioCen 128 induce un retraso del desarrollo en el estadio *bud*, y en este estadio también se produce la función de PrP; se sugiere que BioCen 128 podría estar afectando la vía A β /PrP/SFK (*ver Anexos*). Sin descartar otros posibles mecanismos (por ejemplo, la toxicidad inespecífica de BioCen 128 a altas concentraciones), estos resultados nos permiten concluir que existen indicios que el retraso del desarrollo reportado en embriones tratados con BioCen 128, podría deberse a alteraciones en la actividad de la proteína PrP y/o de las quinasas de la familia Src, Fyn y Yes.

En la segunda sección (5.2) se describieron efectos de BioCen 128 en estadios embriológicos correspondientes al desarrollo neuronal del embrión de pez cebra,

mediante el uso de embriones transgénicos Hb9::GFP y tinciones con anticuerpos contra SV2, ZN8 y tubulina acetilada. Estos resultados evidenciaron que concentraciones bajas de BioCen 128 (<10 µg/ml) generan diversos efectos sobre el desarrollo neuronal, los cuales son dependientes de la concentración. Por ejemplo, se observó una reducción en el tamaño de estructuras fluorescentes para el neuropilo del prosencéfalo (comisura anterior, células ganglionares de la retina, tracto supraóptico y quiasma óptico), mesencéfalo (comisura posterior, epífisis y fascículo longitudinal ventral) y romboencéfalo (fascículo longitudinal medial y tractos axonales), así como en axones de las neuronas motoras de la médula espinal. Notablemente, los resultados también revelaron que BioCen 128 afecta el crecimiento y navegación axonal de las neuronas motoras primarias caudales de la médula espinal. De manera relevante, estos resultados sugieren que BioCen 128 podría modular la función motora y el ritmo circadiano en el embrión de pez cebra.

En nuestros experimentos utilizamos un anticuerpo contra la proteína SV2 (marcador específico de vesículas presinápticas) para analizar la morfología neuronal del embrión de pez cebra, así como para evaluar un posible efecto sobre la actividad sináptica. La proteína SV2 es expresada en la mayoría de las neuronas y células endocrinas, específicamente en la membrana de las vesículas sinápticas. Se sabe que SV2 cumple un rol importante en la transmisión sináptica (45). Por ello, alteraciones en la distribución y concentración de SV2 refleja alteraciones en la actividad sináptica. Los resultados de este estudio demostraron que BioCen 128 genera una reducción en el tamaño de estructuras fluorescentes para SV2. Esto sugiere dos posibles efectos del fármaco. El primero, que BioCen 128 afecta la distribución y concentración de SV2; y el segundo, que afecta la diferenciación neuronal, o induce la muerte de algunas neuronas. Para ambos casos se observaría un cambio en el patrón de fluorescencia SV2. Fue interesante ver que, al analizar el efecto de BioCen 128 en embriones teñidos con tubulina acetilada, proteína que tiene un patrón de fluorescencia similar al de SV2, se encontró una disminución de fluorescencia en las mismas estructuras reportadas con SV2. Por lo tanto, esto podría indicar que el efecto de BioCen 128 no es debido a un efecto en las concentraciones de SV2 o tubulina acetilada, sino a una menor cantidad de neuronas, posiblemente debido a una deficiencia en la diferenciación neuronal o la muerte de algunas de ellas.

Los resultados de este trabajo también evidenciaron que BioCen 128 modula la navegación y arborización de los axones motores primarios de la médula espinal. Se sabe que la activación de los receptores NMDA es importante para los procesos de aprendizaje espacial y memoria a largo plazo (62). Un estudio encontró que altas dosis de ketamina, un antagonista del receptor NMDA, puede inducir neuroapoptosis en ratones y primates, durante el desarrollo, y toxicidad de las neuronas motoras primarias en embriones de pez cebra (63). Esto abre la posibilidad de estudiar el efecto de BioCen 128 en la fisiología de los receptores NMDA, los cuales participan en la vía neurotóxica PrP/SFK (*ver Anexos*). Por otra parte, en el presente estudio se evidenció un menor tamaño de estructuras fluorescentes para el *floor plate* en embriones tratados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de BioCen 128. El *floor plate* consiste en células ubicadas ventralmente al tubo neural, que cumplen un importante rol de señalización en el patrón y guía de los axones ventrales del sistema nervioso (50). Por lo tanto, una posible explicación para la alteración en el crecimiento y navegación de los axones CaP sería un efecto de BioCen 128 sobre el *floor plate*. Alternativamente, una segunda explicación podría ser que BioCen 128 esté afectando los niveles de la quinasa Fyn. Ello, debido a que diversos estudios han identificado a Fyn como mediadora del crecimiento y navegación axonal dependiente de la proteína Netrin (proteína extracelular que cumple una función quimiotrópica para el crecimiento axonal) (*ver Anexos*) (64). Esperamos eventualmente en el futuro decidir entre estas dos hipótesis. Por otra parte, se ha descrito que las quinasas Fyn y Yes están involucradas en la fosforilación de la proteína Tau, proceso clave para desencadenar la neurodegeneración. Es importante precisar que, la proteína Tau promueve la formación y estabilidad de los microtúbulos, y su hiperfosforilación es una condición importante para causar la neurodegeneración en el mal de Alzheimer (*ver Introducción*). Es interesante saber que, estudios en pez cebra han reportado anomalías transitorias en el desarrollo de axones motores de la médula espinal en embriones tratados con proteínas Tau mutantes (65). De manera similar, otro estudio en pez cebra reveló una alteración en el desarrollo de axones motores a los que se indujo la expresión de Tau fosforilada (66). Dicho estudio sugirió que la fosforilación de Tau podría dañar la estabilidad de los microtúbulos en los axones, y por lo tanto afectar el transporte axonal dependiente de microtúbulos, el cual es esencial para el crecimiento axonal. En su conjunto, estos estudios nos permiten concluir que las alteraciones en el crecimiento

y navegación de axones CaP, causados por BioCen 128, podrían ser explicables por efectos sobre la vía PrP/SFK y eventualmente sobre Tau (*ver Anexos*).

Además, nuestros experimentos revelaron una reducción en el tamaño de estructuras fluorescentes para la retina (RGCs) y epífisis en embriones tratados con concentraciones bajas de BioCen 128 (<10 µg/ml). Se sabe que en el pez cebra la glándula pineal inicia la producción de melatonina aprox. a partir de las 48 hpf; y que este proceso es controlado por el ritmo circadiano, y modulado por los estímulos de luz (67). Por lo tanto, el efecto de BioCen 128 sobre la retina y epífisis sugiere que este podría modular la detección de luz y con ello afectar la producción de melatonina y el ritmo circadiano. Esto es consistente con el efecto beneficioso de BioCen 128 encontrado en ratones envejecidos, que mejoró su cognición, ya que diversos estudios han asociado la disregulación del ritmo circadiano con procesos neurodegenerativos, en particular con las alteraciones en los niveles de Aβ que ocurren en la enfermedad de Alzheimer (68).

También, nuestros experimentos mostraron que concentraciones bajas de BioCen 128 (<10 µg/ml) inducen un menor tamaño de estructuras fluorescentes para el neuropilo en la comisura anterior y posterior del embrión de pez cebra. De manera similar, estudios en *Drosophila* han demostrado que la inhibición de quinasas de la familia Src, SRC64B y SRC42A, genera un menor desarrollo axonal en la comisura anterior y posterior del cordón nervioso ventral (69), y sugieren que esta señalización es conservada en vertebrados. Sin descartar otros mecanismos, esto nos podría indicar que el mecanismo por el cual BioCen 128 tiene su efecto sobre el neuropilo en estas y tal vez otras estructuras del embrión de pez cebra, sea explicado por un efecto sobre quinasas de la familia Src.

Es preciso mencionar que, en condiciones normales, las neuronas motoras caudales primarias de la médula espinal inervan los músculos ventrales del tronco y la cola del pez cebra, a partir de la embriogénesis hasta la adultez (48). Por lo tanto, estas son responsables de la señalización nerviosa para la contracción muscular ventral. En ese contexto, el efecto encontrado de BioCen 128 sobre la navegación y crecimiento axonal de estas neuronas, sugiere de manera relevante un efecto sobre el movimiento de los músculos ventrales del tronco y cola del pez cebra, que podría persistir en la etapa larval y adulta. Asimismo, en condiciones normales, las células ganglionares de la retina participan en la transmisión de señales nerviosas visuales hacia el cerebro del pez cebra;

por su parte, la epífisis cumple un rol importante en la detección de señales de luz, producción de melatonina y función circadiana (67). Por lo tanto, la reducción de estructuras fluorescentes para las células ganglionares de la retina y epífisis ocasionada por BioCen 128, sugiere de manera notable un efecto de BioCen 128 sobre la señalización nerviosa de estímulos de luz y ritmo circadiano en el pez cebra, que podría mantenerse en la etapa larval y adulta. Se sugiere para futuros estudios, analizar el efecto de BioCen 128 sobre estas estructuras a nivel funcional; por ejemplo, mediante ensayos conductuales en larvas donde se evalúe la actividad locomotora de estas, así como la respuesta locomotora ante estímulos de luz y oscuridad.

En resumen, en este estudio se propuso conocer la actividad biológica de BioCen 128 y determinar si su efecto neuroprotector podría estar relacionado a la vía de señalización PrP/SFK. Los ejemplos observados como el retraso del desarrollo a partir de la gastrulación, el efecto en la navegación y arborización de los axones motores primarios de la médula espinal, entre otros, sugieren potenciales asociaciones entre BioCen 128 y la vía PrP/SFK. Por lo tanto, dado que hay efectos de BioCen 128 que pueden deberse a efectos en esta vía (sin excluir a otras), se concluye que sí podría haber una asociación entre BioCen 128 y la vía PrP/SFK. Por ello, habría que ahondar con experimentos específicos. Por ejemplo, utilizar anticuerpos específicos para esta vía y evaluar el efecto de BioCen 128 en un modelo de neurodegeneración (embriones microinyectados con A β , PrP morfolino y/o Fyn/Yes morfolino). Cabe señalar que es muy importante identificar estructuras que son afectadas por BioCen 128 en un organismo sano, ya que nos permite luego enfocar el análisis en esas estructuras al momento de evaluar el efecto beneficioso de BioCen 128 en un organismo con una condición patológica.

VII. CONCLUSIONES

- En un rango de concentración de 1-20 $\mu\text{g/ml}$, el fármaco BioCen 128 induce un retraso, concentración dependiente, del desarrollo embrionario en el pez cebra. Este efecto es irreversible durante los tres días de embriogénesis, y no está asociado al tiempo del desarrollo. Además, a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$, BioCen 128 induce el retraso del desarrollo a partir de la gastrulación. Finalmente, a una concentración igual o mayor a 25 $\mu\text{g/ml}$, BioCen 128 es letal para embriones de pez cebra.
- En un rango de concentración de 1-5 $\mu\text{g/ml}$, el fármaco BioCen 128 induce una reducción en el tamaño de la comisura anterior, células ganglionares de la retina, tracto supraóptico, quiasma óptico, comisura posterior, epífisis, fascículo longitudinal ventral, fascículo longitudinal medial, línea lateral y células del *floor plate*.
- En un rango de concentración de 1-5 $\mu\text{g/ml}$, el fármaco BioCen 128 modula la navegación y crecimiento axonal de las neuronas motoras primarias caudales de la médula espinal, e induce una menor fasciculación axonal en las neuronas motoras secundarias.
- Se encontraron efectos de BioCen 128 que pueden estar asociados a la vía PrP/SFK, tales como el retraso del desarrollo a partir de la gastrulación, la modulación de la navegación y crecimiento de axones motores primarios de la médula espinal, entre otros. Por lo tanto, se concluye que hay indicios que sugieren una asociación entre BioCen 128 y la vía PrP/SFK.

VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudio constituye una base para posteriores líneas de investigación, donde se evalúe la actividad biológica de BioCen 128 en un modelo de neurodegeneración. Se sugiere también realizar ensayos conductuales en larvas, para seguir analizando el efecto de BioCen 128 encontrado a nivel celular, sobre la función motora y actividad circadiana. Además de ello, administrar BioCen 128 mediante microinyección, para precisar la concentración del fármaco que es incorporada por el embrión (dosis), así como identificar el modo de acción de este (intracelular o extracelular).

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. United Nations. World population prospects: the 2017 revision, key findings and advance tables. 2017; Available from:
https://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/Files/WPP2017_KeyFindings.pdf
2. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine*. 2004;10(7s):S10.
3. Sarubbo MF. Estrategias neuroprotectoras en el envejecimiento cerebral. Mecanismos neuroquímicos y moleculares y su correlación con los efectos sobre las capacidades cognitivas. TDX (Tesis Dr en Xarxa) [Internet]. 2016; Available from: <http://www.tesisenred.net/handle/10803/385717>
4. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali G, Wu Y, et al. World Alzheimer report 2015: the global impact of dementia, an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's disease international*. 2015; Available from:
<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>
5. Prusiner SB, editor. Prion diseases. San Francisco: CSHL Press; 2017. p. 677.
6. Bossy-Wetzell E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature medicine*. 2004;10(7s):S2.
7. Pająk B, Kania E, Orzechowski A. Killing me softly: connotations to unfolded protein response and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016.
8. Maccioni RB, Muñoz P, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of medical research*. 2001;32(5):367-81.
9. Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G. Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *Journal of cell science*. 1998;111(21):3167-77.
10. Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, et al. Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*. 2010;142(3):387-97.

11. Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling neurodegeneration in zebrafish. *Current neurology and neuroscience reports*. 2011;11(3):274-82.
12. Chávez- Gutiérrez L, Bammens L, Benilova I, Vandersteen A, Benurwar M, Borgers M, et al. The mechanism of γ - secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *The EMBO journal*. 2012;31(10):2261-74.
13. Esposito Z, Belli L, Toniolo S, Sancesario G, Bianconi C, Martorana A. Amyloid β , glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's disease: are we on the right track? *CNS neuroscience & therapeutics*. 2013;19(8):549-55.
14. Nygaard HB, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates the toxicity of β -amyloid oligomers: implications for Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 2009;66(11):1325-8.
15. Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers. *Nature*. 2009;457(7233):1128.
16. Um JW, Kaufman AC, Kostylev M, Heiss JK, Stagi M, Takahashi H, et al. Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer $a\beta$ oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron*. 2013;79(5):887-902.
17. Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, Kostylev MA, Stagi M, Vortmeyer A, et al. Alzheimer amyloid- β oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nature neuroscience*. 2012;15(9):1227.
18. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology*. 2011;162(6):1239-49.
19. U.S. Food and Drug Administration (FDA). The drug development process. 2019; Available from: <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>
20. Sahota PS, Popp JA, Hardisty JF, Gopinath C. Toxicologic pathology, non clinical safety assessment. CRC Press; 2017. p. 1015.
21. Mayden RL, Tang KL, Conway KW, Freyhof J, Chamberlain S, Haskins M, et al. Phylogenetic relationships of Danio within the order Cypriniformes: a

- framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2007;308(5):642-54.
22. Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. 1996;123(1):1-36.
 23. Rubinstein AL. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 2003;6(2):218-23.
 24. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*. 1995;203(3):253-310.
 25. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498.
 26. MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2015;14(10):721.
 27. Harper C & Lawrence C. *The laboratory zebrafish*. CRC Press; 2011. p. 274.
 28. Guo S. Using zebrafish to assess the impact of drugs on neural development and function. *Expert opinion on drug discovery*. 2009;4(7):715-26.
 29. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8(5):353.
 30. Parng C, Seng WL, Semino C, McGrath P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay and drug development technologies*. 2002;1(1):41-8.
 31. Chakraborty C, Hsu CH, Wen ZH, Lin CS, Agoramoorthy G. Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Current drug metabolism*. 2009;10(2):116-24.
 32. Delvecchio C, Tiefenbach J, Krause HM. The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery. *Assay and drug development technologies*. 2011;9(4):354-61.

33. Mueller T, Vernier P, Wullimann MF. The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. *Brain research*. 2004;1011(2):156-69.
34. Rico E, Rosemberg D, Seibt K, Capiotti K, Da Silva R, Bonan C. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicology and teratology*. 2011;33(6):608-17.
35. Tropepe V, Sive HL. Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism? *Genes, Brain and Behavior*. 2003;2(5):268-81.
36. Saleem S, Kannan RR. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. *Cell death discovery*. 2018;5(1):45.
37. Cell Signalling Technology. SV2A (D1L8S) Rabbit mAb #66724. [Online]. [cited 2019]. Available from: <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/sv2a-d118s-rabbit-mab/66724?site-search-type=Products&N=4294956287&Ntt=sv2&fromPage=plp>
38. Sempou E, Biasini E, Pinzón-Olejua A, Harris DA, Málaga-Trillo E. Activation of zebrafish Src family kinases by the prion protein is an amyloid- β -sensitive signal that prevents the endocytosis and degradation of E-cadherin/ β -catenin complexes in vivo. *Molecular neurodegeneration*. 2016;11(1):18.
39. Málaga-Trillo E, Sempou E. PrPs: Proteins with a purpose-Lessons from the zebrafish. *Prion*. 2009;3(3):129-33.
40. Málaga-Trillo E, Salta E, Figueras A, Panagiotidis C, Sklaviadis T. Fish models in prion biology: underwater issues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2011;1812(3):402-14.
41. Solis GP, Radon Y, Sempou E, Jechow K, Stuermer CA, Málaga-Trillo E. Conserved roles of the prion protein domains on subcellular localization and cell-cell adhesion. *PLoS One*. 2013;8(7):e70327.
42. Ochs K, Málaga-Trillo E. Common themes in PrP signaling: the Src remains the

- same. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2014;2:63.
43. Málaga-Trillo E, Ochs K. Uncontrolled SFK-mediated protein trafficking in prion and Alzheimer's disease. *Prion*. 2016;10(5):352-61.
 44. Zebrafish International Resource Center, ZFIN. Wild-Type Line: AB/Tuebingen. [Online]. [cited 2019]. Available from: <https://zfin.org/action/genotype/view/ZDB-GENO-010924-10>
 45. Boon KL, Xiao S, McWhorter ML, Donn T, Wolf-Saxon E, Bohnsack MT, et al. Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects. *Human molecular genetics*. 2009;18(19):3615-25.
 46. Nishimura Y, Inoue A, Sasagawa S, Koiwa J, Kawaguchi K, Kawase R, et al. Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. *Congenital Anomalies*. 2016;56(1):18-27.
 47. OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals: fish embryo acute toxicity (FET) test. Test Guideline No.: 236. París, OECD; 2013.
 48. Myers PZ, Eisen JS, Westerfield M. Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. *Journal of Neuroscience*. 1986;6(8):2278-89.
 49. Zebrafish Information Network, ZFIN. Antibody Name: zn-8. [Online]. [cited 2019]. Available from: <https://zfin.org/ZDB-ATB-081002-22>
 50. Liang JO, Rubinstein AL. Patterning of the zebrafish embryo by nodal signals. *Current topics in developmental biology*. 2003;55:143-71.
 51. Cell Signaling Technology. Acetyl- α -Tubulin (Lys40) (D20G3) XP Rabbit mAb #5335. [Online]. [cited 2019]. Available from: <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/acetyl-a-tubulin-lys40-d20g3-xp-rabbit-mab/5335>
 52. Martínez CS, Feas DA, Siri M, Igartúa DE, Chiaramoni NS, Alonso SD, Prieto MJ. In vivo study of teratogenic and anticonvulsant effects of antiepileptics drugs in zebrafish embryo and larvae. *Neurotoxicology and teratology*. 2018;66:17-24.
 53. Teixido E, Pique E, Gomez-Catalan J, Llobet JM. Assessment of developmental

- delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicology in Vitro*. 2013;27(1):469-78.
54. Kalichak F, Idalencio R, Rosa JG, de Oliveira TA, Koakoski G, Gusso D, et al. Waterborne psychoactive drugs impair the initial development of Zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016;41:89-94.
 55. Xia L, Zheng L, Zhou JL. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 2017;182:416-25.
 56. He JH, Guo SY, Zhu F, Zhu JJ, Chen YX, Huang CJ, et al. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2013;67(1):25-32.
 57. Jopling C, den Hertog J. Fyn/Yes and non- canonical Wnt signalling converge on RhoA in vertebrate gastrulation cell movements. *EMBO reports*. 2005;6(5):426-31.
 58. Huang H, Lu FI, Jia S, Meng S, Cao Y, Wang Y, et al. *Amotl2* is essential for cell movements in zebrafish embryo and regulates c-Src translocation. *Development*. 2007;134(5):979-88.
 59. Lemeer S, Jopling C, Naji F, Ruijtenbeek R, Slijper M, Heck AJ, et al. Protein-tyrosine kinase activity profiling in knock down zebrafish embryos. *PloS one*. 2007;2(7):e581.
 60. Solnica-Krezel L. Gastrulation in zebrafish—all just about adhesion?. *Current opinion in genetics & development*. 2006;16(4):433-41.
 61. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*. 2004;44(1):5-21.
 62. Cuevas E, Trickler WJ, Guo X, Ali SF, Paule MG, Kanungo J. Acetyl L-carnitine protects motor neurons and Rohon-Beard sensory neurons against ketamine-induced neurotoxicity in zebrafish embryos. *Neurotoxicology and teratology*. 2013;39:69-76.
 63. Li W, Lee J, Vikis HG, Lee SH, Liu G, Aurandt J, et al. Activation of FAK and

- Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nature neuroscience*. 2004;7(11):1213.
64. Bai Q, Burton EA. Zebrafish models of Tauopathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2011;1812(3):353-63.
 65. Miller N, Feng Z, Edens BM, Yang B, Shi H, Sze CC, et al. Non-aggregating tau phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5 contributes to motor neuron degeneration in spinal muscular atrophy. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(15):6038-50.
 66. Ben-Moshe Z, Foulkes NS, Gothilf Y. Functional development of the circadian clock in the zebrafish pineal gland. *BioMed research international*. 2014.
 67. Musiek ES, Xiong DD, Holtzman DM. Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer disease. *Experimental & molecular medicine*. 2015;47(3):e148.
 68. Wouda RR, Bansraj MR, de Jong AW, Noordermeer JN, Fradkin LG. Src family kinases are required for WNT5 signaling through the Derailed/RYK receptor in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Development*. 2008;135(13):2277-87.

ANEXOS

Anexo 1. Volúmenes para diluciones seriadas de BioCen 128 a 2X, en un rango de 4 a 200 µg/ml. Se muestran los volúmenes calculados para las diluciones seriadas a 2X, mostradas en la *Fig. 4.2.2 de Métodos*; con el fin de obtener concentraciones finales del fármaco en un rango de 1 a 100 µg/ml (1X), al añadir los embriones en un volumen de transferencia de 500 µl.

Pocillo	Concentración (µg/ml)	Volumen (µl)	Medio E3 1X (µl)	Volumen Final (µl)
A6	200	151.66 de BioCen 128	758.34	500
A5	100	410 de A6	410	500
A4	40	320 de A5	480	500
A3	20	300 de A4	300	500
A2	4	100 de A3	400	500
A1	control	0	500	500

Anexo 2. Volúmenes para diluciones seriadas de BioCen 128 a 2X, en un rango de 2 a 50 µg/ml. Se muestran los volúmenes calculados para las diluciones seriadas a 2X; con el fin de obtener concentraciones finales del fármaco en un rango de 1 a 25 µg/ml (1X), al añadir los embriones en un volumen de transferencia de 500 µl.

Pocillo	Concentración (µg/ml)	Volumen (µl)	Medio E3 1X (µl)	Volumen Final (µl)
A5	50	34.16 de BioCen 128	785.84	500
A4	20	320 de A5	480	500
A3	10	300 de A4	300	500
A2	2	100 de A3	400	500
A1	control	0	500	500

Anexo 3. Volúmenes para diluciones seriadas de BioCen 128 a 2X, en un rango de 2 a 40 µg/ml. Se muestran los volúmenes calculados para las diluciones seriadas a 2X; con el fin de obtener concentraciones finales del fármaco en un rango de 1 a 20 µg/ml (1X), al añadir los embriones en un volumen de transferencia de 500 µl.

Pocillo	Concentración (µg/ml)	Volumen (µl)	Medio E3 1X (µl)	Volumen Final (µl)
A5	40	30 de BioCen 128	870	500
A4	20	400 de A5	400	500
A3	10	300 de A4	300	500
A2	2	100 de A3	400	500
A1	control	0	500	500

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
UnoEL	8	0.88194	1.645	0.854	0.19651
CincoEL	16	0.67616	6.562	3.737	<u>0.00009</u>
DiezEL	16	0.70442	5.989	3.555	<u>0.00019</u>
VeinteEL	16	0.95948	0.821	-0.392	0.65233

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
UnoHTA	8	0.85788	1.980	1.204	0.11437
CincoHTA	16	0.89343	2.159	1.529	0.06314
DiezHTA	16	0.86887	2.657	1.941	<u>0.02613</u>
VeinteHTA	12	0.94878	0.856	-0.303	0.61921

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
UnoOVL	4	0.94990	0.578	-0.569	0.71546
CincoOVL	6	0.95203	0.594	-0.696	0.75665
DiezOVL	6	0.97319	0.332	-1.360	0.91314
VeinteOVL	2

Anexo 4. Análisis de normalidad para porcentaje de retraso por tratamiento, de acuerdo con el EL, HTA y OVL. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk (Stata 10.0) para determinar si los datos (% de retraso por tratamiento) siguen una distribución normal. Se encontró que solo los % de retraso de los tratamientos de 5 y 10 µg/ml de acuerdo con el EL (Variables “CincoEL” y “DiezEL”) y los % de retraso del tratamiento de 10 µg/ml de acuerdo al HTA (Variable “DiezHTA”), no siguen una distribución normal ($p < 0.05$).

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Tratam~o	Obs	Rank Sum
1	8	63.00
2	16	286.50
3	16	490.50
4	16	756.00

chi-squared = 40.971 with 3 d.f.
 probability = 0.0001

chi-squared with ties = 40.982 with 3 d.f.
 probability = 0.0001

Dunn's Pairwise Comparison of Retraso by Tratamiento
 (Bonferroni)

Col Mean- Row Mean	1	2	3
2	-1.420604 0.4663		
3	-3.226231 <u>0.0038</u>	-2.211433 0.0810	
4	-5.576202 <u>0.0000</u>	-5.089547 <u>0.0000</u>	-2.878115 <u>0.0120</u>

Anexo 5. Análisis de comparaciones de porcentaje de retraso entre tratamientos de acuerdo con el EL. Se utilizó el software Stata 10.0 para determinar si los % de retraso de acuerdo con el EL, difieren significativamente entre tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis), y entre cuales tratamientos (prueba de Dunn). Se usaron estas pruebas no paramétricas ya que no todos los tratamientos tuvieron una distribución normal. Abreviaturas: tratamiento 1 = 1 µg/ml; 2 = 5 µg/ml; 3 = 10 µg/ml; 4 = 20 µg/ml. Se encontró que sí existe una diferencia significativa en el % de retraso, de acuerdo al EL, entre los 4 tratamientos ($p < 0.05$); específicamente el tratamiento de 1 µg/ml se diferencia de los tratamientos de 10 y 20 µg/ml, el tratamiento de 5 µg/ml se diferencia del tratamiento de 20 µg/ml y el tratamiento de 10 µg/ml se diferencia del tratamiento de 20 µg/ml ($p < 0.05$).

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Tratam~o	Obs	Rank Sum
1	8	53.00
2	16	297.00
3	16	471.00
4	12	557.00

chi-squared = 39.476 with 3 d.f.
 probability = 0.0001

chi-squared with ties = 39.476 with 3 d.f.
 probability = 0.0001

Dunn's Pairwise Comparison of Retraso by Tratamiento
 (Bonferroni)

Col Mean- Row Mean	1	2	3
2	-1.819130 0.2067		
3	-3.476348 <u>0.0015</u>	-2.029669 0.1272	
4	-5.752595 <u>0.0000</u>	-4.812966 <u>0.0000</u>	-2.933857 <u>0.0100</u>

Anexo 6. Análisis de comparaciones de porcentaje de retraso entre tratamientos de acuerdo con el HTA. Se utilizó el software Stata 10.0 para determinar si los % de retraso de acuerdo con el HTA, difieren significativamente entre tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis), y entre cuales tratamientos (prueba de Dunn). Se usaron estas pruebas no paramétricas ya que no todos los tratamientos tuvieron una distribución normal. Abreviaturas: tratamiento 1 = 1 µg/ml; 2 = 5 µg/ml; 3 = 10 µg/ml; 4 = 20 µg/ml. Se encontró que sí existe una diferencia significativa en el % de retraso, de acuerdo al HTA, entre los 4 tratamientos ($p < 0.05$); específicamente el tratamiento de 1 µg/ml se diferencia de los tratamientos de 10 y 20 µg/ml, el tratamiento de 5 µg/ml se diferencia del tratamiento de 20 µg/ml y el tratamiento de 10 µg/ml se diferencia del tratamiento de 20 µg/ml ($p < 0.05$).

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Tratam~o	Obs	Rank Sum
1	4	10.00
2	6	57.50
3	6	68.50
4	2	35.00

chi-squared = 12.143 with 3 d.f.
probability = 0.0069

chi-squared with ties = 12.156 with 3 d.f.
probability = 0.0069

Dunn's Pairwise Comparison of Retraso by Tratamiento
(Bonferroni)

Col Mean- Row Mean	1	2	3
2	-2.056578 0.1192		
3	-2.588868 <u>0.0289</u>	-0.595119 1.0000	
4	-3.246104 <u>0.0035</u>	-1.817146 0.2076	-1.396333 0.4878

Anexo 7. Análisis de comparaciones de porcentaje de retraso entre tratamientos de acuerdo con el OVL. Se utilizó el software Stata 10.0 para determinar si los % de retraso de acuerdo con el OVL, difieren significativamente entre tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis), y entre cuales tratamientos (prueba de Dunn). A pesar de que todos los tratamientos tuvieron una distribución normal, se usaron estas pruebas no paramétricas debido a la baja cantidad de datos (4-6). Abreviaturas: tratamiento 1 = 1 µg/ml; 2 = 5 µg/ml; 3 = 10 µg/ml; 4 = 20 µg/ml. Se encontró que sí existe una diferencia significativa en el % de retraso, de acuerdo con el HTA, entre los 4 tratamientos ($p < 0.05$); específicamente el tratamiento de 1 µg/ml se diferencia de los tratamientos de 10 y 20 µg/ml ($p < 0.05$).

-> Par_morf = 1

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Retraso	56	0.96245	1.932	1.414	0.07873

-> Par_morf = 2

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Retraso	52	0.95348	2.257	1.740	0.04096

-> Par_morf = 3

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Retraso	18	0.95432	1.004	0.008	0.49667

. kwallis Retraso, by(Par_morf)

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Par_morf	Obs	Rank Sum
1	56	3536.00
2	52	3398.50
3	18	1066.50

chi-squared = 0.383 with 2 d.f.

probability = 0.8255

chi-squared with ties = 0.384 with 2 d.f.

probability = 0.8255

Anexo 8. Análisis de comparaciones de porcentaje de retraso entre EL, HTA y OVL. Se utilizó el software Stata 10.0 para determinar si los % de retraso del desarrollo difieren significativamente entre el EL, HTA y OVL (prueba de Kruskal-Wallis). Abreviaturas: 1 = EL; 2 = HTA; 3 = OVL. Se halló un valor de $p=0.8441$ para tratamiento de 1 $\mu\text{g/ml}$; $p=0.5043$ para tratamiento de 5 $\mu\text{g/ml}$; $p=0.6095$ para tratamiento de 10 $\mu\text{g/ml}$; y $p=0.3559$ para tratamiento de 20 $\mu\text{g/ml}$. Se concluye que los % de retraso no difieren entre el EL, HTA y OVL.

-> Cepa = 1

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Retraso	53	0.93888	3.010	2.358	0.00919

-> Cepa = 2

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Retraso	53	0.91485	4.193	3.068	0.00108

. ranksum Retraso, by(Cepa)

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Cepa	obs	rank sum	expected
1	53	2771	2835.5
2	53	2900	2835.5
combined	106	5671	5671

unadjusted variance 25046.92

adjustment for ties -3.15

adjusted variance 25043.76

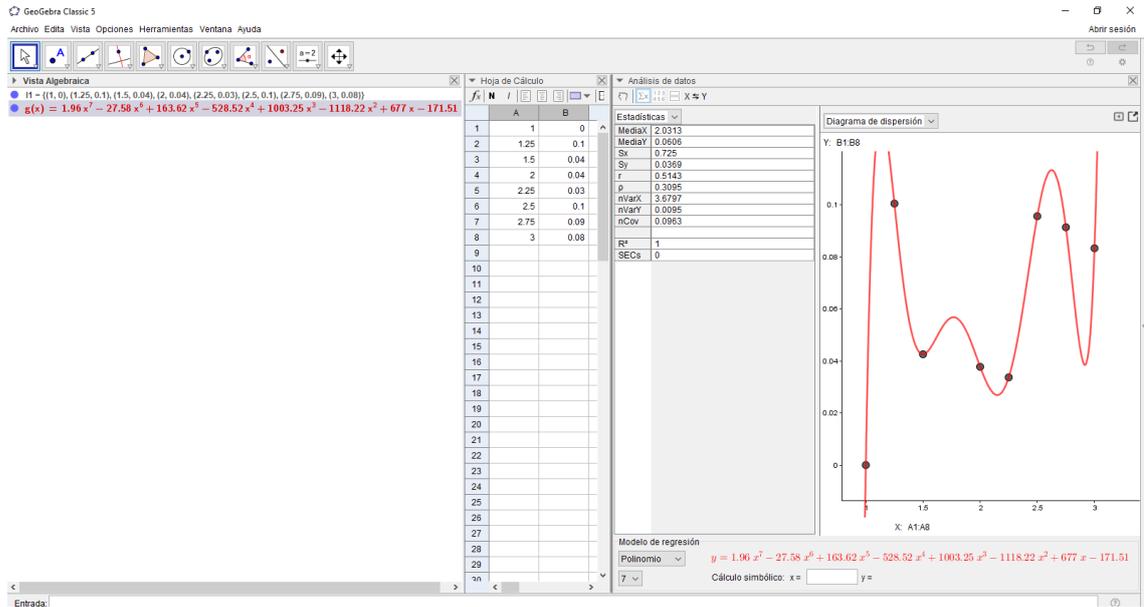
Ho: Retraso(Cepa==1) = Retraso(Cepa==2)

z = -0.408

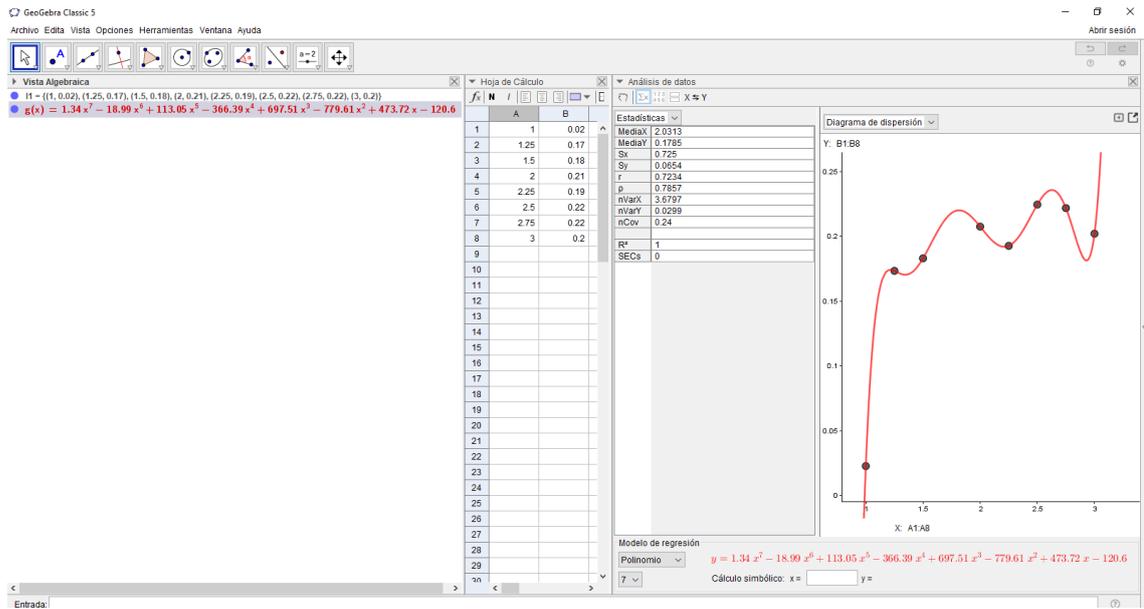
Prob > |z| = 0.6836

Anexo 9. Análisis de comparaciones de porcentaje de retraso entre cepas. Se utilizó el software Stata 10.0 para primero, determinar si los datos de retraso por cepa seguían una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk), y segundo para evaluar si los datos de retraso difieren significativamente entre cepas (prueba suma de rangos de Wilcoxon). Abreviaturas: Cepa 1 = Tab5; cepa 2 = WT^{Kn}. Se concluye que los datos de retraso no difieren entre embriones Tab5 y WT^{Kn} (p>0.05).

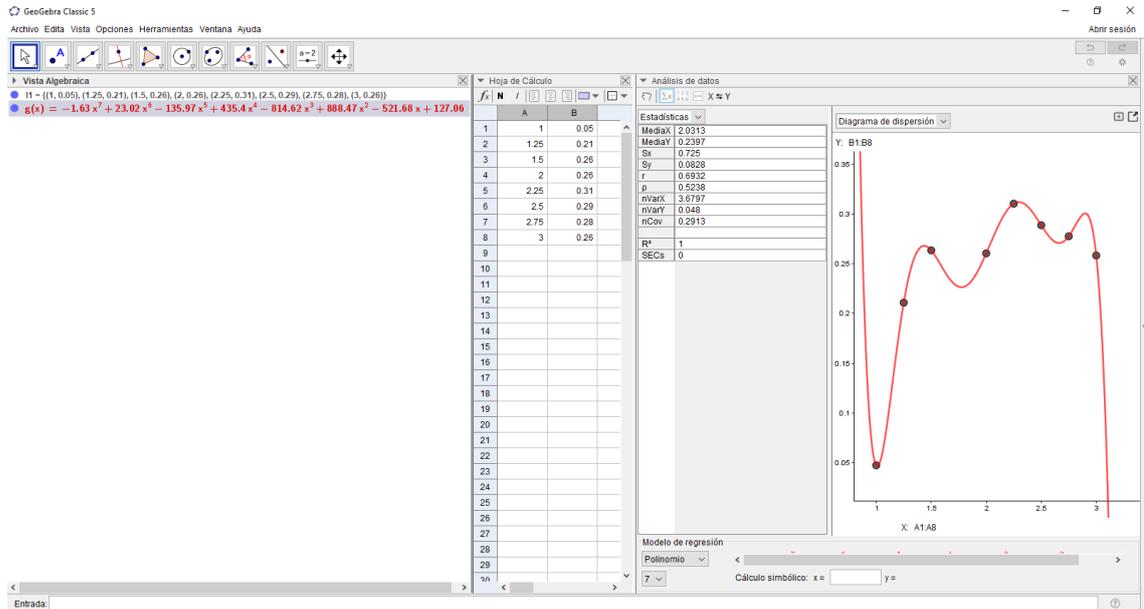
A.



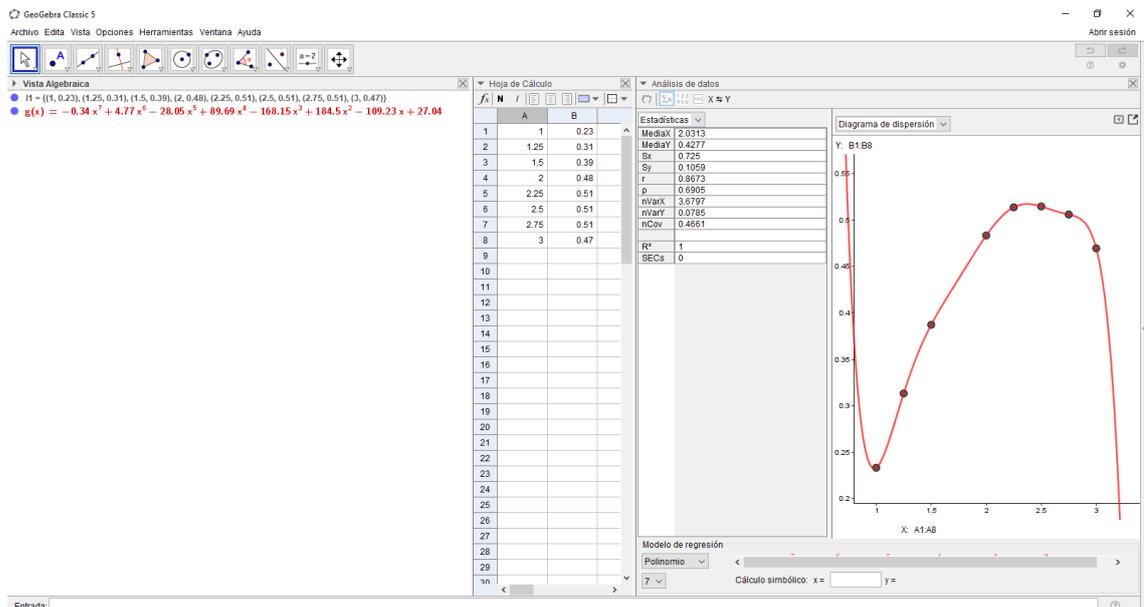
B.



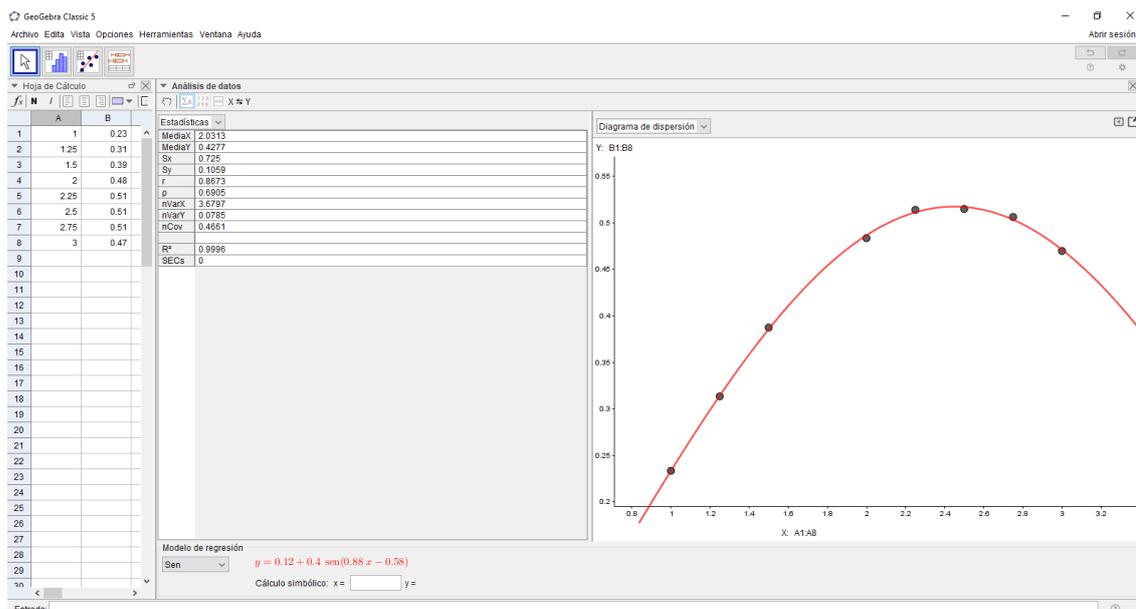
C.



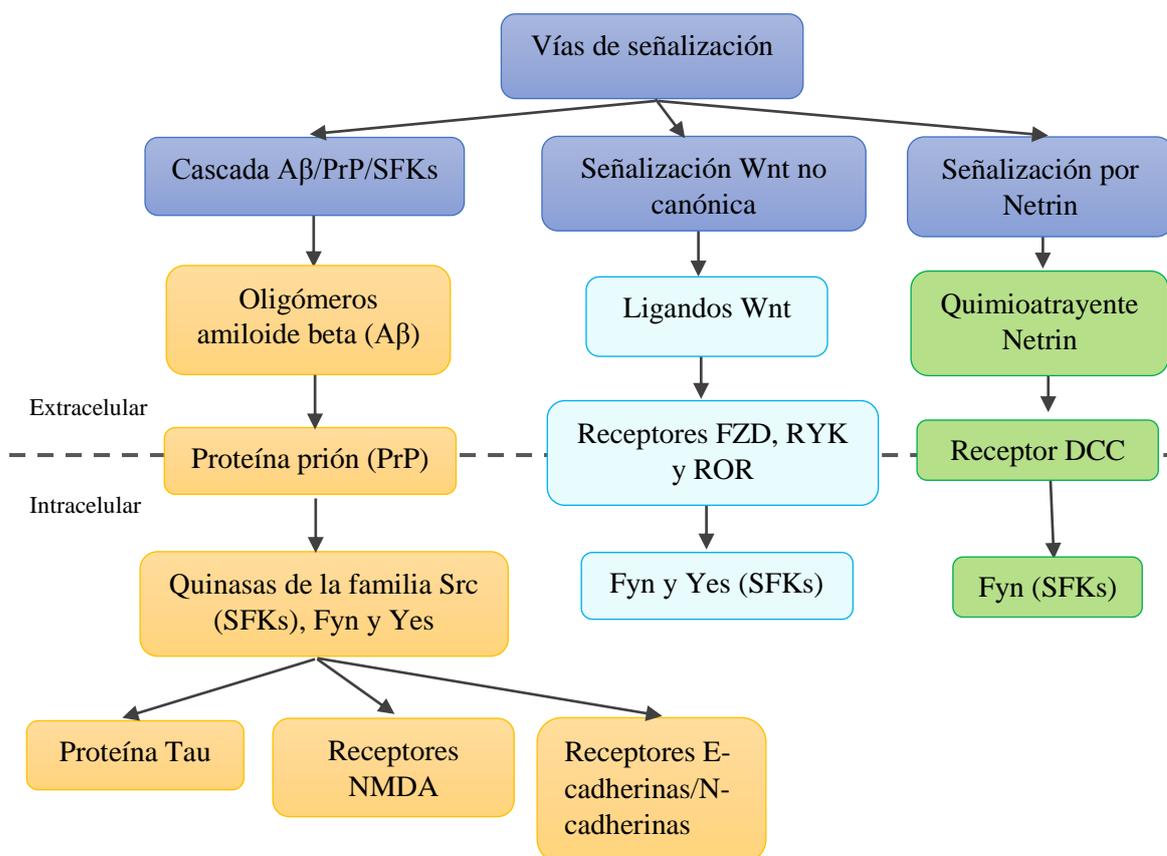
D.



Anexo 10. Análisis de regresiones polinomiales de séptimo grado para curva retraso según EL, HTA y OVL (data proveniente de figura 5.16). Se muestra modelo de regresión polinomial de 7º grado para cada tratamiento con BioCen 128 (1, 5, 10 y 20 µg/ml). Se utilizó como variable “X” el tiempo del desarrollo dado en días y como variable “Y” el porcentaje de retraso del desarrollo dado en decimales. Debido a que el valor de correlación o R^2 fue igual a 1 para las curvas correspondientes a los tratamientos con 1, 5, 10 y 20 µg/ml, se valida el modelo polinómico de 7º grado, y se sugiere utilizar las ecuaciones correspondientes para estimar el efecto retraso (en decimales), para cada tratamiento, de acuerdo al tiempo del desarrollo (en días). (A.) Ecuación para tratamiento con 1 µg/ml de BioCen 128: $Y(x) = 1.96x^7 - 27.58x^6 + 163.62x^5 - 528.52x^4 + 1003.25x^3 - 1118.22x^2 + 677x - 171.51$. (B.) Ecuación para tratamiento con 5 µg/ml de BioCen 128: $Y(x) = 1.34x^7 - 18.99x^6 + 113.05x^5 - 366.39x^4 + 697.51x^3 - 779.61x^2 + 473.72x - 120.6$. (C.) Ecuación para tratamiento con 10 µg/ml de BioCen 128: $Y(x) = -1.63x^7 + 23.02x^6 - 135.97x^5 + 435.4x^4 - 814.62x^3 + 888.47x^2 - 521.68x + 127.06$. (D.) Ecuación para tratamiento con 20 µg/ml de BioCen 128: $Y(x) = -0.34x^7 + 4.77x^6 - 28.05x^5 + 89.69x^4 - 168.15x^3 + 184.5x^2 - 109.23x + 27.04$.



Anexo 11. Análisis de regresión sinusoidal para curva retraso según EL, HTA y OVL, del tratamiento con 20 µg/ml de BioCen 128. Adicionalmente al modelo y ecuación referidos en *fig. 7D*, se encontró que el modelo de regresión sinusoidal también puede ser usado para estimar el comportamiento de retraso con tratamiento de 20 µg/ml ($R^2=1$). La ecuación es $Y(x) = 0.12 + 0.4 \text{ sen}(0.88x - 0.58)$, donde la variable “X” es el tiempo del desarrollo dado en días y la variable “Y” es el porcentaje de retraso del desarrollo dado en decimales.



Anexo 12. Diagrama de posibles vías de señalización moduladas por BioCen 128. Los efectos de BioCen 128 sobre el desarrollo embrionario del pez cebra, tales como el retraso del desarrollo embrionario a partir de la gastrulación, y la variación en la navegación y crecimiento axonal de las neuronas motoras primarias de la médula espinal; podrían estar asociados a la vía PrP/SFKs y/o a las señalizaciones mediadas por Wnt y Netrin (*ver Discusión*).