

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“Alberto Cazorla Talleri”



**Estandarización de técnicas neuroanatómicas y
conductuales para evaluar el rol de la proteína priónica
en el desarrollo del sistema nervioso del pez cebra**

Tesis para optar el grado de Licenciado en Biología

Brenda Delfín Barandiarán

Lima - Perú
2021

Asesor: Prof. George Edward Málaga Trillo, Ph.D.

Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo

ÍNDICE

RESUMEN	5
SUMMARY	6
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 ENFERMEDADES PRIÓNICAS.....	9
1.2 “PRIÓN” Y LA PROTEÍNA PRIÓNICA.....	10
1.3 PROPAGACIÓN Y REPLICACIÓN DE PRIONES.....	12
1.4 ROLES BIOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA.....	16
1.5 ENFOQUES EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA	18
1.6 EL PEZ CEBRA COMO MODELO ANIMAL.....	19
1.7 EL PEZ CEBRA Y EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA.....	20
1.8 ENFOQUE DEL PROYECTO	22
2. HIPÓTESIS.....	26
3. OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GENERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28

4.1	MATERIALES	28
4.1.1	Reactivos.....	28
4.1.2	Soluciones y <i>buffers</i>	28
4.1.3	Materiales de bioterio.....	30
4.1.4	Equipos	30
4.1.5	Materiales de vidrio, plástico y otros	31
4.1.6	Programas informáticos.....	31
4.2	MÉTODOS	32
4.2.1	Mantenimiento de peces adultos	32
4.2.2	Líneas de pez cebra utilizadas	32
4.2.3	Uso de embriones	33
4.2.4	Puesta de cruces – obtención de embriones	34
4.2.5	Microinyecciones	35
4.2.6	Comparaciones morfológicas y neuroanatómicas	37
4.2.7	Estudios conductuales	43
5.	RESULTADOS	48
5.1	ANÁLISIS MORFOLÓGICOS GENERALES: CONTROLES VS. MORFANTES	48

5.2	ANÁLISIS NEUROANATÓMICOS, ETAPA 1: SELECCIÓN DE ANTICUERPOS PRIMARIOS	52
5.3	ANÁLISIS NEUROANATÓMICOS, ETAPA 2: CARACTERIZACIÓN DE PATRONES DE FLUORESCENCIA DE LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS EN CONTROL Y COMPARACIÓN CON MORFANTES....	60
5.4	ANÁLISIS NEUROANATÓMICO, ETAPA 3: DESCRIPCIÓN DE ESTRUCTURAS NERVIOSAS EN ORGANISMOS CONTROL Y COMPARACIÓN CON MORFANTES	81
5.5	ANÁLISIS CONDUCTUALES	101
6.	DISCUSIÓN.....	113
6.1	EL USO DE PEZ CEBRA EN EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA	113
6.2	UTILIDAD DE LOS EXPERIMENTOS CON MORFOLINOS	114
6.3	SELECCIÓN DE ANTICUERPOS PRIMARIOS PARA EL ESTUDIO DE PrP2	118
6.4	EFFECTOS A NIVEL NEUROANATÓMICO DEL KNOCKDOWN DE PrP-2	125
6.5	EFFECTOS A NIVEL CONDUCTUAL DEL KNOCKDOWN DE PrP-2...	130
7.	CONCLUSIONES.....	135
8.	REFERENCIAS.....	136

RESUMEN

La proteína priónica (PrP) es patogénica cuando está anormalmente plegada, causando las llamadas “encefalopatías espongiiformes transmisibles”. Además, la evidencia reciente indica que PrP media la muerte neuronal en el mal de Alzheimer. Sin embargo, se sabe muy poco sobre los complejos roles fisiológicos que cumple en su estado natural, haciendo necesario elucidar su contribución a los mecanismos moleculares que subyacen la neurodegeneración.

Los embriones de pez cebra (*Danio rerio*) tienen muchas ventajas como modelo animal: su desarrollo es externo y rápido, son transparentes, se puede obtener muchos de ellos de una sola cruda y poseen alta homología genética y similitudes fisiológicas con humanos. El pez cebra expresa dos proteínas ortólogas de la PrP mamífera: PrP-1, mediando adhesión celular ubicuamente en blástula y gástrula, y PrP-2 que es más parecida a la proteína priónica de mamíferos tanto en su distribución subcelular como en su patrón de expresión en el sistema nervioso, pero de la que se conoce menos. Así, proponemos profundizar el estudio de los roles fisiológicos de la PrP a través del análisis funcional de PrP-2 en embriones de pez cebra.

En este proyecto se aplicó dos enfoques experimentales para evaluar efectos a nivel celular y conductual de la disminución (“*knockdown*”) de PrP-2 inducida por la microinyección de oligonucleótidos antisentido de morfolinós en embriones tempranos: usando inmunohistoquímica y microscopía confocal, visualizamos estructuras neuroanatómicas afectadas en embriones de 24 y 48 horas post-fertilización, experimentos que fueron complementados con estudios conductuales en larvas de 5 y 7 días post-fertilización, dando un posible contexto fisiológico para los fenotipos hallados y sugiriendo nuevos enfoques.

Nuestros resultados con ambas técnicas combinadas proporcionan información relevante del funcionamiento de la PrP en el desarrollo neural. En organismos tratados, observamos alteraciones importantes en gangliogénesis y axogénesis, posiblemente por una alterada comunicación celular mediada por PrP con proteínas como N-cadherina o NCAM. Además, se anotaron cambios en patrones de nado, consistente con alteraciones de estructuras o vías mediadas por neurotransmisores como GABA y glutamato. Finalmente, nuestro estudio aporta recomendaciones a tener en cuenta en el futuro para estudiar la función de la PrP.

Palabras clave: pez cebra, neurodegeneración, proteína priónica, biología del desarrollo, morfolino, inmunohistoquímica, microscopía confocal, estudios conductuales.

SUMMARY

The prion protein (PrP) is pathogenic when abnormally folded, causing the so-called Transmissible Spongiform Encephalopathies. Current evidence indicates that it also mediates neuronal death in Alzheimer's disease. Nevertheless, little is known about the complex physiological roles it fulfils in its natural state, making it necessary to elucidate its contribution to the molecular mechanisms that underlie neurodegeneration.

Zebrafish (*Danio rerio*) embryos display many advantages as animal model: they are transparent, develop fast and externally, it is easy to obtain large offspring sizes from one couple and present a high degree of genetic and physiological homology with humans. Zebrafish express two proteins orthologous to the mammalian PrP: PrP-1, which mediates cellular adhesion in blastula and gastrula, and PrP-2, which is more similar to the mammalian PrP in terms of subcellular localization and expression pattern in the nervous system. There is scarce information about PrP-2, though. Thus, this work aims at deepening our knowledge of the physiological roles of PrP via the functional analysis of PrP-2 in zebrafish embryos.

In this study, we applied two experimental approaches to evaluate the cellular and behavioural effects of the PrP-2 knockdown induced by microinjection of morpholino oligonucleotides in early embryos. For this, we used immunohistochemistry and confocal microscopy to visualize abnormally-developed neuroanatomical structures in 24 and 48 hours post-fertilization embryos, experiments that were complemented with behavioural analyses in 5 and 7 days post-fertilization larvae, providing a possible physiological context to the neuroanatomical phenotypes identified and suggest further experimental approaches.

Our results with both techniques yield relevant information about the function of PrP in neural development. In treated organisms, we observed alterations during gangliogenesis and axogenesis, possibly as a result of disrupted cell communication in turn mediated by the deregulation of PrP-dependent adhesion proteins like N-cadherin or NCAM. In addition, some changes in larval swimming patterns were noted, consistent with the potential alteration of neuroanatomical structures and pathways mediated by neurotransmitters such as GABA and glutamate. Finally, our work provides recommendations for future studies on PrP function.

Keywords: zebrafish, neurodegeneration, prion protein, developmental biology, morpholino, immunohistochemistry, confocal microscopy, behavioral test.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Las enfermedades priónicas, también llamadas “encefalopatías espongiformes transmisibles” (EETs, o TSE por sus siglas en inglés para *Transmissible Spongiform Encephalopathies*), son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas que afectan el sistema nervioso central. Son ejemplos de estas el scrapie en ovejas y la encefalopatía espongiforme bovina así como el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y el insomnio familiar fatal en humanos (1).

El scrapie es particularmente una de las TSEs que mayor interés ha generado, ya que ha afectado a ganado ovino en Europa por al menos tres siglos (2). A comienzos del siglo XX cobró aún mayor protagonismo cuando, en Escocia, se registró aproximadamente 1500 ovejas con síntomas de scrapie (temblores, incapacidad de mantenerse de pie, movimientos incontrolados). Este hecho ocurrió dos años después de que cerca de 18 000 ovejas -dentro de ellas las 1500 enfermas- hayan sido inmunizadas contra el virus de encefalomielitis ovina, con una vacuna hecha a partir de tejido de bazo y cerebro de ovejas (3). Este protagonismo y este incidente en particular fueron clave para que las entonces desconocidas TSEs tengan un poco de atención y para que eventualmente se entienda mejor sus mecanismos de transmisión.

Por otro lado, el kuru, una rara enfermedad endémica de Nueva Guinea -específicamente confinada entre la tribu de los Fore (2)- se caracterizaba básicamente por temblores y ataxia locomotriz como síntomas, teniendo siempre un desenlace fatal. Todo esto era atribuido por los Fore a la posesión de espíritus y a brujería (4). Dada su innegable delimitación geográfica y la atípica distribución de la población afectada (la mayor parte de los afectados eran niños, mujeres y ancianos (2)), la hipótesis más apoyada a mediados del siglo XX era que el kuru tenía origen genético, pero se desencadenaba de alguna manera por el entorno (5), hipótesis que se apoyó en el nulo éxito de transmitir kuru a otros animales (2), debilitando así la idea de que se contraía por contagio. No fue sino hasta 1959 que William Hadlow, mediante una carta al editor de la revista *The Lancet* (6), resalta que dado que el scrapie y el kuru eran

enfermedades con características tan particulares y nunca antes vistas -sobre todo desde el punto de vista histopatológico y etiológico- era imposible ignorar el enorme parecido entre ellas y que cabría suponer una etiología común e insólita. Las similitudes que señala Hadlow en su escrito “*Scrapie and Kuru*” van desde los síntomas en sí hasta los largos períodos de incubación, características histopatológicas del tejido dañado, endemia, incidencia en poblaciones afectadas, patógeno causante bastante elusivo, entre otros. El aporte de esta observación resultó ser fundamental y determinante. Finalmente, Hadlow sugiere usar primates para inocular el posible patógeno causante de kuru, basándose en que el del scrapie pudo infectar cabras. Dado esto y después de años de experimentar con distintas concentraciones de inóculo del patógeno y tiempos de incubación de la enfermedad, el grupo de Carleton Gajdusek y colaboradores lograron transmitir kuru a chimpancés (7). Así, se fortaleció la hipótesis de que el kuru y el scrapie se asemejaban no casualmente sino que tendrían las mismas bases biológicas. Con estos experimentos se comenzó también a dar idea de una inusual barrera interespecífica en cuanto a la transmisión del patógeno. Por otra parte, la implementación de otros modelos animales para el estudio de estas patologías, como el ratón en 1961 y el hámster sirio en 1980 (8), aceleraron la obtención de hallazgos sobre el agente infeccioso, cuya naturaleza hasta ese momento aún permanecía desconocida (3). En cuanto al kuru, su transmisión se ve explicada dada la práctica de rituales caníbales en la tribu de los Fore (2).

1.2 “PRIÓN” Y LA PROTEÍNA PRIÓNICA

Al haberse constatado que el kuru era una enfermedad transmisible, fue posible desarrollar distintos modelos y estrategias experimentales, pudiéndose corroborar después de muchos estudios con diversos enfoques que el agente infeccioso aparentemente carecía de ácidos nucleicos, que estaba compuesto completa o mayormente por proteína y que, aunque variante, su tamaño era muy pequeño como para ser siquiera un virus (3). A la luz de estas evidencias, en 1982, Stanley Prusiner propone el término “prión” para designar a partículas pequeñas infecciosas de naturaleza proteica (3). Como era de esperar, la idea de “prión” revolucionó el campo de las enfermedades infecciosas.

Desde entonces, los avances en la biología de priones han sido importantes. La evidencia acumulada hasta hoy muestra que son, en efecto, partículas netamente proteicas. Se descubrió que la proteína que forma los priones causantes de enfermedades como el kuru, scrapie, entre otras TSE, es una forma anormalmente plegada de la llamada “proteína priónica” (PrP) (9). La proteína priónica puede coexistir en dos isoformas (Figura 1): PrP^C (por “celular”, i.e. en su forma nativa) y PrP^{Sc} (por "scrapie", refiriendo a la forma anormalmente plegada de PrP^C).

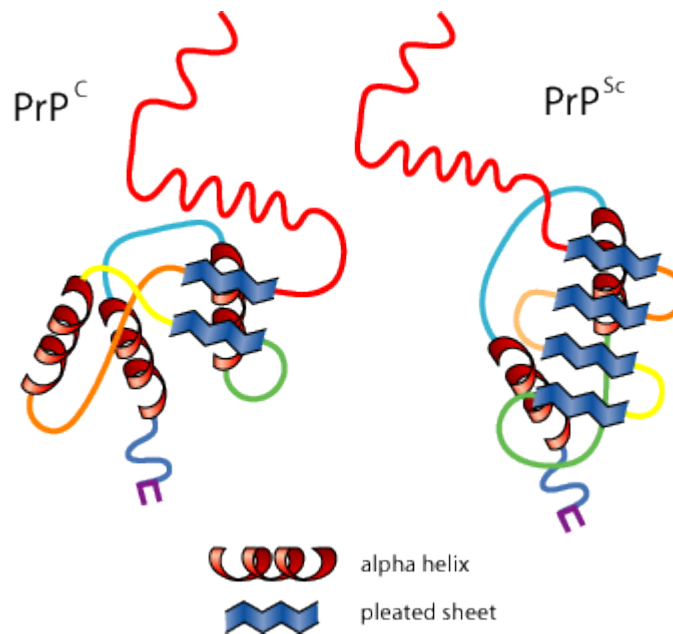


Figura 1. Esquema de representación de la estructura tridimensional de la PrP^C (izquierda) y la PrP^{Sc} (derecha). Resalta la diferencia en estructuras secundarias, pasando de tres a dos alfa hélices y de dos a tres betas plegadas en la conversión de la proteína priónica celular a scrapie. Se muestra en el lado inferior la leyenda de las estructuras secundarias: *alpha helix*, alfa hélice; *pleated sheet*, hojas beta plegadas. Obtenido de: <https://www.scq.ubc.ca/prions-infectious-proteins-repsonsible-for-mad-cow-disease/>

Se descubrió que PrP^C se encuentra normalmente expresada en células de tejidos u organismos sanos (10), mayormente en cerebro de animales adultos (10, 11), incluido humanos (12). Además, se supo que era una proteína codificada a partir del genoma de los

hospederos -y no a partir de algún agente exógeno- (10) gracias a que previamente se identificó parte de la secuencia de aminoácidos de PrP^{Sc} (13). Una de las principales características halladas hasta ese momento era que PrP^C era mucho más susceptible a agentes denaturantes que PrP^{Sc}: en mamíferos, PrP^C es una proteína de alrededor de 34 kD, sensible a proteinasa K, mientras que PrP^{Sc} (del mismo peso molecular que PrP^C) al ser tratada con proteinasa K genera un residuo polipeptídico indigerible de 27 a 30 kD (9).

1.3 PROPAGACIÓN Y REPLICACIÓN DE PRIONES

La manera en la que el prión se difunde y propaga en el organismo infectado fue también una de las primeras grandes preguntas que surgieron. Se encontró evidencia que señalaba que en caso de inoculación fuera del sistema nervioso (como con las vacunas para ovejas en Escocia del siglo XX) o consumido el prión por vía oral (como en el caso de canibalismo en los Fore), el prión es transportado hacia el sistema nervioso vía el sistema linfático (14). Estas evidencias muestran, por ejemplo, que en ratones que producen PrP, pero que carecen de linfocitos B maduros, no se da el transporte de priones hacia el sistema nervioso central (15).

La idea de una “barrera interespecífica”, que comenzó como una posibilidad, fue progresivamente cobrando robustez hasta ser otra de las intrigantes características en cuanto a la transmisión de priones: los priones difícilmente se transmiten entre diferentes especies, algo observado desde los primeros experimentos en enfermedades priónicas, conocimiento que permitió evaluar el contagio de humanos por contacto con ovejas o ganado vacuno infectado (9). Así, estudios en los que ratones eran muy resistentes a ser infectados por priones de hámster demostraron que podían hacerse susceptibles si estos expresaban PrP de hámster en vez o además del propio (16, 17).

La noción de que la PrP es la proteína que conforma los priones se ve sustentada por que en ratones genéticamente manipulados que carecen de PrP^C no se propagan los priones ni desarrollan la enfermedad una vez inoculados con estos (18). Además, ratones que tienen solo una copia de *prnp* (el gen que codifica para PrP) desarrollan la enfermedad con cierto

retraso (19), mientras que los que sobreexpresan la proteína la desarrollan bastante más temprano (20). Posibles diferencias entre enfermedades priónicas han sido relacionadas exclusivamente a variantes al gen *prnp*, aunque aún no se descarta que otro gen pueda tener algún efecto indirectamente (21). Luego, otros experimentos confirmaron esto desde otros enfoques. Se ha visto que ratones *knockout* para PrP cuyos cerebros recibieron trasplantes de neuroectodermo (que sí producía PrP) sí desarrollaban la enfermedad priónica al ser inoculados con priones (22) y no la desarrollaban si ratones con el mismo trasplante eran inoculados en cualquier zona lejos del trasplante (23), a diferencia de ratones con fenotipo salvaje donde la infección se daba indistintamente del lugar donde se aplique el inóculo, mostrando una vez más que la presencia de PrP es necesaria para la propagación de los priones y el desarrollo de la enfermedad.

Las características de los priones se entienden mejor a la luz de los hallazgos sobre PrP^{Sc}. PrP^{Sc} es altamente resistente como proteína (3) y se ha encontrado formando agregados fibrilares en tejido infectado, reuniendo también características propias de un amiloide (24). En cuanto a su estructura, PrP^{Sc} se caracteriza por una mayor proporción de estructuras de hojas beta que PrP^C (Figura 1), favoreciendo termodinámicamente su insolubilidad y, así, la formación de agregados proteicos. Actualmente, a través de distintas pruebas biofísicas, se tiene data que apoya la idea que PrP^{Sc} se pliega formando una estructura beta-solenoide de cuatro escalones, lo que favorecería no solo apilamiento, sino que también la autocatálisis para convertirse de PrP^C a PrP^{Sc} (25, 26).

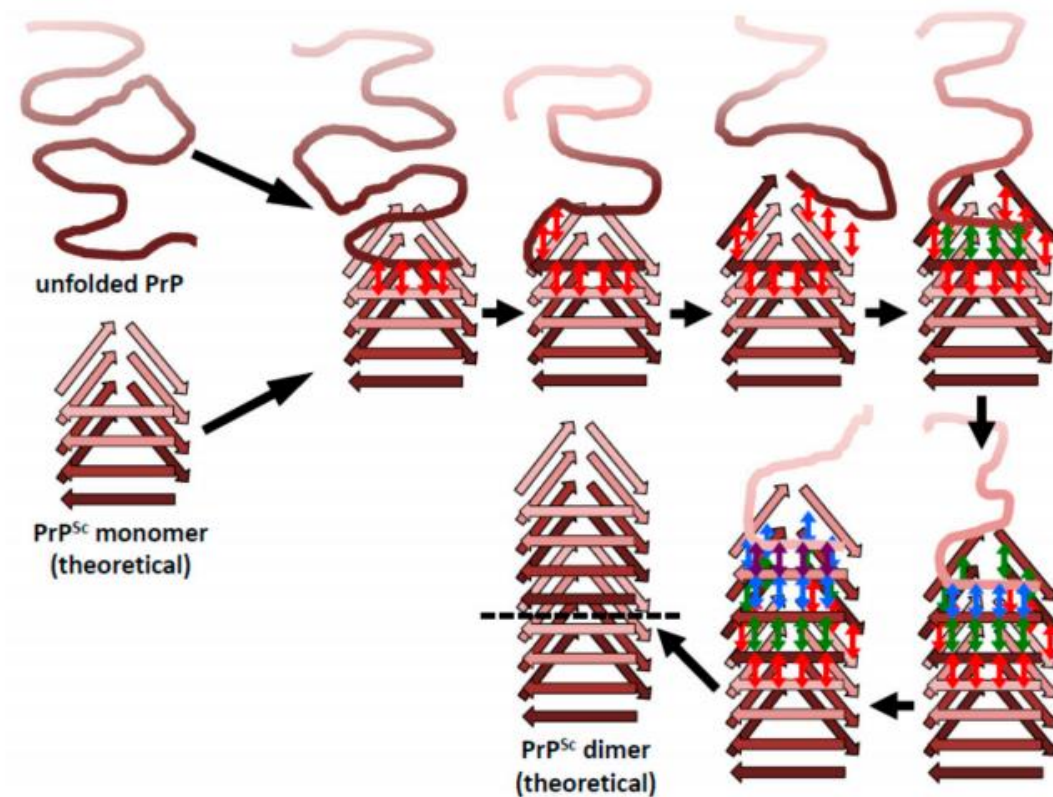


Figura 2. Esquema de la estructura beta solenoide de 4 peldaños propuesta para el monómero de PrP^{Sc} y su posible rol en la propagación de los priones. La estructura de cuatro peldaños de beta solenoide propuesta para PrP^{Sc} sugiere una explicación a cómo una PrP sin plegar es inducida a tomar la conformación propia de PrP^{Sc}, ocurriendo esto como resultado de la interacción entre PrP y PrP^{Sc}. Imagen obtenida de Wille y Requena, 2018.

Para poder abordar la replicación del prión dentro del organismo infectado, la hipótesis más aceptada es la de la solo proteína (9, 27), en la que se propone que una proteína priónica mal plegada, o PrP^{Sc}, interactúa con la proteína priónica nativa, o PrP^C, induciendo el mal plegamiento en la segunda y desatando un proceso en cadena que es dependiente de la concentración de PrP^C. Es interesante notar que se ha observado que a pesar de la propagación de PrP^{Sc}, la expresión de PrP^C (medida a través de la cantidad de ARNm) se mantiene constante en las células de tejido infectado (10). De esta hipótesis, algunas variantes

han sido bastante revisadas y son consideradas las más importantes (14, 21). La primera variante, o “modelo de replegamiento”, propone un mal plegamiento inducido en el que PrP^{Sc} actúa como molde para que una PrP^C cambie su conformación tridimensional. Como esto requeriría disminuir una alta energía de activación, se ha propuesto la existencia de una proteína extra tipo chaperona (“proteína X”) que mediaría la conversión. En otra variante, llamada “hipótesis de nucleación”, se especula que PrP^C y una forma de “pre-PrP^{Sc}” coexisten normalmente en un equilibrio termodinámico en la membrana celular y que la partícula infecciosa se genera cuando los pre-PrP^{Sc}, por cuestiones estocásticas, se encuentran y forman grandes agregados que luego se rompen, formando estos nuevos núcleos de reclutamiento de PrP^{Sc} y, así, nuevos agregados. Una tercera variante sugeriría que PrP^{Sc} se recluta durante la biogénesis de PrP^C, siendo esto menos probable por el extremadamente rápido plegamiento de PrP^C (28). La hipótesis de solo proteína es ahora aún más sólida ya que se ha logrado amplificar el PrP^{Sc} in vitro, en una reacción donde la concentración de PrP^C es el factor limitante (29).

Una vez disperso y propagado el prión, PrP^{Sc} se acumula en el cerebro (10, 30) formando agregados insolubles y causando muerte neuronal. En qué región del cerebro se acumule depende de otra característica propia más de las enfermedades priónicas: estas pueden formar distintas cepas. Se entiende por “cepa”, en este caso, a un determinado tipo de molécula de PrP^{Sc}, diferenciada de otras no por la estructura primaria de la proteína sino por cambios discretos en la conformación tridimensional y el patrón de glicosilación de esta (31). En un mismo organismo pueden coexistir varias cepas, pero predominará aquella que se vea favorecida por alguna condición en el medio, como una selección Darwiniana a nivel molecular (31). Cada cepa puede producir un fenotipo puntual en la enfermedad (i.e. distintos síntomas debido a una distinta distribución en el cerebro) y tener un cierto periodo de incubación específico de la enfermedad (14). De nuevo desafiando lo conocido, estas diferencias no se deberían a la secuencia primaria de la proteína, pues ratones homocigotos para *prnp* pueden propagar distintas cepas de priones. Surgió así la idea de la “hipótesis de conformación”, que propone que la diferencia entre cepas depende de las conformaciones secundarias y/o terciarias que PrP^{Sc} adopte. Esto está apoyado por un estudio en el que se observó que PrP^{Sc} obtenido de hámsters infectados con distintas cepas era clivado con

proteínasa K en distintas partes, dejando péptidos insolubles de distintos tamaños (32) y que los PrP^{Sc} de distintas cepas tenían distintos patrones de glicosilación (33).

1.4 ROLES BIOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA

Las consecuencias a nivel celular del mal plegamiento de PrP no están completamente claras. Por un lado, la interacción de PrP^{Sc} con PrP^C parece inducir neurotoxicidad en un proceso mediado por especies reactivas de oxígeno y que desencadena la respuesta a proteínas desplegadas en el retículo endoplasmático, además de la alteración de la expresión de diversos genes (34). Por otro lado, se debe recordar que la PrP^{Sc} no tiene efecto patogénico *per se*, dado que organismos inoculados con esta que no expresan PrP^C no manifiestan ningún síntoma de enfermedades priónicas (22). Sin embargo, hay otros factores a tener en cuenta. Dado que el ARNm de PrP no se altera durante la infección y que PrP^{Sc} se propaga en tejido infectado a expensas de PrP^C, es lógico pensar que la neurotoxicidad se origina en la pérdida o cambio de función de PrP^C y, para abordar esto, hace falta caracterizar molecular y fisiológicamente a la proteína priónica celular.

PrP^C es una proteína altamente conservada en la evolución de vertebrados (35), apoyando la idea de que cumpliría un rol fisiológico importante (36). Tiene dos dominios: uno N-terminal hidrofílico estructuralmente flexible y un C-terminal globular (37). En el extremo N-terminal, la proteína empieza en un péptido señal -que no está presente en la proteína madura- que la lleva al retículo endoplasmático para terminar su traducción como si fuese una proteína de membrana tipo I. Después, se encuentran tándems de repeticiones de aminoácidos, para terminar con una corta región hidrofóbica, a la cual le sigue el dominio globular, caracterizado por tener 3 estructuras alfa hélice y 2 hojas beta, además de dos cisteínas que formarán un puente disulfuro, dos sitios de N-glicosilación, y una señal para ser anclada a la membrana por un glucofosfatidil inositol (GPI) (38).

Si bien la información disponible sobre las funciones de la PrP es compleja, salvo algunas excepciones, estos detalles en modificaciones post-traduccionales deben ser necesariamente tomados en cuenta en el esfuerzo de esclarecer los roles de esta. Por un lado, ya que los azúcares son por naturaleza hidrofílicos, la glicosilación hace a una proteína más soluble, permitiéndole interactuar con más moléculas alrededor e induciendo cambios conformacionales en esta, modificando por consecuencia su función (39). La glicosilación es necesaria para el correcto plegamiento de algunas proteínas en su forma funcional. Además, sabiendo que hay distintos patrones de glicosilación para una misma proteína, es interesante inferir que esto incrementa las posibles funciones de una misma cadena polipeptídica, siendo una explicación de lo conservado de la glicosilación de proteínas en la evolución (39, 40). En el contexto de la proteína priónica, es imperativo recordar que la glicosilación es especialmente importante en proteínas de membrana, pues los glúcidos actúan como ligandos que permiten la interacción de la proteína glicosilada con otras proteínas de membrana como aquellas relacionadas a adhesión o a vías de señalización, además de mediar la invasión de algunos patógenos (40). Por otro lado, el que esté anclada a la membrana celular mediante un GPI le confiere importantes características, como que forme parte de balsas lipídicas, donde puede funcionar como ligando o receptor para otras proteínas, mediando así diversas vías de señalización (41), sobre todo y probablemente a través de su dominio flexible (42). Es interesante que su localización en la membrana también estaría relacionada a la propagación de PrP^{Sc}, pues en ratones que expresan PrP soluble -sin la señal de unión a GPI y secretado- tanto la replicación de los priones como la aparición de síntomas de enfermedades priónicas demora mucho más que en los controles o simplemente no ocurre, a menos que los priones sean inoculados intracerebralmente (38) . Entre algunas de las interacciones más importantes y más sólidamente demostradas está aquella con la proteína NCAM (43), con la que interactúa en las balsas lipídicas y que resultaría en la activación de las quinasas Src, mediando comunicación celular en sistema nervioso (44). Otra manera en la que PrP interviene en la activación de la vía de las Src es a través de la regulación de E-cadherina (45), siendo importante esta vía en adhesión y diferenciación celular (46). La data también sugiere que PrP tendría un efecto protector ante altas concentraciones de metales y especies reactivas de oxígeno (42), como también regularía directamente el flujo de iones a través de la membrana (47). Se ha mostrado que tanto la ausencia como presencia de PrP -

dependiendo del contexto- media la aparición de fenotipos propios de toxicidad relacionada a señales glutamatérgicas, gabaérgicas y colinérgicas (36, 48) y, directamente relacionado a eso, está involucrada en procesos neurodegenerativos propios de otras enfermedades, como aquel desencadenado por el amiloide beta en la enfermedad de Alzheimer (49, 50). En otro sentido, experimentos extraneuronales señalan a la proteína priónica como mediadora de procesos inmunológicos (36, 42).

Que PrP se encuentre aparentemente mediando tantas funciones es bastante intrigante, pero lo es más que varias de estas funciones probadas han sido luego rebatidas parcial o totalmente (42). ¿Cuál es exactamente su función si, al parecer, media tantos procesos distintos, en tiempos distintos y en situaciones distintas? Más intrigante aún, varios animales cuya proteína priónica ha sido noqueada no muestran fenotipos importantes y se desarrollan aparentemente de manera normal (19).

1.5 ENFOQUES EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA

Queda claro que falta mucho aún por descubrir respecto a la función de la PrP y muchos esfuerzos se hacen desde diversas disciplinas y con diversos modelos experimentales (51). Por ejemplo, importantes avances se han hecho desde la bioinformática, sobretodo para proponer drogas que impidan o ralenticen la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} o la formación de agregados de PrP^{Sc}. Los resultados de experimentos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* también son de gran relevancia. Los primeros han permitido conocer más sobre las interacciones de las proteínas involucradas en sí y su ventaja es que son menos complejos y más reproducibles que los *in vivo*. Sin embargo, no representa lo que ocurre realmente: muchos blancos terapéuticos que han tenido éxito *in vitro* no funcionan en otro tipo de experimentos. En cuanto a los experimentos *ex vivo*, tienen como ventaja el sellar parte de la brecha de reproducción de la realidad de los experimentos *in vitro*, pero la manera de mantener los tejidos entre otras variables propias del modelo hacen que sea más probable obtener resultados diferentes. Así, los modelos *in vivo* son los favoritos porque cumplen con ofrecer

toda la información sobre qué ocurre con un organismo infectado, siendo los más usados las ovejas, chimpancés y, de lejos los más usados, roedores (hámster, ratón, rata). Otros modelos que han permitido hallar interesantes detalles son el pez cebra, la mosca de la fruta y *C. elegans*. El punto débil de los modelos *in vivo* es que es menos controlable: el obtener muestras de organismos vivos o cadáveres hace que muy probablemente se pierdan detalles importantes y sin duda se generen variables extra, teniendo resultados alterados. Todo esto sin contar con las cuestiones éticas en cuanto al trabajo con animales, sobretodo usando mamíferos. Además, usar animales vivos hace, normalmente, que se pierden muchos detalles en cuanto a visualización de fenotipos sutiles.

1.6 EL PEZ CEBRA COMO MODELO ANIMAL

De todos los modelos animales, el modelo de pez cebra tiene mucho que ofrecer para superar justamente los inconvenientes de los modelos *in vivo* (52). Al ser un vertebrado, el parecido a nivel genético, molecular y hasta conductual con los mamíferos es bastante alto, siendo además un sistema mucho más simple. Es bastante manejable y económico, y ya que fue usado amplia y masivamente para estudios en genética, están bien descritos procesos para manipulaciones a ese nivel y son mucho más sencillos y efectivos que en otros modelos animales. Otra de las ventajas, quizá la más importante, es la de los embriones. Es común que una pareja de peces cebra genere hasta 800 o 1000 embriones por cruce, lo que hace que los estudios puedan ser bastante sólidos en cuanto a tamaño de muestra y homogeneidad genética. Además, que los embriones (de 0 días post-fertilización (dpf) a 3 dpf (53, 54)) se desarrollen externamente (fuera del cuerpo de la madre o el padre), además de bastante rápido y sean transparentes, hace de los embriones de pez cebra un modelo ideal para que, con ayuda de técnicas, equipamiento o procedimientos como inmunohistoquímica y microscopía, se constituyan en un excelente modelo para la visualización de procesos celulares y moleculares *in vivo*, algo imposible de lograr en la mayoría de animales modelo y en ningún otro modelo animal vertebrado ampliamente usado. Además, estos procesos pueden ser observados en organismos vivos mediante la generación de embriones transgénicos que expresan proteínas fluorescentes bajo promotores transcripcionalmente activos en determinados tejidos de

interés (55). Algunos ejemplos de procesos biológicos en los que se emplean embriones o larvas de pez cebra para la visualización de procesos celulares y moleculares son: el desarrollo de tejidos (sobre todo del sistema nervioso) (56), migración de células cancerosas (57), desarrollo de células o tejidos trasplantados (58) y desarrollo de granulomas de *Mycobacterium* spp. (59).

Por otro lado, las larvas de pez cebra (de 4 dpf a alrededor de 4 semanas postfertilización (53)) son un excelente modelo animal para estudiar comportamiento, entendido como los patrones de nado en los que se evalúa, por ejemplo, posición respecto al entorno y velocidad en el nado. No solo son un modelo práctico porque permite una mayor solidez estadística sino que también es posible automatizar el rastreo de sus movimientos (60). La integración de tanto estímulos externos como la posibilidad del sistema nervioso de elaborar una respuesta a esto en forma de diversas acciones, en conjunto, resultan en lo que se entiende por comportamiento (61). En este sentido, las larvas de pez cebra, que ya poseen la visión lo suficientemente desarrollada (62), presentan en un modelo simplificado reacciones innatas e instintivas de vertebrados más complejos, como atracción o aversión, ansiedad, búsqueda de alimento, entre otros que, a su vez, están relacionados o correlacionados con determinados circuitos neurales, lo que permite usar este tipo de estudios para, por ejemplo, tamizaje de drogas con efecto en el sistema nervioso (63).

1.7 EL PEZ CEBRA Y EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA

En pez cebra hay dos parálogos de la proteína priónica: PrP-1 y PrP-2, de 606 y 567 aminoácidos, respectivamente (35). Las dos difieren en longitud respecto a las proteínas priónicas de otros vertebrados, pero mantienen todas las regiones conservadas propias de la proteína priónica antes descritas, tanto en el dominio flexible como en el globular. Incluso, los motivos propios del dominio globular de la PrP están bastante conservados entre especies (Figura 3), incluyendo humanos, pollos, ratones, *Xenopus*, pez cebra y otros peces (35, 64), sugiriendo que cumple un rol importante en el sistema nervioso, donde está casi exclusivamente expresada. Otras constantes de la proteína priónica en peces cebra que se

mantiene también en tetrápodos es que la región codante en su gen se encuentra toda en un solo exón, estando solo en algunos casos parte del 3' UTR en el exón siguiente. Además, PrP-1 y PrP-2 están también glicosiladas (64), como la PrP hallada en mamíferos.

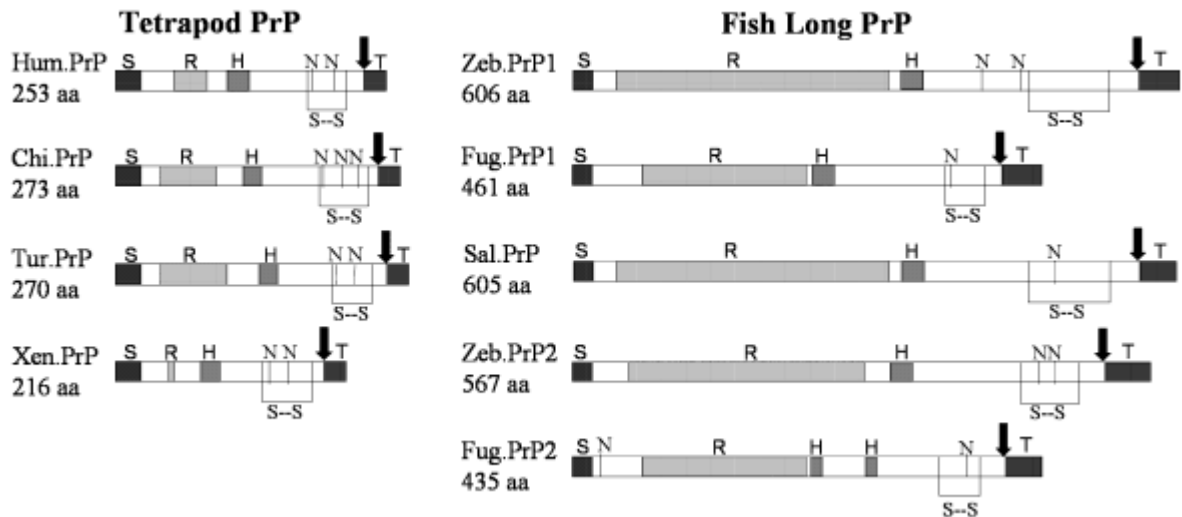


Figura 3. Esquema de las secuencias de aminoácidos de la proteína priónica en diferentes especies. Están representadas las secuencias de aminoácidos de la PrP en tetrápodos (izquierda) y peces (derecha). Hum, humano; Chi, pollo; Tur, tortuga; Xen, Xenopus; Zeb, pez cebra; Fug, Fugu; Sal, salmón. S, péptido señal; R, repeticiones en tándem; H, región hidrofóbica; N, sitio de glicosilación; S-S, puente disulfuro; T, cola hidrofóbica. La flecha indica la zona donde el GPI es añadido para el anclaje de la proteína. Figura adaptada de Cotto et al., 2005.

Ambas proteínas se expresan en el embrión temprano (35, 45, 48), pero sus patrones de expresión difieren. Aunque la literatura muestra algunas discordancias (35, 45, 64), patrones de expresión determinados mediante hibridaciones *in situ* sumado a otros experimentos a nivel celular y molecular como inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia de alta resolución demostraron PrP-1 es un gen de expresión materna (ya que se puede encontrar

transcritos desde la blástula temprana) y en ese contexto espacio-temporal es importante durante la gastrulación para mantener una adecuada adhesión celular (45). Por otro lado, en ese mismo estudio se determinó el patrón de expresión de PrP-2 que, a diferencia de PrP-1, es un gen de expresión cigótica y se expresa en tejido ya determinado o diferenciado que formará el sistema nervioso. Aunque las funciones que cumple PrP-2 en el desarrollo del sistema nervioso de los embriones de pez cebra no han sido estudiadas aún a detalle, se observó que embriones microinyectados con oligonucleótidos antisentido de morfolino (también referidos aquí como “morfolinos”) contra PrP-2 tenían cabezas pequeñas y malformación en los ojos como principales fenotipos (42).

A pesar de ser muy pocos los estudios disponibles sobre PrP-2, algunos de estos pueden ser tomados como antecedentes a este proyecto. En cuanto a estudios donde se usó fluorescencia para determinar posibles roles de la PrP-2, se encontró que esta proteína media el desarrollo de los axones y neuromastos de la línea lateral, siendo defectuoso en embriones donde la traducción de PrP-2 estaba disminuida (65). En cuanto a lo conductual, se ha mostrado que larvas de pez cebra que no producen PrP-2 producto de un noqueo genético mediado por nucleasas con dedos de zinc no presentan funciones motoras alteradas respecto a los controles en condiciones normales, pero sí algunas muy leves cuando se les administra pentilenetetrazol (PTZ), un inductor de epilepsia. En ese mismo estudio se sugiere que PrP-2 media la correcta función de receptores de glutamato (específicamente los NMDAR), un neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso, siendo los animales noqueados ligeramente más sensibles a este ya que llegan a presentar espasmos con aparente relación a los de una epilepsia (45).

1.8 ENFOQUE DEL PROYECTO

Como se comenta en la sección anterior, el conocimiento que se ha reportado hasta el momento acerca de la función de PrP-2 es limitado a observaciones morfológicas en estructuras nerviosas puntuales (línea lateral) y estudios conductuales en condiciones farmacológicas artificiales, no fisiológicas (inducción con PTZ). Si bien estos hallazgos sugieren posibles roles de PrP-2, se requiere estudios funcionales más extensos y utilizando herramientas celulares y moleculares para complementar los estudios genéticos. Por ejemplo, las tinciones con una batería de anticuerpos específicos no sólo abarcan un amplio espectro de estructuras neuronales de relevancia para la neurodegeneración y el neurodesarrollo si no que además proporcionan información sobre antígenos -en su mayoría proteínas de membrana- de suma relevancia para comprender la base molecular de la función nerviosa. Por otro lado, el uso de técnicas conductuales ofrecen una lectura experimental en condiciones fisiológicas, a diferencia de la inducción farmacológica de espasmos. En definitiva, las técnicas incluidas en el presente proyecto pueden ser estandarizadas e implementadas a fin de lograr una herramienta más poderosa para evaluar posibles roles de la PrP-2.

Continuando con la línea de investigación de nuestro laboratorio, este proyecto tiene como objetivo principal validar el empleo de inmunotinciones fluorescentes con una batería seleccionada de anticuerpos primarios, así como de ensayos conductuales para el análisis funcional de la PrP-2. Con este fin, se indujo fenotipos de pérdida de función inhibiendo la traducción de PrP-2 en embriones de pez cebra a través de la microinyección temprana de oligonucleótidos antisentido de morfolino, tratamiento que se aplicó en los primeros estadios de embriogénesis (estadios de 1 a 4 células) (54). Aquellos organismos que fueron tratados con morfolinos serán referidos como “morfantos”. Consideramos dos tipos de análisis para el estudio del efecto de la disminución de PrP-2: uno bajo un enfoque neuroanatómico y otro, conductual. Bajo el enfoque neuroanatómico, los embriones se fijaron en los estadios de *prim-5* y *long-pec* (54), que corresponden a 1 y 2 dpf o, más exacto, a las 24 y 48 horas post-fertilización (hpf), respectivamente (Figura 4).

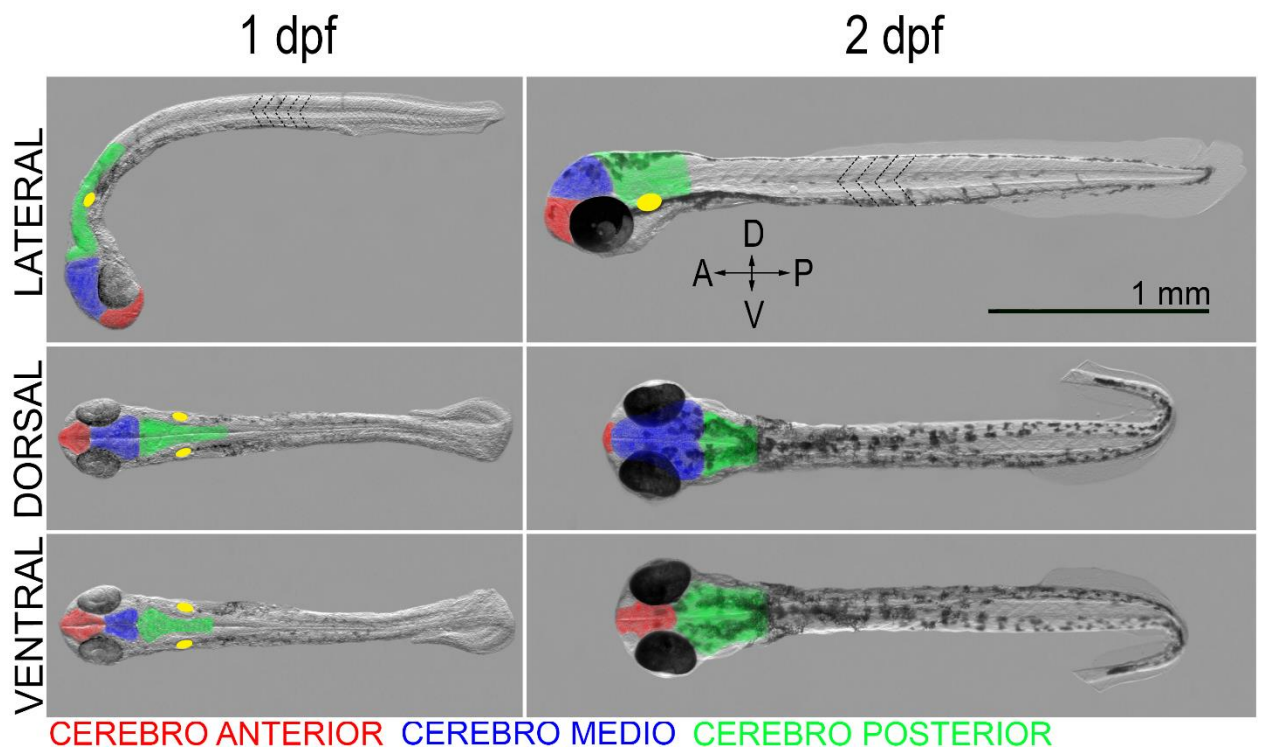


Figura 4. Embriones de pez cebra bajo microscopía de campo claro. Se muestran embriones en estadio *prim-5* (1 dpf) y *long-pec* (2 dpf) y se indica la vista desde la que fue capturada la imagen (lateral, dorsal, ventral). Las regiones más importantes del cerebro se muestran coloreadas y la leyenda de esto se ubica al pie de la figura. Las elipses amarillas señalan la posición y forma de la vesícula ótica. Las líneas punteadas en el centro del tronco de los embriones en posición lateral indican los límites de algunos somites. Fotos tomadas con un objetivo de 1X y un aumento de 25X. En el panel superior derecho, las flechas y letras indican la ubicación convencional de los ejes de desarrollo, siendo: A, anterior; P, posterior; D, dorsal; V, ventral; que aplica para las vistas laterales en ambos estadios.

Después de analizar los cambios generales producidos por la reducción de PrP-2, el siguiente paso fue evaluar las diferencias a nivel neuroanatómico, para lo que buscamos validar el uso de inmunotinciones en este contexto. Con este fin, el proceso se dividió en tres etapas: 1) selección de anticuerpos primarios, 2) descripción de patrones según anticuerpo primario y comparación preliminar de estructuras neuroanatómicas entre controles y morfantes, y 3)

descripción y comparación a detalle de estructuras neuroanatómicas entre controles y morfantes.

De manera análoga, se evaluó el efecto de la pérdida de función de PrP-2 sobre el comportamiento con el fin de hallar más posibles roles fisiológicos de PrP, además de evaluar si existe un correlato con lo observado a nivel tisular o celular, observando el comportamiento en los primeros días de desarrollo y luego comparando los patrones de nado entre los distintos grupos de tratamiento a 5 y 7 dpf sin estímulo ninguno y con estímulos de luz. Señalar las diferencias en el comportamiento es importante pues sugieren de manera más puntual qué circuitos o estructuras nerviosas se han visto funcionalmente comprometidas con la disminución de la PrP-2, así como qué moléculas (por ejemplo, receptores) se podrían encontrar alteradas en cuanto a su función o posicionamiento, ofreciendo un modelo experimental potencialmente robusto para delimitar y profundizar nuestro conocimiento sobre las bases celulares y moleculares del rol de PrP-2 en el desarrollo del sistema nervioso.

2. HIPÓTESIS

El presente es de naturaleza exploratoria y por lo tanto estudio no plantea una hipótesis específica. Sin embargo, apunta a demostrar la utilidad de estas técnicas con hallazgos funcionales concretos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Validar el uso de técnicas inmunohistoquímicas y conductuales para el estudio de la función de la PrP-2 en el desarrollo del sistema nervioso en el pez cebra.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Optimizar la metodología para las inmunotinciones propuestas en embriones de pez cebra. Se halló las condiciones experimentales ideales para la utilización de una batería de anticuerpos primarios en inmunotinciones con el fin de detectar proteínas marcadoras de estructuras nerviosas.

3.2.2 Estandarizar protocolos para el análisis automatizado de patrones de conducta locomotriz en larvas de pez cebra. Se estableció las condiciones y criterios técnicos necesarios para llevar a cabo los experimentos conductuales con el menor sesgo posible, así como para identificar variables que brindarán información relevante.

3.2.3 Establecer el patrón de marcaje que ofrecen los anticuerpos primarios seleccionados. Una vez realizadas las inmunotinciones, se describió el patrón de tinción espacio-temporal de cada anticuerpo, el cual refleja la expresión de proteínas puntuales en determinadas estructuras del sistema nervioso y en ciertos estadios de desarrollo.

3.2.4 Caracterizar patrones de nado normal en larvas de peces cebra. Definidas las condiciones y los criterios necesarios para los experimentos

conductuales, se caracterizó y describió los patrones de nado correspondientes a situaciones control, con el fin de identificar alteraciones en larvas tratadas.

3.2.5 Analizar la calidad de la información obtenida a partir de la aplicación de lo obtenido en los objetivos específicos iii y iv. A partir del enfoque neuroanatómico y conductual ya estandarizados, se procedió a comparar dichos parámetros en embriones o larvas de pez cebra control y en aquellos cuya expresión de PrP-2 ha sido disminuida.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Reactivos

Reactivos utilizados en microinyección y procesamiento de muestras para estudios neuroanatómicos		
Material	Proveedor	Uso
Rojo fenol	Sigma	Microinyección
Morfolino MO-PrP2-1	Gene Tools	Microinyección
Morfolino MO-PrP2-2	Gene Tools	Microinyección
Parafomaldehído (PFA)	Riedel-de-Häen	Fijado de embriones
Tritón X-100	Merck	Inmunotinción
DMSO	Merck	Inmunotinción
Suero de cabra	Sigma Aldrich	Inmunotinción
Anticuerpos primarios	DSHB	Inmunotinción
Alexa flúor 488	Abcam	Inmunotinción
CF 647	Sigma Aldrich	Inmunotinción
DAPI	Thermofisher	Inmunotinción
Glicerol	Sigma Aldrich	Preparación de muestras

4.1.2 Soluciones y *buffers*

Compuestos para la solución madre E3

60X

Reactivo	Concentración final
NaCl	297.74 mM
KCl	10.73 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	19.12 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	24.05 mM

Reactivos y concentraciones para la solución <i>buffer</i> Danieau 1X	
Reactivo	Concentración final
NaCl	58 mM
KCl	0.7 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 mM
Ca(NO ₃) ₂	0.6 mM
HEPES <i>buffer</i> pH 7.6	5 mM

Reactivos y concentraciones para el <i>buffer</i> PBS	
Reactivo	Concentración final
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM

4.1.3 Materiales de bioterio

Materiales de bioterio para mantenimiento de peces adultos, con proveedores y usos indicados		
Material	Proveedor	Uso
Zebtec Active Blue Stand Alone	Tecniplast	Mantenimiento peces
Huevos de Artemia salina	Brine Shrimp Direct	Mantenimiento peces
Vipagran	Sera	Mantenimiento peces
Cajas de cruce de 1.8 L	Tecniplast	Obtención de embriones

4.1.4 Equipos

Equipos utilizados para realizar y procesar experimentos, con proveedores y usos indicados		
Material	Proveedor	Uso
Micromanipulador Bachofer 7410	Bachofer	Microinyección
Microinyector PV820 Pneumatic Pico Pump	World precision instruments	Microinyección
Stemi 508	Carl Zeiss Microscopy	Microinyección, preparación de muestra, observaciones en campo claro
LSM 880	Carl Zeiss Microscopy	Obtención de imágenes
Computador	HP	Obtención de imágenes, análisis de imágenes, procesamiento estadístico
Zebrabox	ViewPoint	Análisis conductual

4.1.5 Materiales de vidrio, plástico y otros

Listado de todos los materiales de vidrio, plástico y otros; usados a través de todo el proyecto, indicando su proveedor y su uso		
Material	Proveedor	Uso
Placas petri 90 mm	Euro Lab	Obtención de embriones
Tubos con tapa 15 mL	Falcon	Fijado de embriones, inmunotinción, preparación de muestra
Tubos con tapa 50 mL	Falcon	Fijado de embriones, inmunotinción, preparación de muestra
Capilares de vidrio 4", w/Fil, 1,0 mm	World precision instruments	Microinyección
Tips (p10, p200, p1000)	N. A.	Todos los procesos
Pinzas de desyemar	N. A.	Preparación de muestra
Láminas cubreobjetos #1 24 × 60 mm	Isolab	Preparación de muestra
Láminas cubreobjetos #1 20 × 20 mm	Isolab	Preparación de muestra
Grasa de laboratorio	Borer	Preparación de muestra
Estilete punta roma	N.A.	Análisis conductuales
48-well Cell Culture Plate	SPL Life Sciences	Análisis conductuales

4.1.6 Programas informáticos

Programas informáticos y descripción de su uso en este estudio	
Programa	Uso
ZEN 2 (blue edition)	Captura y procesamiento de imágenes
ZEN 2.3 SP1	Captura y procesamiento de imágenes
Adobe Photoshop CC 2017	Procesamiento de figuras
Zebralab	Cuantificación y gráfica de nado de larvas
GraphPad Prism 8.0	Gráficos y análisis estadísticos

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Mantenimiento de peces adultos

Los peces cebra adultos son criados en el Bioterio de Peces del Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, ubicado en el edificio de Laboratorios para la Investigación y Desarrollo, en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima, Perú). Ellos se mantienen en el sistema automático Zebtec Active Blue Stand Alone de Tecniplast (Varese, Italia) como acuario y a condiciones previamente descritas (66), como temperatura a 28.5 °C, ciclo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad y pH del agua a 7.5, además de a alrededor de 1000 µS de conductividad. A los peces se les alimenta con hojuelas Vipagran, elaboradas por Sera (Heisenberg, Alemania) y con *Artemia* (*Artemia salina*) viva, cultivada a partir de sus huevos (Grade A Brine Shrimp Eggs), comprados de Brine Shrimp Direct (UT, EE.UU.).

4.2.2 Líneas de pez cebra utilizadas

Se utilizó dos líneas genéticas de pez cebra para los experimentos realizados: WTKn, como línea silvestre, y *hb9:GFP* (67), línea cuyos peces expresan proteína verde fluorescente soluble (GFP, por sus siglas en inglés) bajo el promotor *hb9*, transcripcionalmente activo en zonas de interés para este estudio (rombómeros y neuronas motoras). La línea silvestre se usó para las etapas 1 y 2 de las inmunotinciones, mientras que la cepa transgénica se utilizó

para las etapas 2 y 3 de los análisis neuroanatómicos y para los estudios conductuales. La fluorescencia emitida por GFP fue utilizada principalmente como patrón de referencia para poder identificar estructuras neuroanatómicas.

4.2.3 Uso de embriones

Se hizo primero pruebas preliminares (data no incluida) en la que se aseguró que tanto los reactivos como equipamiento funcionen adecuadamente, tanto para los estudios inmunohistoquímicos como conductuales.

Se consideró normalmente un número bastante mayor de organismos al finalmente utilizados, teniendo en cuenta que hay un proceso de selección tanto de los organismos recién nacidos (calidad de los embriones) como de aquellos que ya pasaron por el tratamiento (desarrollo normal, tomando de referencia a los organismos no tratados, y dispersión uniforme del morfolino en organismos microinyectados). Cabe mencionar también que si bien para la etapa 2 y 3 se tuvo una y dos rondas de experimento, respectivamente, al ser exactamente el mismo experimento, con el mismo objetivo general y solo variar el nivel de detalle de los análisis que se hizo de cada uno, se considera que el experimento fue realizado en triplicado tanto a nivel técnico como a nivel de muestra biológica. Además, los estudios conductuales fueron desarrollados por duplicado y triplicado a nivel técnico para 5 dpf y 7 dpf, respectivamente. Se detallan los números a continuación:

Conteo total de embriones/larvas de <i>D. rerio</i> utilizados en el proyecto
--

Experimento	Organismos seleccionados y usados	Organismos totales (seleccionados + no seleccionados)
Pruebas preliminares	2000	2000
Inmunohistoquímica, etapa 1	5 embriones × 2 estadios × 8 anticuerpos × 2 rondas = 160	500
Inmunohistoquímica, etapa 2	10 embriones × 2 estadios × 2 grupos × 4 anticuerpos = 160	500
Inmunohistoquímica, etapa 3	10 embriones × 2 estadios × 2 grupos × 4 anticuerpos × 2 rondas = 320	1000
Estudios conductuales	48 larvas	250
Total de embriones		4250

Los embriones fueron sacrificados según protocolos estándar ampliamente usados: estos fueron colocados en agua con hielo por 15 – 20 minutos. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de uso de animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (código del proyecto en SIDISI: 104519)..

4.2.4 Puesta de cruces – obtención de embriones

Para conseguir embriones recién fertilizados, una pareja de peces adultos (hembra y macho) eran tomados del acuario la tarde o noche anterior al día del experimento, para ser inmediatamente colocados en un tanque de cruce de 1.8 L producido por Tecniplast (Varese, Italia), donde quedaban separados uno a cada lado de una división removible (Figura 5). Temprano al día siguiente, la división era retirada permitiendo el contacto físico de los peces necesario para la liberación de gametos en el agua, que da origen a los huevos.

Los huevos fertilizados (o embriones) eran luego colectados filtrando manualmente el agua que los contenía. Luego, eran limpiados retirando las impurezas usando una micropipeta, y luego eran mantenidos en placas Petri plásticas de 90 mm de diámetro, producidas por

Eurolab (Buenos Aires, Argentina) y en medio embrionario E3 (previamente llevado a 28.5 °C), un medio estándar ampliamente usado para mantener embriones de pez cebra, conteniendo además 12.5 µL/L de azul de metileno al 1 % (68).



Figura 5. Caja de cruce para peces cebra. Las cajas son transparentes y tienen una capacidad de 1.8 litros. En ellas, un pez hembra (izquierda) y un pez macho (derecha) son colocados. Al centro de la caja se coloca la división removible que es totalmente lisa, sólida y continua, también transparente. A una corta distancia del piso de la caja y paralela a este se encuentra otra división, pero esta con pequeños agujeros que permitirán la caída de los huevos hasta el fondo de la caja. Imagen de Tecniplast, disponible en: <https://www.tecniplast.it/uk/product/071-tank.html>.

4.2.5 Microinyecciones

Las agujas utilizadas en la microinyección se hicieron a partir de capilares de pared delgada de vidrio (4", w/Fil, 1.0 mm) elaborados por World Precision Instruments (FL, EE.UU.), a los cuales se les dio la forma necesaria utilizando la forja de micropipetas Micropipette Puller P-30, de Sutter Instruments (CA, EE.UU.). Una vez cargadas con la solución a microinyectar (ver abajo), las agujas eran instaladas en un micromanipulador de Bachofer (Reutlingen, Alemania) y conectadas al microinyector PV820 Pneumatic Pico Pump, de World Precision Instruments (CA, EE.UU.) que, al estar este a su vez conectado a un galón de nitrógeno, permitía la inyección de solución al regular la liberación de gas que estaba controlada por nosotros.

La microinyección se hizo en huevos recién fertilizados (Figura 6), entre los estadios de 1 a 4 células (54) y bajo el estereomicroscopio Stemi 508 de Carl Zeiss Microscopy GmbH (Oberkochen, Alemania). Con este fin, los embriones eran colocados en placas con una matriz de silicona (Sylgard) con carriles paralelos, para mantenerlos quietos. Se tuvo hasta tres grupos de embriones entre los diferentes experimentos, cada uno de ellos con entre 80 y 100 embriones viables por experimento.

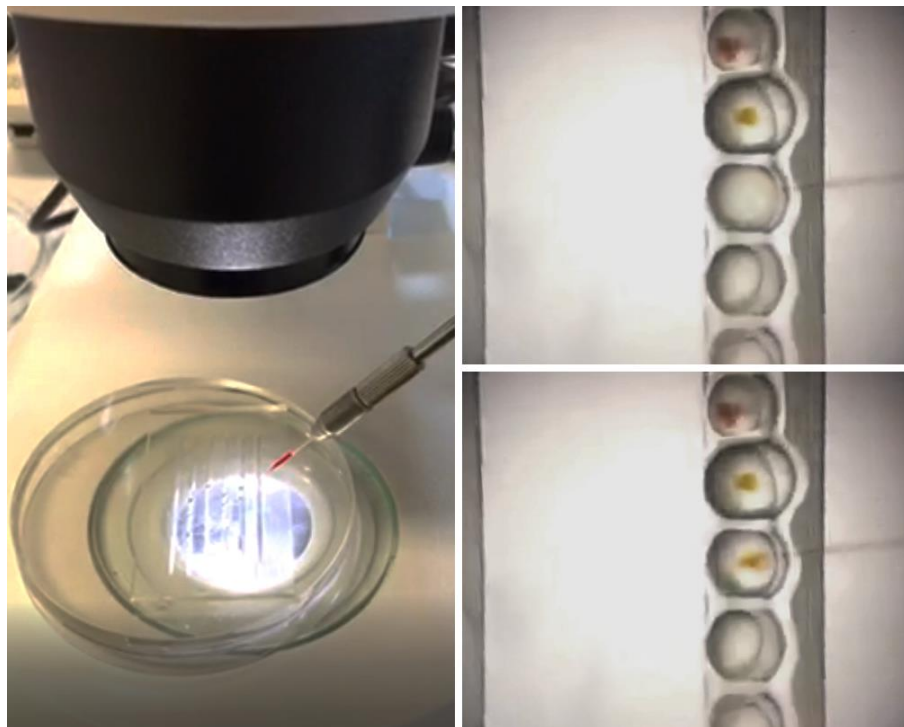


Figura 6. Microinyección en embriones de pez cebra. La imagen izquierda muestra el estereomicroscopio enfocando la placa de microinyección, además de una parte del micromanipulador al centro derecho de la imagen (extensión metálica) sosteniendo la aguja de microinyección que lleva dentro la solución de microinyección color rojo. Las dos imágenes a la derecha muestran a los embriones vistos a través del estereomicroscopio (objetivo de 10X, aumento de 3X) en campo claro, ubicados en carriles. Al centro de cada una de ellas se distingue la aguja de microinyección. Los embriones ya microinyectados muestran una marca roja. En la imagen superior derecha, el tercer embrión (contando de arriba a abajo) está por ser microinyectado, mientras que en la imagen inferior derecha este ya fue microinyectado.

Los tres grupos difirieron entre sí exclusivamente en el tratamiento experimental recibido:

- a. Grupo control (CO): los embriones no fueron tratados.
- b. Grupo microinyectado con solución control: los embriones fueron microinyectados con un volumen final de 5 nL de una solución compuesta por buffer Danieau 1X y 0.125 % de rojo fenol.
- c. Grupo microinyectado con oligonucleótidos antisentido de morfolino (MI): los embriones fueron microinyectados según previas descripciones (45) con un volumen final de 5 nL de una solución de buffer Danieau 1X, 0.125 % de rojo fenol como referencia visual (Figura 6) y dos morfolinis, nombrados MO-PrP2-1 (5'-CCA AGG GAC AAC AATCGC CCA AGA G-3') y MO-PrP2-2 (5'-AGG ACT CGC TTA AAA CAG CCC GAA G-3'), fabricados por Gene Tools (OR, EE.UU.), contra el 5' UTR del ARNm de PrP-2, en una concentración final de 0.8 ng/nL. Los morfolinis estaban marcados con el fluoróforo rojo lisamina.

4.2.6 Comparaciones morfológicas y neuroanatómicas

4.2.6.1 Fijación de embriones

Del total de embriones microinyectados y correctamente desarrollados, la mitad fue fijado en el primer día de desarrollo, en el estadio *prim-5* (correspondiente a las 24 hpf), mientras que

el resto fue fijado en el estadio de desarrollo *long-pec* (48 hpf) (54). Las observaciones de fenotipos generales eran realizadas usando el Stemi 508, con microscopía de campo claro o campo oscuro. Para elegir a los embriones que eran fijados, estos eran primero observados bajo el canal de luz roja (~ 550 nm) del estereomicroscopio de fluorescencia AxioZoom v16 de Carl Zeiss Microscopy GmbH (Oberkochen, Alemania), para asegurar que el morfolino microinyectado esté adecuadamente distribuido en el tejido embrionario, guiados por la señal relativa de la lisamina. Así, fueron excluidos aquellos embriones con nula o muy poca señal, además de aquellos con fenotipos extremadamente deformes, como los que presentaban falta parcial o total de alguna estructura.

Llegado el estadio adecuado, los embriones retirados para ser fijados eran decorionados (i.e. se les retiraba el corion) y colocados en tubos de 2 mL según grupos de tratamiento, en un volumen mínimo de medio para ser sacrificados poniéndolos en hielo con agua por entre 15 y 20 minutos. Luego de esto, el medio E3 fue removido para añadir 150 µL de paraformaldehído (PFA) al 4 % en *buffer* fosfato salino (PBS) 1X y se dejó incubando a 4 °C por 24 horas. Después de este tiempo, el PFA se retiró e, inmediatamente, los embriones fueron inmersos en 250 µL de PBS 1X, con el que se hizo un total de 3 lavados, esperando 5 minutos entre cada uno.

4.2.6.2 Immunotinciones

Los embriones fueron permeabilizados mediante 3 lavados de entre 5 y 10 minutos, cada uno con 250 µL de PBST, compuesto por PBS con 0.1 % de Tritón X-100 producido por Merck (Darmstadt, Alemania). Luego, en lugar de PBST se usó PBSDT, compuesto por PBST y 1 % de DMSO (dimetilsulfóxido), producido por Merck (Darmstadt, Alemania), repitiendo exactamente el procedimiento anterior. A continuación, los embriones eran bloqueados con 250 µL de suero de cabra, producido por Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.), al 10 % en PBSDT, por 4 horas a temperatura ambiente y sobre un agitador que proporcionaba un suave movimiento a 60 rpm a fin de homogeneizar el contenido en el tubo.

Terminado el bloqueo, los embriones eran separados en tubos de 2 mL conteniendo de 10 a 20 embriones por estadio y tratamiento en 250 µL de suero de cabra al 10 % en PBSDT,

donde se añadió luego el anticuerpo primario correspondiente. Se usó un total de 8 anticuerpos primarios monoclonales (Tabla 1), todos ellos desarrollados en el Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, Universidad de Iowa, IO, EE.UU.) con ratón (*Mus musculus*) como especie hospedera.

Tabla 1. Lista de los anticuerpos primarios usados en este estudio	
Anticuerpo primario	Antígeno
zn-1	Desconocido. Marcador neuronal citoplasmático
ZN-8	Neurolina (CD166, homólogo A)
zn-12	HNK-1. Carbohidrato en superficies neuronales
zns2	Deconocido. Marcador de sistema nervioso
znp-1	Sinaptotagmina 2, epítoto proteico
SV2	Glicoproteína de vesículas sinápticas (SV) 2 ^a
mAb48 (SV48)	Sinaptotagmina 1, dominio citoplasmático
F59	Cadena pesada de miosina, todas las isoformas rápidas
mAb35	Receptores musculares nicotínicos de acetilcolina

Se menciona en la primera columna el nombre del anticuerpo primario y, a la derecha de cada uno de estos, el antígeno que reconocen. La información fue recogida de la página web del DSHB: <http://dshb.biology.uiowa.edu/>.

La dilución inicial usada para cada anticuerpo primario fue de 1:500. Esto fue modificado acorde a los resultados obtenidos (ver *Resultados*). Los embriones incubaron con el anticuerpo primario a 4 °C por entre 20 y 24 horas, con eventuales agitaciones hechas manualmente.

El anticuerpo primario fue retirado cumplido el tiempo de incubación y a los embriones se les lavó 3 veces con 250 µL de PBSDT, dando 5 minutos entre cada lavada. Seguido a esto, se dejó incubar a los embriones con 100 µL de suero de cabra al 10 % en PBSDT y anticuerpo secundario anti-ratón, usando Alexa Fluor® 488 de Abcam (Cambridge, Reino Unido) para la línea silvestre y CF™ 647 de Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.) para la línea transgénica, a una dilución de 1:500. La incubación se dio a 4 °C por 20 a 24 horas. Además, se co-incubó

con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), de Thermofisher (MA, EE.UU.) a una dilución final de 1:1000, para usarlo como contratinción. Terminado el período de incubación, los embriones se enjuagaron 3 veces con 250 μ L de PBSDT, dando 5 minutos entre cada enjuague.

4.2.6.3 Preparación de muestra

Los embriones fijados y teñidos fueron luego desyemados (i.e., se les retiró manualmente la yema en su totalidad) con ayuda de pinzas especiales elaboradas manualmente en el laboratorio y bajo el estereomicroscopio Stemi 508. De ser necesario, se hicieron varios lavados con PBS 1X para retirar restos del vitelo antes de pasar a una serie de lavados de 5 minutos cada uno con 200 μ L de glicerol de Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.) en PBS 1X a concentraciones que variaron de manera creciente: glicerol al 25 %, glicerol al 50 % y glicerol al 75 %.

Con ayuda del estereomicroscopio Stemi 508 y estiletes, los embriones fueron colocados en las posiciones necesarias para obtener vistas dorsoventrales o laterales entre una lámina cubreobjetos #1 de 24 \times 60 mm, a manera de portaobjeto, y otra lámina cubreobjetos #1 de 20 \times 20 mm cuyas esquinas tenían grasa de laboratorio de Borer (Zuchwil, Suiza) para asegurar la adhesión entre las dos láminas. Luego de colocar esta última lámina cuidadosamente, se agregó muy despacio glicerol al 75 % en PBS para llenar el espacio entre las láminas, quedando los embriones inmersos en él.

4.2.6.4 Obtención de imágenes

Para obtener imágenes en campo claro de los embriones montados se utilizó el estereomicroscopio de fluorescencia AxioZoom v16, con un objetivo de 1X y acercamiento de 25X, usando su software ZEN 2 (blue edition), mientras que para obtener las imágenes en fluorescencia se usó un microscopio confocal invertido, el LSM 880 de Carl Zeiss Microscopy GmbH (Oberkochen, Alemania) y usando el software del mismo, ZEN 2.3 SP1.

Respecto a las imágenes en fluorescencia, los parámetros bajo los que fueron obtenidas fueron diferente para cada etapa del estudio (selección de anticuerpos, obtención de patrones de tinción y comparación de estructuras neuroanatómicas, Tabla 2).

Tabla 2. Configuración de parámetros para la obtención de imágenes en el microscopio confocal según etapa del estudio			
Parámetro	Etapa 1: selección de anticuerpos	Etapa 2: patrones de fluorescencia	Etapa 3: análisis de estructuras
Objetivo	10X, 20X	20X	40X
Acercamiento	variado	cabeza: 0.8, 0.7 tronco: 1	variado
Pinhole	variado	80 (2.26 AU, 2.8 μm)	80 (2.26 AU, 1.8 μm)
Averaging	4	4	4
Velocidad	4	4	4, 5
Píxeles	1024 \times 1024	1024 \times 1024	1024 \times 1024
Z-stack*	N. A.	2.5 μm	1.5 μm
Tile-scan**	N. A.	N. A.	10 % sobreposición

Las configuraciones utilizadas variaron según etapas dentro de los análisis neuroanatómicos. Los acercamientos en la cabeza al obtener los patrones de fluorescencia variaron, siendo de 0.8 para los embriones de 1 dpf y 0.7 para aquellos de 2 dpf. La velocidad en la etapa 3 varió, siendo de 4 solamente si la imagen era tomada en un aumento de 1.5X o mayor. *distancia en el eje z entre una toma y otra, ** sobreposición de dos imágenes tomadas una junto a la otra en el mismo plano. N. A., no aplica.

Además de la toma convencional, algunas imágenes son producto de más de una toma. Para esto, se habilitó las opciones de *z-stack* y *tile-scan* que ofrece ZEN para el LSM 880. Gracias al primero se pueden tomar varias imágenes en las mismas coordenadas para los ejes X y Y, pero diferentes en el eje Z, permitiendo obtener una sola imagen producto de la superposición de estas y/o representaciones en 3D, mientras que el segundo permite tomar dos o más imágenes cuyas coordenadas en el eje z no varían, pero sí en el eje X y/o el eje Y, permitiendo tener tomas más amplias sin tener que sacrificar la calidad de la toma cambiando el objetivo

o el aumento. En la primera etapa, todas las imágenes fueron procesadas a partir de tomas simples, mientras que en la segunda todas fueron procesadas a partir de *z-stacks* y en la tercera se usó una combinación de imágenes sencillas, *z-stacks* y *tile-scans*.

Respecto a la configuración de los láseres, en las rondas preliminares donde se seleccionó los anticuerpos con los que se trabajó en el estudio se utilizó solamente el canal de láser verde (alrededor de 488 nm de luz emitida), con intensidades que variaban entre 0.5 y 2 %. Para el resto del estudio, se usaron hasta 4 canales de luz láser con configuraciones específicas para cada uno y que se mantuvieron entre todos los experimentos restantes (Tabla 3).

Tabla 3. Configuración de los láseres usados en microscopía confocal		
Canal	Rango de longitud de onda (nm)	Intensidad del láser (%)
405 (azul)	405 – 450	2
488 (verde)	485 – 525	0.2, 0.5
561 (rojo)	570 – 605	1
633 (rojo lejano)	640 – 759	2.5

Se usaron hasta cuatro láseres distintos. La intensidad del láser verde varió, siendo de 0.2 % si la señal iba a ser producida por GFP o de 0.5 % si lo sería por el fluoróforo Alexa488.

4.2.6.5 Edición de imágenes

Para mostrar las fotos tomadas en forma de figuras ordenadas, se seleccionaron y ajustaron en el programa ZEN correspondiente a cada microscopio. Las saturaciones y contrastes de las imágenes de fluorescencia fue ajustada, siendo exactamente la misma en las etapas de selección de anticuerpos (etapa 1) y patrones de tinción (etapa 2) (negro: 50, gamma: 0.8, blanco: 4080) y la misma entre estructuras comparadas en la etapa del análisis de estructuras neuroanatómicas, ajustándola siempre a no tener imágenes con una señal sobresaturada en el control. Para armar las figuras se usó el programa Adobe Photoshop CC 2017. Todas las imágenes están orientadas de tal forma que corresponden a los ejes de desarrollo de la siguiente manera: izquierda, anterior; derecha, posterior; arriba, dorsal y abajo, ventral, a menos que se indique lo contrario en la leyenda.

4.2.7 Estudios conductuales

Para los análisis conductuales, los embriones fueron mantenidos en placas Petri plásticas de 90 mm de diámetro con medio embrionario E3 y a una temperatura constante de 28.5 °C. En estas mismas placas, los embriones eran observados sin estímulo alguno para poder evaluar y comparar sus comportamientos. También en las placas fueron llevadas a cabo observaciones de movimiento sin estímulo alguno y las pruebas de respuesta al tacto (Figura 7), usando para esto último un estilete de punta roma para tocarlos e inducir la respuesta de nado. Todo esto fue observado bajo el estereomicroscopio Stemi 508.

A los 5 dpf, las ya larvas (53) se colocaron en una placa de 48 pocillos (48-well Cell Culture Plate) fabricada por SPL Life Sciences (Gyeonggi-do, Korea), quedando una larva por pocillo (Figura 7). Fueron incluidos en estos experimentos los grupos control y aquellos microinyectados con morfolino. De estos últimos, fueron seleccionadas dependiendo de la intensidad de su fenotipo (ver *Resultados*, Figura 13), teniendo finalmente dos grupos de estas: microinyectados con fenotipo severo (MI-S), que presentaban deformidades en el tronco que comprometían anatómicamente el nado, y microinyectados con fenotipo leve (MI-L), que o no presentaban anomalías en el tronco o tenían muy leves curvaturas que no interrumpían *per se* el nado. Al igual que en las inmunotinciones, las larvas sin fluorescencia o con demasiada fluorescencia proveniente de la señal de lisamina del morfolino fueron excluidas para asegurar una distribución más uniforme de este. Una sola placa contenía al mismo tiempo las larvas control y las microinyectadas, con el fin de que el análisis se dé simultáneamente para ambos grupos. Las manipulaciones hechas a las larvas eran siempre bastante suaves y delicadas, con el fin de alterarlas lo menos posible. Con el mismo fin, estas reposaban sin disturbio alguno entre 20 y 30 minutos antes de iniciar cada experimento.

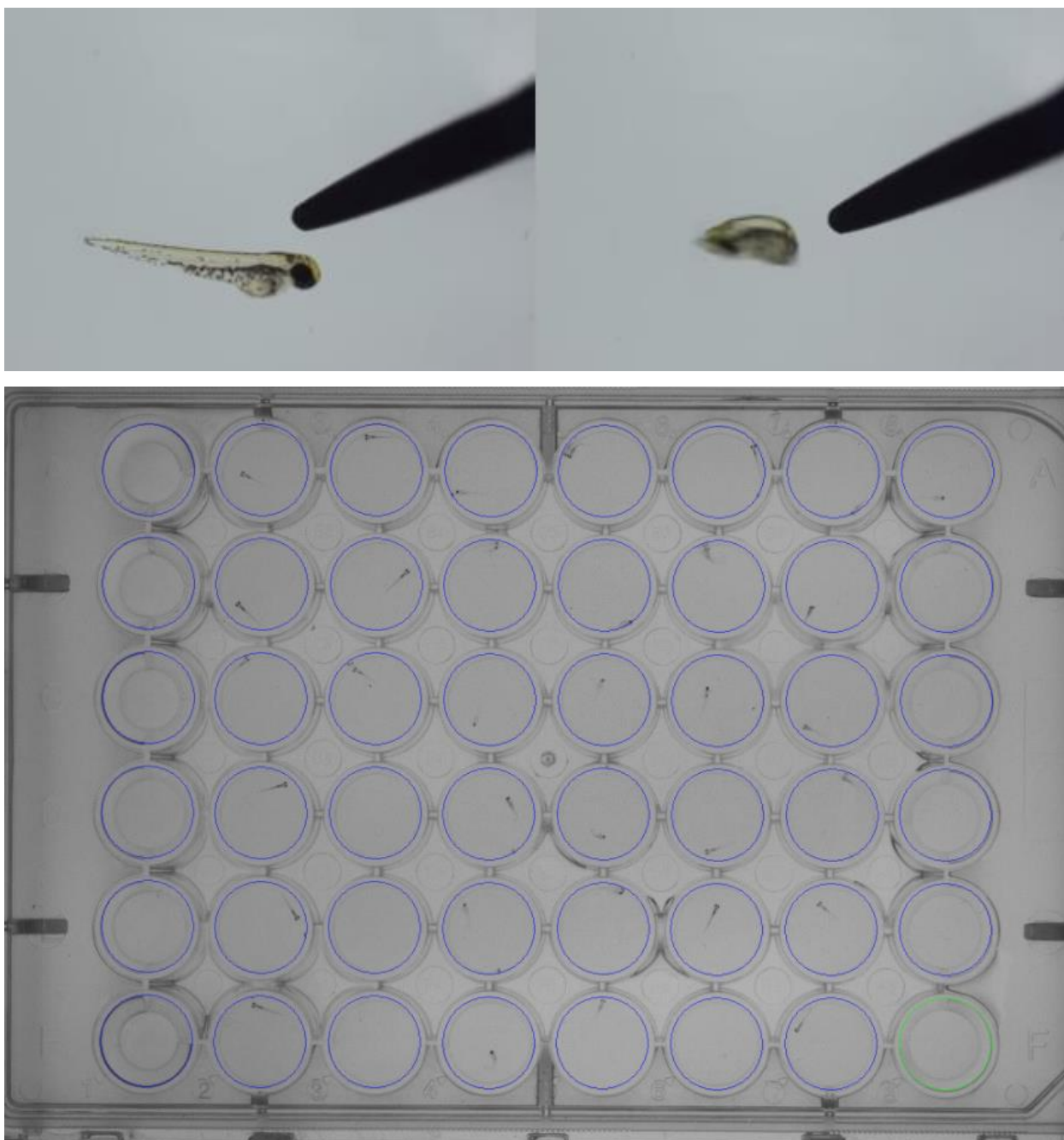


Figura 7. Imágenes de ensayos conductuales. En el panel superior, se observan dos imágenes de antes (izquierda) y después (derecha) de haber tocado a un embrión control de 2 dpf con un estilete punta roma para la prueba de respuesta al tacto. El embrión pasa de estar quieto a huir hacia el lado contrario del toque. En el panel inferior se tiene una captura de pantalla de lo que el software Zebralab muestra gracias a lo registrado por la cámara del

Zebrabox (ver abajo). Una sola larva era colocada dentro de cada pocillo de una placa transparente de 48 pocillos. Cada columna tenía larvas de un solo grupo. Los círculos azules son dibujados en el software Zebralab por el usuario y delimitan las áreas que el software entenderá como aquella de los pocillos, donde registrará el movimiento de las larvas.

Antes del experimento, los pocillos eran enrasados con medio E3 y colocados dentro del Zebrabox de Viewpoint (Lyon, Francia) (Figura 8), que posee una cámara que registra la placa con las larvas (Figura 7). La información, a manera de video, fue procesada por su mismo software, el Zebralab, dando como resultado gráficos con los patrones de nado de cada larva y también cuantificaciones del tipo de movimiento de cada larva, que fueron clasificados en tres dependiendo de la velocidad de estos: inactividad (< 2 mm/s), movimiento lento (2 - 5 mm/s) y movimiento rápido (> 5 mm/s). En los patrones de nado, la inactividad puede verse como ausencia de trazo alguno o puede también verse graficada de color negro, mientras que se usó los colores verde y rojo para graficar los movimientos lentos y rápidos, respectivamente. Los análisis conductuales se hicieron sin estímulo alguno (en oscuridad) y bajo estímulos de luz, esto es, sometiendo a las larvas a ciclos continuos de oscuridad y luz blanca, de 5 minutos cada uno. Todos los experimentos tuvieron una duración total de 30 minutos y se realizó en un ambiente con una temperatura de 26 °C y sin ruidos a los alrededores ni movimientos que puedan afectar el experimento.



Figura 8. Imagen del Zebrabox, de Viewpoint. Una vez colocada la placa en el Zebrabox, se desliza hacia abajo la cobertura azul, creando un ambiente interno en el que la entrada de la luz y el sonido es casi nula. La luz blanca usada en este estudio proviene de la base. En la parte superior se encuentra la cámara que registra a las larvas. Imagen de Viewpoint, disponible en: <http://www.viewpoint.fr/en/p/equipment/zebrabox>.

4.2.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron usados para comparaciones entre grupos en la cuantificación del tipo de nado de larvas. Para determinar si los datos seguían una distribución normal se utilizó la prueba de Shapiro Wilk. Para comparar grupos, se utilizó la prueba t de Student para datos no pareados y el test de Mann-Whitney como pruebas paramétricas y no paramétricas, respectivamente. Para todos los casos, se consideró $p < 0.05$ como

significativo. Las pruebas estadísticas y gráficas de caja-bigotes fueron hechas con el programa GraphPad Prism 8.0.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS GENERALES: CONTROLES VS. MORFANTES

Antes de analizar si la disminución de PrP-2 causaba fenotipos específicos, se consideró confirmar si la microinyección o el uso de morfolidos afectaban de manera inespecífica el desarrollo de los embriones. Con este objetivo, las primeras comparaciones entre los grupos de embriones control, microinyectados con solución control y microinyectados con morfolido para PrP-2 fueron hechas usando microscopía de campo claro.

En los organismos control, la cabeza aparece abultada y compacta comparada con el tronco, que es más bien alargado, recto y con una terminación en punta en el extremo posterior y representa la mayor parte del embrión en cuanto a longitud (Figuras 9A, 9B, 10A). En la cabeza resaltan dos estructuras: los ojos, bilateralmente simétricos y ubicados en la parte anterior y ventral de la misma, con contornos bien definidos y ocupando aproximadamente un tercio del exterior total de la cabeza, y el cerebro, ocupando casi todo el volumen de la parte interior dorsal de la cabeza.

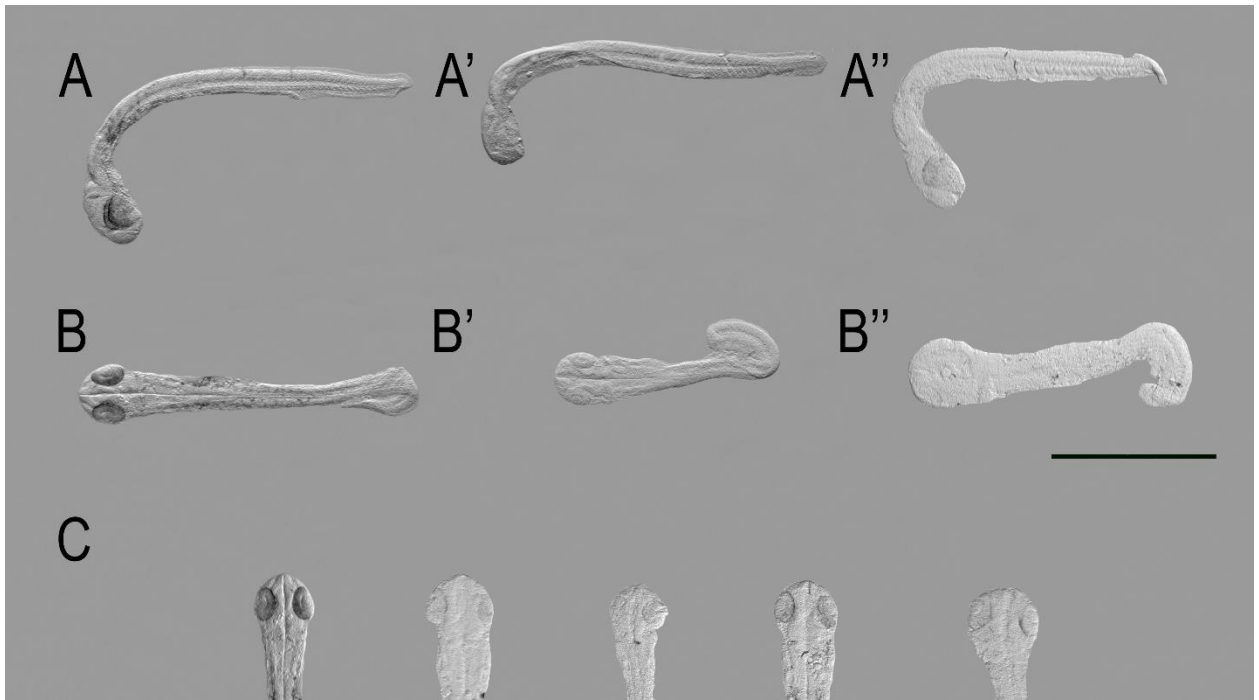


Figura 9. Imágenes en campo claro de embriones fijados de grupos control, microinyectados con solución control y microinyectados con morfolino para PrP-2 a 1 dpf. (A) Se muestra un embrión del grupo control en vista lateral, mientras que en (A') y en (A'') se muestran un embrión microinyectado con solución control y otro microinyectado con morfolino, respectivamente. (B) Se observa un embrión control en vista dorso-ventral, mientras que en (B') y (B'') se muestran, respectivamente, embriones en la misma vista de los grupos de microinyectados con la solución control y microinyectados con morfolino para PrP-2, respectivamente. (C) Muestra desde una vista dorsoventral la cabeza de un embrión control (primera, de izquierda a derecha) y de cuatro embriones microinyectados con morfolino para PrP-2, donde se puede notar las alteraciones en la morfología y tamaño de las cabezas. También, se observa que hay diferencias en cuanto a forma y tamaño en los ojos de los embriones comparado con otros embriones y, en algunos casos, entre los ojos del mismo embrión. Objetivo: 1x, aumento 25X (para todas las imágenes). Barra de escala: 1 mm.

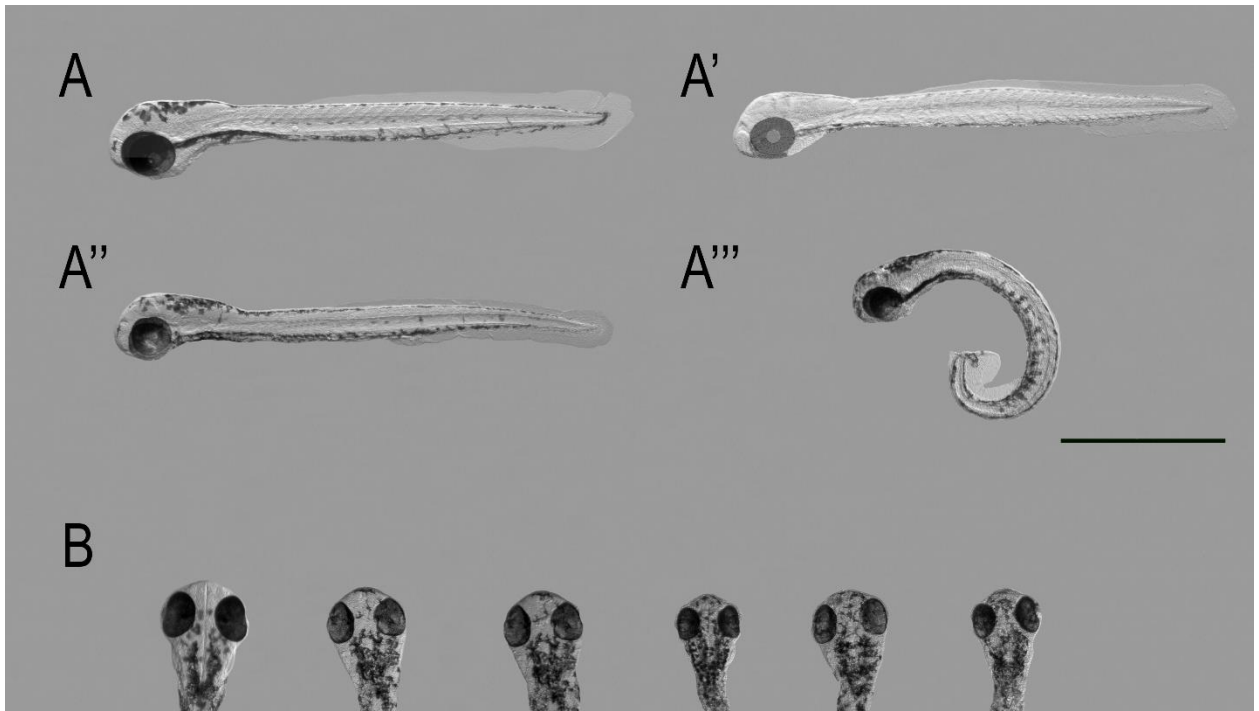


Figura 10. Imágenes en campo claro de embriones fijados de grupos control, microinyectados con solución control y microinyectados con morfolino para PrP-2 a 2 dpf. (A) Se muestra un embrión del grupo control en vista lateral, mientras que en (A') se muestra, en la misma vista, un embrión microinyectado con solución control. (A'') y (A''') muestran en vista lateral embriones microinyectados con morfolino para PrP-2 con fenotipos leve y severo, respectivamente. (B) Muestra desde una vista dorsoventral la cabeza de un embrión control (primera, de izquierda a derecha) y de cinco embriones microinyectados con morfolino para PrP-2, donde se puede notar las alteraciones en la morfología y tamaño de las cabezas y de los ojos de los embriones comparado con otros embriones y, en algunos casos, entre los ojos del mismo embrión. Objetivo: 1x, aumento 25X (para todas las imágenes). Barra de escala: 1 mm.

En los embriones microinyectados con solución control se observó un ligero retraso en el desarrollo a 1 dpf (8A'), pero no a 2 dpf (9A'). Aparte de este retraso, todas las estructuras se habían desarrollado de manera simétrica y como en un embrión control, tanto a 1 como a

2 dpf, sugiriendo que ni la microinyección como técnica ni la introducción de las soluciones que acompañan al morfolino alteran el desarrollo de alguna estructura de manera específica.

Este ensayo preliminar también nos sirvió para determinar parámetros útiles para el resto del estudio. Notamos que entre los embriones tratados con morfolino para PrP-2, dos fenotipos eran especialmente notorios: ojos deformes y cabezas pequeñas, siendo el primero normalmente más evidente en embriones de 1 dpf y el segundo, en los de 2 dpf (Figuras 9C, 10B). Además, para escoger a los embriones que fueron usados dentro del total de microinyectados, se corroboró la intensidad relativa de la fluorescencia roja de la lisamina que marcaba los morfolinós:

- Los que tenían señal nula o muy baja (~ 10 % del total). Mostraron siempre fenotipos iguales a los controles. Estos fueron descartados del estudio.
- Los que tenían señal baja o media y eran aparentemente similares al control o tenían fenotipos leves (~ 40 % del total). Estos fueron incluidos en el estudio.
- Los que tenían señal media y fenotipos medios o severos (~ 45 % del total). Estos fueron incluidos en el estudio.
- Los que tenían señal alta o muy alta (~ 5 % del total). Estos mostraban fenotipos extremadamente fuertes, como ausencia parcial o total de alguna estructura (ojos, tronco, cabeza). Estos fueron descartados del estudio.

Esta selección aseguraba que el morfolino haya sido correctamente difundido en los organismos tratados, haciendo comparables los efectos observados.

Finalmente, mediante este análisis se confirmó que el uso del morfolino sí producía alteraciones específicas en el desarrollo. Los embriones con fenotipo débil lucían exactamente como un organismo control, mientras que el leve (Figura 10A'') y el severo (Figura 10A''') mostraban los fenotipos característicos antes mencionados en ojos y cabeza, además de alteraciones en el tronco, tales como torsiones o muy ligeras o bastante

pronunciadas, respectivamente. Es importante mencionar que el tratamiento no fue letal para los embriones.

5.2 ANÁLISIS NEUROANATÓMICOS, ETAPA 1: SELECCIÓN DE ANTICUERPOS PRIMARIOS

Los fenotipos predominantes en los embriones morfantes para PrP-2 (i.e., ojos y cabeza anormalmente desarrollados) podrían tener relación con alguna alteración en el desarrollo del sistema nervioso, ya que ambas estructuras están predominantemente compuestas por tejido nervioso. Esto va acorde a estudios previos donde se muestra el patrón de expresión de PrP-2 en embriones de pez cebra (45), y apoyó la intención de validar el análisis inmunohistoquímico para evaluar el efecto del *knockdown* de PrP-2 a nivel neuroanatómico. Así, el siguiente paso fue elegir qué anticuerpos primarios iban a ser utilizados con este fin.

Se buscó elegir los anticuerpos primarios que brindaran mayor información en el contexto de este estudio, lo que nos llevó a fijarnos en dos parámetros: la calidad de la tinción y el patrón de estructuras reconocidas. Partiendo de una dilución inicial de 1:500 para todos los anticuerpos primarios y usando embriones de pez cebra fijados de 1 y 2 dpf sin ningún tratamiento, se clasificó cualitativamente la calidad de las inmunotinciones obtenidas usando cada uno de estos. La calidad es entendida como la relación entre la intensidad de señales específicas y señales inespecíficas (Tabla 4). Esta valoración resultó de observar a los embriones teñidos tanto en *prim-5* como en *long-pec*, usando el LSM 880.

Anticuerpo primario	Señal específica	Señal inespecífica
zn1	Regular	Fuerte
ZN8	Muy fuerte	Muy débil
zn12	Fuerte	Débil
zns2	Fuerte	Débil
znp1	Regular	Débil
SV2	Muy fuerte	Muy débil

mAb48	Muy débil	Regular
F59	Regular	Fuerte

Tabla 4. Calificación cualitativa de la calidad de tinción según el anticuerpo primario usado. En la escala utilizada para calificar la señal se empleó 5 categorías: muy débil, débil, regular, fuerte y muy fuerte. Fueron observados 5 embriones como mínimo por estadio (*prim-5* y *long-pec*) y por anticuerpo primario. Las señales fueron invariantes dentro de cada grupo, para todos los casos.

Como control para la señal obtenida en las inmunotinciones, se utilizó embriones que no incubaron con anticuerpo primario, siguiendo todo el resto del protocolo de inmunotinción de manera regular. Estos embriones no mostraron ninguna señal de fluorescencia siquiera comparable con aquella observada en los embriones que incubaron con algún anticuerpo primario, viéndose solo una muy débil señal inespecífica en el extremo ventral de estos. Así, se tuvo por seguro que las señales de fluorescencia obtenidas se deben al uso del anticuerpo primario.

A partir de estos resultados y con el fin de mejorar la calidad de las tinciones, otros cambios fueron considerados en el protocolo para inmunotinción, especialmente en las condiciones de bloqueo para los embriones usados con los anticuerpos primarios zn1, mAb48 y F59. Para el primer caso, se optó por bloquear 24 horas a 4 °C, con agitaciones suaves hechas eventualmente y a mano, mientras que para los dos últimos se eliminó el bloqueo y se pasó directamente de la permeabilización a la incubación con el anticuerpo primario. Además, después de estas observaciones en la calidad de la tinción, se establecieron las diluciones finalmente usadas para cada anticuerpo primario en el resto de este estudio (Tabla 5).

Tabla 5. Diluciones finales para cada anticuerpo primario	
Anticuerpo primario	Dilución final

zn1	1:500
ZN8	1:1000
zn12	1:500
zns2	1:500
znp1	1:500
SV2	1:1000
mAb48	1:200, 1:100 y 1:50
F59	1:200, 1:100 y 1:50

Estas fueron establecidas a partir de la primera observación de calidad de tinción y fueron utilizadas en el resto de este estudio. Para los anticuerpos mAb48 y F59 se utilizaron 3 diluciones distintas en paralelo, a fin de probar aún cuál era la mejor.

A partir de ello, se capturó las primeras imágenes usando el microscopio confocal con el objetivo de asegurar que, hechos los cambios, la calidad de la tinción mejoró o se mantuvo (esto es, siguió siendo buena) y de identificar someramente las estructuras teñidas con cada uno de los anticuerpos primarios (Tabla 6).

Tabla 6. Calidad de tinciones después de ajustar los protocolos y resumen de estructuras visualizadas someramente			
Anticuerpo primario	Señal específica	Señal inespecífica	Resumen de estructuras teñidas
zn1	Regular	Fuerte	Parénquima cerebral Placa del piso Neuronas Rohon-Beard

			Axones longitudinales Axones de neuronas motoras
ZN8	Muy fuerte	Muy débil	Parénquima cerebral Estructuras relacionadas a visión Neuronas motoras Ganglios craneales y cerebrales Piel Músculo
zn12	Fuerte	Débil	Parénquima cerebral Ganglios craneales y cerebrales Axones varios Neuronas Rohon-Beard Piel Músculo
zns2	Fuerte	Débil	Todo el parénquima del SNC
znp1	Regular	Débil	Parénquima cerebral Neuronas motoras
SV2	Muy fuerte	Muy débil	Ganglios craneales y cerebrales Nervios varios Médula espinal

			Neuronas motoras Parénquima cerebral
mAb48	Muy débil	Regular	No identificadas
F59	Regular	Fuerte	Músculo esquelético

Estos datos fueron obtenidos no solo observando la muestra bajo el microscopio confocal sino también evaluando imágenes capturadas.

El procedimiento seguido efectivamente nos permitió determinar qué anticuerpos primarios no solo ofrecían imágenes con alta calidad, sino también aquellos con patrones de tinción útiles. Tomando en cuenta tanto la calidad de la tinción obtenida después de los cambios hechos como en las estructuras cubiertas en los patrones de tinción (Tabla 6, Figuras 11 - 13), se decidió descartar el uso de los anticuerpos primarios mAb48, F59, zn1 y znp1.

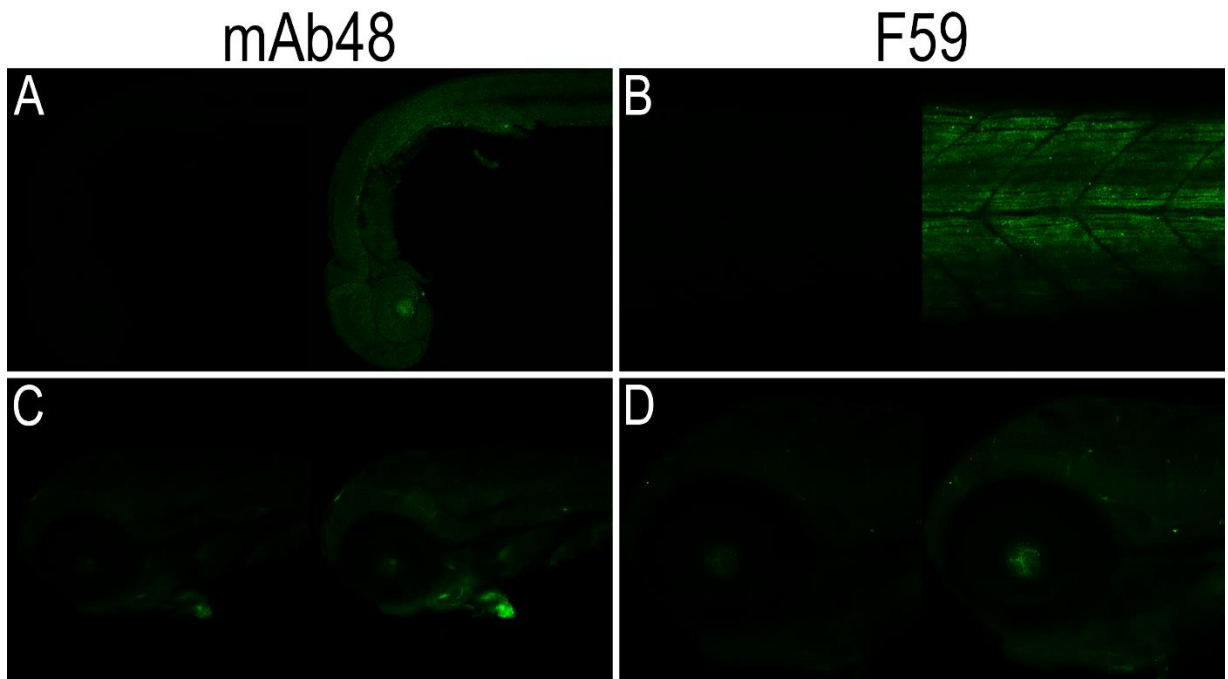


Figura 11. Imágenes seleccionadas de tinciones con los anticuerpos primarios descartados mAb48 y F59. Todas las figuras están divididas en dos, donde el panel a la izquierda muestra la imagen capturada y procesada normalmente, mientras que el panel de la derecha muestra la misma imagen con la saturación de luz aumentada casi al máximo que el software ZEN ofrece. Todas las tomas son de vistas laterales. (A) Cabeza y parte del tronco de embrión de 1 dpf teñido con mAb48. Objetivo: 10X. (B) Tronco de embrión de 1 dpf teñido con F59. Objetivo: 20X. (C) Cabeza de embrión de 2 dpf teñido con mAb48. Objetivo 20X. (D) Cabeza de embrión de 2 dpf teñido con F59. Objetivo: 20X. No se observan señales específicas en ninguna imagen, salvo en (B), donde se ve una proveniente de los somites.

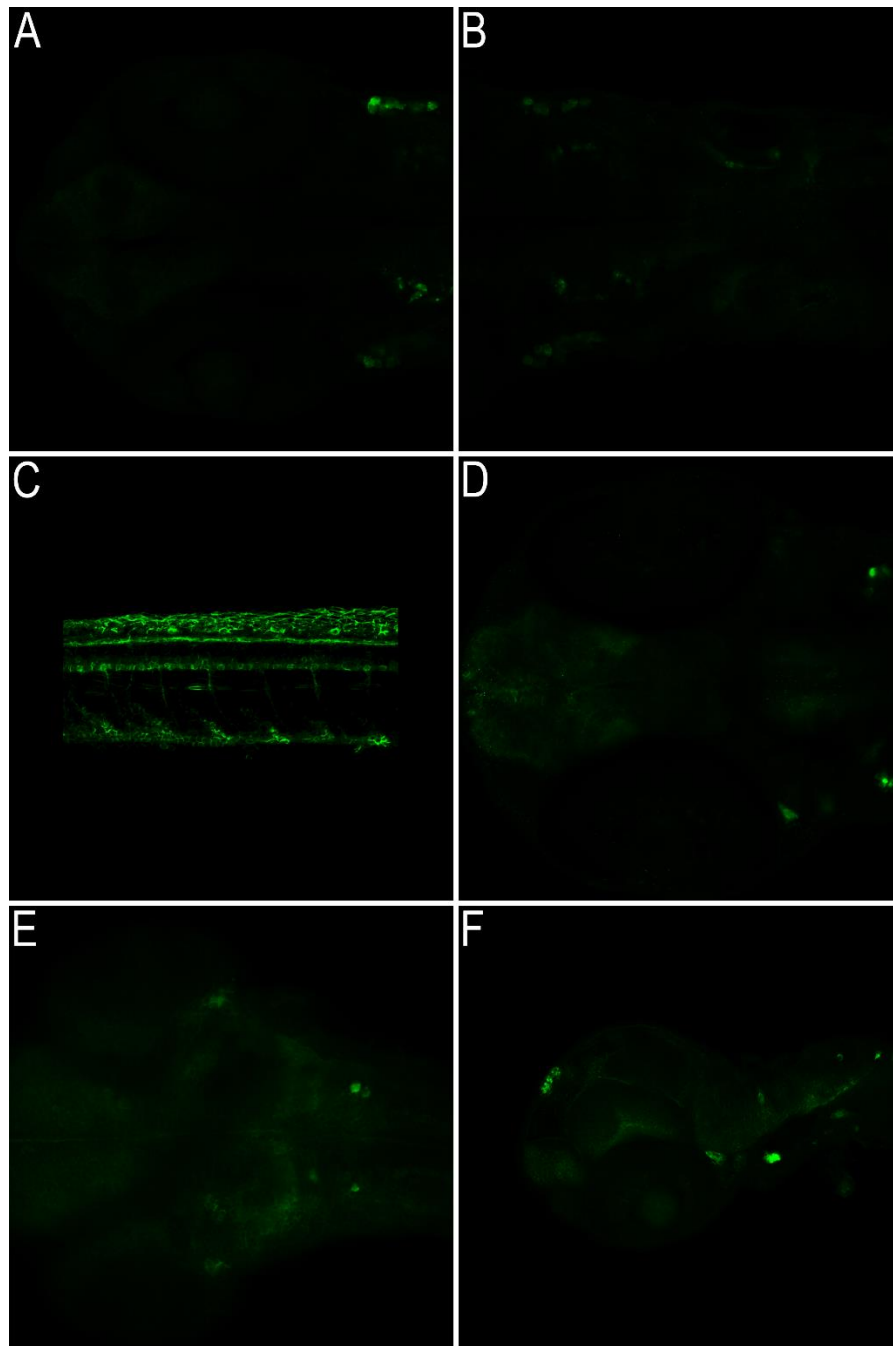


Figura 12. Imágenes seleccionadas de tinciones con el anticuerpo primario descartado znl1. (A) y (B) muestran una vista ventral de un embrión a 1 dpf del cerebro anterior y medio y del cerebro posterior, respectivamente. Objetivo: 20X. (C) Vista lateral del tronco de un embrión de 1 dpf. De dorsal a ventral, resaltan en esta figura las siguientes estructuras: piel, neuronas Rohon-Beard y neuronas motoras primarias. (D) y (E) muestran la cabeza de un

embrión a 2 dpf desde vistas ventral y dorsal, respectivamente. En (D), en la parte anterior, resalta la fluorescencia en el parénquima del cerebro anterior, mientras que en (E) se ve una señal un poco difusa proveniente del parénquima cerebral. Objetivo: 20X. (F) Vista lateral de la cabeza de un embrión de 2 dpf. Resalta la señal fluorescente del parénquima cerebral (a lo largo de toda la cabeza) y de unas pocas poblaciones neuronales más discretas. Objetivo: 10X.

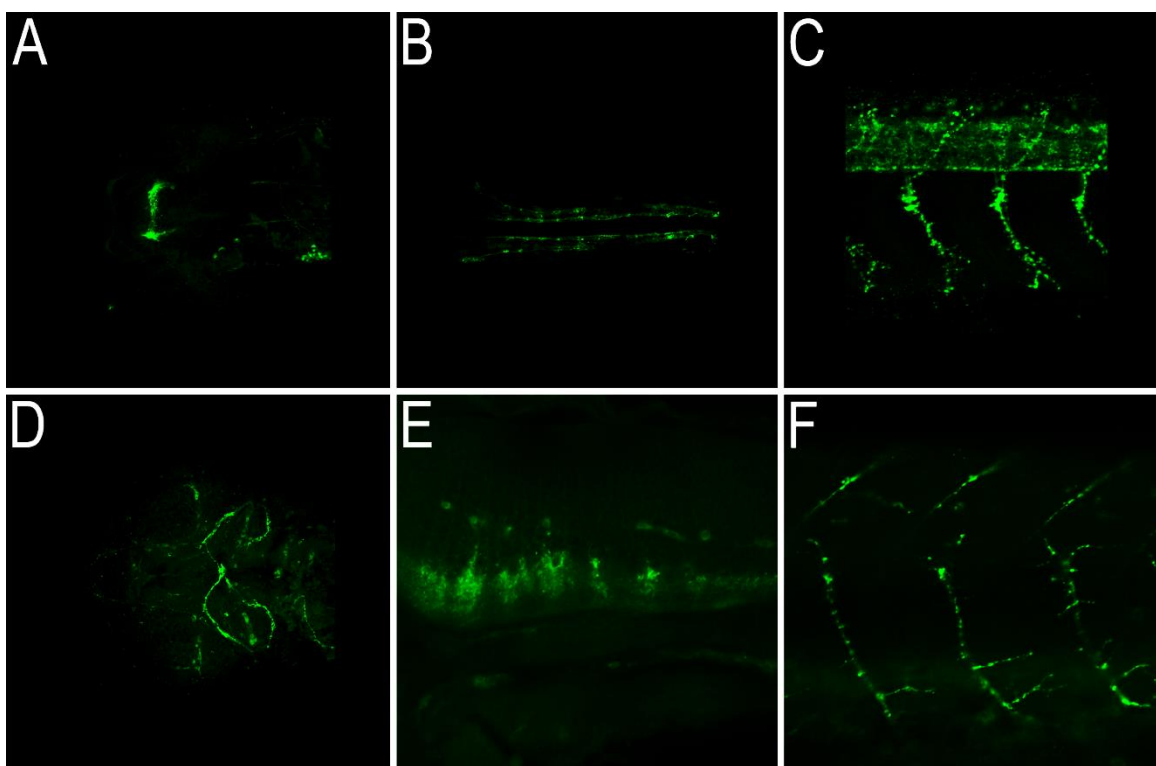


Figura 13. Imágenes seleccionadas de tinciones con el anticuerpo primario znp1. (A) y (B) muestran desde una vista ventral imágenes de embriones a 1 dpf hechas a partir de z-stacks. En la cabeza, que incluye al cerebro anterior y medio (A), resalta el parénquima y una comisura cerebral, mientras que en el cerebro posterior y el tronco (B) resaltan ganglios y axones, como los longitudinales. Objetivo: 20X y 10X, respectivamente. (C) Vista lateral del tronco de un embrión a 1 dpf, donde resalta la médula espinal y los axones de las neuronas motoras primarias. Objetivo: 20X. (D) Vista ventral de la cabeza de un embrión a 2 dpf,

donde resalta el parénquima cerebral y nervios craneales. Objetivo: 20X. (E) Vista lateral del cerebro posterior de un embrión a 2 dpf, donde se observa fluorescencia en el parénquima cerebral y en poblaciones discretas de neuronas pertenecientes a los rombómeros. Objetivo: 20X. (F) Vista lateral del tronco de un embrión de 2 dpf, donde se observan las proyecciones axonales de las neuronas motoras primarias, además de una señal inespecífica de fondo. Objetivo: 20X.

5.3 ANÁLISIS NEUROANATÓMICOS, ETAPA 2: CARACTERIZACIÓN DE PATRONES DE FLUORESCENCIA DE LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS EN CONTROL Y COMPARACIÓN CON MORFANTES

Teniendo seleccionados los anticuerpos primarios a usar para investigar si PrP-2 tiene algún rol en el desarrollo del sistema nervioso, se requirió caracterizar a detalle cada estructura que estos nos permitían visualizar. Usando microscopía confocal de fluorescencia, se logró caracterizar con mayor detalle los patrones de tinción obtenidos para cada uno de los cuatro anticuerpos primarios seleccionados: ZN8 (Figuras 14, 15), zn12 (Figuras 16, 17), zns2 (Figuras 18, 19) y SV2 (Figuras 20, 21).

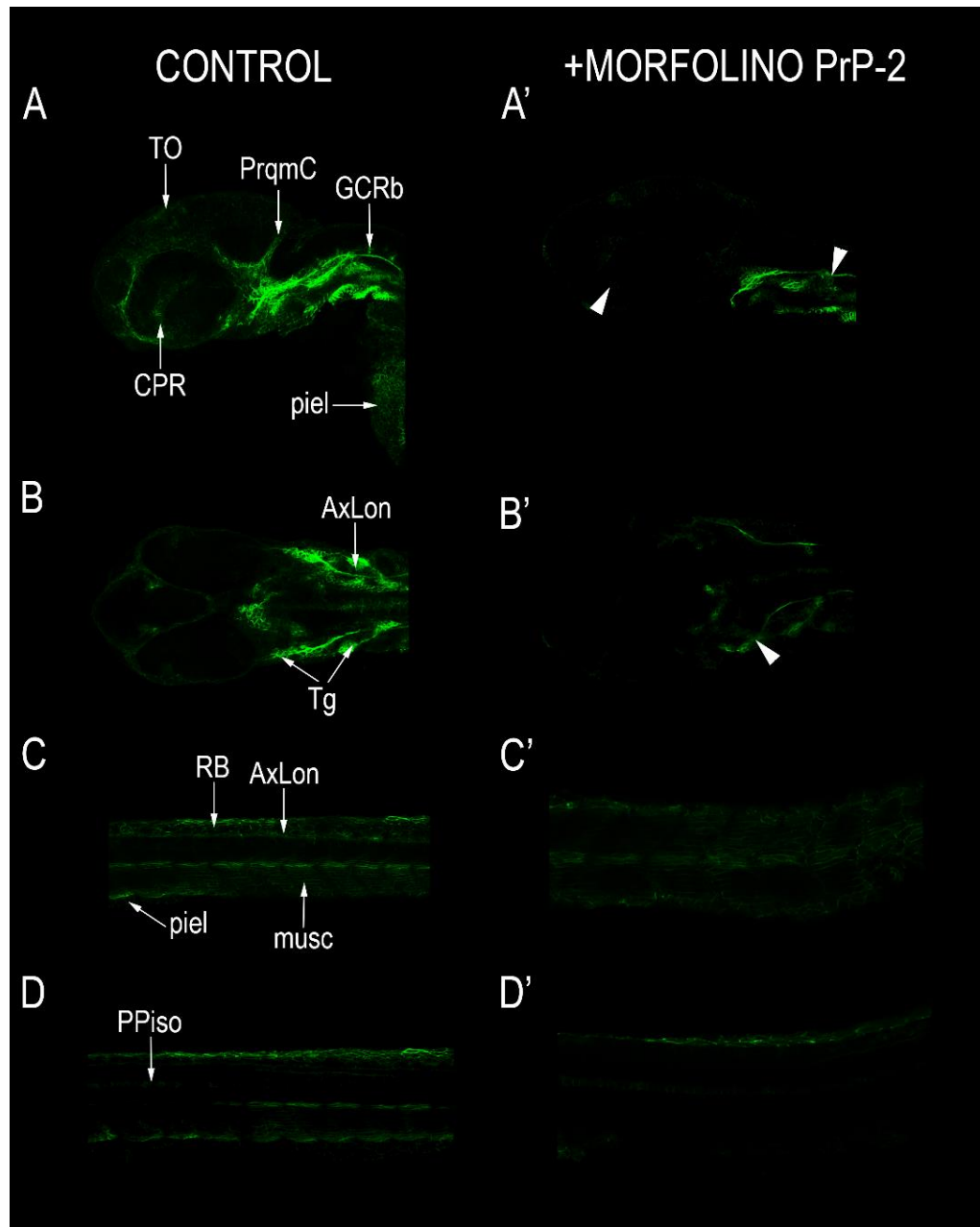


Figura 14. Patrón de tinción usando el anticuerpo primario ZN8 en embriones de 1 dpf. Se muestra en verde las estructuras reconocidas en cabeza o tronco y en distintas vistas: (A) y (A'), vista lateral de la cabeza; (B) y (B'), vista dorsoventral de la cabeza; (C) - (D') vistas laterales del tronco. Las flechas indican estructuras o tejidos. Las puntas de flecha blancas indican estructuras alteradas en embriones con producción reducida de PrP-2. TO, tectum óptico; PrqmC, parénquima cerebral; GCRb, ganglios centrales de los rombómeros; CPR,

células progenitoras de la retina; piel, tejido epidérmico; AxLon, axones longitudinales; Tg, ganglio trigémino; RB, neuronas Rohon-Beard; musc, tejido muscular esquelético; PPiso, placa del piso.

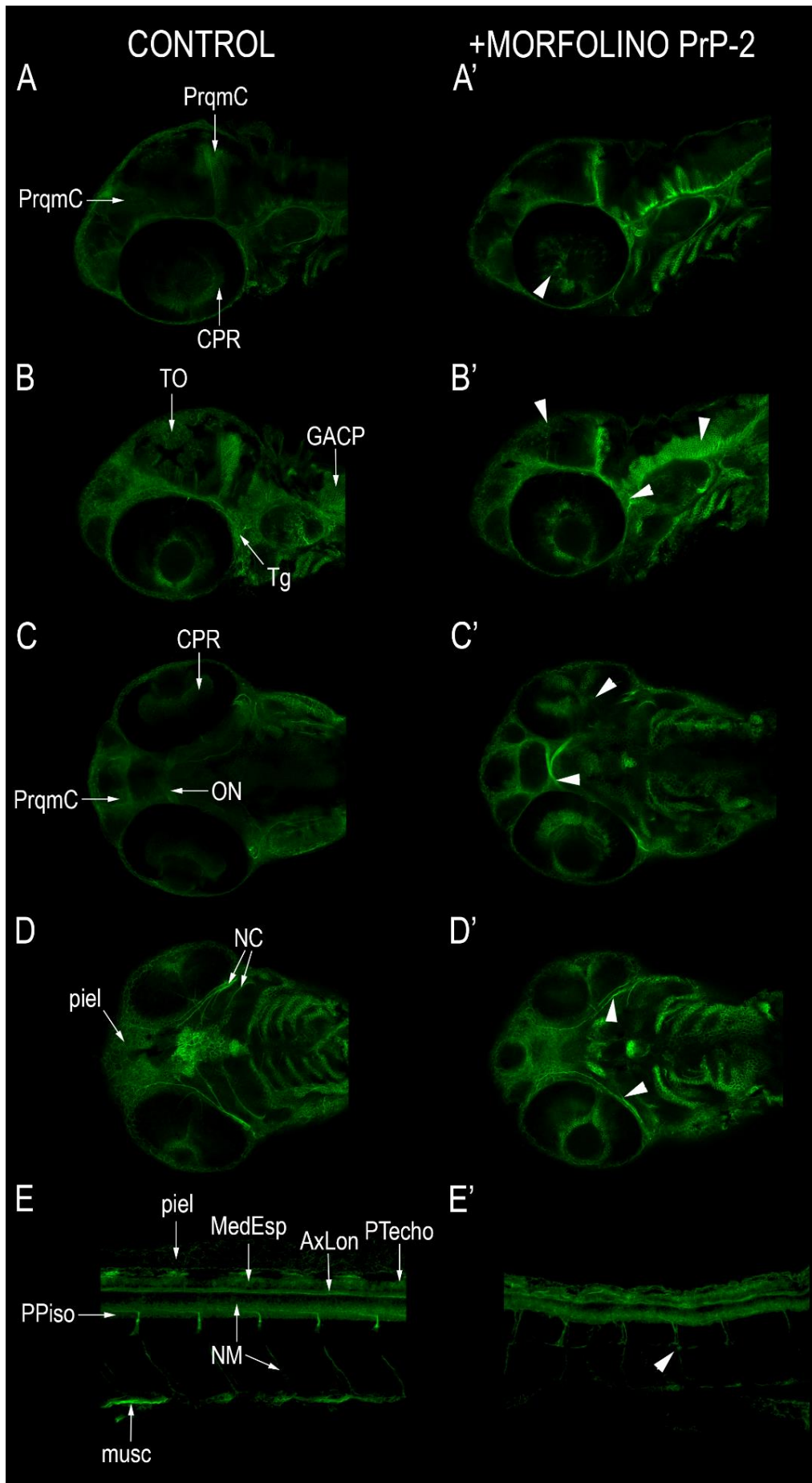


Figura 15. Patrón de tinción usando el anticuerpo primario ZN8 en embriones de 2 dpf. Se muestra en verde las estructuras reconocidas en cabeza o tronco y en distintas vistas: (A) - (B'), vista lateral de la cabeza; (C) - (D'), vista dorsoventral de la cabeza; (E) - (E') vistas laterales del tronco. Las flechas indican estructuras o tejidos. Las puntas de flecha blancas indican estructuras alteradas en embriones con producción reducida de PrP-2. PrqmC, parénquima cerebral; CPR, células progenitoras de la retina; GACP, ganglios ascendentes del cerebro posterior (ganglios centrales de los rombómeros); Tg, ganglio trigémino; NO, nervio óptico; NC,

nervios craneales; piel, tejido epidérmico; MedEsp, médula espinal; AxLon, axones longitudinales; PTecho, placa del techo; PPiso, placa del piso; NMS, neuronas motoras secundarias.

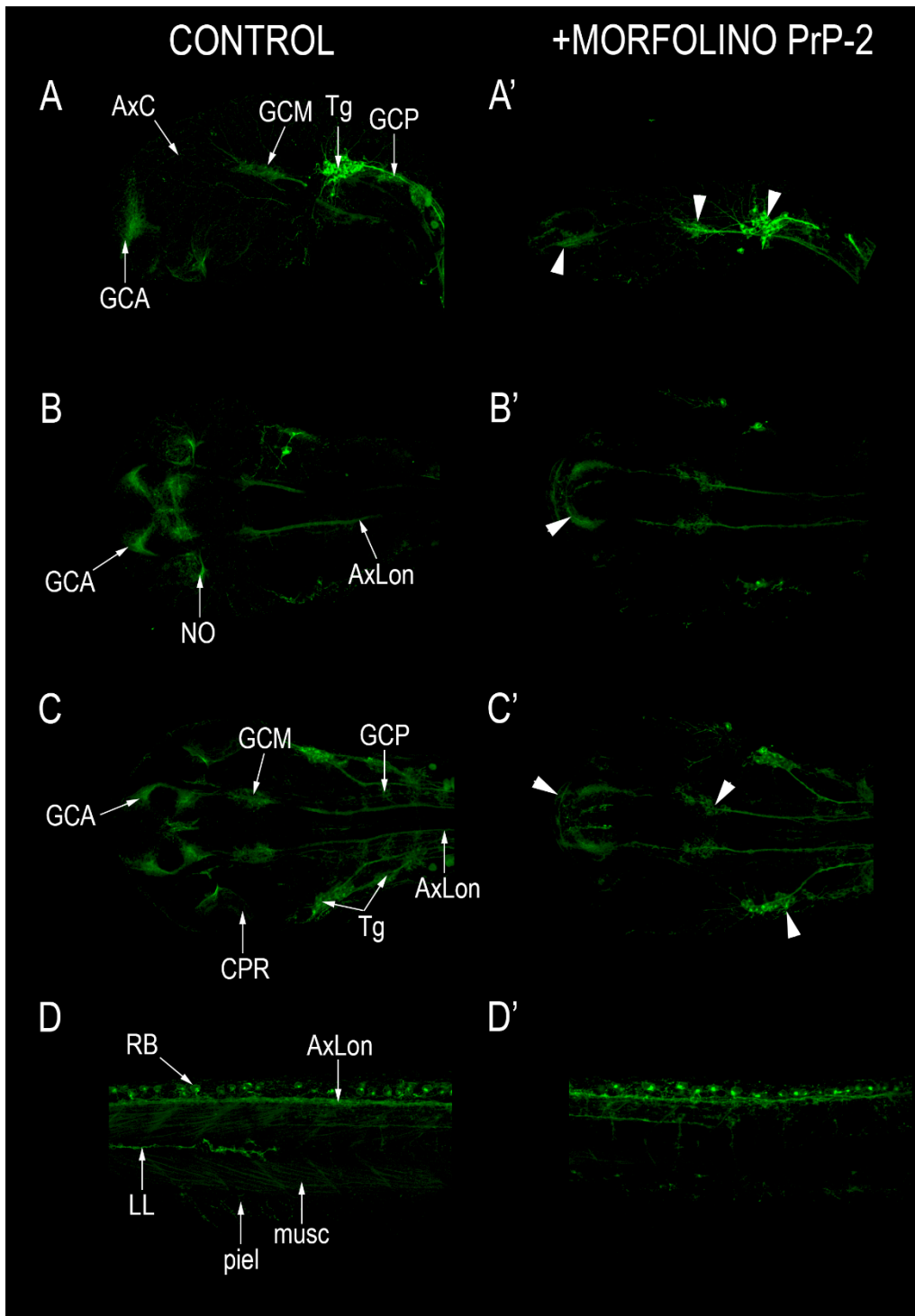


Figura 16. Patrón de tinción usando el anticuerpo primario zn12 en embriones de 1 dpf. Se muestra en verde las estructuras reconocidas en cabeza o tronco y en distintas vistas: (A) y (A'), vista lateral de la cabeza; (B) - (C'), vista dorsoventral de la cabeza; (D) y (D') vistas laterales del tronco. Las flechas indican estructuras o tejidos. Las puntas de flecha blancas indican estructuras alteradas en embriones con producción reducida de PrP-2. AxC, axones craneales; GCM, ganglios del cerebro medio; Tg, ganglio trigémino; GCP, ganglios del cerebro posterior; GCA,

ganglios del cerebro anterior; NO, nervio óptico; AxLon, axones longitudinales; CPR, células progenitoras de la retina; RB, neuronas Rohon-Beard; LL, línea latera; piel, tejido epidérmico; musc, músculo esquelético.

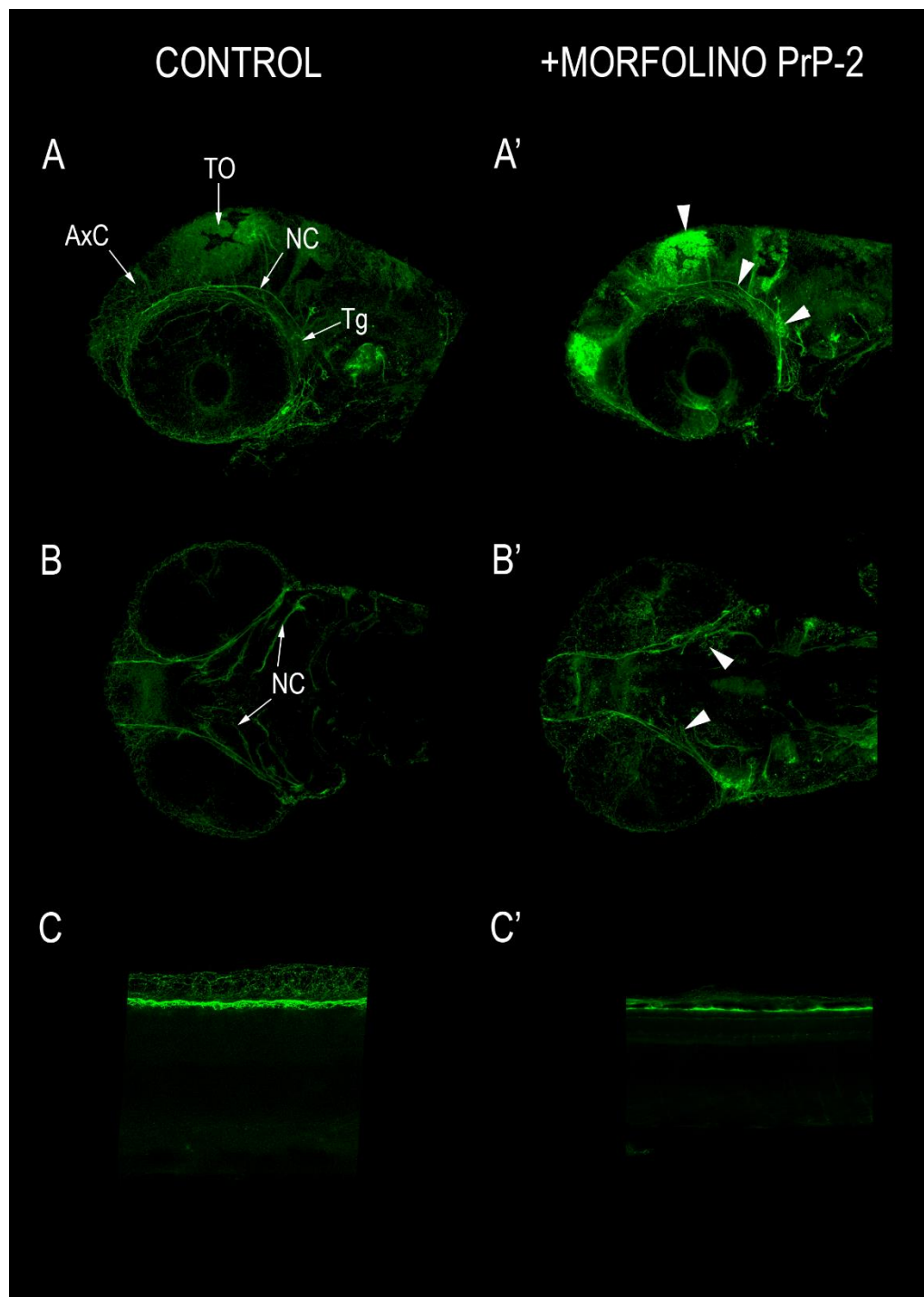


Figura 17. Patrón de tinción usando el anticuerpo primario zn12 en embriones de 2 dpf.
 Se muestra en verde las estructuras reconocidas en cabeza o tronco y en distintas vistas: (A)

y (A'), vista lateral de la cabeza; (B) y (B'), vista dorsoventral de la cabeza; (C) - (C') vista lateral del tronco. Las flechas indican estructuras o tejidos. Las puntas de flecha blancas indican estructuras alteradas en embriones con producción reducida de PrP-2. TO, tectum óptico; AxC, axoones craneales; NC, nervios craneales; Tg, ganglio trigémino.

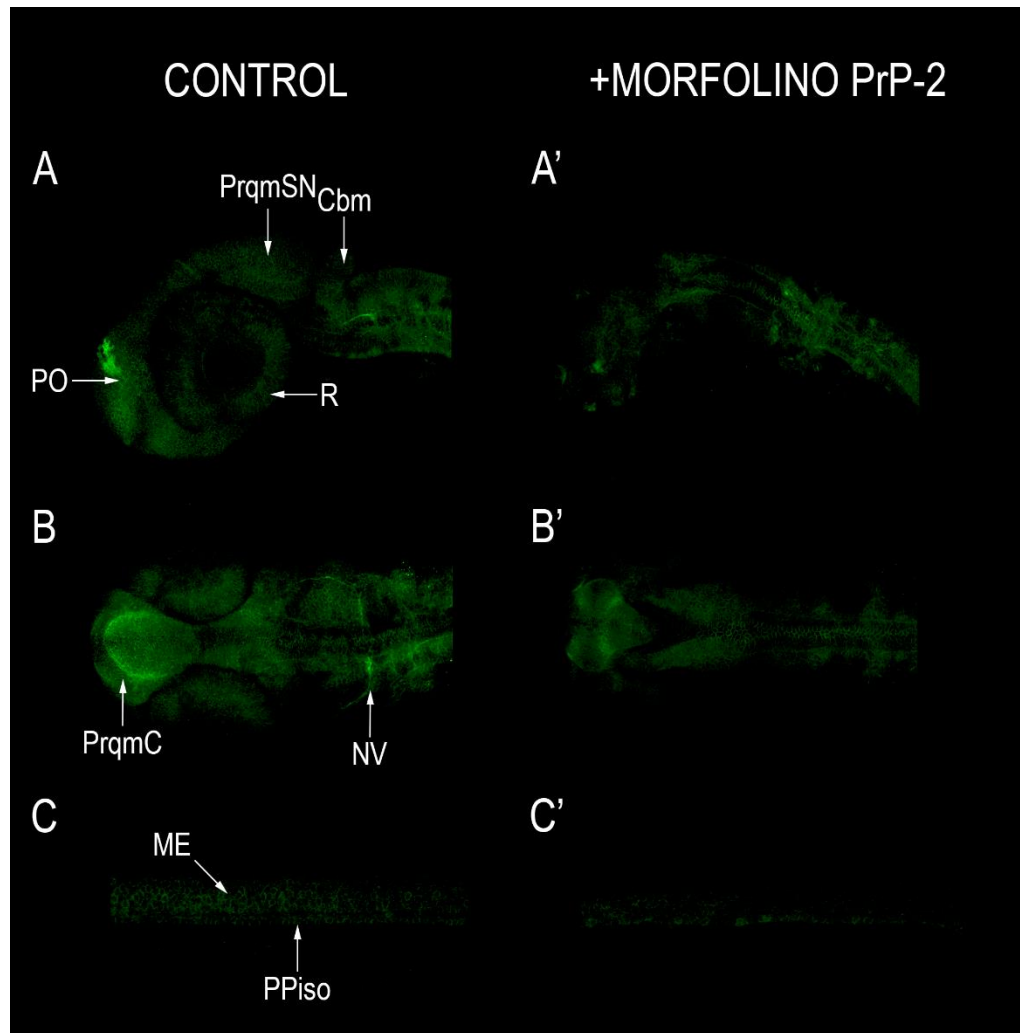


Figura 18. Patrón de tinción usando el anticuerpo primario zns2 en embriones de 1 dpf. Se muestra en verde las estructuras reconocidas en cabeza o tronco y en distintas vistas: (A) y (A'), vista lateral de la cabeza; (B) y (B'), vista dorsoventral de la cabeza; (C) - (C') vistas laterales del tronco. Las flechas indican estructuras o tejidos. Las puntas de flecha blancas indican estructuras alteradas en embriones con producción reducida de PrP-2. PrqmSN,

parénquima del sistema nervioso; Cbm, cerebelo; PO, placodio olfatorio; R, retina; PrqmC, parénquima cerebral; NV, nervio vago; ME, médula espinal; PPiso, placa del piso.

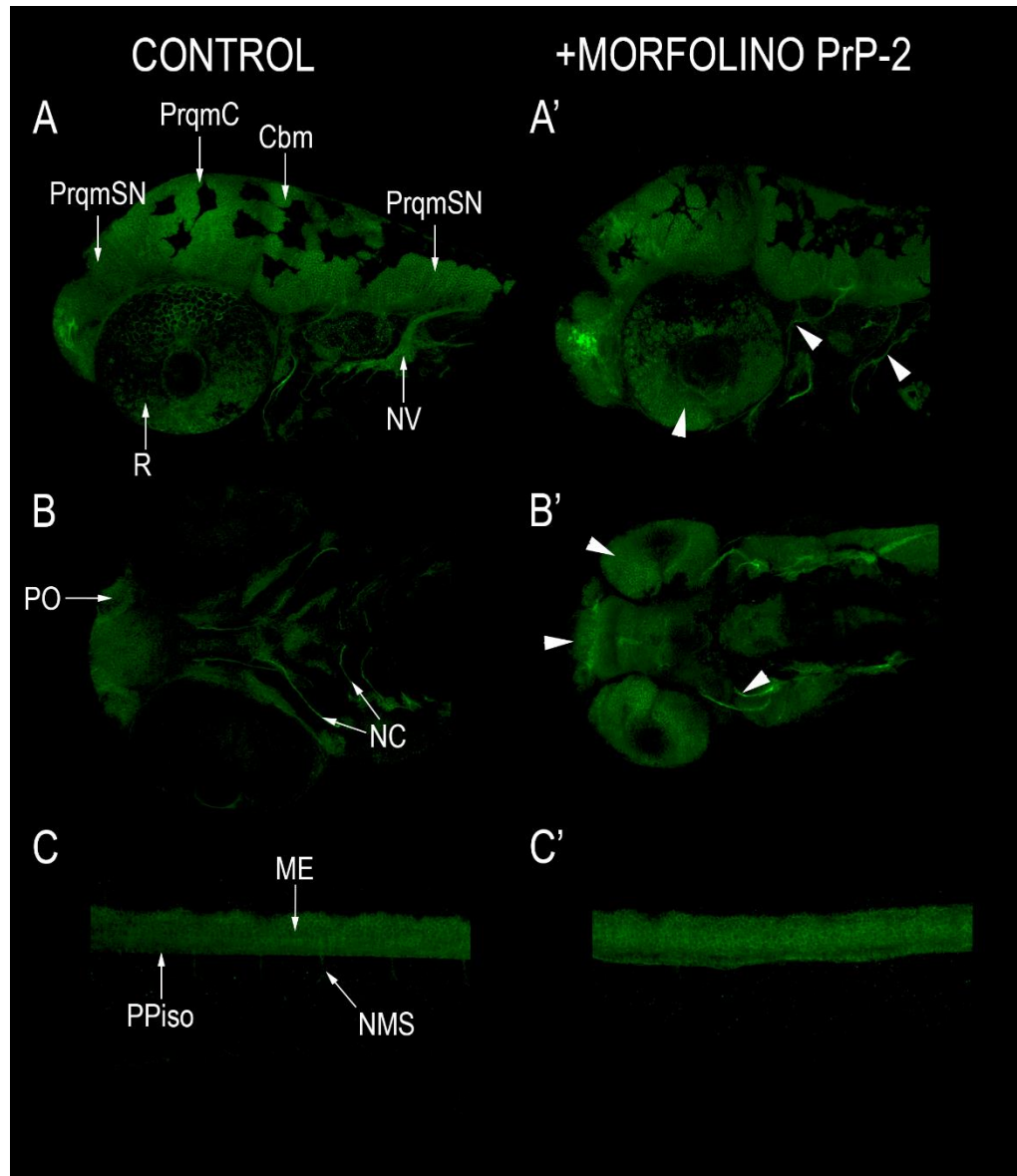


Figura 19. Patrón de tinción usando el anticuerpo primario zns2 en embriones de 2 dpf. Se muestra en verde las estructuras reconocidas en cabeza o tronco y en distintas vistas: (A) y (A'), vista lateral de la cabeza; (B) y (B'), vista dorsoventral de la cabeza; (C) - (C') vistas laterales del tronco. Las flechas indican estructuras o tejidos. Las puntas de flecha blancas

indican estructuras alteradas en embriones con producción reducida de PrP-2. PrqmSN, parénquima del sistema nervioso; Cbm, cerebelo; PO, placodio olfatorio; R, retina; PrqmC, parénquima cerebral; NV, nervio vago; ME, médula espinal; PPiso, placa del piso; NMS, neuronas motoras secundarias.

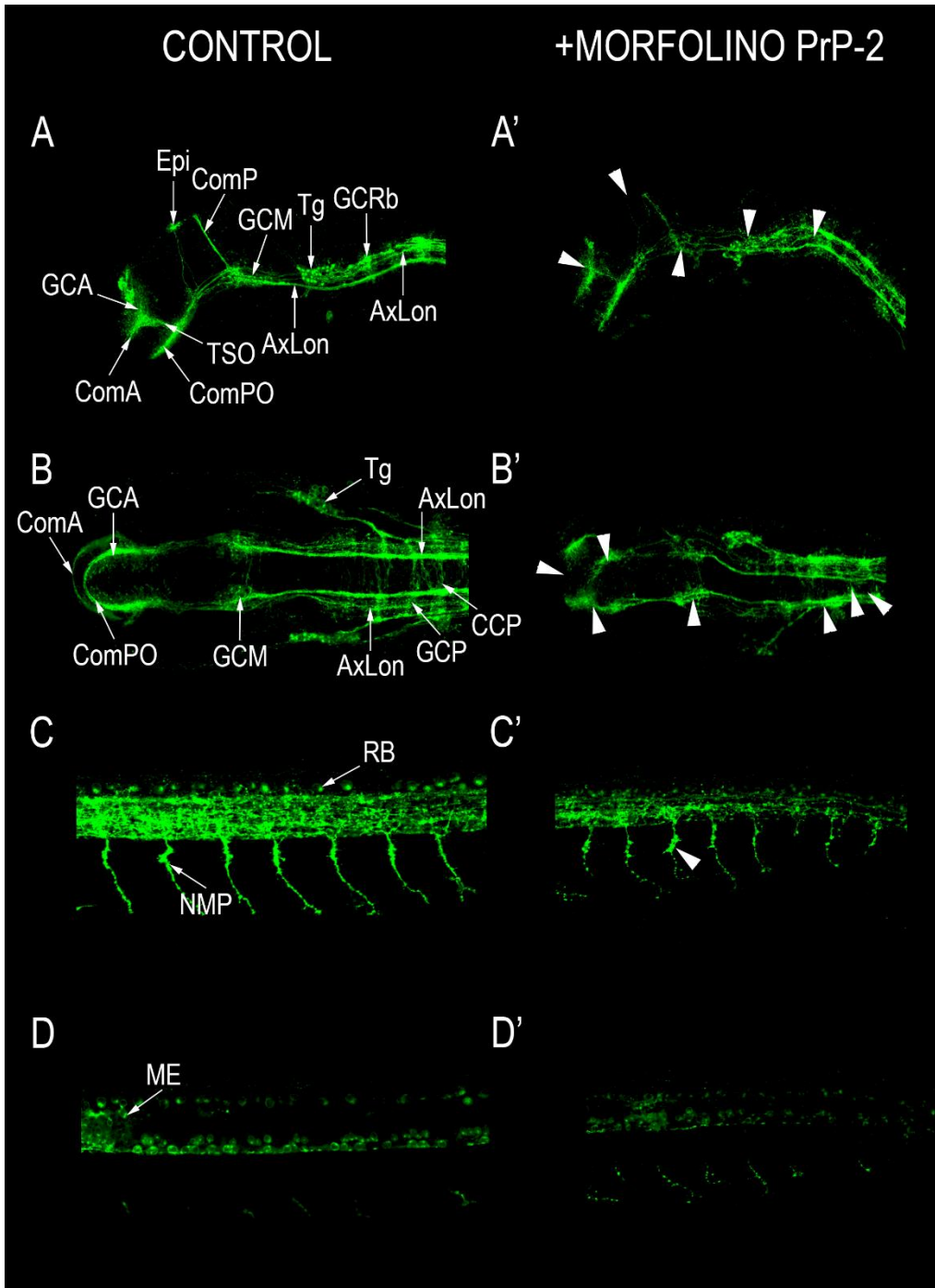


Figura 20. Patrón de tinción usando el anticuerpo primario SV2 en embriones de 1 dpf. Se muestra en verde las estructuras reconocidas en cabeza o tronco y en distintas vistas: (A) y (A'), vista lateral de la cabeza; (B) y (B'), vista dorsoventral de la cabeza; (C) - (D') vistas laterales del tronco. Las flechas indican estructuras o tejidos. Las puntas de flecha blancas indican estructuras

alteradas en embriones con producción reducida de PrP-2. Epi, epífisis; ComP, comisura posterior; GCM, ganglio del cerebro medio; Tg, ganglio trigémino; GCRb, ganglios centrales de los rombómeros; GCA, ganglios del cerebro anterior; ComA, comisura anterior; ComPO, comisura post-óptica; TSO, tracto supraóptico; AxLon, axones longitudinales; RB, neuronas

Rohon-Beard; NMP, neuronas motoras primarias, ME, médula espinal, CCP: axones comisurales del cerebro posterior.

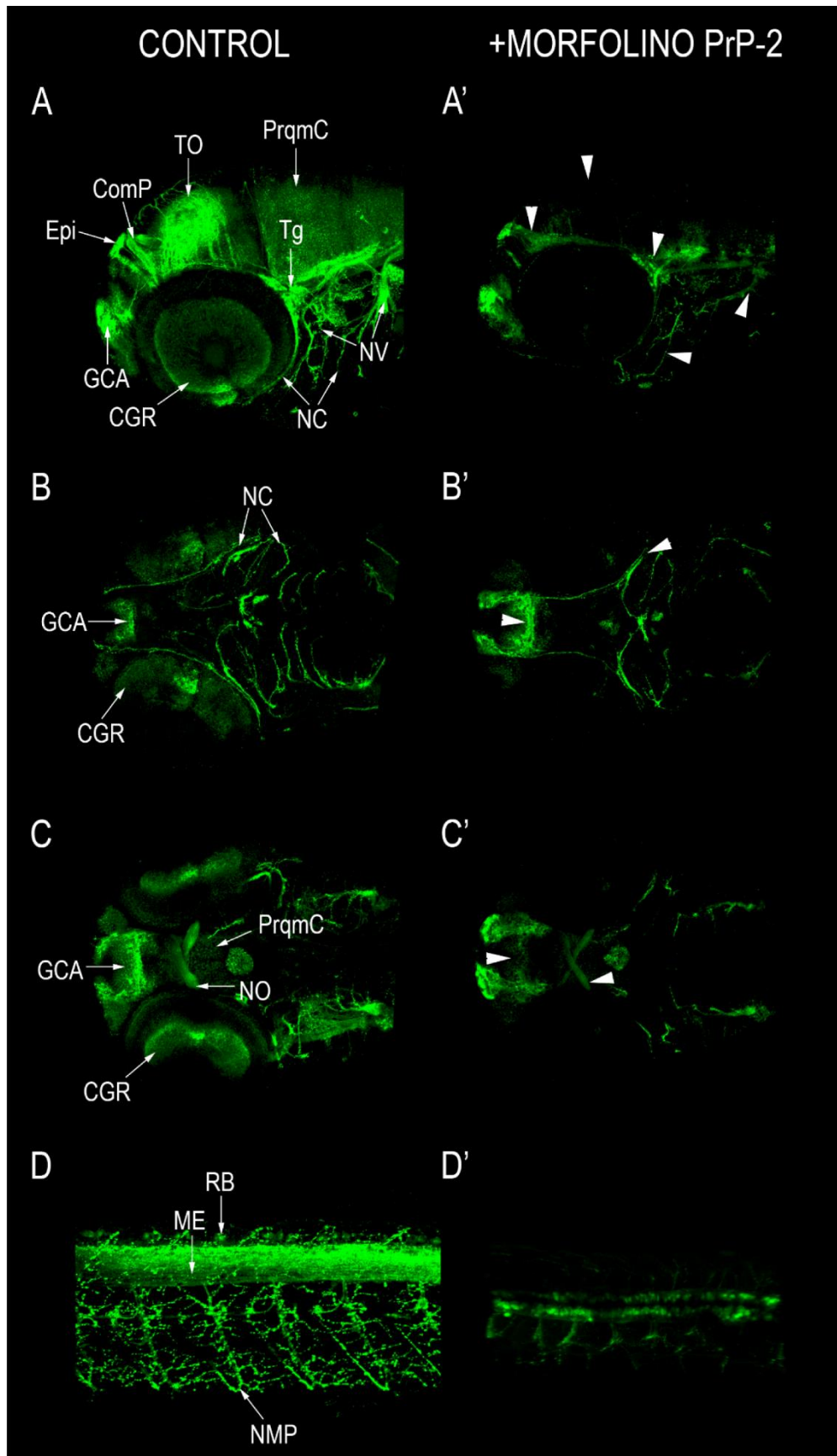


Figura 21. Patrón de tinción usando el anticuerpo primario SV2 en embriones de 2 dpf. Se muestra en verde las estructuras reconocidas en cabeza o tronco y en distintas vistas: (A) y (A'), vista lateral de la cabeza; (B) y (C'), vista dorsoventral de la cabeza; (D) - (D') vistas laterales del tronco. Las flechas indican estructuras o tejidos. Las puntas de flecha blancas indican estructuras alteradas en embriones con producción reducida de PrP-2. TO, tectum óptico; PrqmC, parénquima cerebral; ComP,

comisura posterior; Epi, epífisis; Tg, ganglio trigémino; GCA, ganglios del cerebro anterior; CGR, células ganglionares de la retina; NC, nervios craneales; NV, nervio vago; NO, nervio óptico; RB, neuronas Rohon-Beard; ME, médula espinal; NMP, neuronas motoras primarias.

Visualizar los patrones de tinción con detenimiento nos permitió no solo identificar cada una de las estructuras o tejidos reconocidos (Tabla 7), que suman un total de 37 elementos identificados, sino también el poder ubicarlos dentro del embrión y determinar la mejor manera de visualizar estructuras puntuales. Por ejemplo, este análisis nos permitió determinar desde qué vista (lateral, dorsal, ventral) se puede apreciar mejor cada estructura y además crear una matriz en la que se puede de manera práctica elegir qué anticuerpo es el mejor para visualizar tal o cual estructura (Tablas 7 y 8). Esto es útil para este estudio ya que complementa nuestro objetivo de estandarizar y validar el uso de inmunotinciones en el contexto del estudio de la proteína priónica. Por otro lado, estos mismos patrones de tinción también nos permitieron identificar qué estructuras se veían alteradas en embriones tratados con morfolino para PrP-2 comparadas con aquellas en los embriones control (Figuras 14 – 21, Tabla 7).

Tabla 7. Estructuras visualizadas ordenadas según los 4 anticuerpos primarios elegidos y según estadio						
I Ab	Estadio	Estructuras	Región		Intensidad	Mejor vista
ZN8	<i>prim-5</i>	Piel	cabeza	Tronco	5	NA
		Músculos	cabeza	Tronco	5	NA
		Axones longitudinales	cabeza	Tronco	5	NA
		Placa del piso	cabeza	Tronco	4	l
		Parénquima cerebral	cabeza	Tronco	1.5	NA
		Téctum óptico	cabeza	tronco	2	D
		Células progenitoras de la retina	cabeza	tronco	3.5	l>d=v

		Epitelio del lente	cabeza	tronco	3.5	l>d=v
		Ganglio trigémino	cabeza	tronco	5	l>d>>v
		Ganglios centrales de rombómeros	cabeza	tronco	5	v>l>>>d
		Neuronas Rohon-Beard	cabeza	tronco	0.5	l=d
	<i>long-pec</i>	Piel	cabeza	tronco	5	NA
		Músculos	cabeza	tronco	5	NA
		Axones longitudinales	cabeza	tronco	5	NA
		Placa del piso	cabeza	tronco	4	l
		Parénquima cerebral	cabeza	tronco	4	NA
		Téctum óptico	cabeza	tronco	4	d>>>>>l>v
		Nervios craneales	cabeza	tronco	5	v + l
		Nervio óptico	cabeza	tronco	5	v>>>>>d
		Células ganglionares de la retina	cabeza	tronco	4	l>>d=v
		Ganglio trigémino	cabeza	tronco	5	l>>d>>>v
		Ganglios centrales de rombómeros	cabeza	tronco	5	l>>v>>>d
		Placa del techo	cabeza	tronco	2.5	l
		Médula espinal	cabeza	tronco	4.5	l
		Neuronas motoras secundarias	cabeza	tronco	5	l
zn12	<i>prim-5</i>	Piel	cabeza	tronco	5	NA
		Músculos	cabeza	tronco	4	NA
		Axones craneales	cabeza	tronco	5	l=v=d
		Nervios craneales	cabeza	tronco	5	l+v
		Células progenitoras de la retina	cabeza	tronco	3.5	l>d=v

		Ganglios del cerebro medio	cabeza	tronco	4.5	v>>d>>>l
		Ganglio trigémino	cabeza	tronco	5	v>d>l
		Axones comisurales del cerebro posterior	cabeza	tronco	4	v>>>>d
		Ganglios del cerebro posterior	cabeza	tronco	4	l>d>>>v
		Ganglio de la línea lateral	cabeza	tronco	5	l>v>d
		Línea lateral	cabeza	tronco	4.5	l
		Neuronas Rohon-Beard	cabeza	tronco	5	l>d>>>>>v
	<i>long-pec</i>	Piel	cabeza	tronco	5	NA
		Músculos	cabeza	tronco	5	NA
		Tectum óptico	cabeza	tronco	4	d>>>l
		Axones craneales	cabeza	tronco	5	d=v=l
		Nervios craneales	cabeza	tronco	5	l>>>d>>>>v
		Ganglio trigémino	cabeza	tronco	5	l>>>d>v
		Parénquima cerebral	cabeza	tronco	3	l>>>v>d
zns2	<i>prim-5</i>	Parénquima del SNC	cabeza	tronco	5	l=d>>>>v
		Placa del piso	cabeza	tronco	3	l
		Placodios olfatorios	cabeza	tronco	3	v>>>l>>>>>d
		Retina	cabeza	tronco	5	l=d=v
		Cerebelo	cabeza	tronco	4	l
		Nervio vago	cabeza	tronco	3.5	l>>>>v
		Médula espinal	cabeza	tronco	5	l
	<i>long-pec</i>	Parénquima del SNC	cabeza	tronco	5	l+d-v
		Placa del piso	cabeza	tronco	4	l
		Placodios olfatorios	cabeza	tronco	5	v>>>l>>>>d
		Nervios craneales	cabeza	tronco	5	v>d>>>>>l
		Retina	cabeza	tronco	5	l=d=v

		Cerebelo	cabeza	tronco	4.5	1
		Nervio óptico	cabeza	tronco	2.5	v>>>>>d
		Nervio vago	cabeza	tronco	4	l>>>>>v>d
		Ganglio trigémino	cabeza	tronco	2.5	l>>>>>d>v
		Ganglio de la línea lateral	cabeza	tronco	2.5	l>>>>d>>v
		Médula espinal	cabeza	tronco	4	1
		Neuronas motoras	cabeza	tronco	1	1
SV2	<i>prim-5</i>	Ganglios del telencéfalo	cabeza	tronco	5	v>>>>l>d
		Ganglios del diencéfalo	cabeza	tronco	5	v>>>d>>>>l
		Epífnis	cabeza	tronco	5	d>>>>>l>v
		Tracto supraóptico	cabeza	tronco	5	
		Comisura post-óptica	cabeza	tronco	5	
		Tracto de la comisura post-óptica	cabeza	tronco	5	
		Comisura anterior	cabeza	tronco	5	
		Comisura posterior	cabeza	tronco	5	d>>>>>l>v
		Axones comisurales del cerebro posterior	cabeza	tronco	4	v>>>d
		Ganglios del cerebro posterior	cabeza	tronco	5	d>>>>v
		Ganglios centrales de rombómeros	cabeza	tronco	4	1
		Ganglio trigémino	cabeza	tronco	5	l>d>v
		Neuronas motoras primarias	cabeza	tronco	5	l>>>>>>d>v
		Neuronas Rohon-Beard	cabeza	tronco	5	d>l>>>v
		<i>long-pec</i>	Parénquima cerebral	cabeza	tronco	3
Ganglios del telencéfalo	cabeza		tronco	5	v>>>d>>>>l	
Nervios craneales	cabeza		tronco	5	v+l	

	Comisura posterior	cabeza	tronco	5	d>>>>>>l>v
	Comisura habenular	cabeza	tronco	5	d
	Epífisis	cabeza	tronco	5	d>>>>>>l>v
	Téctum óptico	cabeza	tronco	5	d>>>>>>>>l>v
	Células ganglionares de la retina	cabeza	tronco	3	d=v=l
	Nervio óptico	cabeza	tronco	4	v>>>>>>l>>>>d
	Ganglios centrales de rombómeros	cabeza	tronco	3.5	L
	Ganglio trigémino	cabeza	tronco	5	l>>>>d>v
	Nervio vago	cabeza	tronco	4	l>>>>>v>d
	Neuronas motoras primarias	cabeza	tronco	5	L

Las estructuras están puestas en orden de anterior a posterior y están en negrita aquellas que se ven afectadas por la disminución de PrP-2. Sombreado en gris se indica la región donde se encuentran. Se muestra la intensidad de la señal emitida en esa estructura para un anticuerpo y estadio determinado, donde 0.5 es que la señal es apenas visible y 5 que la señal es muy fuerte. Se muestra también la mejor vista para visualizar tal estructura, ordenándolas de mejor a peor, donde l = lateral, d = dorsal, v = ventral y NA = no aplica.

Tabla 8. Resumen de estructuras identificadas, señalando qué anticuerpo primario es óptimo para reconocerlas									
Estructura	Acrónimo	1 dpf				2 dpf			
		ZN8	zn12	zns2	SV2	ZN8	zn12	zns2	SV2
Axones longitudinales	AxLon	2	2	X	1	2	2	X	1
Piel	Piel	1	1	X	X	1	1	X	X
Músculos	Musc	1	2	X	X	1	2	X	X
Placa del piso	PPiso	1	X	1	X	1	X	1	X
Placa del techo	PTecho	1	X	X	X	1	X	X	X
Ganglios del cerebro anterior	GCA	X	2	X	1	X	2	X	1
Comisura anterior	ComA	X	X	X	1	X	X	X	X
Comisura post-óptica	ComPO	X	X	X	1	X	X	X	X
Comisura habenuar	ComH	X	X	X	X	X	X	X	1
Tracto de la comisura post-óptica	TComPO	X	X	X	1	X	X	X	X
Tracto supraóptico	TSO	X	X	X	1	X	X	X	X
Comisura posterior	ComP	X	X	X	1	X	X	X	1
Axones craneales	AxC	X	1	X	X	X	1	X	X
Nervios craneales	NC	X	1	X	X	1	1	X	1
Téctum óptico	TO	2	X	X	X	1	X	2	1
Células progenitoras de la retina	CPR	1	2	X	X	X	X	X	X
Células ganglionares de la retina	CGR	X	X	X	X	1	X	X	1
Epitelio del lente	len	1	X	X	X	1	X	X	X
Ganglio trigémino	Tg	2	1	3	1	2	1	3	1
Nervio óptico	NO	X	1	X	X	1	3	3	2
Ganglios del cerebro medio	GCM	X	1	X	2	X	X	X	X

Placodio olfatorio	PO	X	X	3	X	X	X	1	3
Retina	Ret		X	1	X		X	1	X
Nervio vago	NV	X	X	2	X	X	X	2	1
Cerebelo	Cbm	X	X	1	X	X	X	1	X
Epífisis	Epi	X	X	X	1	X	X	X	1
Parénquima del SNC	PrqmSN	X	X	1	X	X	X	1	X
Parénquima del cerebro	PrqmC	3	3	1	3	3	3	1	3
Ganglios del cerebro posterior	GCP	2	1	X	1	X	X	X	X
Ganglio de la línea lateral	pLLg	X	1	3	1	X	1	3	1
Ganglios centrales de los rombómeros	GCRb	X	2	X	1	3	3	3	2
Axones comisurales del cerebro posterior	CCP	X	1	X	1	X	X	X	X
Línea lateral	LL	X	1	X	X	X	X	X	X
Neuronas motoras primarias	NMP	X	X	X	1	X	X	X	1
Neuronas motoras secundarias	NMS	X	X	X	X	2	3	X	X
Neuronas Rohon-Beard	RB	3	1	X	1	X	X	X	3
Médula espinal	MedEsp	X	X	1	3	X	X	1	3

Se enlista las estructuras reconocidas y al costado de cada una se indica las siglas con las que están representadas en las figuras de patrones. Se indica qué anticuerpo primario se utilizaría preferentemente, según estadio, siendo 1: muy recomendado, 2: medianamente recomendado, 3: poco recomendado, X: no se obtiene señal.

A partir de esta información, no solo se cumplió con caracterizar las estructuras reconocidas por cada anticuerpo, sino que se pudo concluir que, efectivamente, existen diferencias visibles entre diferentes estructuras nerviosas de embriones control y embriones morfantes, tanto en cerebro anterior, medio y posterior como en el tronco, permitiéndonos continuar con los objetivos de este proyecto. Importantemente, las diferencias entre controles y morfantes correspondían a alteración en el desarrollo de las estructuras nerviosas (morfología), pero no a ausencia de ninguna de ellas.

Algunas observaciones adicionales a partir de estos resultados caben ser mencionados, ya que no sirvieron solo como referencias internas sino que son también productos de este trabajo. Primero, comparando el resultado de las tinciones para una misma estructura usando distintos anticuerpos primarios, notamos que la definición de las imágenes obtenidas era distinta, pudiendo establecer que esta variaba dependiendo del anticuerpo primario y no de la estructura en sí. Dado esto, se asignó un puntaje de definición a cada anticuerpo primario con valores del 1 al 10, donde a mayor puntaje, mejor es la definición, y fijando como referencia para puntaje máximo a la mejor de las definiciones que obtuvimos. Los puntajes de definición por anticuerpo primario fueron de 7/10, 8/10, 4/10 y 10/10 para ZN8, zn12, zns2 y SV2, respectivamente.

Segundo, es recalable que, según nuestras observaciones, cada anticuerpo es especialmente recomendable dependiendo de qué estructuras o poblaciones de neuronas se quisieran estudiar: para aquellas relacionadas a la visión, el anticuerpo primario ideal a usar es ZN8; para procesos axonales (como axones craneales y longitudinales), zn12; para morfología total del sistema nervioso, zns2 y para ganglios y neuronas motoras primarias, SV2. De nuevo, toda esta información complementa nuestro objetivo de estandarizar y validar la inmunotinción usando estos anticuerpos primarios en el contexto de elucidar funciones de la proteína priónica.

5.4 ANALISIS NEUROANATÓMICO, ETAPA 3: DESCRIPCIÓN DE ESTRUCTURAS NERVIOSAS EN ORGANISMOS CONTROL Y COMPARACIÓN CON MORFANTES

Ya que aparentemente la diferencia entre controles y morfantes parecía ser ubicua entre las estructuras nerviosas, se evidenció la necesidad de elaborar una caracterización con mayor detalle de estas, con el fin de identificar alteraciones puntuales. Así, usando el microscopio confocal, pero esta vez con un objetivo de 40X, se observó a detalle cada estructura que se vio alterada en los patrones de tinción dado el *knockdown* de PrP-2 y en la tinción mediada por aquel anticuerpo primario que ofrecía una mejor calidad para esta, permitiéndonos poder capturar las imágenes con la mejor calidad posible (Figuras 22 – 26).

A 1 dpf, en el cerebro anterior, medio y la parte anterior del cerebro posterior resaltan como fenotipos morfantes la desorganización en los ganglios del cerebro posterior y medio, comisuras cerebrales y axones comisurales (Figuras 22 A, A') y de la epífisis y la comisura posterior (Figura 22 B, B'). A 2 dpf, en el cerebro anterior y medio pueden ser visualizados y resaltan la alteración en los ganglios y comisuras del cerebro anterior (Figura 23 A, A'), la retina y el nervio óptico (Figura 23 B, B') y comisuras habenular y posterior, epífisis y tectum óptico (Figura 23 C, C').

En cuanto al cerebro posterior, en los embriones a 1 dpf se visualizó especialmente diferencias en el desarrollo de los ganglios centrales de los rombómeros (Figura 24 A y A'), además de en el ganglio trigémino (Figura 24 B y B'), donde también es interesante notar la enorme fluorescencia proveniente de algún compartimento interno de las neuronas en el caso de los morfantes, mientras que en el control esta fluorescencia en el cuerpo neuronal es más ubicua. A 2 dpf, el anticuerpo primario SV2 nos permitió visualizar las diferencias entre el ganglio trigémino y las proyecciones y el ganglio sensorial del nervio vago de organismos control y morfantes (Figura 25).

Finalmente, en el tronco, de nuevo usando el anticuerpo primario SV2, se visualizan diferencias entre los controles y morfantes en la médula espinal y en las neuronas motoras primarias (Figura 26), tanto a 1 como a 2 dpf.

Las descripciones a detalle de todas las estructuras visualizadas (a partir de las etapas 2 y 3 de los análisis neuroanatómicos) en los organismos control y las diferencias en las estructuras cuyo desarrollo se vio alterado están ordenadas en la Tabla 9.

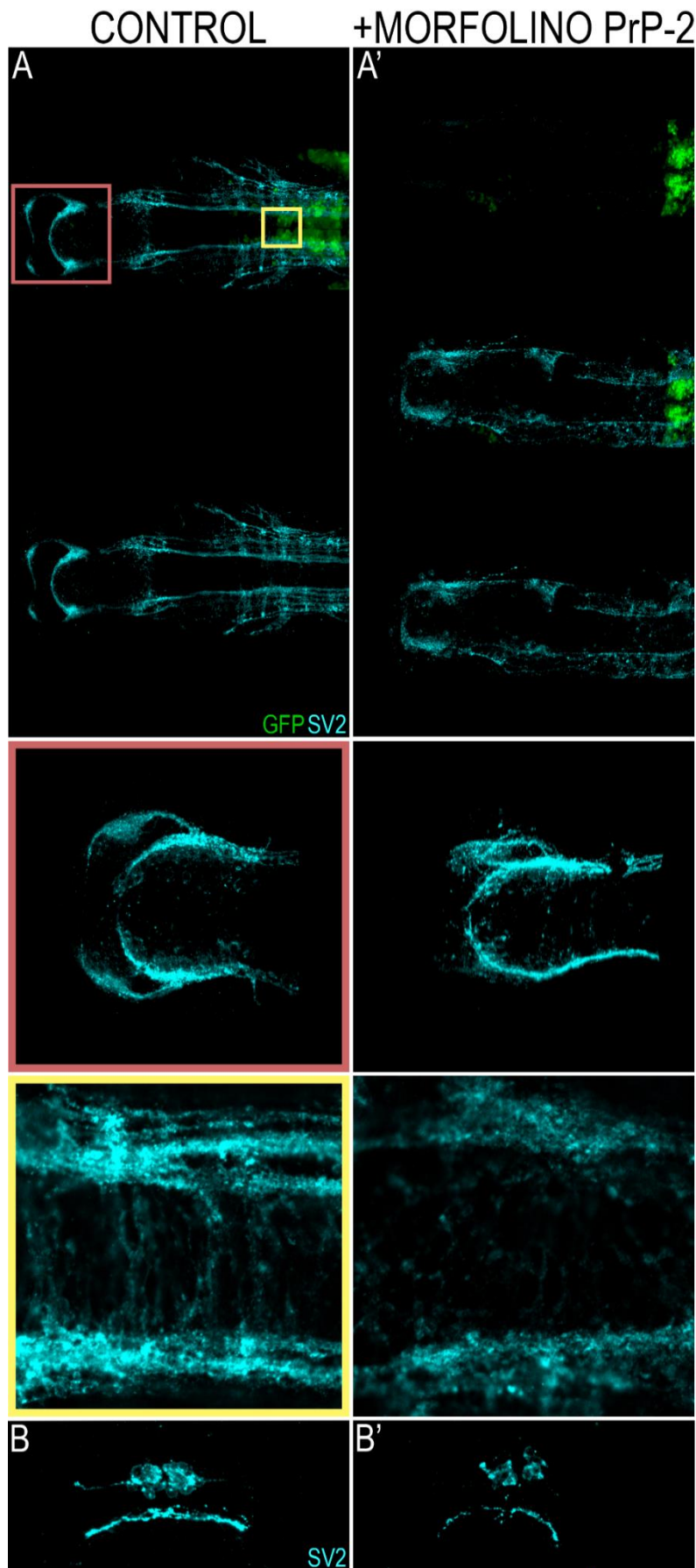


Figura 22. Estructuras nerviosas alteradas en el cerebro anterior y medio y región anterior del cerebro posterior de embriones morfantes a 1 dpf. (A) y (A') muestran en un organismo control y un morfante, respectivamente, una toma ventral (*z-stack* y *tile-scan*) donde se observan los ganglios del cerebro anterior, comisuras cerebrales, ganglios del cerebro medio y axones comisurales del cerebro posterior en organismos control y morfantes, respectivamente. Sin cambios visualizados, se observan además los axones longitudinales. En (A), se muestran dos paneles, donde el superior muestra en celeste la señal del anticuerpo primario SV2 y en verde la señal de GFP en los rombómeros, expresado bajo el promotor *hb9*, mientras que en la inferior solo se ve la señal del anticuerpo primario en color celeste. En (A'), el primer panel es el resultado de un procesamiento similar al que recibió la imagen del control, mientras que en los dos paneles debajo de este la intensidad fue ajustada para poder visualizar las estructuras alteradas. La correspondencia de paneles

entre (A) y (A') es, respectivamente: primer panel con segundo panel y segundo panel con tercer panel. Las imágenes rodeadas de un cuadrado rojo (*z-stack*) y amarillo (*z-stack*) fueron tomadas con mayor aumento y mostradas en la parte inferior de la figura. Aumento: 0.8X, 1.5X (panel rojo), 2X (panel amarillo). En (B) se muestra una toma dorsal (*z-stack*) la señal del anticuerpo primario SV2 en celeste, marcando la epífisis y la comisura posterior en un organismo control mientras que en (B') lo mismo correspondiente a un organismo morfante. La correspondencia de los lados con los ejes es la siguiente: arriba, dorsal; izquierda, ventral. Aumento: 1.5X.

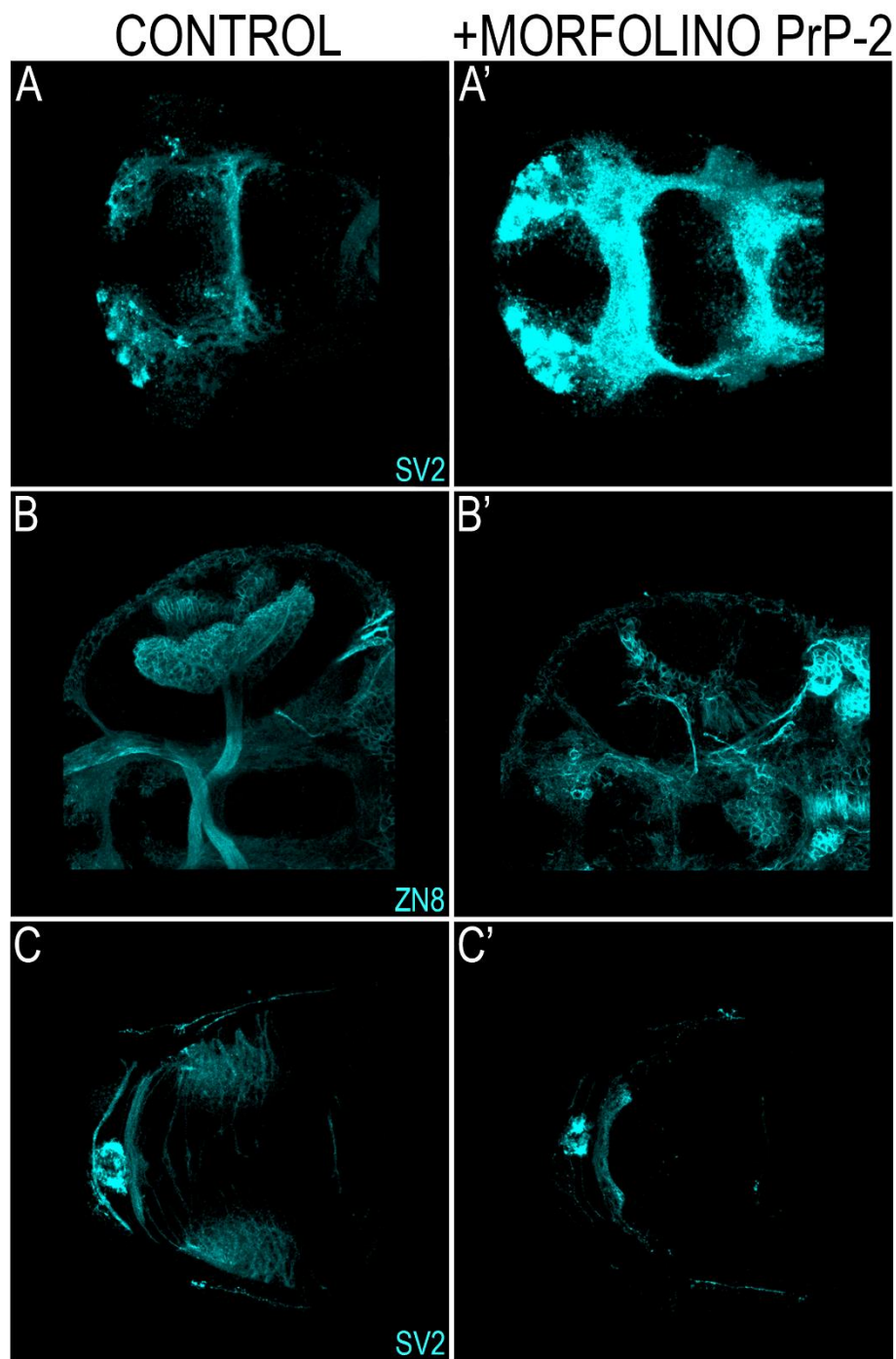


Figura 23. Estructuras nerviosas alteradas en el cerebro anterior y medio de embriones morfantes a 2 dpf. En (A) y (A') se muestra en tomas ventrales (*z-stack*), en celeste la señal del anticuerpo primario SV2, marcando ganglios del cerebro anterior y comisuras cerebrales en un organismo control y morfante, respectivamente. Aumento: 1.5X. (B) y (B') muestran

en tomas ventrales (*z-stack*) en celeste la señal del anticuerpo primario ZN8, que marca las células ganglionares de la retina y el nervio óptico. Aumento: 0.8X. (C) y (C') muestran en tomas dorsales (*z-stack*) celeste la señal del anticuerpo primario SV2, marcando comisuras cerebrales, la epífisis y el tectum óptico en embriones control y morfantes, respectivamente. Aumento: 1X.

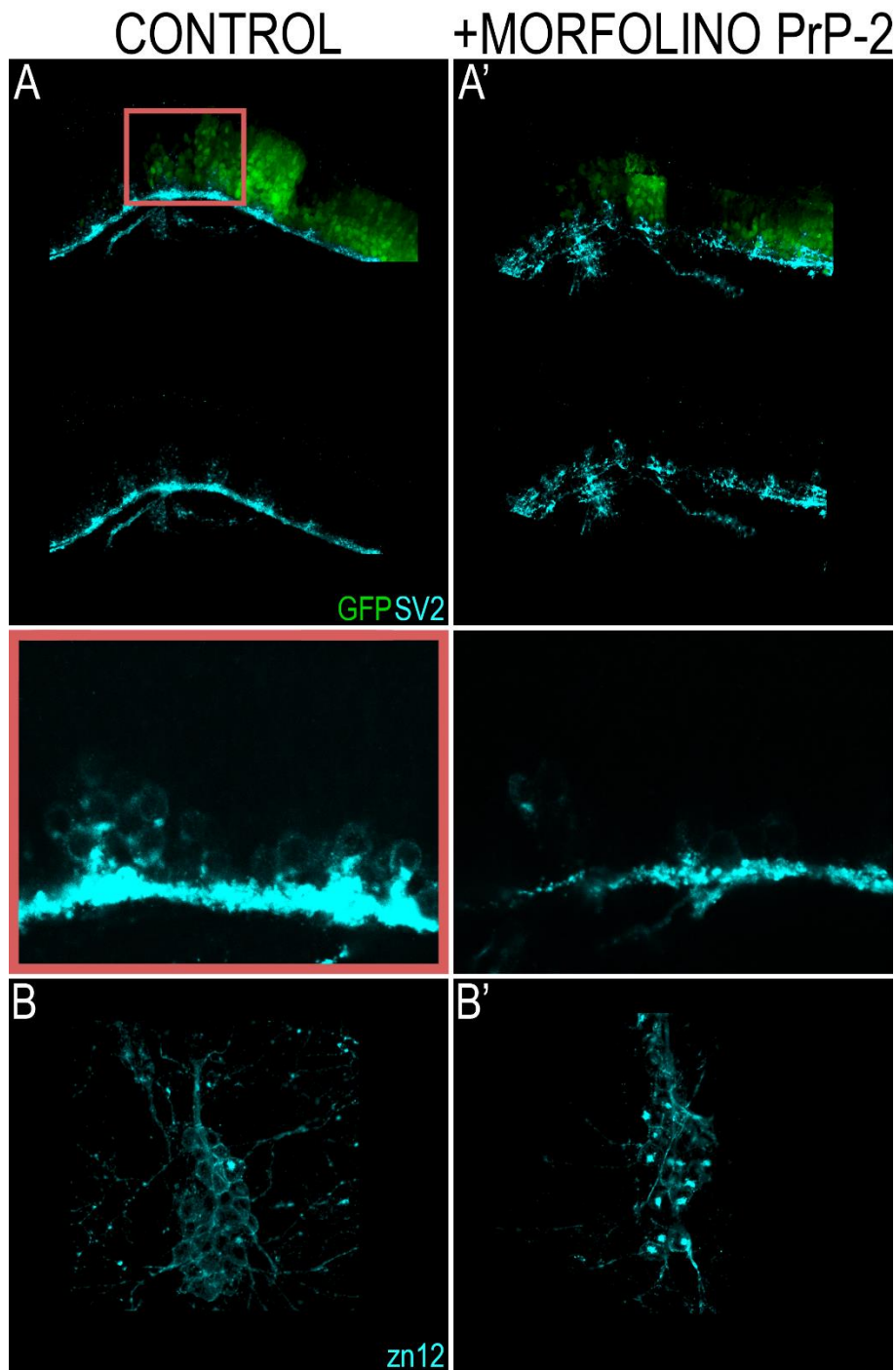


Figura 24. Estructuras nerviosas alteradas en el cerebro posterior de embriones morfantes a 1 dpf. (A) y (A') muestran en vista lateral (*z-stack* y *tile-scan*) dos paneles cada uno, donde en los superiores se puede visualizar en verde la señal de GFP expresada bajo el promotor de *hb9* en los rombómeros, mientras que tanto en el panel superior como el inferior se ve en celeste la señal del anticuerpo primario SV2 marcando los ganglios centrales de los rombómeros, además de axones longitudinales aparentemente no afectados. Aumento: 1X. Debajo de estos paneles (*z-stack*), se muestra una magnificación

de los ganglios centrales de los rombómeros. Aumento: 2X. (B) y (B') muestran en tomas laterales (*z-stack*) y en celeste la señal del anticuerpo primario *zn12* marcando el ganglio trigémino anterior de embriones control y morfantes, respectivamente. La correspondencia entre lados y ejes es: arriba, posterior; derecha, ventral. Aumento: 1.5X.

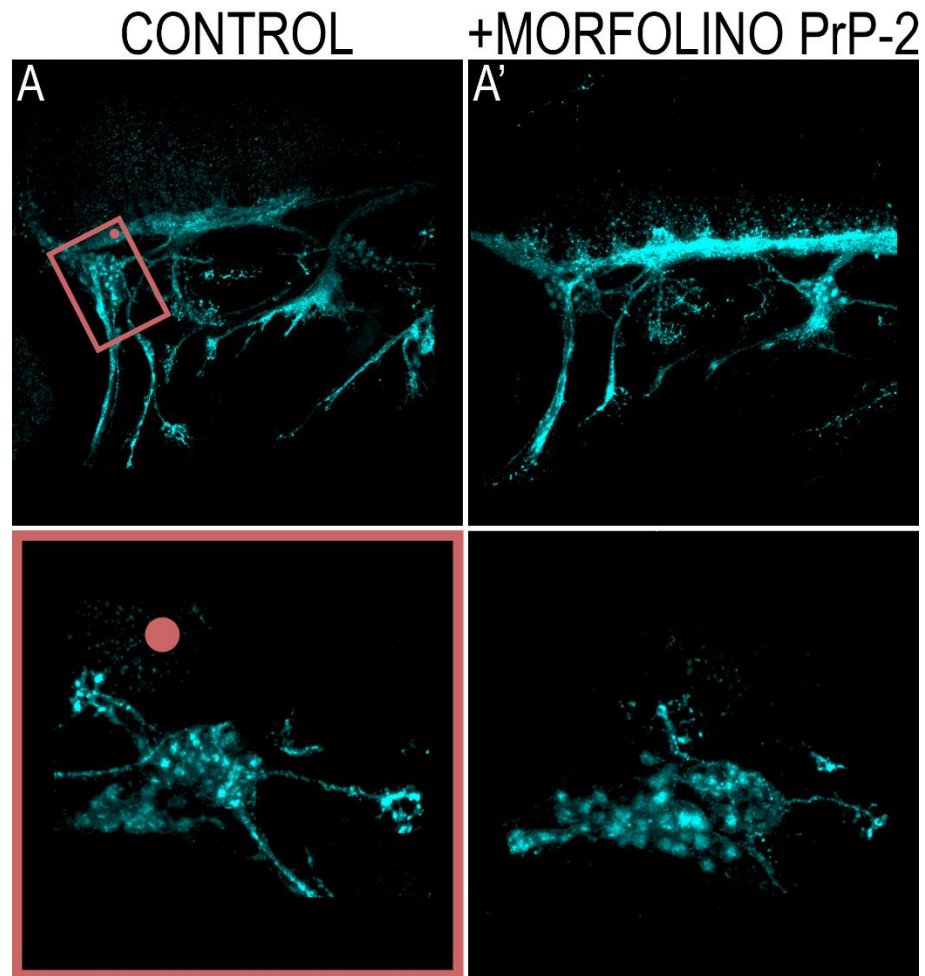


Figura 25. Estructuras nerviosas alteradas en el cerebro posterior de embriones morfantos a 2 dpf, teñidas usando el anticuerpo primario SV2. En (A) y (A') se muestra en tomas laterales (z-stacks) y en celeste la señal del anticuerpo primario marcando el ganglio trigémino, los ganglios centrales de los rombómeros y las proyecciones y ganglio sensorial del nervio vago. Aumento: 1X. Inmediatamente abajo, se muestran magnificaciones del ganglio trigémino (z-stack). Aumento: 1.5X.

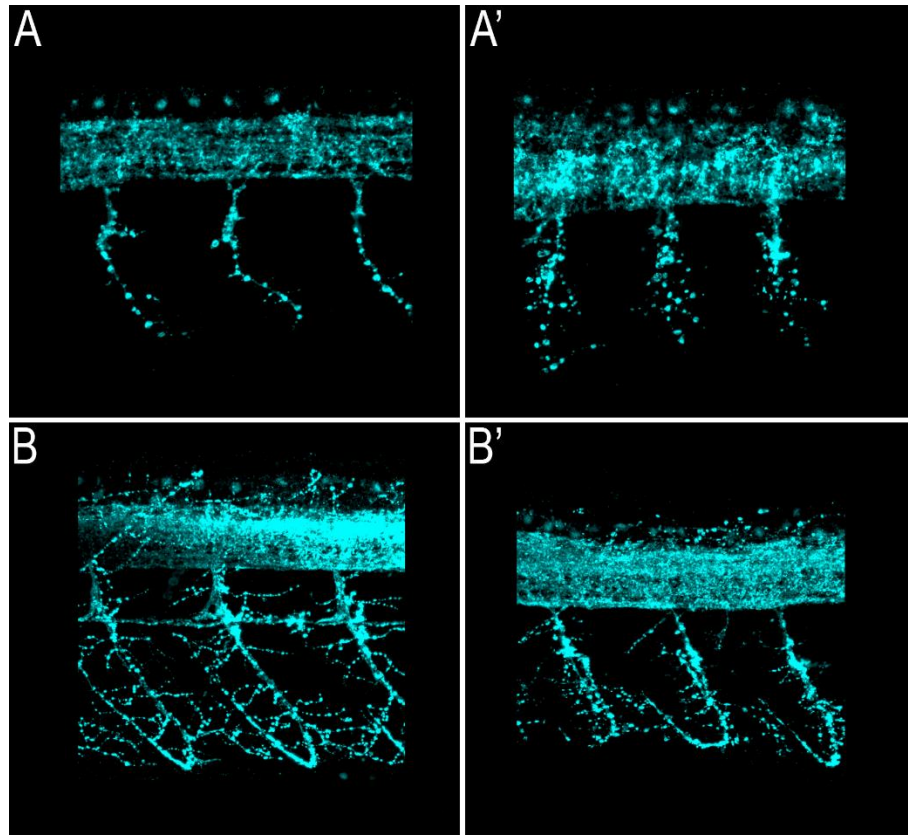


Figura 26. Estructuras nerviosas alteradas en el tronco de embriones morfantes a 1 y 2 dpf teñidas usando el anticuerpo primario SV2. En (A) y (A') se muestran en tomas laterales (z-stack) del tronco de embriones a 1 dpf control y morfantes, respectivamente. Se observan los axones de las neuronas motoras primarias y la médula espinal, además de aparentemente normal las neuronas Rohon-Beard. Aumento: 1X. En (B) y (B') se muestran en tomas laterales (z-stack) del tronco de embriones a 2 dpf control y morfantes, respectivamente. Se observan los axones de las neuronas motoras primarias y la médula espinal, además de aparentemente normal las neuronas Rohon-Beard. Aumento: 1X.

Tabla 9. Descripción del total de estructuras nerviosas visualizadas		
Estructura	Edad	Descripción
Estructuras del cerebro anterior		
Placodio olfatorio	1 dpf	En este período, las células del placodio olfatorio están dispersas en la región anterior a cada uno de los ojos y no forman una estructura discreta.
	2 dpf	En la parte más anterior y ligeramente ventral del embrión, tiene forma de un elipsoide hueco partido a la mitad en su lado más largo, donde el espacio cóncavo resultante se encuentra hacia afuera del organismo.
Células progenitoras de la retina	1 dpf	En la retina, se observan células que se proyectan desde el centro (zona basal) hasta el borde externo del ojo (zona apical). Estas células tienen una región ovalada (lo que será el cuerpo), ubicada aleatoriamente en cualquier parte entre el eje apical-basal, y cuyas proyecciones están aparentemente ancladas a ambos extremos. Las células se encuentran en mayor proporción en la región nasal que en la temporal.
	2 dpf	No visualizado
	Alteración en MI	Se observan menos células o en patrones diferentes a aquellos visualizados en organismos control.
Células ganglionares de la retina	1 dpf	No visualizado
	2 dpf	Se observan como un grupo compacto de células en el interior de la retina, que van desde la zona basal hasta aproximadamente la mitad entre la zona apical y la basal de la retina. Aunque el conjunto de células tiene un borde externo ligeramente irregular, el límite externo de la estructura como un todo es parejo.

	Alteración en MI	El límite externo de las células pierde su regularidad, habiendo partes de la estructura donde alcanza la mitad entre el centro y el borde externo de la retina y otros donde alcanza, por ejemplo, un cuarto de esta. Las células parecen bastante desordenadas.
Retina	1 dpf	En la región anterior y ventral en la cabeza, se observa como una estructura elíptica, compacta y con bordes y límites externos regulares. Ocupa aparentemente todo el ojo, alrededor de 1/3 del total de la vista lateral de una cabeza.
	2 dpf	
	Alteración en MI	Deja de ser una estructura elíptica porque pierde la regularidad de los límites externos. Además, su tamaño es inferior al de un embrión control. Muchas veces la apariencia de las retinas difiere entre las dos de un mismo embrión.
Ganglios del cerebro anterior	1 dpf	En la parte anterior a los ojos y a la mitad del embrión (rodeando la línea media que divide los hemisferios derecho e izquierdo), se encuentran cuatro ganglios, dos en cada hemisferio. Se observan como pequeños grupos de cuerpos neuronales compactados entre ellos, formando estructuras ligeramente extendidas, como medialunas. De estos cuatro, dos de ellos se ubican dorsalmente (núcleos de la comisura anterior) y dos de ellos, ventralmente (núcleos de la comisura post-óptica).
	2 dpf	
	Alteración en MI	Los núcleos lucen desordenados, sin ningún patrón o forma específico. Los cuerpos neuronales parecen reducidos en número y han perdido coalescencia.
Comisuras y tractos cerebrales	1 dpf	Incluye la comisura anterior, comisura post-óptica, comisura posterior y comisura habenuar, y también
	2 dpf	

		los tractos supraópticos y post-ópticos. Aglomerado de axones que forman fibras compactas y relativamente gruesas, conectado un hemisferio cerebral con el otro (comisuras) o estructuras del mismo hemisferio (tractos).
	Alteración en MI	Los haces de axones lucen menos compactados y difusos comparados con el control.
Epitelio del lente	1 dpf	Alrededor del lente ocular, que está en el centro del ojo, se distingue un tejido monoestratificado con células de forma ligeramente rectangular.
	2 dpf	
Nervio óptico	1 dpf	Apenas visualizado como una fibra delgada que se proyecta contralateral y ventralmente desde la parte basal y posterior la retina.
	2 dpf	Haces gruesos y compactos, de superficie aparentemente lisa. Son un conglomerado de los axones de las células ganglionares de la retina, que surgen de la parte basal y posterior de la retina y tienen proyección ventral contralateral.
	Alteración en MI	Se observa bastante más delgado que el nervio óptico control, reducido entre 50 y 75 %.
Nervios craneales	1 dpf	Visualizados apenas como fibras cortas proyectadas desde ganglios craneales.
	2 dpf	Proyecciones de un conjunto de axones que surgen de los ganglios craneales (trigémino, vago...). Tienen direcciones distintas pero son consistentes entre los organismos control. Se observan como fibras compactas y que se dividen en proyecciones menores en los extremos.

	Alteración en MI	Los nervios son mucho más cortos y siguen direcciones anormales comparadas con aquellas en organismos control.
Axones craneales	1 dpf	Se observa como una red de conexiones bastante finas y superficiales, casi justo debajo de la piel, por toda la cabeza.
	2 dpf	
Parénquima cerebral	1 dpf	Tejido del cerebro en su totalidad. Posicionado en la parte dorsal y anterior del embrión, en la cabeza. Se distinguen células redondeadas, formando un tejido aparentemente muy compacto.
	2 dpf	
	Alteración en MI	El parénquima cerebral como un todo se observa más pequeño en los organismos microinyectados comparados con el control.
Estructuras del cerebro medio		
Epífisis	1 dpf	En la parte más dorsal y anterior del cerebro medio, se observa como dos ganglios pequeños en forma de racimo (uno a cada lado del hemisferio), aparentemente no interconectados pero próximo el uno del otro. De ellos, se desprenden proyecciones axonales ventralmente y hacia ambos costados del embrión.
	2 dpf	
	Alteración en MI	Los cuerpos neuronales se ven desordenados y las proyecciones que salen de estos, más delgadas.
Tectum óptico	1 dpf	En la región dorsal y anterior del cerebro medio se observan células que se extienden desde la zona más distal hasta la línea media del embrión (zona proximal). Estas células ocupan una región ovalada, y tienen proyecciones que parecieran anclarlas a los extremos distales y ventrales del cerebro medio.

	2 dpf	En la región dorsal y anterior del cerebro medio y proximal y posterior a los ojos, se observan cuerpos neuronales compactados unos a otros, formando una capa que ocupa aproximadamente 1/3 de la superficie dorsal del cerebro medio. De este grupo de células se desprenden proyecciones axonales comisurales y otras proyecciones hacia las regiones distales y ventrales del cerebro medio.
	Alteración en MI	El área que ocupa el tectum óptico se ve disminuida, así como el número y grosor de las proyecciones en general.
Ganglios diencéfalo	1 dpf	Cuerpos neuronales redondos formando racimos dispersos pero ordenados a lo largo del eje antero-posterior del cerebro medio, en sus regiones distales. Sus proyecciones, entre otras, dan origen a los axones longitudinales que recorren todo el embrión hacia el extremo posterior.
	2 dpf	No visualizado
	Alteración en MI	Los cuerpos neuronales se ven desordenados en comparación al grupo control.
Cerebelo	1 dpf	En el extremo posterior del cerebro medio, colindando con el cerebro posterior, se ve como un pliegue grueso del parénquima cerebral.
	2 dpf	
Estructuras del cerebro posterior		
Axones comisurales CP	1 dpf	Filamentos delgados (axones) en ligero desorden, pero paralelos unos a otros y contralaterales. Poco abundantes. Ubicados en la parte ventral del cerebro posterior.
	2 dpf	No visualizado

	Alteración en MI	Los axones dejan de parecer paralelos, tomando direcciones variadas aunque siempre yendo de un hemisferio a otro.
Ganglio trigémino	1 dpf	Ligeramente ventral respecto al embrión y posterior a cada uno de los ojos. Compuesto por dos núcleos: el posterior y el anterior. A 1 dpf, los núcleos son claramente distinguibles pues están bastante separados, mientras que a 2 dpf un ganglio está al costado del otro, formando entre ambos una estructura piramidal, cuyo lado más largo (“base”) da la impresión de estar apoyado sobre el costado dorsal-posterior del ojo. Apariencia de racimo, compacto, con largas y notorias proyecciones (nervios craneales), donde resaltan las supraópticas y post-ópticas.
	2 dpf	
	Alteración en MI	El ganglio pierde lo compacto, teniendo algunas células incluso ligeramente alejadas del grupo, mientras que el grupo mismo luce menos compacto.
Ganglios del cerebro posterior	1 dpf	Grupo de cuerpos neuronales casi pegados a los axones longitudinales y formando hasta tres filas de ancho. No están muy juntos entre ellos.
	2 dpf	No visualizado
	Alteración en MI	Los ganglios aparecen ligeramente desordenados.
Nervio vago	1 dpf	Visualizado apenas como una proyección corta que sale ventralmente de la parte posterior del cerebro posterior.
	2 dpf	Proyección axonal gruesa que se extiende ventralmente desde el rombómero caudal. Se observa

		además su ganglio sensorial. Ambos inmediatamente posteriores a la vesícula ótica.
	Alteración en MI	La proyección es más corta y delgada, además de tener una direccionalidad alterada. Su ganglio sensorial se ve también desordenado, habiendo perdido coalescencia.
Ganglios centrales de los rombómeros	1 dpf	Grupos de cuerpos neuronales pueden distinguirse a la mitad de cada rombómero, a partir de los cuales surgen algunos de los axones longitudinales. El ganglio da la impresión de estar extendiéndose dorsalmente desde el extremo ventral del cerebro posterior. El número de cuerpos varía, pero son siempre pocos (< 10). Tienen una compactación media.
	2 dpf	Se observan como un grupo de ganglios ascendentes (van desde la parte ventral hasta dorsal) en los rombómeros.
	Alteración en MI	Se pierde esta aparente direccionalidad de ventral a dorsal en muchas de las células, que además no están agrupadas formando un ganglio.
Estructuras del tronco		
Ganglio de la línea lateral	1 dpf	Ventral a los últimos rombómeros, posterior a la vesícula ótica y al nervio vago. Los cuerpos neuronales se encuentran agrupados de manera muy compacta.
	2 dpf	
Línea lateral	1 dpf	Proyección axonal que se desprende del ganglio de la línea lateral hacia el extremo posterior del embrión, ventral a la médula espinal.
	2 dpf	
Axones longitudinales	1 dpf	Axones que nacen principalmente de cuerpos neuronales del cerebro medio y de otros cuerpos
	2 dpf	

		neuronales a lo largo del cerebro posterior. Recorren el embrión hasta el extremo posterior. Hay dos por hemisferio: uno de ubicación proximal y ventral (medio) y otro, distal y dorsal (externo). No forman un haz perfecto, apareciendo algunos grupos de axones independientes por tramos.
Médula espinal	1 dpf	Continuación posterior del cerebro a lo largo del tronco del embrión. Forma tubular cerrada, compacta, que disminuye de grosor a lo largo del eje anterior-posterior hacia el extremo posterior.
	2 dpf	
	Alteración en MI	El grosor se ve disminuido, además de que algunas células que logran ser teñidas se ven deslocalizadas respecto al control.
Neuronas motoras primarias	1 dpf	Ubicadas en la región ventral de la médula espinal, a lo largo de todo el eje antero-posterior. Los cuerpos neuronales son redondos y tienen una sola proyección axonal ventral.
	2 dpf	Ubicadas en la región ventral de la médula espinal, a lo largo de todo el eje antero-posterior. Los cuerpos neuronales son redondos y pueden tener tres tipos de proyección: rostral, media-ventral y caudal-dorsal.
	Alteración en MI	La alteración se observa clara en los axones, que pueden o verse más cortos o con ramificaciones que han perdido direccionalidad. Además, el axón presenta muchas más variscosidades que el control.
Neuronas motoras secundarias	1 dpf	No visualizadas
	2 dpf	Se observan sus proyecciones siguiendo la proyección media de las neuronas motoras primarias. Tienen solo un tipo de proyección, a diferencia de las neuronas motoras primarias.

	Alteración en MI	Los axones pueden observarse más delgados y/o con la orientación alterada.
Neuronas Rohon-Beard	1 dpf	Dorsal a la médula espinal y a lo largo de todo el tronco en el eje antero-posterior, se observan cuerpos neuronales redondos, aislados, cuasiequidistantes y con proyecciones que se entremezclan con los axones longitudinales.
	2 dpf	
Placa del piso	1 dpf	En el extremo ventral y a la altura de la línea media del embrión, desde el cerebro medio hasta el extremo más posterior de la médula espinal, se observan como células rectangulares formando una capa monoestratificada bastante compacta.
	2 dpf	
Placa del techo	1 dpf	En el extremo dorsal y a la altura de la línea media del embrión, desde el cerebro medio hasta el extremo posterior de la médula espinal, se observan como células redondas y más grandes que las que les rodean en el parénquima de la médula espinal.
	2 dpf	

Se indica el día post-fertilización en el que son visualizadas las estructuras y cómo luce cada una de ellas. Alteración en MI: descripción de estructuras de encontrarse alterada en los organismos microinyectados con morfolino de PrP-2.

La descripción detallada de cada uno de los fenotipos obtenidos indican que si bien el *knockdown* de PrP-2 puede afectar más de una estructura, todos ellos podrían ser clasificados bajo cualquiera de estos dos grupos: ganglios o axones anormalmente desarrollados. Estos resultados sugieren que PrP-2 podría cumplir un rol en gangliogénesis o axogénesis en el desarrollo del sistema nervioso de embriones de pez cebra.

Por otro lado, si bien se utilizó DAPI como contratinción, notamos que también este puede ser utilizado para poder analizar alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso. Por

ejemplo, la retina se caracteriza por tener tres capas de neuronas: la primera está formada por los fotorreceptores, la segunda por células amacrinas, horizontales y bipolares y la tercera por células ganglionares. Estas capas son ya distinguibles a 2 dpf y se pueden visualizar con la señal de DAPI, que tiñe núcleos celulares (Figura 27A). Sin embargo, en los morfantes esta división de capas no se nota (Figura 27A'). Esto sugiere que DAPI podría ser usado no solo como contraindicación, sino también para analizar la correcta formación de estructuras, sobre todo aquellas en las que hay un orden claro como en la retina.

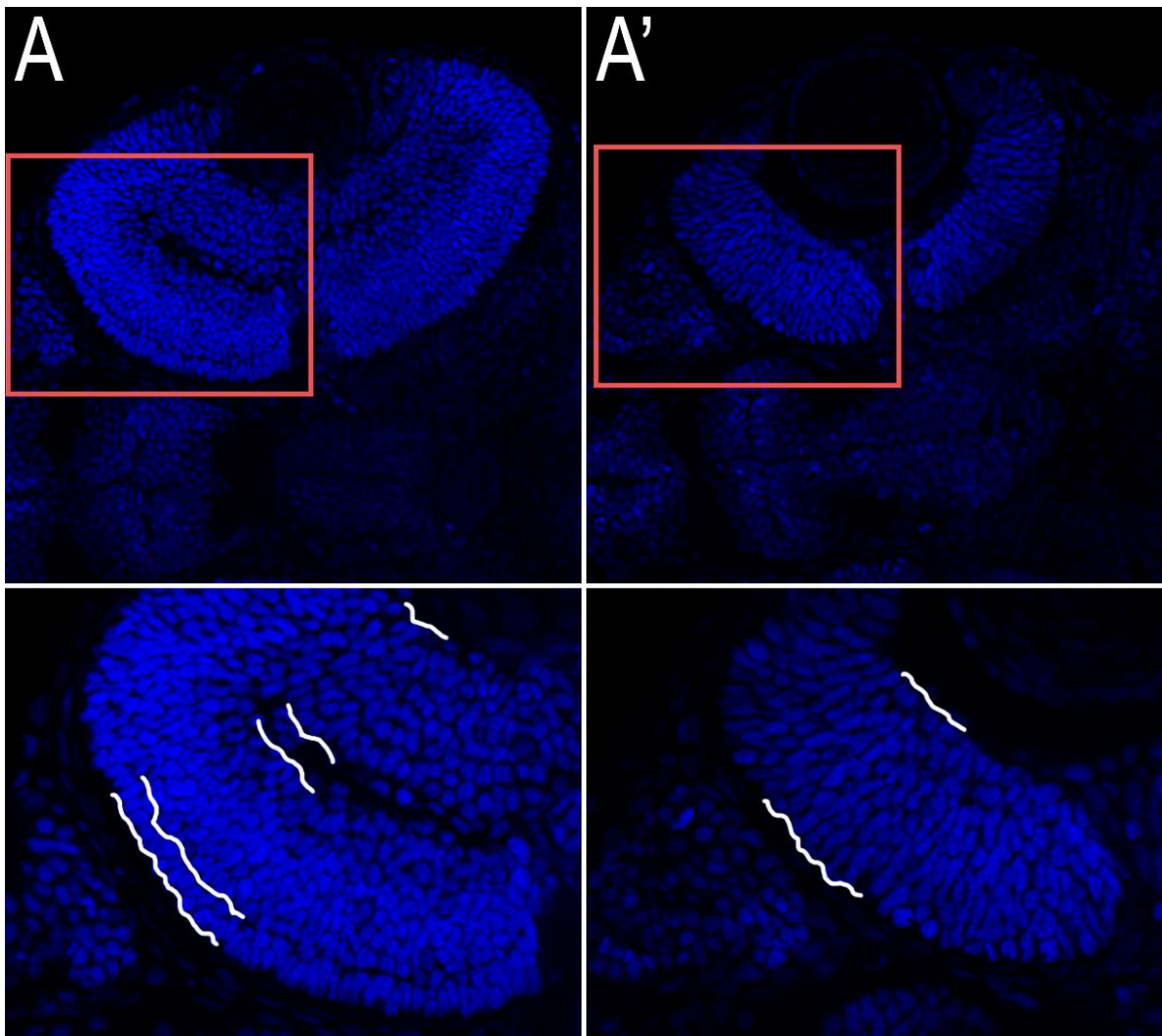


Figura 27. Núcleos celulares de la retina de un embrión control y uno morfante a 2 dpf visualizados con DAPI. (A) muestra la retina de un embrión control, mientras que (A') la del embrión morfante en los paneles superiores. Los paneles inferiores son una magnificación

de lo contenido en los recuadros rojos en los paneles superiores. Se marcó con líneas blancas parte de los límites de cada capa celular para resaltarlos. La toma es ventral y con un aumento de 0.8X.

5.5 ANÁLISIS CONDUCTUALES

El comportamiento en animales está dictado y controlado por el sistema nervioso. Ya que los resultados en inmunohistoquímica de este estudio sugieren que PrP-2 tiene un rol en el desarrollo del sistema nervioso, nos preguntamos si esto tendría también un efecto conductual. El observar alteraciones a este nivel podría darnos idea de las implicancias fisiológicas de la disminución de PrP-2, como también analizar si tiene un rol en vías descritas de comportamientos, lo que nos permitiría relacionar su función con determinadas estructuras y neurotransmisores. Para los organismos microinyectados, se utilizó la clasificación de fenotipos débiles, leves y severos, basados en tanto la morfología general como la intensidad de la fluorescencia de la señal de lisamina. Los organismos de fenotipo débil fueron descartados del estudio conductual. Con este fin, se efectuaron los experimentos conductuales, que se hicieron a 5 y 7 dpf.

Para poder llevar a cabo estos experimentos e interpretar correctamente los datos que nos proporcionen, creímos necesario contar con observaciones previas, a manera de una línea base. Con este fin, los embriones fueron observados en sus placas Petri día a día antes de esto. A partir de 1 dpf se notó que mientras los controles normalmente se mantienen quietos (~ 1 contracción/2 min), los microinyectados tienden a moverse espontáneamente más seguido (~ 1 contracción/30 segundos). Además, de moverse espontáneamente, el movimiento en los organismos controles era instantáneo (< 1 segundo de duración), mientras que el de los microinyectados tenía una mayor duración que el de los controles (> 2 segundos de duración, llegando incluso a ~ 10 segundos). Debido a limitaciones técnicas, no fue posible hacer mediciones exactas de esto. Sin embargo, estas observaciones permiten notar tendencias en cuanto al funcionamiento motor de los embriones.

Continuando con las observaciones previas, se hizo un test para evaluar la respuesta al tacto a los 2 dpf (Tabla 10), donde se halló que la duración de los movimientos (nados) iniciados una vez ocurrido el toque difería significativamente entre controles y morfantes ($p < 0.05$).

Tabla 10. Medidas resumen de la prueba de respuesta al tacto en embriones de 2 dpf

	CO	MI
Embriones observados (3 rondas)	10	10
Tiempo mínimo	0.19	0.28
Tiempo máximo	5.41	8.43
Media	1.344	3.2
Percentil 25	0.36	1.35
Percentil 75	1.74	4.72
Mediana	0.58	3.18
SD	1.49	2.15
SW valor <i>p</i>	0.0001	0.12

Se anotó el tiempo (en segundos) que duraba el movimiento de los embriones una vez que eran tocados. Se hicieron 3 observaciones con los mismos 10 embriones por grupo. El test de Shapiro-Wilk (SW) indica que los datos recogidos en el grupo control no siguen una distribución normal ($p < 0.05$), mientras que el grupo de microinyectados con morfolino sí la tiene. CO: grupo control; MI: grupo microinyectado con morfolino contra PrP-2.

A partir de estas observaciones, se concluyó que al ser tocados los embriones responden con movimientos cortos (que se ven como reacomodamientos del embrión sobre prácticamente el mismo sitio) o largos (se ven como un nado que implican desplazamiento por parte del embrión y culminan generalmente cuando el embrión ha alcanzado la pared de la placa). En el caso de los controles, los movimientos cortos predominan y duran normalmente menos de 2 segundos, mientras que los movimientos largos son infrecuentes. Por otro lado, en los organismos microinyectados los movimientos largos son más frecuentes y más duraderos que en los organismos control (Tabla 10).

A partir de los 4 dpf, el comportamiento de las larvas de pez cebra, entendido como patrones de nado, es más informativo que en etapas previas, ya que es el resultado del correcto funcionamiento e integración de diversas vías de señalización celular que están finalmente

maduras. Muchas de estas vías de señalización están mediadas, por ejemplo, por neurotransmisores, ya que el comportamiento está dictado por el sistema nervioso. Además, estructuras clave relacionadas al nado, tales como vejiga natatoria, visión y uniones neuromusculares ya están desarrolladas, ofreciendo mayor homogeneidad en los patrones de nado (53, 54). Es notable resaltar que el correcto funcionamiento de la vejiga natatoria y la visión dependen de manera importante del sistema nervioso. Así, se hicieron experimentos conductuales automatizados con el fin de determinar si el patrón de nado se ve afectado por la disminución de PrP-2. Estos consistieron en colocar una larva de 5 dpf por pocillo en una placa de 48 pocillos, con medio E3 al ras del pocillo, y registrar su patrón de nado con la ayuda del Zebrabox y Zebralab (ver *Materiales y métodos*). En ellos se comparó primero aspectos generales: cuánto tiempo pasaban activas y qué tipo de movimientos las larvas ejercían mientras estaban activas (inactivo, lento o rápido). Cabe mencionar que el grupo de larvas microinyectadas con fenotipo severo fue analizado, pero solo como control positivo de pérdida de función motora dado efectos extremos del *knockdown* de PrP-2. Esto ya que ellas no se recuperaron de las deformaciones en el tronco, añadiendo otra variable que nos impedía compararlas directamente con aquellas del grupo control y del de microinyectados con fenotipo leve. En ese sentido, las comparaciones fueron hechas solo entre el grupo control y el grupo de larvas microinyectadas que mostraban un fenotipo leve y cuyos troncos eran similares al grupo control. Se cuantificó el tiempo que las larvas estuvieron activas y el tiempo que pasaron ejerciendo tal o cual tipo de nado. Estos experimentos tuvieron una duración de 30 minutos y fueron realizados en oscuridad.

Para tener una mejor idea de la distribución, decidimos graficar los datos en diagramas de caja-bigotes (Figura 28), con el que se puede visualmente intuir que en el grupo control no solo la distribución es normal, sino que la desviación estándar es mucho menor que en los microinyectados con fenotipo medio, que coincide con la estadística (Tabla 11). Sin embargo, lo mismo no ocurre en los organismos tratados. Esto es interesante pues, como se ha mencionado previamente, el nado es resultado del desarrollo y maduración de tanto vías de señalización como estructuras relacionadas a él, y que las larvas nadan tan distinto unas de otras sugiere que ciertamente existen alteraciones dado el *knockdown* de PrP-2. Estas

alteraciones son de amplio rango, pues van desde movimiento nulo a una aparente hiperactividad (Figura 28A).

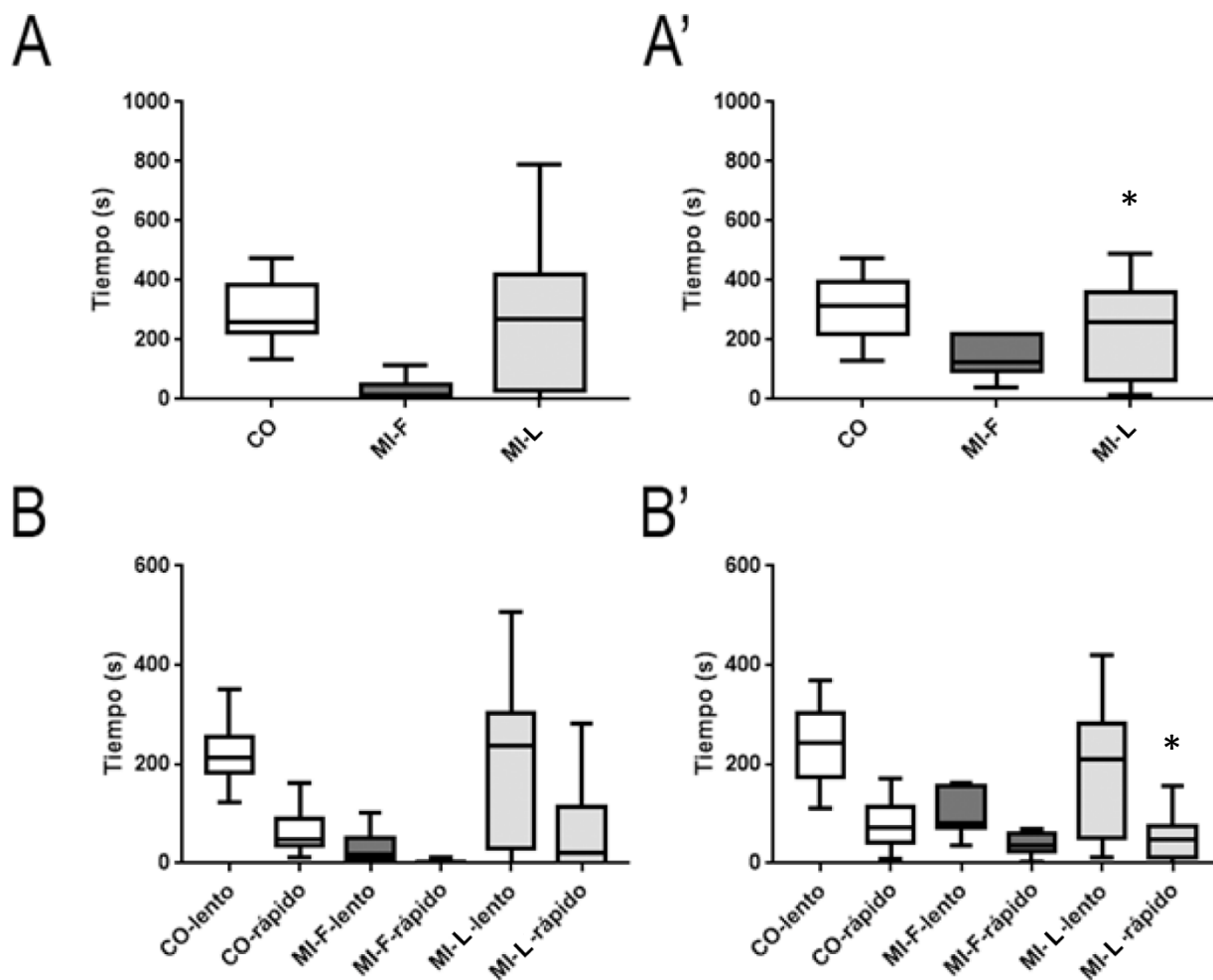


Figura 28. Diagramas de caja-bigote de tiempos de actividad y tipos de movimiento en larvas de 5 y 7 dpf control y morfantes. (A) y (A') muestran la distribución de los tiempos que las larvas pasan activas en un total de 30 minutos a 5 y 7 dpf, respectivamente. (B) y (B') muestran los tiempos que las larvas pasan ejerciendo movimientos lentos o rápidos en un total de 30 minutos a 5 y 7 dpf, respectivamente. CO, control; MI-F, microinyectado con fenotipo severo; MI-L, microinyectado con fenotipo leve. Media, desviación estándar y mediana a 5 dpf: CO, 286.8, 98.03, 260.3; MI-L, 254, 211.9, 270.9; CO-lento, 221.6, 61.48,

211.8; CO-rápido, 65.21, 44.15, 48.5; MI-L-lento, 198.7, 150.3, 237.1; MI-L-rápido, 55.34, 77.64, 21.55. Media, desviación estándar y mediana a 7 dpf: CO, 313.7, 101.6, 317.3; MI-L, 233.8, 151, 261.9; CO-lento, 239.2, 72.14, 242, CO-rápido, 74.53, 42.23, 73.2; MI-L-lento, 181.6, 120, 208.7; MI-rápido, 52.2, 43.54, 48.5. * = diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con control (solo fenotipo leve fue comparado y no fenotipo fuerte).

Tabla 11. Medidas resumen de la actividad total de larvas control (CO) y microinyectadas, con fenotipo leve (MI-L), a 5 y 7 dpf

	5 dpf		7 dpf	
	CO	MI-L	CO	MI-L
N	9 (× 2)	11 (× 2)	9 (× 3)	11 (× 3)
Mínimo	134.9	134.9	127.9	14.7
Máximo	472.5	0.5	476.8	492.4
Media	286.8	254	313.7	233.8
Percentil 25	223.9	29.68	217.9	62.85
Percentil 75	385	422.4	396.8	359.2
Mediana	260.3	270.9	317.3	261.9
SD	98.03	211.9	101.6	151
SW valor p	0.217	0.04	0.3	0.03

Se analizaron dos experimentos a 5 dpf y tres a 7 dpf. Los tiempos están representados en segundos. Según el test de Shapiro-Wilk (SW), los datos del grupo control siguen siempre una distribución normal, mientras que no es así para los microinyectados ($p < 0.05$).

Para entender mejor el amplio rango de los cambios en la actividad de las larvas, recurrimos a observar los patrones de nado (Figura 29), donde la data de cuantificación se vio explicada en que algunas larvas con fenotipo leve tenían patrones de movimiento bastante más recargados, mientras que otros se movieron apenas, además de otro grupo cuyo movimiento sí se parecía al del grupo control. Los del grupo control mantenían patrones de movimiento más constantes y similares entre sí, en los que las larvas nadaban normalmente pegados a las paredes de los pocillos, con movimientos mayormente rápidos. Es importante notar que si bien se trata de llevar a cabo los experimentos conductuales de tal forma que las larvas se ven alteradas en lo mínimo, hay muchos otros factores que son aún desconocidos o que no son controlados porque son intrínsecos a cada organismo, así que no es raro que existan algunas diferencias entre el patrón de nado de larvas control. Así, lo recalable son las tendencias observadas, que en este caso fueron similares. Sin embargo, al realizar comparaciones estadísticas entre el grupo control y el de los microinyectados con fenotipo leve a 5 dpf para la actividad total ($p = 0.58$), el movimiento corto ($p = 0.52$) y el movimiento largo ($p = 0.06$), no se encontraron diferencias significativas. Debe notarse que las pruebas estadísticas comparan el tiempo que las larvas pasan ejerciendo cierto tipo de movimiento, pero no las diferencias en los patrones de nado, que es también un componente importante y donde sí pueden observarse diferencias (Figura 29). En cuanto al fenotipo severo, solo a manera descriptiva, el desplazamiento se ve sumamente reducido. Esto, en algunos casos, por la inactividad total del individuo y, en otros, debido a sus impedimentos morfológicos para nadar. De estos últimos, algunos de ellos exhibían eventualmente movimientos similares a aquellos observados durante una epilepsia, una suerte de vibración desatada por la contracción aparentemente descontrolada en el tronco y que comprometía el movimiento de la larva en general. Esto puede ser observado en los patrones de nado (Figura 29). Es importante tener esto en cuenta pues va de acuerdo con la disminuida actividad e hiperactividad también observada en fenotipos leves, donde el nado es morfológicamente viable, tanto en la cuantificación como en los patrones de nado.

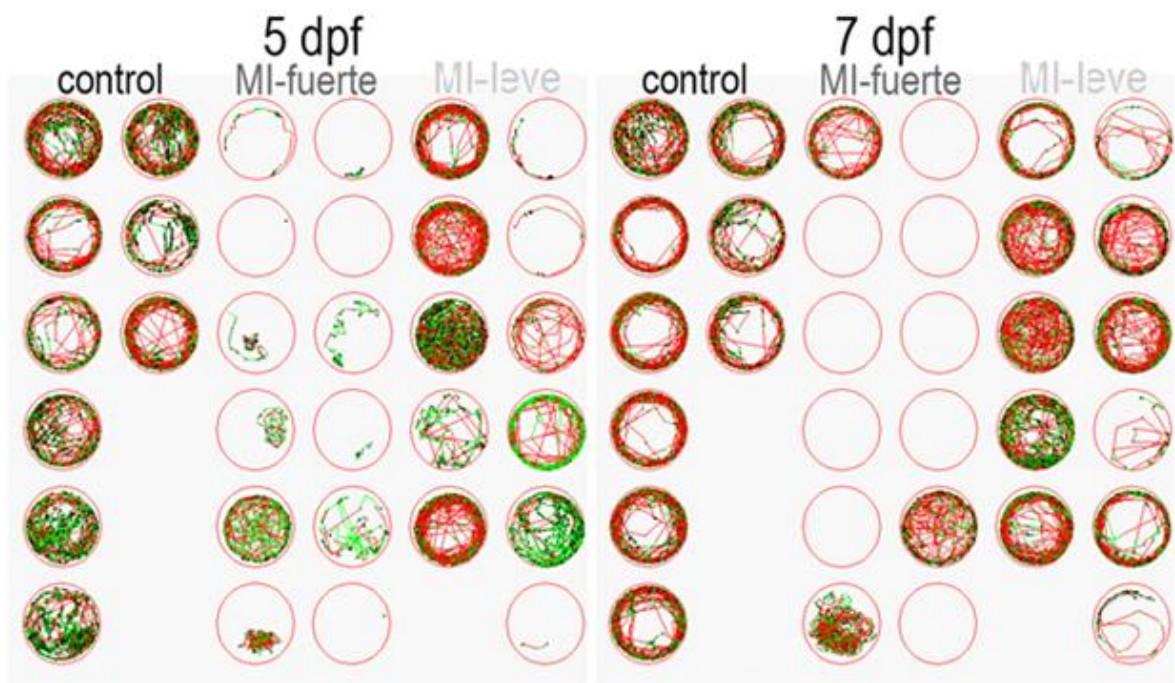


Figura 29. Patrones de nado en larvas de 5 y 7 dpf control y morfantes. Se muestra el recorrido acumulado en 30 minutos de experimento. En verde se dibuja la trayectoria de movimientos lentos, mientras que en rojo aquellos con movimientos rápidos. MI-fuerte, grupo microinyectado con fenotipo fuerte; MI-leve, grupo microinyectado con fenotipo leve.

Ya que se encontraron diferencias observadas en los patrones de nado, este experimento fue repetido con las mismas larvas cuando tenían 7 dpf de edad, donde se espera observar que los patrones de nado estén más consolidados, lo que significaría que lucen más homogéneos y permitirían notar mejor un posible efecto del *knockdown* de PrP-2. Esto fue efectivamente observado en los patrones de nado del grupo control a 7 dpf (Figura 29), que se muestran bastante más uniformes comparados con los mismos para 5 dpf. En cuanto a las distribuciones (Figura 28), se puede observar que aún la dispersión es mucho mayor en las larvas microinyectadas con fenotipo leve, comparadas con el control. Al compararlas estadísticamente, hay diferencias significativas en el tiempo que las larvas pasan activas ($p = 0.04$) y en el tiempo que pasan ejerciendo movimientos rápidos ($p = 0.03$), pero no en el tiempo que pasan ejerciendo movimientos lentos ($p = 0.06$). Complementado esto con los

patrones de nado, es interesante notar que en el fenotipo leve son aún más notorios las alteraciones con respecto a aquellas observadas en las larvas a 5 dpf, habiendo algunos cuya motilidad se ve sumamente reducida y, en otros, bastante aumentada (Figura 29). En cuanto a las larvas con fenotipo severo, solo sobrevivieron 3 de las 12, que murieron a los 6 dpf, posiblemente por edemas en la yema producidos por la microinyección que les impiden aprovechar los nutrientes de esta. A causa de esto, lamentablemente las observaciones sobre su nado no aportan mayor detalle.

Estos resultados sugieren que el efecto de la disminución de PrP-2 en el comportamiento de las larvas es consistente, siendo más notorio a 7 dpf dado que el nado en general es más homogéneo. En los estudios conductuales se puede afirmar que el *knockdown* de PrP-2 tiene dos efectos: uno muestra un nado claramente limitado, mientras otro muestra uno más bien hiperactivo.

Las larvas de pez cebra ya tienen la visión desarrollada, así que pueden responder a estímulos, cambiando su comportamiento. Ya que el nado parece estar alterado dado el *knockdown* de PrP-2, es esperable que también lo esté la respuesta a estímulos, que resulta en gran parte del correcto funcionamiento de y entre diferentes circuitos neuronales. Con este fin, se sometió a los embriones a estímulos de 5 minutos de oscuridad seguidos inmediatamente por 5 minutos de luz blanca, por un período total de 30 minutos. En los diagramas de caja-bigotes del grupo control (Figura 30), los resultados indican que la actividad total de las larvas es casi similar, mientras que varía la cantidad de tipo de movimiento: hay mayor cantidad de movimiento rápido en oscuridad que en luz, mientras que el movimiento lento se mantiene similar. Esto se ve apoyado por los patrones de nado, donde el movimiento lento claramente predomina en los períodos de luz. Además, en los patrones de nado se ve que las larvas control nadan un poco más alejados de las paredes en la luz que en la oscuridad. Por otro lado, en las larvas con PrP-2 disminuido y fenotipo medio, el movimiento en general es menor en luz, sobre todo a 5 dpf, donde el movimiento rápido es casi nulo y el lento está también disminuido.

A 7 dpf, estas larvas tienen tendencias a responder similar a los estímulos comparado con los controles, sin embargo la dispersión de los datos es mayor a aquella de los controles. Observando los patrones de nado (Figura 31), estos muestran que en el grupo microinyectado con fenotipo medio a 5 dpf, la mayoría de larvas se quedan estáticas durante el estímulo de luz, y estas mismas sí se mueven en oscuridad, incluso algunas muestran nados similares al control. Esto indica que, si bien algunas larvas pueden mostrar nados normales (i.e. similar al común en los controles), eso no significa que reaccionen también normal a los estímulos, ya que estos pueden estar mediados por distintos circuitos neurales. Sin embargo, a 7 dpf varias de estas larvas mantienen aún un nado disminuido, mientras que otras parecen tener una trayectoria que podría ser calificada como un nado hiperactivo, comparado con el control. Finalmente, a nivel estadístico, la actividad tanto en oscuridad como en luz, así como la cantidad de movimientos rápidos y lentos en cada una de ellas difieren significativamente entre las larvas control y las microinyectadas con morfolino para PrP-2 ($p < 0.05$).

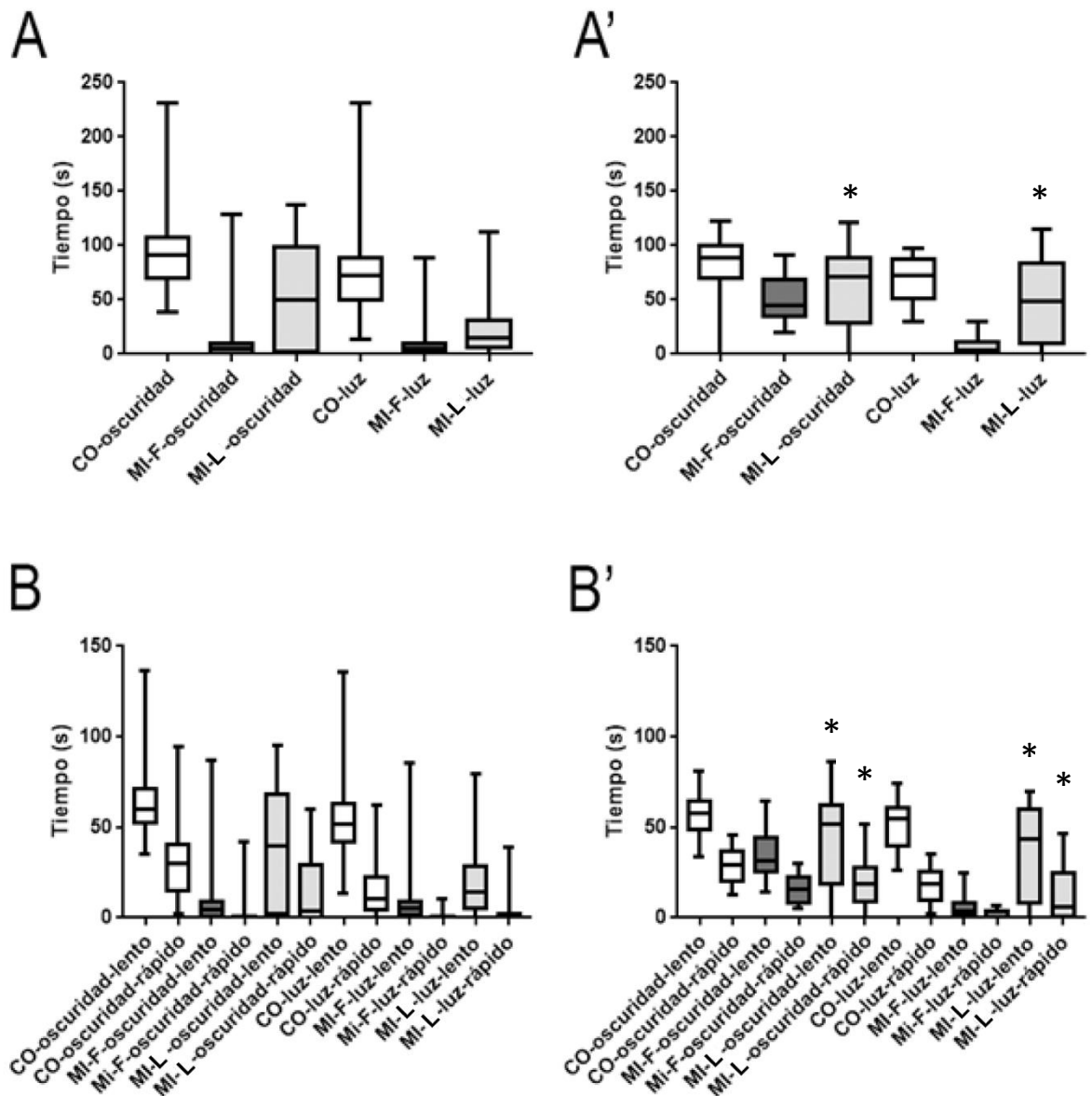


Figura 30. Diagramas de caja-bigote de tiempos de actividad y tipos de movimiento en larvas de 5 y 7 dpf control y morfantes. (A) y (A') muestran la distribución de los tiempos que las larvas pasan activas en un total de 30 minutos a 5 y 7 dpf, respectivamente, en oscuridad o en luz. (B) y (B') muestran los tiempos que las larvas pasan ejerciendo movimientos lentos o rápidos en un total de 30 minutos a 5 y 7 dpf, respectivamente, en oscuridad o en luz. CO, control; MI-F, microinyectado con fenotipo severo; MI-L,

microinyectado con fenotipo leve. Media, desviación estándar y mediana a 5 dpf: CO-oscuridad, 92.29, 31.67, 91.3; MI-L-oscuridad, 52.3, 46.31, 49.85; CO-luz, 73.36, 38.95, 72.6; MI-L-luz, 26.72, 31.6, 15.35; CO-oscuridad-lento, 63.19, 17.17, 60.1; CO-oscuridad-rápido: 29.1, 17.45, 30.35; MI-L-oscuridad-lento, 38.56, 32.14, 39.5; MI-L-oscuridad-rápido, 13.73, 16.7, 3.9; CO-luz-lento, 53.96, 22.19, 51.8; CO-luz-rápido, 14.28, 13.07, 10.15; MI-L-luz-lento, 21.6, 22.74, 14.55; MI-L-luz-rápido, 5.123, 9.961, 0.2. Media, desviación estándar y mediana a 7 dpf: CO-oscuridad, 84.23, 19.65, 88.8; MI-L-oscuridad, 63.33, 32.31, 70.9; CO-luz, 69.06, 20.02, 73.1; MI-L-luz, 46.35, 36.62, 48.9; CO-oscuridad-lento, 56.64, 10.05, 57.5; CO-oscuridad-rápido: 28.63, 8.499, 29.4; MI-L-oscuridad-lento, 44.01, 22.66, 51.6; MI-L-oscuridad-rápido, 19.32, 11.98, 19; CO-luz-lento, 51.21, 12.4, 54.8; CO-luz-rápido, 17.85, 8.769, 18.6; MI-L-luz-lento, 34.29, 25.36, 43.3; MI-L-luz-rápido, 12.05, 12.81, 5.7. * = diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con control (solo fenotipo leve fue comparado y no fenotipo fuerte)



Figura 31. Patrones de nado en larvas de 5 y 7 dpf control y morfantes bajo estímulos de oscuridad y luz. Se muestra el recorrido acumulado en 5 minutos de experimento. En verde se dibuja la trayectoria de movimientos lentos, mientras que en rojo aquellos con movimientos rápidos. MI-fuerte, grupo microinyectado con fenotipo fuerte; MI-leve, grupo microinyectado con fenotipo leve.

6. DISCUSIÓN

6.1 EL USO DE PEZ CEBRA EN EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA

Al igual que con otras moléculas relevantes en enfermedades neurodegenerativas (como la proteína tau en el mal de Alzheimer), muchos de los experimentos en los que se ha hecho noqueo parcial o total de la proteína priónica resultan en organismos viables y sin fenotipos notorios (19, 69). A partir de esto es posible plantear dos posibilidades: 1) que la proteína en cuestión no cumple un rol útil en el organismo o 2) que los fenotipos existen, pero son más sutiles quizá producto de algún tipo de compensación genética. El primer escenario parece poco probable si se tiene en cuenta que la PrP está presente y conservada entre vertebrados bastante lejanos unos de otros (35, 64). El segundo tiene mayor sentido, basado en que en los modelos animales que son normalmente usados (como roedores) es difícil observar fenotipos sutiles (por ejemplo a nivel celular) sin procedimientos altamente invasivos que resulten totalmente contraproducentes debido a las alteraciones secundarias que producen. Teniendo todo esto en cuenta, cabe pensar que no existan fenotipos notorios al noquear estas proteínas porque pueden estar mediando procesos lo suficientemente importantes de modo que se active otros mecanismos redundantes para asegurar la supervivencia del organismo.

Este problema de la visualización de un fenotipo de pérdida de función de PrP podría ser perfectamente abordado usando embriones de pez cebra, por las ventajas ya mencionadas en la *Introducción* (sección 1.6), como su desarrollo externo y rápido, y su transparencia. Sobre todo, el pez cebra al ser un vertebrado guarda una similitud de hasta el 70 % de su genoma con los humanos, así que mecanismos celulares básicos están bien conservados. Por estos motivos, el pez cebra ha sido ya utilizado largamente en áreas donde la visualización de fenotipos es clave para dar pistas sobre la función de diversos genes, teniendo resultados impresionantes y de gran relevancia para la biomedicina, destacando lo convenientes que son los embriones de pez cebra para el manejo genético y la observación de fenotipos. Asimismo, la transparencia del embrión ofrece un interesante modelo *in vivo* donde muchos procesos han podido ser visualizados directamente a nivel celular e incluso molecular por medio de microscopía de fluorescencia y de alta resolución.

Es por todo esto que consideramos a los embriones de pez cebra como un modelo animal ideal para estudiar la controvertida función de la proteína priónica. Entre los estadios de *prim-5* (1 dpf) y *long-pec* (2 dpf), los embriones de pez cebra tienen la mayoría de tejidos recién diferenciados o determinados, lo que hace posible distinguir estructuras de interés. Además, entre esos dos estadios hay una alta tasa de formación, maduración y/o migración de muchos tipos celulares, siendo dos estadios interesantes para hacer comparaciones. Así, la fijación e inmunotinción de los embriones en los estadios de *prim-5* y *long-pec* permiten no solo determinar la presencia o el estado de tejidos y estructuras neuroanatómicas en determinado momento del desarrollo embrionario, sino también el comparar el desarrollo de estas en el tiempo. Por otro lado, las larvas de pez cebra se han vuelto un modelo animal bastante interesante para el estudio de comportamiento animal (70), pues de una manera sencilla presentan comportamientos propios y básicos de los vertebrados, siendo fácil visualizarlos e interpretarlos en determinadas situaciones, así como los cambios de estos en respuesta a ciertos estímulos

6.2 . UTILIDAD DE LOS EXPERIMENTOS CON MORFOLINOS

Los oligonucleótidos antisentido normalmente usados para interrumpir la expresión de un gen dependen de RNAsa H: al formar dobles cadenas con su secuencia blanco, inducen la degradación de esta. Como esto ocurre desde 5 nucleótidos de apareamiento en adelante, los efectos inespecíficos son altos. Así, la interrupción de la expresión genética independiente de RNAsa H, como aquella mediada por oligonucleótidos de morfolino, es un proceso más específico (71).

Los oligonucleótidos de morfolino, que poseen una cadena de morfolina en vez de la cadena de pentosas propia de los nucleótidos naturales, no son degradados en la célula, lo que les da un mayor tiempo de vida medio. Se afirma que esto reduce su toxicidad, al no poder ser metabolizados (72). Otros estudios (73, 74) indican que estos no interactúan con otras proteínas o estructuras. Además, los morfolinos han mostrado requerir una alta complementariedad al ARNm a bloquear, lo que lo hace específicos, y muestran efectos a concentraciones bajas debido a su longitud y a su alta afinidad por ARNm, lo que significa que son altamente eficientes (74).

Los morfolidos no inducen directamente la degradación de su ARNm, sino que ofrecen un impedimento estérico a nivel o de *splicing* o de la interacción del 5' UTR con la subunidad 40S del ribosoma, impidiendo la iniciación de la traducción (72). Estos fueron desarrollados con la idea de ser usados como agentes terapéuticos, sobre todo porque ofrecen la posibilidad de alterar el *splicing*, generando la opción de dejar de lado exones que podrían estar dañados en proteínas relacionadas a alguna enfermedad. Hasta ahora, los morfolidos han sido bastante usados en biología del desarrollo, sobretodo en embriones de pez cebra (75), pero también en embriones de otras especies como *Xenopus*, pollo, y hasta erizo de mar (76), para inducir la pérdida de función de diversos genes y analizar su función en base al fenotipo resultante. Sin embargo, el uso de morfolidos también tiene potenciales desventajas que deben ser tomadas en cuenta y mitigadas (76). Como todo oligonucleótido antisentido, los efectos inespecíficos son una posibilidad a considerar. Algunos estudios refieren que dichos efectos podrían deberse a que tienen cierta toxicidad, produciendo la activación de, por ejemplo, la proteína p53 (77) e induciendo así la apoptosis celular (78). No obstante, diversos estudios sugieren que para prevenir la eventual inespecificidad o toxicidad, una dosis adecuada de morfolino y experimentos de control preliminares son suficientes para garantizar los resultados (71). Para abordar esto, estudios pasados de nuestro grupo usando morfolidos han probado que los efectos de los morfolidos usados se deben propiamente a su secuencia, no a algún tipo de toxicidad mediada por ellos, además que han probado que efectivamente se reduce la producción de la proteína blanco, o sea, PrP-2 (45).

Nuestros embriones morfantes para PrP-2 tienen un fenotipo notorio cuando son observados en campo claro, que es cabeza pequeña y malformación en ojos. Esto es consistente con observaciones previas de nuestro laboratorio (45). Esta disminución de masa en el parénquima del sistema nervioso podría deberse a una incompleta diferenciación o maduración de tejido, a limitada proliferación de neuroblastómeros o también a un aumento en la apoptosis de células neuronales. Sin embargo, entre todas estas hipótesis, debido al patrón temporal de expresión de PrP-2 y debido a que en nuestras muestras las estructuras nerviosas sí están presentes y solamente se ven desorganizadas o de tamaños variables, nuestros resultados sugieren que la proliferación de neuroblastómeros y sus posteriores diferenciaciones sí están ocurriendo, aunque quizás no de manera óptima. Dado que la

reducción de tamaño es un efecto real, un tema a abordar por futuros estudios es el conteo de células y la medición de estas en áreas del parénquima cerebral. Es importante contemplar también la posibilidad de que la reducción en el tamaño de la cabeza se deba a apoptosis. Futuros estudios deberán abordar esto. El hecho de que el efecto sea notorio en la cabeza, una estructura ocupada mayormente por tejido nervioso y donde se expresa PrP-2, es consistente con funciones esenciales para el desarrollo neuronal.

Un posible artefacto a tener en cuenta y descartar es que la sola manipulación de los embriones produzca algún efecto sobre el desarrollo. Según nuestras observaciones, esto no ocurre, ya que la cabeza y ojos en embriones microinyectados con solución control (sin morfolino) no presentan específicamente alteración alguna. Sin embargo, los embriones microinyectados con solución control, si bien no presentan ningún tipo de deformación ni específica ni inespecífica comparable con los organismos morfantes, sí presentan un ligero retraso especialmente notorio a 1 dpf, además de ser más sensibles a la manipulación, a comparación de los embriones control. Esto podría deberse al impacto de la microinyección, que podría causarles cierto daño mecánico a nivel de, por ejemplo, el citoesqueleto de las grandes células tempranas o a la pérdida de componentes de la yema y/o célula, que en esos estadios tempranos son ricos en moléculas necesarias para el desarrollo normal del embrión. De todas formas, según nuestras observaciones, esto no es determinante y no tiene mayor repercusión que cierto retraso que se ve superado para las 48 horas de desarrollo.

Otros fenotipos, como aquellos vistos a nivel celular gracias a tinciones inmunohistoquímicas, difícilmente son explicados por toxicidad del morfolino o efectos secundarios de la microinyección, pues las células sí están diferenciadas y ocupando el lugar debido dentro del embrión, y sus fenotipos son bastante más sutiles y puntuales en cuanto a su desarrollo. Además, los fenotipos observados en este estudio ocurren coincidentemente en lugares donde se da normalmente la expresión de PrP-2 (45), y donde también son procesos importantes el crecimiento de proyecciones (axones) y la coalescencia celular (en ganglios). Finalmente, para garantizar la especificidad del morfolino, habría que hacer conteos celulares y ensayos para medir apoptosis en tejidos donde se expresa y donde no se expresa PrP-2 y

comparar si hay diferencias entre organismos control y organismos tratados con morfolino para PrP-2.

Para muchos genes analizados en diversos organismos, llama la atención que los fenotipos pérdida de función tras la aplicación de morfolinos no corresponde siempre a aquellos obtenidos luego de un noqueo a nivel genético (76). Sin embargo, esto podría explicarse por mecanismos tales como la compensación genética, en el que se propone que los transcritos truncos producidos a partir del gen mutado inducirían la transcripción de genes funcionalmente relacionados con los genes mutados (79, 80). Es interesante notar que de esto se concluye que usar morfolinos o algún otro oligonucleótido antisentido presenta la ventaja de que el organismo afectado no tendría manera de compensar la pérdida de función de la proteína.

En el caso de nuestro estudio, resulta ventajoso usar morfolinos por su alta vida media comparado con otros oligonucleótidos antisentido, pues nuestra proteína blanco no proviene de un gen de expresión materna. Cabe mencionar también que nuestra solución contiene dos oligonucleótidos morfolinos, pero que ambos se aparean con la región 5' UTR del ARNm de PrP-2, impidiendo su traducción. No usamos morfolinos contra el *splicing* de PrP-2 porque, como hemos mencionado antes, la secuencia codante está contenida en un solo exón (64).

En cuanto a las diferencias en la fuerza del fenotipo obtenido, estas pueden deberse a que el morfolino no se distribuía homogéneamente. Efectivamente, esto era corroborado al observar a los embriones microinyectados con morfolino bajo el estereomicroscopio de fluorescencia, donde la intensidad de la fluorescencia del morfolino (marcado con rojo lisamina) estaba normalmente relacionado con la intensidad del fenotipo, a simple vista. Para fenotipos más débiles, ocurría que mucho de este a veces estaba retenido en la yema, mientras que para fenotipos más severos eran a veces microinyectados de más por errores en la manipulación. Todos estos embriones fueron descartados, eliminando así este tipo de sesgo.

Una forma de asegurar completamente si los fenotipos observados se deben a la pérdida de función es rescatando el fenotipo. En el caso de de PrP-2, esto no es técnicamente viable porque la inyección del ARNm de rescate se debe hacer en embriones tempranos, y, al no ser

PrP-2 de expresión materna, el ARNm inyectado produce otros fenotipos tempranos de ganancia de función que dificultan los análisis (45).

Finalmente, cabe agregar que por limitaciones técnicas y logísticas no nos fue posible verificar en estos experimentos la especificidad de los morfolinis ni la reducción en la expresión de PrP-2 para esta investigación. Tenemos en cuenta que para su publicación en una revista especializada, deberá incluirse dichos controles. Sin embargo, cabe mencionar que como parte de otros estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio, estos ensayos fueron hechos múltiples veces, quedando demostrada la especificidad del morfolino mediante el uso de 1) morfolinis diseñados para distintas secuencias blanco en el mismo ARNm, 2) morfolinis para otros genes, tanto neuronales como *housekeeping* 3) rescate cruzados de ARNm para PrP-1/PrP-2 y 4) Western blots que revelan una marcada disminución de la expresión de esta proteína.

6.3 SELECCIÓN DE ANTICUERPOS PRIMARIOS PARA EL ESTUDIO DE PrP-2

De PrP-2 en pez cebra se sabe mucho menos que su parólogo PrP-1. A nivel de función, se ha sugerido un rol en la regulación de excitación neuronal, pues larvas cuyo gen de PrP-2 fue noqueado, si bien tienen un nado normal, presentan una sensibilidad ligeramente mayor al glutamato que sus pares control (48). También hay evidencia de que PrP-2 está involucrada en la formación de la línea lateral y neuromastos en embriones de pez cebra (65). Se sabe también que, en embriones, se expresa básicamente en tejido nervioso (35, 45), lo cual sugiere que no es un gen de expresión materna, a diferencia de PrP-1 (45). En este contexto y con el fin de explorar, inferir o descartar roles de PrP-2, se planteó usar inmunohistoquímica para analizar los posibles cambios fenotípicos a nivel neuroanatómico que una pérdida de función de PrP-2 podría ocasionar.

Para determinar qué anticuerpos primarios de los 8 disponibles usaríamos, se consideró evaluar dos aspectos de estos: calidad y patrón de tinción. Como se menciona en la sección

de *Resultados*, la calidad fue definida como la relación entre las señales específicas y las inespecíficas, siendo la mejor calidad una señal específica muy fuerte con una inespecífica muy débil y la calidad más baja una señal específica muy débil con una señal inespecífica muy fuerte. A su vez, una señal es específica si está localizada y es distinguida claramente en un tejido puntual. Molecularmente, la calidad del anticuerpo primario estaría explicada por la afinidad de este por su antígeno y/o por la ubicuidad de este último. Es útil tener esta variable en cuenta porque una alta calidad asegura una mejor visualización de estructuras y, como consecuencia, una mayor puntualidad en las conclusiones obtenidas a partir de las observaciones.

Para garantizar que la diferencia en intensidad de las señales tanto específicas como inespecíficas se debía exclusivamente a los anticuerpos primarios, junto a la estandarización de inmunotinciones se consideró un grupo en el que se hizo el solo cambio de no usar anticuerpo primario. De esta forma se comprobó que el anticuerpo secundario usado, aquel que está conjugado con el fluoróforo, no reconoce alguna estructura en embriones de pez cebra. El no obtener señal fluorescente en estos embriones garantiza que cualquier señal proveniente de futuras tinciones está mediada por y se debe exclusivamente a los anticuerpos primarios.

Por otro lado, el patrón de tinción, que a nivel molecular refleja al conjunto de estructuras que contienen al antígeno reconocido por cierto anticuerpo primario, fue considerado la segunda variable para seleccionar qué anticuerpos primarios usaríamos. Esto porque, ya que la intención es evaluar cambios a nivel morfológico en el sistema nervioso central, había que decidirse no solo por el anticuerpo que marque más estructuras en general sino más estructuras que sean potencialmente de interés en este estudio. También fue tomado en cuenta la redundancia entre anticuerpos (i.e., si teñían las mismas estructuras), haciendo que anticuerpos que no reconocían estructuras de manera especial (que otros no) o no reconocían un número de estructuras no sean considerados como ideales para su uso.

Las primeras tinciones fueron hechas con una dilución considerada estándar para muchos anticuerpos primarios: 1:500. Los primeros resultados en la calidad de la tinción (Tabla 4) mostraron tres tendencias claras en cuanto a cómo abordar la optimización del protocolo de

acuerdo a cada anticuerpo primario: 1) cambios en tiempo de bloqueo, 2) cambios en concentración de anticuerpo primario y 3) ningún cambio. Con los cambios en los tiempos de bloqueo se buscó mejorar la calidad obtenida en la tinción, mientras que con los cambios en la concentración del anticuerpo primario se buscó tanto modular la intensidad de las señales en general y optimizar el uso de los reactivos. Habiendo identificado esto, se evaluó los ajustes para cada uno de los 8 anticuerpos primarios.

Para el primer caso, se consideró hacer cambios en el tiempo de bloqueo al usar los anticuerpos primarios zn1, mAb48 y F59. El anticuerpo primario zn1 presentó una baja calidad como anticuerpo primario (Tabla 4): la señal se veía emitida en casi todo el embrión indistintamente, siendo ligeramente más fuerte la señal para algunos tejidos nerviosos como el parénquima cerebral y la placa del piso (Tabla 6). Así, se decidió abordar el problema en la calidad incrementando el tiempo de bloqueo con suero de cabra, que pasó de ser 4 horas a temperatura ambiente y con agitación constante (como está establecido en el protocolo regular) a incubación por 24 horas a 4 °C y con agitación eventual. Esto no produjo ningún cambio visualmente apreciable, lo que indica que la calidad es intrínseca al anticuerpo primario. El anticuerpo primario zn-1 se une a la parte citoplasmática de una proteína desconocida, propia del sistema nervioso (81), así que no es posible descartar que pueda unirse a estructuras no nerviosas. Otra solución podría haber sido disminuir la concentración de zn-1 hasta que la unión del anticuerpo primario sea lo bastante específica al epítipo ubicado en estructuras relevantes para este estudio, pero esto no fue tomado como opción ya que la señal en general no era intensa y disminuir la concentración podría mejorar la especificidad, pero el problema de la señal específica débil empeoraría. A esto último, aumentar la concentración del anticuerpo secundario o aumentar la intensidad del láser del microscopio al momento de obtener las imágenes podrían resolver el problema, pero también podrían ocasionar otros como el crear nuevas señales inespecíficas o deteriorar la muestra, respectivamente. No son muchos los artículos que reportan haber usado zn1 para estudiar tejido nervioso en embriones de pez cebra, y los que lo hicieron usaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, no con fluoróforos (82). Que el anticuerpo primario haya sido generado usando membranas de cerebro posterior de peces cebra adultos (81, 82) no excluye que el antígeno se encuentre en otras partes del organismo y, de sí encontrarse

solo ahí y en otras estructuras nerviosas, puede que el origen del inmunógeno explique también su poca especificidad en este caso, siendo el antígeno aún ubicuo en edades tempranas donde la diferenciación no está totalmente completa.

Para el anticuerpo primario mAb48, que tiene como antígeno a la proteína sinaptotagmina-1, la señal específica e inespecífica eran regular y muy débil, respectivamente, mientras que para F59 estas eran regular y fuerte, respectivamente. Se buscó mejorar la calidad de ambos anticuerpos de la misma manera: estos anticuerpos no fueron bloqueados, sino que fueron incubados con el anticuerpo primario inmediatamente después de ser permeabilizados. Esta medida se basó en la suposición de que el bloqueo podría estar ocultando el epítipo de estos anticuerpos. A pesar de que el bloqueo con suero de cabra, albúmina sérica bovina, entre otras, es un paso común y ampliamente incluido en diversos protocolos de inmunotinción, algunos estudios señalan que esto sería innecesario, pues la especificidad de los anticuerpos bastaría para que no hayan señales inespecíficas a causa del reconocimiento de epítopes atípicos por parte de estos (83). Sin embargo, la señal no mejoró sin el bloqueo, y ya que en este caso incluso la señal inespecífica no era muy fuerte, decidimos incrementar la concentración de anticuerpo primario, usándose 1:200, 1:100 y 1:50, sin mejora en los resultados. Esto podría explicarse, para mAb48, con que quizá la proteína no está aún siendo expresada, ya que el anticuerpo fue hecho con cerebros adultos de rata como inmunógenos. Si bien los depositores de este anticuerpo afirman reacción positiva para pez cebra, al revisar la literatura se encuentra que los artículos científicos publicados de investigaciones que han usado este anticuerpo lo han hecho en cerebros adultos de rata. Para F59, la señal en los somites era débil, pero parecía corresponder al patrón esperado para miosina, así que experimentos futuros deberán re-ajustar las condiciones para efectuar tinciones. Cabe mencionar que este anticuerpo, a pesar de no marcar estructuras nerviosas, nos fue de interés porque los músculos sirven de guía para el crecimiento correcto de los axones de las neuronas motoras. Finalmente, otro punto que podría abordarse en futuras investigaciones refiere al proceso de fijación de tejidos, pues los enlaces covalentes formados con el paraformaldehído podrían estar ocultando los epítopes reconocidos por alguno de estos anticuerpos primarios.

Para los anticuerpos ZN8 y SV2 se alteró la concentración de anticuerpo primario respecto a la usada en las pruebas preliminares: en ambos casos se disminuyó a 1:1000 como dilución final, dada la calidad de la señal obtenida (Tabla 4). Las imágenes obtenidas luego de este cambio (Tabla 6, Figuras 14, 15, 20, 21) muestran que la calidad se mantuvo y se logró optimizar el uso del anticuerpo. Por otro lado, el protocolo quedó sin alteraciones al usar los anticuerpos primarios zn12, zns2 y znp1.

Tomando todo esto en consideración, basándose en la calidad de imágenes obtenidas usando determinados anticuerpos primarios, se decidió descartar el uso de zn1, mAb48 y F59 en este estudio. La siguiente variable para definir qué anticuerpos primarios serían usados en el resto del proyecto fue el patrón de tinción.

El patrón de fluorescencia obtenido con ZN8 como anticuerpo primario permite visualizar de manera importante, además de algunas otras (Tablas 6 – 8, Figuras 14, 15), estructuras neuronales relacionadas a la visión, tales como células progenitoras ganglionares (1 dpf) y células ganglionares de la retina (2 dpf), tectum óptico (2 dpf) y nervio óptico (2 dpf). Según lo hallado en la información del proveedor (DSHB), el anticuerpo ZN8 reconoce un epítipo propio de la proteína neurolina, una proteína de membrana expresada principalmente en tejido nervioso en embriones de pez cebra y que es necesaria para la correcta diferenciación de tejido nervioso necesario para la visión (84) y para el crecimiento axonal en neuronas motoras secundarias, pero no primarias (85, 86). Esto es consistente con los patrones de tinción obtenidos en este estudio (Tabla 7, Figuras 14, 15). El patrón de tinción que ofrece el uso de ZN8 es interesante en el estudio de la proteína priónica porque se ha comprobado recientemente que la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob puede ser transmitida iatrogénicamente a través del ojo y presentar síntomas específicos en este (86). Así, podrían llevarse a cabo experimentos en los que se infecten ojos de pez cebra con priones y visualizar lo que ocurre a nivel celular usando ZN8 como anticuerpo primario. Asimismo, la visualización que ZN8 permite de los axones de las neuronas motoras secundarias ofrece un muy buen modelo para profundizar en el rol de PrP en el desarrollo de neuritas, del cual ya hay cierta evidencia (87).

El patrón de tinción obtenido con zn12 mostraba fluorescencia en procesos axonales en todo el embrión, además de señales fuertes en estructuras puntuales, sobre todo a 1 dpf, como las neuronas Rohon-Beard, ganglios en el cerebro medio y posterior y en el ganglio trigémino (Figuras 16, 17, Tabla 7). El que sea tan inespecífico el patrón se debe a que este anticuerpo reconoce el glico-epítotope HNK-1, que está presente ubicuamente en la membrana en diferentes procesos axonales y es necesario para la correcta generación de espinas sinápticas (88), e incluso estaría relacionado a regulación de procesos como el aprendizaje y la memoria (89). Ya que el epítotope está potencialmente en casi todo el sistema nervioso, se esperaría ver una señal aun más ubicua de la que se obtuvo. Esto no fue observado con embriones de 1 y 2 dpf, posiblemente porque la mayoría de neuronas aún no están suficientemente maduras y poseen el epítotope en bajas cantidades. Sin embargo, este anticuerpo debe ser tenido en consideración no solo por la información que da a 1 y 2 dpf, sino por la mayor información que seguramente da cuando el sistema nervioso está más desarrollado. Por último, se ha visto que la alteración de la producción de HNK-1 está relacionada a la enfermedad de Alzheimer, siendo producida en menor cantidad en el cerebro de pacientes que sufren este mal (90). Sabiendo la relación de PrP con la enfermedad de Alzheimer (50), es interesante contar con este anticuerpo que podría potencialmente marcar regiones afectadas en esta enfermedad. Además, como en el caso de ZN8, una ventaja de este anticuerpo primario es el poder visualizar procesos axonales, donde el rol de PrP no está aún bien descrito.

El anticuerpo primario zns2 se une a un epítotope desconocido, pero propio del sistema nervioso central, según información del proveedor (DSHB). Esto es fácilmente corroborado observando la tinción obtenida, donde todo el parénquima del sistema nervioso está específicamente teñido, obteniendo una señal fuerte para 1 y 2 dpf, con una señal inespecífica casi inexistente. Dentro de la fluorescencia emitida por todo el parénquima del sistema nervioso central no resalta especialmente ninguna estructura a 1 dpf, pero sí a 2 dpf, donde se observa una señal ligeramente más fuerte en los placodios olfatorios (Figura 4), habiendo sido esto aprovechado por otros estudios para analizar el desarrollo de estas estructuras (91). La utilidad de este anticuerpo radica en lo específico que es para marcar el sistema nervioso central de manera general. Así, permite apreciar y comparar alteraciones en la morfología general del SNC, importante en estudios que se enfocan en el desarrollo del sistema nervioso

y/o procesos neurodegenerativos, donde PrP media diversos procesos. Este anticuerpo primario podría ser usado, por ejemplo, para contar y medir las células en el parénquima cerebral y hallar si hay diferencias entre morfantes y controles.

El anticuerpo primario znp1, que reconoce a sinaptotagmina 2 como antígeno, tenía como única señal específica fuerte aquella vista en las neuronas motoras primarias (Tabla 6, Figura 13). Esto es esperable, ya que el antígeno se encuentra especialmente en este tipo de neuronas y es por esto que znp1 suele ser usado para visualizar efectos en ellas.

Finalmente, siendo el antígeno reconocido por SV2 la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A), según el proveedor (DSHB), las estructuras fuertemente teñidas eran aquellas que formaban ganglios (como el trigémino o ganglios en el cerebro anterior, medio o posterior) y también proyecciones axonales (comisurales, axones de neuronas motoras y la línea lateral) (Tabla 7, Figuras 20, 21). La proteína SV2A, como su nombre sugiere, se encuentra en vesículas sinápticas y, aunque se desconoce puntualmente su función, se le atribuyen algunas como de regular la exocitosis de neurotransmisores o el transporte de vesículas y la activación de sinaptotagmina (92). Además, esta proteína es ampliamente usada como blanco terapéutico para tratar epilepsias (93). Teniendo en cuenta esto último, ya que se ha visto que el noqueo de la PrP crea sensibilidad a o reacciones similares a epilepsias en larvas de pez cebra (48), es probable que el anticuerpo primario SV2 ofrezca información importante sobre estructuras en las que PrP puede estar jugando un rol.

Teniendo en cuenta esto, se decidió descartar el uso de znp1 por su pobre patrón de tinción (Tabla 6, Figura 13), ya que cubre específicamente una cantidad reducida de estructuras que, además, se encuentran también en los patrones de tinción de los otros anticuerpos primarios. Así, se decidió usar los anticuerpos primarios ZN8, zn12, zns2 y SV2 para lo siguiente del estudio debido a su calidad y a la información que sus patrones de tinción daban (Tabla 7, Figuras 14 – 21).

Adicionalmente, pudimos notar que la definición de las imágenes obtenidas variaba dependiendo del anticuerpo primario usado, incluso para una misma estructura, siendo la mejor la definición aquella obtenida usando SV2 y la peor, zns2 (ver *Resultados*). Ya que el

término “definición” está siendo estrictamente usado en este contexto, estas diferencias pueden deberse a dónde es que se ubica el antígeno o incluso el epítipo que es marcado por el anticuerpo. Por ejemplo: si el antígeno se encuentra en membrana, la definición estará delimitada a esta, por lo que será más fina, mientras que si la proteína es citoplasmática es esperable que la definición sea más difusa.

6.4 EFECTOS A NIVEL NEUROANATÓMICO DEL *KNOCKDOWN* DE PrP-

2

Al comparar los patrones de tinción de los distintos anticuerpos en embriones control y embriones tratados, resaltan principalmente dos conclusiones. La primera es que todas las estructuras que pudieron ser visualizadas en los embriones control también están presentes en los embriones tratados. La segunda conclusión es que no todas las estructuras neuroanatómicas lucen igual entre controles y tratados (Figuras 14 – 26, Tabla 9). El efecto del morfolino para PrP-2 parece ser exclusivo para el sistema nervioso, ya que algunos anticuerpos primarios usados en este estudio marcan otro tipo de tejidos, tales como piel o músculo, y en ellos se observó un desarrollo normal (Figuras 14 – 21).

Dentro de todas las estructuras que pueden ser visualizadas gracias a la combinación de patrones de tinción que el uso de los anticuerpos primarios seleccionados en este estudio ofrece, solo en algunas se observaron alteraciones morfológicas, dada la disminución de la traducción de PrP-2 (Figuras 22-26, Tabla 9). En este sentido, es importante notar que, al igual que en el caso del parénquima del sistema nervioso, todas las estructuras presentes en los organismos control lo están también en los organismos microinyectados con morfolino. Esto sugiere que PrP-2 no cumple un rol en procesos tempranos del sistema nervioso como mantenimiento de la identidad del neuroectodermo, la formación de la placa neural, la formación del tubo y la cresta neural, determinación de linajes celulares y diferenciación celular. Esto está además apoyado por información previa sobre los patrones de expresión de PrP-2 obtenida mediante hibridaciones *in situ*, que determinan que PrP-2 se expresa en epitelio que ya está determinado a formar estructuras del sistema nervioso (46).

Los cambios observados entre estructuras de controles y morfantes, excluyendo diferencias de tamaño en el parénquima cerebral y diferencias en la distribución de fluorescencia (como en los cuerpos neuronales en el ganglio trigémino, Figura 24 B y B'), pueden ser agrupados en dos grandes categorías. La primera refiere a diferencias en gangliogénesis, principalmente visualizado en los ganglios trigéminos (Figuras 24 B y B' y 25), ganglio del nervio vago (Figura 25), los ganglios del telencéfalo (Figura 23 A, A', C y C'), la epífisis (Figuras 22 B y B' y 23 C y C') y ganglios de los rombómeros (Figura 24A). En ellos, la coalescencia se ve disminuida, es decir, no lucen como un conglomerado de cuerpos neuronales compacto, sino que algunos de los cuerpos neuronales están desprendidos del grupo. La segunda refiere a diferencias en axogénesis (elongación y ramificación), donde los axones no llegan a alcanzar regiones que deberían alcanzar y/o presentan ramificaciones en exceso. Esto puede ser visualizado en axones comisuras cerebrales o axones comisurales (Figuras 22 A y B y 23 A y C), el nervio óptico (Figura 23 B) y axones de neuronas motoras (Figuras 25 A y A' y 26).

La alteración en gangliogénesis puede ser principalmente observada en algunos de los ganglios craneales de los morfantes, sobre todo en el ganglio trigémino, probablemente debido a que es el que más células tiene y uno de los que más migra durante el desarrollo. Dos tipos de células están involucradas en la gangliogénesis: células de la cresta neural y células del placodio neural. Las primeras migran desde la parte dorsal del tubo neural hacia la región ventral del embrión e interactúan con las segundas, impulsando su delaminación (94, 95). Estudios muestran que las células de la cresta neural forman una especie de corredor, donde no guiarían activamente a las células de los placodios neurales, sino que su función sería más bien delimitar el espacio de migración e impedir el contacto entre las células del placodio neural y las del mesodermo, con el fin de que no se vea alterada la identidad de alguno de estos grupos celulares. En ausencia de las células de la cresta neural, las células del placodio neural migran y se diferencian en neuronas, pero terminan formando ganglios cuya coalescencia se ve disminuida (96). Se ha encontrado también que la alteración de proteínas de membrana que median la comunicación celular entre las células del placodio neural así como de estas mismas con las células de la cresta neural, como Slit1 y Robo2,

resulta también en ganglios con evidentes anormalidades en su ensamblaje y, con esto, en la morfología total de la estructura (95-97), fenotipos similares a los aquí obtenidos.

Aunque el proceso de gangliogénesis no está muy bien entendido a nivel molecular, una de las proteínas que cumple un rol clave en la coalescencia de las células del placodio neural es N-cadherina (96). La ausencia de N-cadherina ocasiona que las células de los ganglios no formen un grupo compacto, demostrando que N-cadherina es una molécula indispensable para la correcta formación de ganglios craneales. Por otro lado, se ha probado que la alteración de la comunicación entre las células de la cresta neural y el placodio neural mediante la manipulación del ligando-receptor Slit-Robo causa también un fenotipo similar al de N-cadherina y a los observados en este estudio dada la disminución de PrP-2 (97).

En este sentido, el uso de los anticuerpos primarios aquí propuestos para el estudio del rol de la PrP-2 sugiere que PrP-2 podría estar interactuando con alguna de estas vías. Esto es consistente con el hecho de que su parálogo, PrP-1, causa fenotipos análogos en embriones tempranos, en procesos mediados por otro tipo de cadherina, la E-cadherina (46). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los ganglios craneales son normalmente un *anlage* de neuronas provenientes de dos linajes distintos: células de la cresta neural y células del placodio neural (94). Ambos dan origen a neuronas que forman el ganglio. Así, otro punto que queda pendiente a evaluar podría ser si la alterada coalescencia en los ganglios de los organismos morfantes se debe específicamente a uno de los tipos de neuronas formando el *anlage*, o a ambos. No nos es posible discernir qué tipo de células son marcadas por nuestras tinciones. Para abordar esto, una posibilidad es hacer una tinción sobre embriones que producen proteína verde fluorescente bajo el promotor de *islet1*, transcripcionalmente activo en neuronas provenientes del placodio neural, y que está disponible en el bioterio de nuestro laboratorio.

Otras de las pocas moléculas que se sabe están involucradas en gangliogénesis son las anexinas (98). Fenotipos donde se ha disminuido la producción de anexina muestran que las células que han migrado para formar el ganglio sí ingresan y forman la estructura, pero, finalmente, no alcanzan la forma madura de neurona bipolar que se espera, teniendo proyecciones craneales que no alcanzan sus blancos regulares. Este fenotipo también es

observado en nuestros experimentos, donde los nervios craneales de los morfantes, que son proyecciones de los ganglios craneales, se ven notoriamente acortados en comparación a sus pares control.

Por otro lado, la axogénesis también se ve comprometida en los morfantes. Para la formación correcta del axón deben ocurrir tres pasos: polarización, crecimiento y ramificación (99). Así, primero debe darse una polarización correcta de la célula. Esto parece ocurrir bien, pues los axones sí crecen inicialmente en la región y dirección que deberían. Luego, debido a su interacción con señales extracelulares, el axón se alarga y una vez que detiene su elongación, ocurren las ramificaciones. Los morfantes de PrP-2 muestran usualmente axones decrecidos y con bastantes ramificaciones deslocalizadas. Esto puede sugerir dos cosas: la primera es que el crecimiento axonal está directamente comprometido por la disminución de PrP-2. Esto explicaría la aparente ramificación temprana, dado un detenimiento temprano de la elongación. La segunda es que el crecimiento axonal esté detenido como consecuencia secundaria: puede que quizá se dé una ramificación prematura que detenga el crecimiento axonal.

El crecimiento del axón está mediado por moléculas en la membrana que se adhieren o que repelen ciertas otras moléculas en los alrededores, así como por el reconocimiento de señales externas (100). Todo esto desencadena procesos celulares internos que ocasionan endocitosis y exocitosis, además de rearrreglos en el citoesqueleto (actina y miosina, básicamente) en los conos de crecimiento, estructuras a partir de las cuales surgen las neuritas (axones y dendritas). Los pasos del crecimiento son protrusión, congestión y consolidación. El cono de crecimiento está compuesto básicamente por filamentos de actina que forman lamelipodios (una red de actina) y filopodios. Estos últimos son como dedos que sobresalen del cono de crecimiento y que poseen alta densidad de receptores. Una vez que estos encuentran alguna señal, esta se transduce al interior de la célula para polimerizar o despolimerizar la actina hacia o lejos de alguna señal. Los microtúbulos, por otro lado, dan estabilidad y rigidez a estos movimientos. Cuando la señal de crecer hacia un lado está activada, estos polimerizan hacia esa dirección y luego son acetilados, perdiendo su dinamismo y dando solidez a ese crecimiento, que a la larga será el crecimiento del axón. Por otro lado, los microtúbulos

tirosinados (o aún dinámicos) sirven también para impulsar la membrana hacia la búsqueda de señales externas. Además, estos son requeridos para la correcta localización de proteínas Src cerca de los puntos de adhesión celular, que activan señales dirigidas de crecimiento. Se sabe que PrP promueve el reclutamiento de Src mediante NCAM (44) y E-cadherina (45). Se sabe además que NCAM (101) y N-cadherina (102) median el correcto crecimiento axonal y que PrP interactúa con NCAM y con E-cadherina, siendo altamente probable que interactúe también con N-cadherina. Para determinar con precisión qué proceso está alterado dado el *knockdown* de PrP-2, experimentos como medir y cuantificar neuritas y las ramificaciones de estas en organismos control y morfantes son necesarios y son viables según nuestros resultados.

En conclusión, es importante notar que si bien se puede dividir en dos tipos el efecto a nivel neuroanatómico observado a consecuencia de la disminución de PrP-2, la literatura sugiere que estos dos grupos de fenotipos responderían a un tipo de mecanismo molecular: la comunicación celular se ve alterada. Esto no es sorpresa, dadas las características de las proteínas priónicas, como su anclaje a la membrana por un GPI, que hace más probable encontrarla en balsas lipídicas donde estas proteínas que median comunicación celular están normalmente embebidas, y como que esté glicosilada, que le confiere características tridimensionales para interactuar con diversas proteínas, como receptor o como ligando (ver *Introducción*, sección 1.4). Tanto en el caso de las alteraciones en gangliogénesis como en axogénesis, futuros estudios deberán probar con cuál de todas estas proteínas aquí mencionadas interactúa realmente PrP-2 para causar determinado fenotipo y, para esto, la información proporcionada por este estudio mediante las inmunotinciones acá validadas permitirá llevar a cabo experimentos clave, como los mencionados oportunamente en esta sección, para alcanzar este objetivo. Luces de esto podría dar también quizá observaciones como la deslocalización de fluorescencia a causa del *knockdown*, más notorio en el ganglio trigémino (Figuras 24 B y B'), pero que también se observa en otras estructuras, que sugiere que el procesamiento mismo de proteínas podría estar siendo alterado, y futuras investigaciones deberán abordar este tema pues podría ser un rol de la PrP.

Por último, es interesante mencionar que si bien el reactivo DAPI fue utilizado como contratinción, para poder ubicarnos mejor en el embrión, también este brinda información relevante (Figura 27). Muchas estructuras, como la retina, se desarrollan en capas cuidadosamente estratificadas. La visualización de la señal de DAPI, en este caso, nos permitió notar que esta estratificación en la retina no se está dando en los organismos cuya PrP-2 fue disminuida. Asimismo, DAPI podría ser usado con otros fines, como por ejemplo contar núcleos y sabiendo si la disminución de tamaño de ciertas estructuras (como el parénquima cerebral) se debe a que hay un menos número de células. Futuros estudios deberán aprovechar el potencial que el uso de DAPI ofrece más allá de como contratinción.

6.5 EFECTOS A NIVEL CONDUCTUAL DEL *KNOCKDOWN* DE PrP-2

Desde *prim-5*, los embriones ya muestran movimientos espontáneos. Según la literatura, estos ocurren ya que están formándose o madurando las interacciones entre los axones de las neuronas motoras y el tejido muscular (54). Al observar a los embriones control en este estadio, la mayoría de ellos está inerte la mayor parte del tiempo, salvo por movimientos cortos y espontáneos, en los que no nadan sino que solamente contraen el tronco y lo relajan inmediatamente después. En cuando a los morfantes, llama bastante la atención que estos movimientos son más frecuentes, y que la contracción que ejercen tiene notoriamente mayor duración. Si tenemos en cuenta que las contracciones involucran músculo y neuronas motoras, habría que fijarse en cuál de estos tejidos se produce algún defecto visible, o si en ambos. Podemos decir que difícilmente se trata de alguna falla en el desarrollo de tejido muscular, pues este se ve aparentemente normal usando microscopía de campo claro y de fluorescencia. Por otro lado, al ver las inmunotinciones de las neuronas motoras primarias en embriones de 1 dpf, se vio que estas habían perdido la dirección al crecer, además de mostrar más ramificaciones y variscosidades que el control (Figura 26). Así, es posible que las contracciones anormales tengan un origen en la disrupción de su control nervioso.

Si bien estas contracciones difícilmente son observadas a 2 dpf (aunque algunos morfantes seguían mostrándolas), se observó este fenómeno de manera análoga a través del test de respuesta al toque, donde los organismos cuya PrP-2 había sido disminuida mostraban respuestas mucho más prolongadas (Tabla 10). De estas sí se hicieron mediciones, y

efectivamente hay diferencias significativas entre el grupo control y el tratado (ver *Resultados*, sección 6.5). Así, a manera general, podría decirse que lo que se percibe es una relativa hiperactividad en los morfantes. Lo más cercano a esto en la literatura señala que larvas cuyo gen de PrP-2 ha sido alterado son mucho más sensibles a efectos excitatorios (48, causando que exhiban movimientos de tipo epilepsia. Esto podría sugerir que la hiperactividad observada está también mediada por mecanismos similares, aunque a un distinto nivel de desarrollo.

Otro aspecto interesante a observar una vez estimulado el embrión con el toque es la respuesta de escape (103): una vez tocado el embrión, este dobla su cuerpo formando una “C”, que inicia un movimiento de escape en la dirección opuesta a la que recibió el estímulo. Dadas nuestras observaciones, la respuesta de escape parecía no ser normal en embriones tratados. Lamentablemente, se necesitan cámaras con mucho más cuadros por segundo que aquellas con las que contamos para poder determinar esto puntualmente. Esta respuesta es bastante consistente y conservada y está bastante bien descrita en embriones y larvas de pez cebra, incluso a nivel de qué circuitos nerviosos y estructuras participan. Se sabe que están envueltas estructuras que son visibles con nuestros anticuerpos, como el ganglio de la línea lateral y la línea lateral misma. Aunque en este estudio no pudimos observar ninguna alteración en ninguno de ellos, esto probablemente se debe a que el ganglio de la línea lateral es bastante pequeño y la línea lateral no se teñía adecuadamente con los anticuerpos aquí usados como para ser analizada, así que este problema debe ser abordado con otros materiales, por ejemplo, usando la línea transgénica *neuroD* disponible en nuestro bioterio, donde tanto el ganglio de la línea lateral como la línea lateral emiten una clara y fina fluorescencia bajo el microscopio adecuado. Por ahora, un estudio previo sobre la PrP-2 muestra que esta sí tendría un rol en el desarrollo de la línea lateral (65). Ese estudio, como el presente, sugieren que la PrP-2 media procesos de adhesión celular en el sistema nervioso en formación. Esta alteración observada en el desarrollo de la línea lateral apoyaría las observaciones de una respuesta a escape alterada.

En cuanto al nado de las larvas, primero analizamos la actividad total de estas. Para las comparaciones siguientes, se ha considerado comparar las larvas control con las larvas

morfantes que presentaban fenotipos leves, y el análisis de los fenotipos fuertes se hace más adelante. Los datos recogidos de los tiempos de actividad en las larvas control siguen una distribución normal, no siendo así para las larvas microinyectadas que, por otro lado, muestran una importante desviación estándar. Esto puede ser visualmente inferido al observar los diagramas de caja-bigotes (Figura 28), y explicado al observar los patrones de nado (Figura 29), donde se podría clasificar a las larvas morfantes en tres grupos: aquellas cuyo nado está notoriamente disminuido, aquellas que nadan como los organismos control y aquellas cuyo patrón de nado refleja relativa hiperactividad. El nado de las larvas suele ser tigmotáctico, es decir, suelen nadar cerca a las paredes. Esto es entendido como cierto nivel de ansiedad intrínseco en las larvas (104), y fue probado por otros estudios en los que la administraron ansiolíticos y ansiogénicos ocasionaron en las larvas disminución y aumento, respectivamente, de su tendencia a nadar cerca a las paredes. Teniendo esto en cuenta, es más frecuente encontrar larvas morfantes que nadan más tiempo lejos de las paredes, según lo observado en los patrones de nado. Una baja ansiedad está relacionada a mayor actividad en vías GABAérgicas. Teniendo en cuenta los roles ya atribuidos en estudios pasados y los acá propuestos para la PrP-2, futuros estudios deberán probar si la distribución y correcta función de receptores de GABA es normal en las larvas morfantes. Por otro lado, si se ve la estadística, solamente hay diferencias significativas entre el grupo control y el tratado para actividad y total y movimientos rápidos en larvas de 7 dpf. Esto podría ser quizá porque se tomó en cuenta tres experimentos, haciéndolo estadísticamente más sólido. Por otro lado, los patrones de nado de las larvas a 5 dpf son menos homogéneos que aquellos de las de 7 dpf, posiblemente porque las estructuras que participan en el nado y sus conexiones están mucho más maduras. Esto sugiere que las larvas de 7 dpf son mejores para usar en este tipo de análisis en el sentido de ofrecer mayor robustez a los resultados.

En cuanto al estímulo de luz, se sabe que las larvas tienden a explorar más su entorno, mostrando comportamientos donde la ansiedad es menor y, por lo tanto, la tigmotaxis lo es también (63). Esto se observa en las larvas control, pero no en las microinyectadas, donde, de nuevo, los patrones observados pueden ser subdivididos: algunas se quedan estáticas ante el estímulo de luz, mientras que otras adquieren una aparente hiperactividad (Figuras 30, 31). Durante la observación de los videos registrados, cuando se enciende la luz, se observa que

las larvas control tienen un movimiento corto y rápido, seguido de uno o dos segundos donde están estáticas, para luego retomar su nado. Sin embargo, en este primer subgrupo de las larvas microinyectadas, se observa que se quedan estáticas durante todo el estímulo de luz (5 min) o que tienen movimientos sumamente reducidos. Según estudios previos, este comportamiento es entendido en las larvas como miedo. Un estudio ha encontrado que la región habenular del cerebro de las larvas de pez cebra se encarga de mediar la recuperación de la función motora ante estímulos de miedo (105). El estudio muestra que aquellas larvas en las que la región habenular fue dañada durante el desarrollo, no se recuperan de estímulos de miedo, quedándose quietas. Cabe mencionar que hay un núcleo habenular por cada hemisferio, interconectados por las comisuras habenulares. Estas comisuras pueden ser observadas a 2 dpf justo posterior a la epífisis con el anticuerpo SV2 (Figura 23). En nuestras imágenes podemos ver que, como todas las comisuras, las fibras axonales no están ordenadas como se espera. Estudios futuros deberán comprobar si este daño no ha sido revertido en las larvas de 5 o 7 dpf, pudiendo hallar evidencia que apoye la disminución de PrP-2 en el desarrollo del sistema nervioso de pez cebra causa efectos a nivel neuroanatómico que son irreversibles y que tienen un efecto notorio en el comportamiento de las larvas. Por otro lado, en aquellas larvas donde se muestra un mayor nado por todo el pocillo, de nuevo esto podría estar relacionado a alteraciones en vías mediadas por GABA, ya que puede ser entendido como una muy baja ansiedad. Un estudio que usó larvas de pez cebra cuyo gen de PrP-2 fue noqueado con nucleasas con dedos de zinc mostró que estas larvas eran ligeramente más sensibles a PTZ, mostrando más movimientos similares a epilepsia (48). Esto respalda la hipótesis de que en larvas de pez cebra, la PrP-2 media alguna vía GABAérgica, ya que PTZ causa excitación en el sistema nervioso a través de su interacción con receptores de GABA.

Finalmente, las larvas con fenotipo severo (fuerte) no ofrecieron información directamente a nivel conductual, pues su cuerpo les impidió nadar normalmente. Sin embargo, estas fueron usadas como control positivo: en embriones bastante dañados por la microinyección de morfolino contra PrP-2 se observa tanto larvas que no se mueven en lo absoluto como otras que muestran contracciones sumamente rápidas y continuas, como si se tratara de una epilepsia. Esto va acorde a los tipos de nado encontrados en las larvas con fenotipo leve: son

los mismos fenotipos, pero con mayor intensidad, y esto refuerza que los efectos observados puedan ser atribuidos al efecto del *knockdown* de PrP-2.

En conjunto, los estudios conductuales llevados a cabo en este estudio sugieren que la PrP-2 cumple un rol en el desarrollo correcto del sistema nervioso en embriones de pez cebra, que repercute en el comportamiento incluso llegado el período larval. Estos daños pueden ser correlacionados con aquellos observados a través de nuestras inmunotinciones, como neuronas motoras o comisuras cerebrales. Además, integrando lo aquí observado con lo que la literatura presenta, los cambios también podrían ocurrir a nivel celular y molecular, por ejemplo, nivel de función o distribución de ciertos receptores, como los del neurotransmisor GABA. Futuros estudios deberán comprobar esto.

7. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que el uso de embriones (prim-5 y long-pec) y larvas de pez cebra (5 y 7 dpf) como modelo animal combinado con el uso de técnicas como inmunohistoquímica y estudios conductuales brindan información relevante para elucidar el rol de la PrP-2.

Por un lado, ya que los análisis a nivel neuroanatómico del *knockdown* de PrP-2 revelan una alteración especialmente de procesos relacionados a axogénesis y gangliogénesis, el mejor anticuerpo primario para evaluar los fenotipos producidos es SV2, que permite teñir algunos axones importantes (tales como axones craneales y de neuronas motoras) y diversos tipos de ganglios (como los ganglios craneales). Además, este anticuerpo primario permite obtener imágenes con muy alta resolución.

Por otro lado, en los estudios conductuales observamos diferencias entre el grupo control y tratado. Estas diferencias se percibían como o un nado hiperactivo (acompañado de una trayectoria indefinida) o como un nado bastante inactivo (donde la larva se quedaba estática por largos periodos de tiempo) en el grupo tratado y con fenotipo leve comparado al del control. Estas tendencias fueron corroboradas observando a las larvas tratadas y con fenotipo severo, que fueron usadas como control positivo. Además, encontramos que las larvas de 7 dpf ofrecen información más sólida, ya que el nado en los organismos control es más homogéneo. También, realizar los experimentos por triplicado brindan importante consistencia estadística. Por último, las larvas cuya producción de PrP-2 está disminuida muestran una respuesta anormal a los estímulos de luz, mostrando comportamientos relacionados en la literatura con mayor ansiedad y miedo.

Finalmente, esta investigación ofrece bases para el desarrollo de un enfoque neuroanatómico-conductual, cuya ventaja radica en la combinación de técnicas que permiten correlacionar la forma y función de estructuras nerviosas en un contexto de disminución de PrP-2, pudiendo así tener luces más claras de su rol fisiológico. En particular, los análisis a nivel neuroanatómico son una herramienta útil para descubrir qué vías de señalización están siendo afectadas resultando en la alteración de la axogénesis y gangliogénesis; siendo potenciales

blancos de estudio, dados los fenotipos que visualizamos entre el grupo tratado con morfolino para PrP-2 y según la literatura, proteínas encargadas de comunicación celular como N-cadherina y NCAM. En cuanto a los estudios conductuales, queda pendiente confirmar si los cambios en comportamiento se deben a la alteración del desarrollo en las estructuras en sí (como pudimos visualizar gracias a los análisis neuroanatómicos), a la alteración en la distribución de algunas moléculas, como receptores de neurotransmisores (como GABA), o a ambos factores.

8. REFERENCIAS

1. Collinge J. Prion Diseases of Humans and Animals: Their Causes and Molecular Basis. *Annual Review of Neuroscience*. 2001;24:36.
2. Poser CM. Notes on the history of the prion diseases. Part I. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2001;104:9.
3. Prusiner SB. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science*. 1982;226(9):9.
4. Berndt R. Reaction to contact in the Eastern Highlands of New Guinea. *Oceania*. 1954;24:20.
5. Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. *The New England Journal of Medicine*. 1957;257(20):5.
6. Hadlow W. Scrapie and Kuru. *The Lancet*. 1957;II:2.
7. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees. *Nature*. 1966;209:3.

8. Prusiner SB, Groth DF, Cochran SP, Masiarz FR, McKinley MP, Martinez HM. Molecular Properties, Partial Purification, and Assay by Incubation Period Measurements of the Hamster Scrapie Agent. *Biochemistry*. 1980;19:9.
9. Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science*. 1991;252:8.
10. Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. A Cellular Gene Encodes Scrapie PrP 27-30 Protein. *Science*. 1985;40:12.
11. Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ. Scrapie Prion Proteins Are Synthesized in Neurons. *The American Journal of Pathology*. 1986;122:5.
12. Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, Dearmond SJ. Molecular Cloning of a Human Prion Protein cDNA. *DNA*. 1986;5(4):9.
13. Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE. Purification and Structural Studies of a Major Scrapie Prion Protein Cell. 1984;38:8.
14. Weissmann C. Molecular Genetics of Transmissible Spongiform Encephalopathies. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(1):4.
15. Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature*. 1997;390:4.
16. Scott M, Foster D, Mirenda C, Serban D, Coufal F, Wälchli M, Torchia M, Groth D, Carlson G, DeArmond SJ, Westaway D, Prusiner SB. Transgenic Mice Expressing Hamster Prion Protein Produce Species-Specific Scrapie Infectivity and Amyloid Plaques. *Cell*. 1989;59:11.

17. Scott M, Groth D, Foster D, Torchia M, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB. Propagation of Prions with Artificial Properties in Transgenic Mice Expressing Chimeric PrP Genes. *Cell*. 1993;73:10.
18. Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. Mice Devoid of PrP Are Resistant to Scrapie. *Cell*. 1993;73:8.
19. Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 1992;356:6.
20. Büeler H, Raeber A, Sailer A, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C. High prion and PrP^{Sc} levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Molecular Medicine*. 1994;1(1):12.
21. Aguzzi A, Brandner S. The genetics of prions - a contradiction in terms? *The Lancet*. 1999;354:4.
22. Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*. 1996;379:5.
23. Brandner S, Reber A, Sailer A, Blättler T, Fischer M, Weissmann C, Aguzzi A. Normal host prion protein (PrP^C) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:4.
24. Stanley BP, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG. Scrapie Prions Aggregate to Form Amyloid-like Birefringent Rods. *Cell*. 1983;35:10.
25. Requena J, Wille H. The Structure of the Infectious Prion Protein and Its Propagation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2017;150:19.

26. Wille H, Requena J. The Structure of PrP^{Sc} Prions. *Pathogens*. 2018;7:11.
27. Griffith JS. Self-replication and Scrapie. *Nature*. 1967;215:2.
28. Wildegger G, Liemann S, Glockshuber R. Extremely rapid folding of the C-terminal domain of the prion protein without kinetic intermediates. *Nature Structural Biology*. 1999;6(6):4.
29. Castilla J, Saá P, Hetz C, Soto C. In Vitro Generation of Infectious Scrapie Prions. *Cell*. 2005;121:12.
30. McKinley MP, Meyer RK, Kenaga L, Rahbar F, Cotter R, Serban A, Prusiner SB. Scrapie Prion Rod Formation In Vitro Requires both Detergent Extraction and Limited Proteolysis. *Journal of Virology*. 1991;65(3):12.
31. Li J, Browning S, Mahal SP, Oelschlegel AM, Weissmann C. Darwinian Evolution of Prions in Cell Culture. *Science*. 2010;327(5967):12.
32. Bessen RA, Marsh RF. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *Journal of Virology*. 1994; 68(12):10.
33. Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*. 1996;383(6602):6.
34. Herrmann US, Sonati T, Falsig J, Reimann RR, Dametto P, O'Connor T, Li B, Lau A, Hornemann S, Sorce S, Wagner U, Sanoudou D, Aguzzi A. Prion Infections and Anti-PrP Antibodies Trigger Converging Neurotoxic Pathways. *PLoS Pathogens*. 2015;11(2):22.
35. Cotto E, André M, Forgue J, Fleury HJ, Babin PJ. Molecular characterization, phylogenetic relationships, and developmental expression patterns of prion genes in zebrafish (*Danio rerio*). *The FEBS Journal*. 2005;272:14.
36. Wulf MA, Senatore A, Aguzzi A. The biological function of the cellular prion protein: an update. *BioMed Central Biology*. 2017;15:13.

37. Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wüthrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 1997;413:7.
38. Klingeborn M, Race B, Meade-White KD, Rosenke R, Striebel JF, Chesebro B. Crucial Role for Prion Protein Membrane Anchoring in the Neuroinvasion and Neural Spread of Prion Infection. *Journal of Virology*. 2011;85:11.
39. Schwarz F, Aebi M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*. 2011;21:7.
40. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012;13:16.
41. Taylor DR, Hooper NM. The prion protein and lipid rafts *Molecular Membrane Biology*. 2006;23(1):11.
42. Gill AC, Castle AR. Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2017;4:25.
43. Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB. Binding of Neural Cell Adhesion Molecules (N-CAMs) to the Cellular Prion Protein. *Journal of Molecular Biology*. 2001;314:17.
44. Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Schachner M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59 fyn and to enhance neurite outgrowth. *The Journal of Cell Biology*. 2005;160:14.
45. Málaga-Trillo E, Solis GP, Schrock Y, Geiss C, Luncz L, Thomanetz V, Stuermer CA. Regulation of Embryonic Cell Adhesion by the Prion Protein. *PLoS Biology*. 2009;7:15.
46. Sempou E, Málaga-Trillo E. PrPs: Proteins with a purpose. *Prion*. 2009;3(3):5.

47. Solomon IH, Khatri N, Biasini E, Massignan T, Huettner JE, Harris DA. An N-terminal Polybasic Domain and Cell Surface Localization Are Required for Mutant Prion Protein Toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(16):13.
48. Fleisch VC, Leighton PL, Wang H, Pillay LM, Ritzel RG, Bhinder G, Roy B, Tierney KB, Ali DW, Waskiewicz AJ, Allison WT. Targeted mutation of the gene encoding prion protein in zebrafish reveals a conserved role in neuron excitability. *Neurobiology of Disease*. 2013;55:15.
49. Kaiser DM, Acharya M, Leighton PL, Wang H, Daude N, Wohlgemuth S, Shi B, Allison WT. Amyloid Beta Precursor Protein and Prion Protein Have a Conserved Interaction Affecting Cell Adhesion and CNS Development. *PLoS Biology*. 2012;7(12):17.
50. Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers. *Nature*. 2009;457:7.
51. Brandner S, Jaunmuktane Z. Prion disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*. 2017;133:26.
52. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8:15.
53. Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN, Engeszer RE. Normal Table of Post-Embryonic Zebrafish Development: Staging by Externally Visible Anatomy of the Living Fish. *Developmental Dynamics*. 2009;238(12):81.
54. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*. 1995;203:58.
55. Jontes JD, Emond MR. Fluorescence Imaging of Transgenic Zebrafish Embryos. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012;Protocols.

56. Köster RW, Fraser SE. Time-Lapse Microscopy of Brain Development. *Methods in Cell Biology*. 2004;76.
57. Ignatius MS, Langenau DM. Fluorescent Imaging of Cancer in Zebrafish. *Methods in Cell Biology*. 2011;105:22.
58. Gansner JM, Dang M, Ammerman M, Zon LI. Transplantation in Zebrafish. *Methods in Cell Biology*. 2011;105(Chapter 17):15.
59. Davis JM, Clay H, Lewis JL, Ghorri N, Herbomel P, Ramakrishnan L. Real-Time Visualization of Mycobacterium-Macrophage Interactions Leading to Initiation of Granuloma Formation in Zebrafish Embryos. *Immunity*. 2002;17:10.
60. Creton R. Automated analysis of behavior in zebrafish larvae. *Behaviora Brain Research*. 2009;203(2009):10.
61. Palmér T, Ek F, Enqvist O, Olsson R, Åström K, Petersson P. Action sequencing in the spontaneous swimming behavior of zebrafish larvae - implications for drug development. *Scientific Reports*. 2017;7:13.
62. Fleisch VC, Neuhauss SC. Visual Behavior in Zebrafish. *Zebrafish*. 2006;3(2):11.
63. Basnet RM, Zizioli D, Taweedet S, Finazzi D, Memo M. Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. *Biomedicines*. 2019;7(23):16.
64. Rivera-Milla E, Oidtmann B, Panagiotidis CH, Baier M, Sklaviadis T, Hoffmann R, Zhou Y, Solis GP, Stuermer CA, Málaga-Trillo E. Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppel- and prion-related loci revealed by fish-to-mammal comparisons. *FASEB Journal*. 2006;20(20):9.
65. Huc-Brandt S, Hieu N, Imberdis T, Cubedo N, Silhol M, Leighton PL, Domaschke T, Allison WT, Perrier V, Rossel M. Zebrafish Prion Protein PrP2 Controls Collective

Migration Process during Lateral Line Sensory System Development. PLoS ONE. 2014;9(12):22.

66. Westerfield M. The Zebrafish Book. A Guide For the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 4th edition. University of Oregon Press. 2000.

67. Flanagan-Steet H, Fox MA, Meyer D, Sanes JR. Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development*. 2005;132.

68. Nüsslein-Volhard C. Zebrafish: a practical approach. New York: Oxford University Press. 2002.

69. Ke YD, Suchowerska AK, van der Hoven J, De Silva DM, Wu CW, van Eersel J, Ittner A, Ittner LM. Lessons from Tau-Deficient Mice. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;2012:8.

70. Colwill RM, Creton R. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behavioral processes*. 2011;86(2):7.

71. Stein D, Foster E, Huang SB, Weller D, Summerton J. A Specificity Comparison of Four Antisense Types: Morpholino, 2'-O-Methyl RNA, DNA, and Phosphorothioate DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1997;7:7.

72. Summerton J, Weller D. Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1997;7:9.

73. Ekker SC, Larson JD. Morphant technology in model developmental systems. *Genesis*. 2001;30:5.

74. Summerton JE. Morpholino, siRNA, and S-DNA Compared: Impact of Structure and Mechanism of Action on Off-Target Effects and Sequence Specificity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2007;7:10.

75. Bill BR, Petzold AM, Clark KJ, Schimmenti LA, Ekker SC. Primer for Morpholino Use in Zebrafish. *Zebrafish*. 2009;6(1):10.
76. Blum M, De Robertis EM, Wallingford JB, Niehrs C. Morpholinos: Antisense and Sensibility. *Developmental Cell*. 2015;35:5.
77. Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA, Ekker SC. p53 Activation by Knockdown Technologies. *PLoS Genetics*. 2007;3(5):16.
78. Gerety SS, Wilkinson DG. Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. *Developmental Biology*. 2011;350:11.
79. Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, Stainier DY. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*. 2015;000:15.
80. El-Brolosy MA, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Günther S, Fukuda N, Kikhi K, Boezio GLM, Takacs CM, Lai SL, Fukuda R, Gerri C, Giraldez AJ, Stainier DYR. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature*. 2019:26.
81. Trevarrow B, Marks DL, Kimmel CB. Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron*. 1990;4:11.
82. Hanneman E, Trevarrow B, Metcalfe WK, Kimmel CB, Westerfield M. Segmental pattern of development of the hindbrain and spinal cord of the zebrafish embryo. *Development*. 1988;103:11.
83. Buchwalow I, Samoilova V, Boecker W, Tiemann M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Scientific Reports*. 2011:6.

84. Diekmann H, Stuermer C. Zebrafish Neurolin-a and -b, Orthologs of ALCAM, Are Involved in Retinal Ganglion Cell Differentiation and Retinal Axon Pathfinding. *The Journal of Comparative Neurology*.513:13.
85. Ott H, Diekmann H, Stuermer CA, Bastmeyer M. Function of Neurolin (DM-GRASP/SC-1) in Guidance of Motor Axons during Zebrafish Development. *Developmental Biology*. 2001;235(12):86.
86. Orrù CD, Soldau K, Cordano C, Llibre-Guerra J, Green AJ, Sanchez H, Groveman BR, Edland SD, Safar JG, Lin JH, Caughey B, Geschwind MD, Sigurdson CJ. Prion Seeds Distribute throughout the Eyes of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients. *American Society for Microbiology*. 2018;9(6):10.
87. Parrie LE, Crowell JAE, Telling GC, Bessen RA. The cellular prion protein promotes olfactory sensory neuron survival and axon targeting during adult neurogenesis. *Developmental Biology*. 2018.
88. Kizuka Y, Oka S. Regulated expression and neural functions of human natural killer-1 (HNK-1) carbohydrate. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012:13.
89. Morita I, Kakuda S, Takeuchi Y, Kawasaki T, Oka S. HNK-1 (human natural killer-1) glyco-epitope is essential for normal spine morphogenesis in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2009;164:10.
90. García-Ayllón MS, Botella-López A, Cuchillo-Ibañez I, Rábano A, Andreasen N, Blennow K, Ávila J, Sáez-Valero J. HNK-1 Carrier Glycoproteins Are Decreased in the Alzheimer's Disease Brain. *Molecular Neurobiology*. 2015:12.
91. Whitlock KE, Westerfield M. The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development*. 2000;127:9.

92. Mendoza-Torreblanca JG, Vanoye-Carlo A, Phillips-Farfán BV, Carmona-Aparicio L, Gómez-Lira G. Synaptic vesicle protein 2A: basic facts and role in synaptic function. *European Journal of Neuroscience*. 2013;38:11.
93. Ohno Y, Tokudome K. Therapeutic Role of Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A (SV2A) in Modulating Epileptogenesis. *CNS and Neurological Disorders*. 2017;16:9.
94. D'Amico-Martel A, Noden DM. Contributions of Placodal and Neural Crest Cells to Avian Cranial Peripheral Ganglia. *The American Journal of Anatomy*. 1983;166:24.
95. Freter S, Fleenor SJ, Freter R, Liu KJ, Begbie J. Cranial neural crest cells form corridors prefiguring sensory neuroblast migration. *Development*. 2013;140:6.
96. Shiau CE, Bronner-Fraser M. N-cadherin acts in concert with Slit1-Robo2 signaling in regulating aggregation of placode-derived cranial sensory neurons. *Development*. 2010;137:10.
97. Shiau CE, Lwigale PY, Das RM, Wilson SA, Bronner-Fraser M. Robo2-Slit1 dependent cell-cell interactions mediate assembly of the trigeminal ganglion. *Nature neuroscience*. 2008;11(3):9.
98. Shah A, Schiffmacher AT, Taneyhill LA. Annexin A6 controls neuronal membrane dynamics throughout chick cranial sensory gangliogenesis. *Developmental Biology*. 2017;425(1):15.
99. Lewis TL Jr, Courchet J, Polleux F. Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *The Journal of Cell Biology*. 2013;202(6):12.
100. Lowery LA, Van Vactor D, Th Cremer H, Chazal G, Goridis C, Represa A.
101. Cremer H CG, Goridis C, Represa A. NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Molecular Cellular Neuroscience*. 1997;8(5):13.

102. Wanner IB, Wood PM. N-Cadherin Mediates Axon-Aligned Process Growth and Cell–Cell Interaction in Rat Schwann Cells. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22(10):14.
103. Roberts AC, Chornak J, Alzagatiti JB, Ly DT, Bill BR, Trinkeller J, Pearce KC, Choe RC, Campbell CS, Wong D, Deutsch E, Hernandez S, Glanzman DL. Rapid habituation of a touch-induced escape response in Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *PLoS One*. 2019 Apr 4;14(4):e0214374.
104. Richendrfer H, Pelkowski SD, Colwill RM, Creton R. On the edge: pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Behav Brain Res*. 2012 Mar 1;228(1):99-106.
105. Facchin L, Duboué ER, Halpern ME. Disruption of Epithalamic Left-Right Asymmetry Increases Anxiety in Zebrafish. *J Neurosci*. 2015 Dec 2;35(48):15847-59.