



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la expresión del gen Frizzled 7 durante el desarrollo y  
en la regeneración de la médula espinal de alevines de pez cebra  
(*Danio rerio*) mediante PCR

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A :**

**José Ricardo García Rodríguez**



**COMITÉ DE TUTORES**  
**DIRECTORA: PhD. CARLA GARCÍA MORALES**  
**ASESOR: M. en C. JAIME CARLOS LÓPEZ RODRÍGUEZ**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Septiembre de 2023.

## ÍNDICE

<b>Índice de figuras</b>	III
<b>Índice de tablas</b>	VI
<b>Listado de abreviaturas</b>	VII
<b>Nomenclatura</b>	X
<b>Resumen</b>	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Sistema nervioso de los vertebrados.....	1
1.1.1. Sistema nervioso central.....	2
1.1.1.1. Médula espinal.....	4
1.2. Lesión de médula espinal.....	6
1.2.1. Tratamientos para lesión de médula espinal.....	7
1.3. Generalidades del pez cebra.....	8
1.4. El Pez cebra como modelo de investigación.....	10
1.4.1. Regeneración de médula espinal.....	11
1.5. Proteínas Wnt.....	14
1.6. Vías de señalización Wnt.....	15
1.6.1. Vía de señalización canónica.....	16
1.6.2. Vías de señalización no canónicas.....	17
1.6.2.1. Vía de polaridad celular planar (PCP).....	17
1.6.2.2. Vía Wnt/Ca <sup>2+</sup> .....	18
1.7. Receptores Frizzled.....	19
1.7.1. Frizzled 7.....	23
1.8. Frizzled 7 en pez cebra.....	24
1.8.1. <i>Fzd7a</i> .....	25
1.8.2. <i>Fzd7b</i> .....	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	27
3. OBJETIVO.....	28
4. MÉTODO.....	29
4.1. Bioética.....	29
4.2. Mantenimiento de organismos.....	29
4.3. Diseño de oligonucleótidos.....	29

4.4. Obtención de embriones.....	30
4.5. Obtención de oocitos.....	30
4.6. Recolección de embriones y extracción de RNA.....	30
4.7. Lesión de médula espinal.....	31
4.8. Recolección de embriones lesionados y extracción de RNA.....	31
4.9. Síntesis de cDNA.....	31
4.10. PCR.....	31
4.11. Evaluación de la reconexión axonal.....	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1. Alineamiento de secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de los genes <i>fzd7a</i> y <i>fzd7b</i> .....	33
5.2. Diseño de oligonucleótidos.....	37
5.2.1. Diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen <i>fzd7a</i> .....	37
5.2.2. Diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen <i>fzd7b</i> .....	40
5.2.3. Diseño de oligonucleótidos para amplificar $\beta$ -actina.....	40
5.3. Optimización de PCR.....	41
5.3.1. Optimización de PCR para $\beta$ -actina.....	41
5.3.2. Optimización de PCR para el gen <i>fzd7a</i> .....	42
5.3.3. Optimización de PCR para el gen <i>fzd7b</i> .....	43
5.4. Análisis de la expresión del gen <i>fzd7b</i> durante el desarrollo embrionario del pez cebra.....	44
5.5. Lesión de médula espinal de embriones de pez cebra.....	45
5.6. Análisis de la expresión de <i>fzd7b</i> en la regeneración de médula espinal en embriones y alevines de pez cebra.....	46
5.7. Evaluación de la reconexión de la médula.....	47
6. CONCLUSIONES.....	51
7. PERSPECTIVAS.....	52
8. REFERENCIAS.....	54
9. ANEXOS.....	63
<b>Anexo I.</b> Tabla de desarrollo normal de <i>Danio rerio</i> a 28 °C, Kimmel <i>et al.</i> , 1995. .....	63

## Índice de figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> División anatómica del sistema nervioso humano.....	1
<b>Figura 2.</b> División anatómica del encéfalo humano.....	3
<b>Figura 3.</b> División anatómica del SNC de pez cebra.....	4
<b>Figura 4.</b> Corte transversal de la médula espinal.....	5
<b>Figura 5.</b> Anatomía humana de la columna vertebral y la médula espinal.....	5
<b>Figura 6.</b> Anatomía de la columna vertebral y de la médula espinal del pez cebra.....	6
<b>Figura 7.</b> Representación comparativa de los eventos posteriores a una lesión de la médula espinal (LME) en mamíferos y pez cebra.....	14
<b>Figura 8.</b> Vías de señalización Wnt.....	15
<b>Figura 9.</b> Vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina.....	17
<b>Figura 10.</b> Vía de señalización Wnt de polaridad celular planar en estado activo.....	18
<b>Figura 11.</b> Diagrama de la vía de señalización Wnt/Ca <sup>2+</sup> en estado activo.....	19
<b>Figura 12.</b> Esquema general de una proteína Frizzled y sus correceptores LRP-5 o LRP-6.....	20
<b>Figura 13.</b> Esquema general de la expresión del gen <i>fzd7a</i> en pez cebra.....	25
<b>Figura 14.</b> Esquema general de la expresión del gen <i>fzd7b</i> en pez cebra.....	26
<b>Figura 15.</b> Alineamiento local de las secuencias aminoacídicas de <i>fzd7a</i> y <i>fzd7b</i> de pez cebra en T-Coffee.....	34
<b>Figura 16.</b> Alineamiento de secuencias nucleotídicas de los genes <i>fzd7a</i> y <i>fzd7b</i> de pez cebra en T-Coffee.....	35
<b>Figura 17.</b> Opciones de pares de oligonucleótidos de <i>fzd7a</i> sugeridas por Primer 3...37	

<b>Figura 18.</b> Alineamiento del oligonucleótido sentido de <i>fzd7a</i> con herramienta BLAST®.....	38
<b>Figura 19.</b> Alineamiento del oligonucleótido anti-sentido de <i>fzd7a</i> con herramienta BLAST®.....	39
<b>Figura 20.</b> Longitud del amplicón para el gen <i>fzd7a</i> determinado con la herramienta primer-BLAST.....	39
<b>Figura 21.</b> Longitud del amplicón para el gen <i>fzd7b</i> determinado con la herramienta primer-BLAST. ....	40
<b>Figura 22.</b> Longitud del amplicón para el gen $\beta$ -actina determinado con la herramienta primer-BLAST. ....	40
<b>Figura 23.</b> Electroforesis de la optimización de la PCR para la amplificación del gen $\beta$ -actina.....	42
<b>Figura 24.</b> Electroforesis de la optimización de la PCR para la amplificación del gen <i>fzd7a</i> (rampa de temperatura de 56 °C a 64 °C). ....	43
<b>Figura 25.</b> Electroforesis de la optimización de la PCR para la amplificación del gen <i>fzd7b</i> .....	44
<b>Figura 26.</b> Expresión del gen <i>fzd7b</i> en distintos estadios de desarrollo embrionario del pez cebra. ....	45
<b>Figura 27.</b> Embrión de 24 horas de desarrollo con lesión en médula espinal, magnificación 4x (vista lateral).....	45
<b>Figura 28.</b> Embrión de 24 horas de desarrollo con lesión en el músculo a nivel de médula espinal, magnificación 4x (vista lateral).....	45
<b>Figura 29.</b> Embrión de 24 horas de desarrollo no lesionado, magnificación 4x (vista lateral).....	46
<b>Figura 30.</b> Expresión del gen <i>fzd7b</i> durante la regeneración de médula espinal (ME) en embriones y alevines de pez cebra, colectados a distintos tiempos post-lesión (Repetición 1).....	46

**Figura 31.** Expresión del gen *fzd7b* durante la regeneración de médula espinal (ME) en embriones y alevines de pez cebra, colectados a distintos tiempos post-lesión (Repetición 2). .....47

**Figura 32.** Desarrollo normal de individuos no lesionados (vista lateral).....46

**Figura 33.** Evaluación de la regeneración de músculo en embriones lesionados (vista lateral).....48

**Figura 34.** Evaluación de la reconexión axonal en embriones lesionados (vista lateral).. .....50

## Índice de tablas

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Particularidades de los receptores de los genes frizzled y ligandos Wnt con los que interactúan.....	20
<b>Tabla 2.</b> Ensamble de reacción de la PCR para una reacción de 25 µL con DNA polimerasa GoTaq.....	32

## Listado de abreviaturas

$\beta$ -Trcp	<i><math>\beta</math>-transducin repeat-containing protein</i>
APC	Gen supresor de tumores de la poliposis coli adenomatosa
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
CaMKII	Proteína quinasa II dependiente de calmodulina
cDNA	DNA complementario
CK1 $\alpha$	Caseína quinasa 1 $\alpha$
Cn	Calcineurina
CRD	<i>Cysteine rich domain</i> (Dominio rico en cisteína)
CREB	Elemento de respuesta a AMPc de unión a DNA
DAAM1	Activador de la morfogénesis 1 asociado a dishevelled
DNA	<i>Deoxyribunecleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dpf	Días post-fertilización
dpl	Días post-lesión
Dvl	<i>Dishevelled</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (Factor de crecimiento de fibroblastos)
gdf8	Factor de crecimiento y diferenciación 8
GPCR	<i>G Protein Coupled Receptors</i> (Receptores acoplados a proteínas G)
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
hpf	Horas post-fertilización
hpl	Hora post-lesión
IF	Inmunofluorescencia
ISH	Hibridación in situ



JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
LEF	Factor estimulador linfoide
LLC	Leucemia linfocítica crónica de células B
LME	Lesión de médula espinal
LPA	Ácido lisofosfatídico
LRP 5	Proteína relacionada a receptores de lipoproteínas de baja densidad-5
LRP 6	Proteína relacionada a receptores de lipoproteínas de baja densidad-6
ME	Médula espinal
mRNA	RNA mensajero
MVP	<i>Major vault protein</i> (Proteína de bóveda principal)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa de las células B activadas
NFAT	Factor nuclear asociado a células T
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NLK	<i>Nemo-like kinase</i> (Quinasa similar a Nemo)
PCP	<i>Tissue/planar cell polarity</i> (Vía de polaridad celular planar)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfodiesterasa GMPc específica
PTK	Proteína tirosina quinasa
Rac1	GTPasa 1 de la familia Rac
Rho	Factor Rho
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
ROCK	Proteína quinasa relacionada a Rho

ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i> (Receptor huérfano relacionado a RAR)
RYK	<i>Receptor-like tyrosine kinase</i> (Receptor similar a tirosina quinasa)
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TA	Temperatura ambiente
TCF	Factor de células T
TCF4	Factor de transcripción 4
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$ -activado
T <sub>m</sub>	Temperatura de alineamiento
VREF	Vitreorretinopatía exudativa familiar
ZFIN	<i>Zebrafish Information Network</i>

## Nomenclatura

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
cm	Centímetro
L	Litros
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
Rx	Reacción
Seg	Segundos
u/µL	Unidades por microlitro
xg	Fuerza centrífuga relativa

## Resumen

El receptor Fzd7, se encuentra ampliamente caracterizado y presenta expresión en el sistema nervioso central del pez cebra, por lo que podría estar relacionado con la inducción de neuronas y la reconexión axonal, sin embargo, su expresión durante el proceso de regeneración de la médula espinal no ha sido estudiada. Este trabajo evaluó la expresión de *fzd7* durante el desarrollo embrionario y en la regeneración de la médula espinal de alevines de pez cebra de 24 hpf, para ello, se diseñaron oligonucleótidos del gen *fzd7a*, se optimizaron las condiciones de la técnica de PCR para los homólogos de *fzd7* y  $\beta$ -actina, se realizó la lesión de médula espinal en embriones de 24 hpf y se analizó la expresión de *fzd7b* mediante RT-PCR. Por RT-PCR se observó que el transcrito de *fzd7* es de herencia materna y está presente hasta las 48 horas de desarrollo. Por otra parte, la lesión en músculo mostró no alterar la expresión de *fzd7b* a las 0 hpl, mientras que al lesionar la médula los resultados sugieren una ligera reducción en su expresión de las 0 a las 48 hpl. Los embriones lesionados en músculo se recuperaron de la lesión al 4 dpl, en aquellos lesionados en médula se observó actividad natatoria provocada por contacto a las 48 hpl y se identificó la generación de puentes axonales a partir de los 4 dpl y un 90% de regeneración a los 8 dpl.

**Palabras clave:** Regeneración de médula espinal, Frizzled, *fzd7*, Pez Cebra, desarrollo embrionario, RT-PCR.

## Abstract

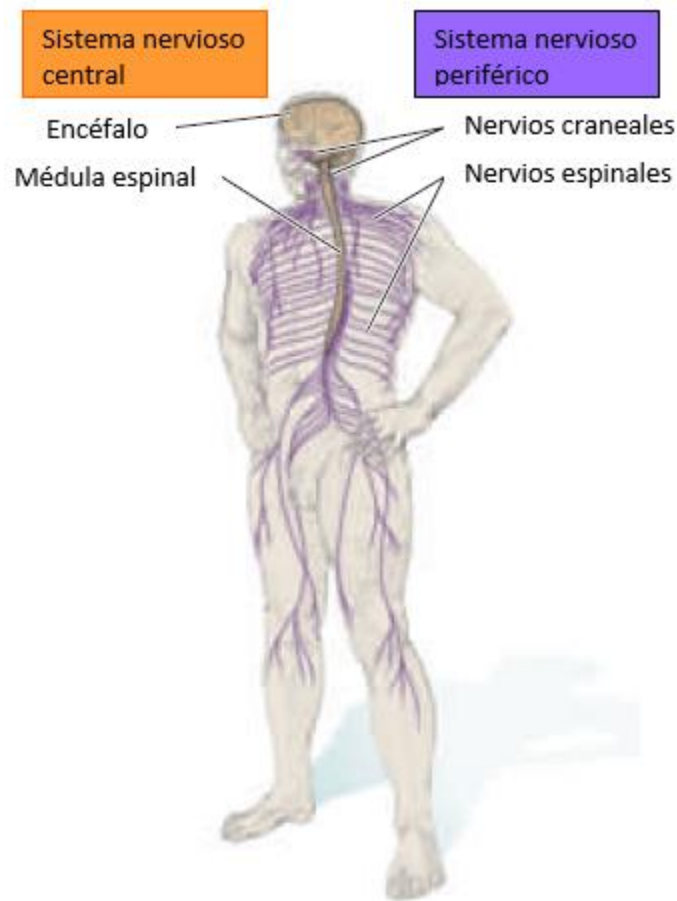
The *fzd7* receptor is widely characterized and is expressed in the central nervous system, so it could be related to the induction of neurons and axonal reconnection; however, its expression during the spinal cord regeneration process has not been studied. This work evaluated the expression of *fzd7* during embryonic development and in the regeneration of the spinal cord of zebrafish larvae. For this purpose, oligonucleotides of the *fzd7a* gene were designed, PCR conditions were optimized for the homologs of *fzd7* and  $\beta$ -actin, spinal cord injury was performed in 24 hpf embryos and the expression of *fzd7b* was analyzed by RT-PCR. The analysis suggests that during the first 48 hpf, the expression of *fzd7b* is uniform, and its maternal origin could also be confirmed. On the other hand, muscle injury did not alter the expression of *fzd7b* at 0 hpi, while when the spinal cord was injured, the results suggested a slight reduction in its expression from 0 to 48 hpi. Embryos injured in muscle recovered from the injury at 4 dpi, in those injured in spinal cord, contact-induced swimming activity was observed at 48 hpi and the generation of axonal bridges was identified from 4 dpi and 90% regeneration at 8 dpi.

**Keywords:** Spinal cord regeneration, Frizzled, *fzd7*, Zebrafish, embryonic development, RT-PCR.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Sistema nervioso de los vertebrados

El sistema nervioso de los vertebrados está formado por distintos tipos de neuronas que transmiten y procesan toda la información colectada por los órganos sensoriales, permitiéndonos el movimiento del cuerpo y adaptarnos al ambiente externo (Pérez-Estudillo *et al.*, 2018). El sistema nervioso presenta una simetría lateral y se subdivide anatómicamente en el sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP) (**Figura 1**), funcionalmente, éstos se dividen en el sistema nervioso somático y autónomo (Noback *et al.*, 2005).



**Figura 1.** División anatómica del sistema nervioso humano. Imagen tomada y traducida de Purves *et al.*, 2004.

Al sistema nervioso central lo comprenden, el encéfalo y la médula espinal, localizados dentro del cráneo y en el centro de la columna vertebral, respectivamente. El sistema

nervioso periférico consiste de los nervios que emergen tanto del cerebro (nervios craneales) como de aquellos que surgen de la médula espinal (nervios espinales) (**Figura 1**). Los nervios periféricos transmiten mensajes desde los órganos y receptores sensoriales alrededor del organismo hacia el SNC, y desde este último hacia los músculos y glándulas de todo el cuerpo (Noback et al., 2005).

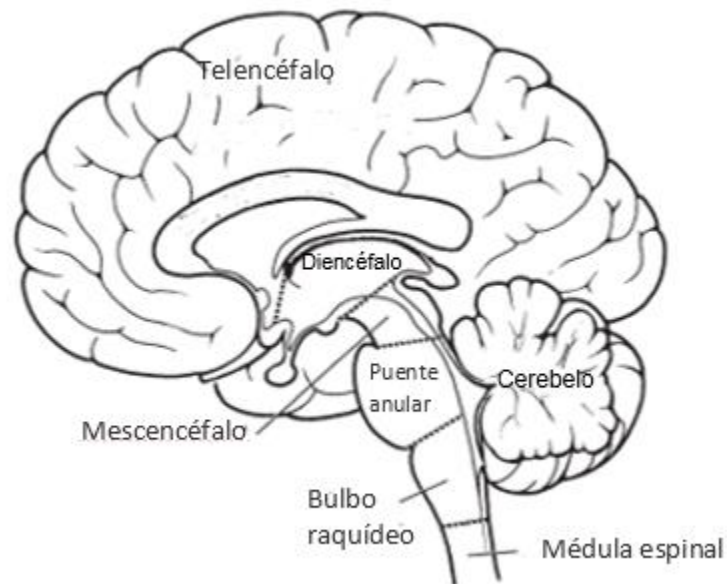
La porción motora del SNP consiste de dos componentes, los axones motores que conectan el encéfalo y la médula espinal con los músculos esqueléticos, constituyen la división motora somática, mientras que, las células y axones que inervan en los músculos liso, cardíaco y las glándulas la división motora visceral o autonómica (Purves et al., 2004). A continuación, se describe con mayor detalle la estructura y funciones del sistema nervioso central.

### **1.1.1. Sistema nervioso central**

Como ya se mencionó, el SNC consta de dos estructuras fundamentales, el encéfalo y la médula espinal. A su vez, el cerebro de los vertebrados comprende tres divisiones principales prosencéfalo, meséncéfalo y rombencéfalo. Al prosencéfalo lo componen el telencéfalo (parte más rostral del encéfalo) y el diencefalo. El mesencéfalo contiene al techo óptico. El rombencéfalo es la región más caudal del encéfalo y se divide; en el mielencéfalo y el metencéfalo. El rombencéfalo y la médula espinal comparten el control y regulación de las tareas de los órganos internos, como el corazón, el sistema digestivo y el respiratorio (Butler & Hodos, 2005).

El encéfalo humano está constituido básicamente por seis partes; el bulbo raquídeo, la protuberancia o puente anular, el cerebelo, el mesencéfalo, el diencefalo y los hemisferios cerebrales (telencéfalo) (**Figura 2**). Además, el SNC está compuesto de materia gris y materia blanca. La materia gris está constituida por cuerpos de células neuronales, dendritas, terminales de axones, sinapsis y células gliales, y se encuentra altamente vascularizada. La materia blanca está formada por conjuntos de axones (la mayoría mielinizados) y de oligodendrocitos, el color blanco se debe a la mielina, carece de cuerpos celulares neuronales y está menos vascularizada que la gris (Noback et al., 2005; Purves et al., 2004).

El encéfalo humano se encuentra dividido en 3 principales estructuras el cerebro, tronco encefálico y cerebelo. El término cerebro es utilizado para referirse a los hemisferios cerebrales (telencéfalo) y al diencefalo. El bulbo raquídeo, el puente anular y el mesencéfalo en conjunto forman el tronco encefálico (Strominger *et al.*, 2011). El cerebelo está ubicado de manera dorsal a la protuberancia anular este se encarga de controlar el balance y ayuda en la coordinación de los movimientos (Rye *et al.*, 2016).

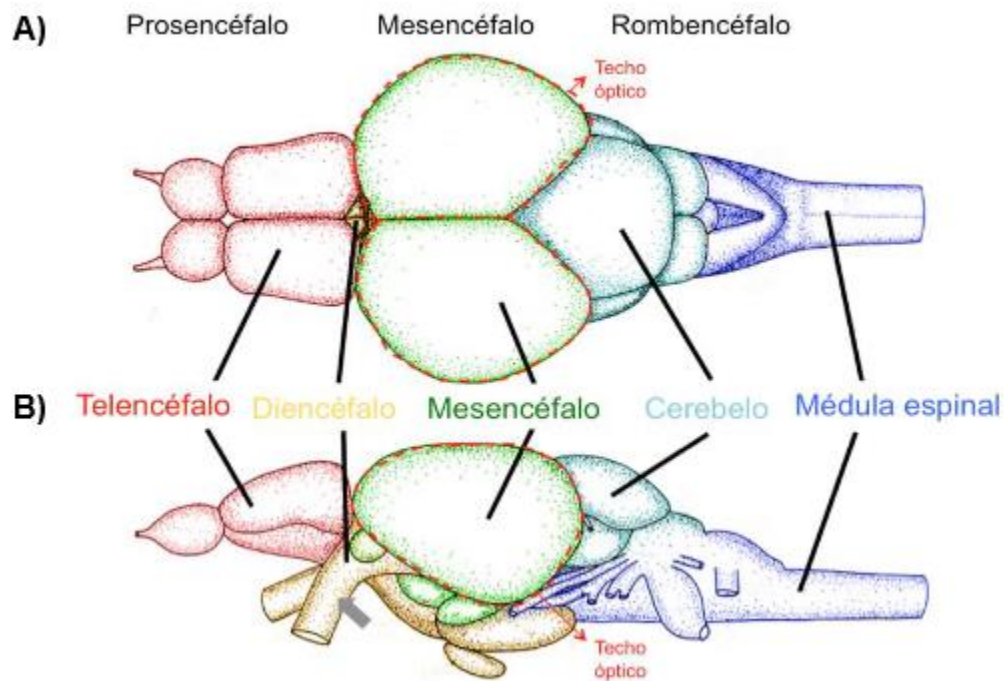


**Figura 2.** División anatómica del encéfalo humano. Imagen tomada y modificada de Strominger *et al.*, 2011.

Existe gran diversidad en el sistema nervioso de los diferentes vertebrados, sin embargo, comparten la estructura general del sistema nervioso. En el caso del pez cebra, modelo utilizado en este trabajo, podemos considerar como sus principales componentes estructurales el telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, rombencéfalo (**Figura 3**). El telencéfalo se subdivide en 3 partes; el par de bulbos olfatorios (ubicados en la parte más rostral), el área dorsal y el área ventral del telencéfalo. El diencefalo está compuesto por 5 principales divisiones el epítalamo, el tálamo dorsal, el tálamo ventral, el tubérculo posterior y el hipotálamo. El mesencéfalo incluye, el techo óptico, el toro semicircularis y el área pretectal. El techo óptico es la estructura en capas más compleja del cerebro del pez cebra. El rombencéfalo como en la mayoría de los vertebrados, se divide en el mielencéfalo y metencéfalo, la primera estructura conformada por el bulbo



raquídeo, y la segunda por el puente anular y el cerebelo. El bulbo raquídeo y el área pretectal forman el tallo encefálico (Wullimann *et al.*, 1996).



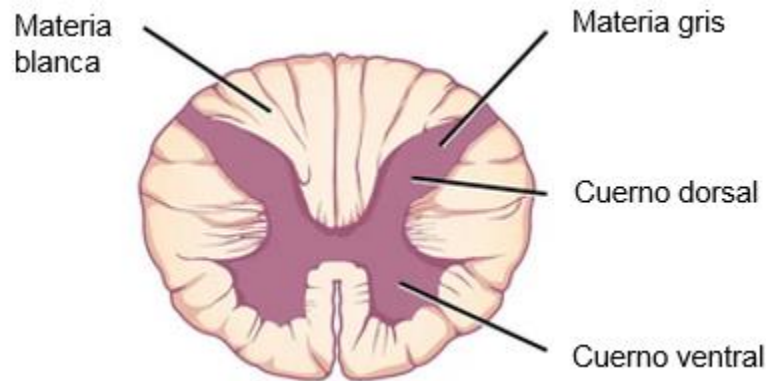
**Figura 3.** División anatómica del SNC de pez cebra. **A)** Vista dorsal. **B)** Vista lateral. Imagen tomada de Vázquez *et al.*, 2019.

#### 1.1.1.1. Médula espinal

La médula espinal (ME) es una estructura cilíndrica delgada compuesta de sustancia gris y blanca que se encuentra en los dos tercios superiores del canal vertebral y está rodeada por la columna vertebral. Un corte transversal de la médula luciría como el presentado en la **Figura 4**, similar a un óvalo blanco con una silueta gris con forma de mariposa. La médula espinal se divide en segmentos y cada segmento tiene un par de nervios raquídeos que envían mensajes entre el encéfalo y el resto del cuerpo (Rye *et al.*, 2016; Strominger *et al.*, 2011).

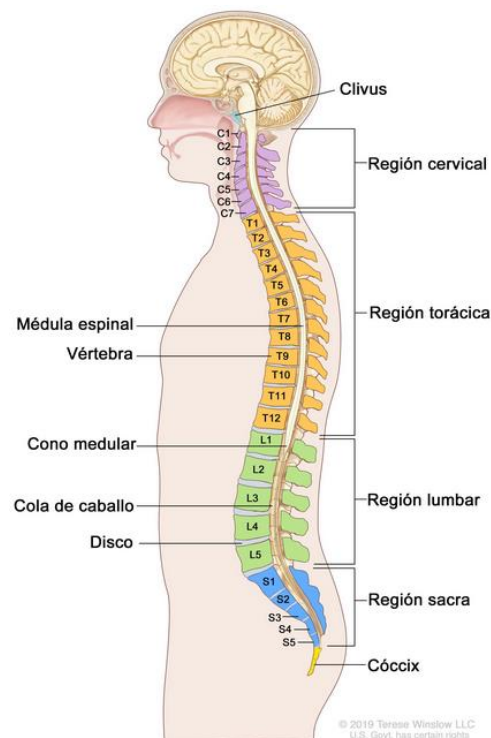
La médula espinal se extiende desde la base del cráneo hasta una terminación en forma de cono, el cono medular. El filum terminal (estructura no neuronal) continúa caudalmente como un filamento desde el cono medular hasta su inserción en el cóccix (Felten *et al.*, 2021). Hay muchos nervios raquídeos que continúan más allá del cono

medular (parte final de la médula espinal); este conjunto de nervios se llama cola de caballo (Strominger *et al.*, 2011).



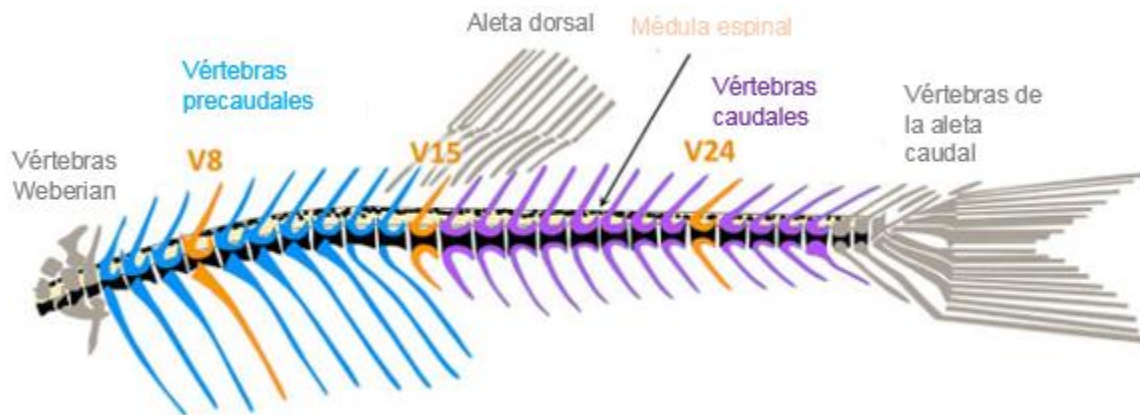
**Figura 4.** Corte transversal de la médula espinal. Imagen tomada y traducida de Rye *et al.*, 2016.

La columna vertebral está formada por huesos, músculos, tendones, nervios y otros tejidos que se extienden a lo largo de la médula espinal. Los huesos que la componen son llamados vértebras, éstas son estructuras óseas que rodean y protegen la médula. En el humano, las vértebras forman la región cervical (C1-C7), la región torácica (T1-T12), la región lumbar (L1-L5), la región sacra (S1-S5) y el cóccix, entre cada vértebra hay un disco que la separa de la siguiente (**Figura 5**) (Felten *et al.*, 2021).



**Figura 5.** Anatomía humana de la columna vertebral y de la médula espinal. Imagen tomada del sitio del Instituto Nacional del Cáncer, perteneciente al National Institute of Health (NIH) Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/columna-espinal>.

En el pez cebra adulto, la columna vertebral está formada por hasta 33 vértebras que se dividen en diferentes tipos; weberian, precaudales, caudales y vértebras de la aleta caudal (**Figura 6**) (Stil & Drapeau, 2016). Dentro de ella, de manera análoga al humano se encuentra la médula espinal contando con similitud en las características anatómicas previamente descritas.



**Figura 6.** Anatomía de la columna vertebral y de la médula espinal del pez cebra. Imagen tomada y traducida de (Stil & Drapeau, 2016).

La médula espinal es la estación central de procesamiento y retransmisión, conduce la información del cerebro hacia los nervios periféricos del cuerpo e inversamente de las terminaciones nerviosas al cerebro (Strominger *et al.*, 2011). También se encarga de controlar los reflejos motores, estos se caracterizan por ser movimientos rápidos e inconscientes, su rapidez se debe a que su transmisión se efectúa mediante conexiones sinápticas locales (Rye *et al.*, 2016).

## 1.2. Lesión de médula espinal

La lesión de médula frecuentemente lleva a la pérdida del control de las funciones motoras, sensoriales y autonómicas por debajo del sitio de la lesión debido a una afectación completa o parcial de la ME (Padilla-Zambrano *et al.*, 2017). La causa

principal es por trauma, destacando en humanos los accidentes automovilísticos, caídas de altura, heridas por arma de fuego o explosiones, y por prácticas deportivas. A nivel mundial, los accidentes de tráfico son la principal causa de lesiones en la médula espinal (Pérez-Estudillo et al., 2018).

Dentro de los problemas generales que plantea lesión medular es la formación de la cicatriz glial, la cual consiste en respuestas celulares y moleculares que inhiben el crecimiento axonal (Cigliola et al., 2020). Además, un trauma en la médula espinal genera procesos que se clasifican como daño primario y daño secundario (Pérez-Estudillo et al., 2018). En el proceso primario se incluye el trauma mecánico inicial causado por la energía directa debido al desplazamiento de la columna vertebral, esto ocasiona una disrupción axonal, daño vascular y apoptosis celular (Padilla-Zambrano et al., 2017).

En el proceso secundario se observan cambios vasculares progresivos causados por el trauma inicial que conduce a la presencia de edema e isquemia, acompañado de la liberación de radicales libres, alteraciones iónicas, generando un proceso excitotóxico ocasionando la muerte celular de las neuronas en la ME (Padilla-Zambrano et al., 2017). A diferencia del sistema nervioso periférico, en el que sí hay regeneración axonal, en el SNC se han identificado mecanismos fisiopatológicos que no permiten la reconexión de las vías o fascículos espinales (Pérez-Estudillo et al., 2018).

Por lo anterior, se han realizado estudios de reparación funcional de la ME desde principios de los años ochenta (Pérez-Estudillo et al., 2018). En la siguiente sección se resumen los tratamientos y terapias utilizados en la actualidad para la rehabilitación de los pacientes afectados por lesiones en la médula espinal.

### **1.2.1. Tratamientos para lesión de médula espinal**

Los tratamientos disponibles actualmente para las LME, cuyo objetivo son a nivel espinal, en la periferia de la lesión y cerebral, incluyen opciones tanto farmacológicas como no farmacológicas (Guy et al., 2016) para estabilizar la columna y reducir el dolor. Las opciones farmacológicas comprenden el uso de anticonvulsivos, antidepresivos u opioides. Mientras que, las no farmacológicas engloban técnicas de estimulación, cirugía

y tratamiento psicológico (Guy et al., 2016). Para algunos pacientes con lesión espinal, la movilidad solo es posible con la ayuda de aparatos como caminadores, soporte rígido en las piernas o una silla de ruedas (Pérez-Estudillo et al., 2018).

El manejo intensivo del traumatismo de médula espinal está encaminado a limitar o reducir los efectos de las lesiones secundarias y lograr una recuperación neurológica efectiva (García-Gómez et al., 2013). El tratamiento quirúrgico está reservado para descomprimir y optimizar la perfusión y oxigenación de la médula espinal y detener los mecanismos de daño (Dorrian et al., 2023).

La fisioterapia es importante para mantener la integridad del sistema neuromuscular debajo del nivel de la lesión. Los programas de rehabilitación combinan terapias físicas para la recuperación de la fortaleza de las piernas y de los brazos para evitar la atrofia muscular (Pérez-Estudillo et al., 2018). La estimulación eléctrica en la zona epidural y en los nervios periféricos ha mostrado resultados prometedores, las mejoras funcionales que han traído la implementación de estos dispositivos van desde la locomoción con soporte de peso hasta el alivio del dolor (Dorrian et al., 2023).

No obstante, los mecanismos celulares y moleculares detrás de estas mejoras continúan siendo poco claros, entenderlos permitirá la optimización de los dispositivos y parámetros aumentando así su eficacia, y a su vez, la combinación de distintas terapias con efectos sinérgicos que mejoren aún más los resultados (Dorrian et al., 2023). Por ello, proponemos el uso de organismos modelo con alta capacidad de regeneración celular como el pez cebra.

### **1.3. Generalidades del pez cebra**

El pez cebra cuyo nombre científico es *Danio rerio*, es una especie de la familia Ciprinidae, clase Actinopterygii y subclase de los teleósteos, que incluye más de 26,000 especies existentes. Este largo número de especies es posible que se deba a una duplicación genómica en un ancestro común durante la evolución de los actinopterigios alrededor de hace 300 millones de años (Holtzman et al., 2016).

El pez cebra es un pez tropical de agua dulce con una longitud en etapa adulta de 3 a 4 cm que posee un cuerpo fusiforme y con ojos centrados, también se caracteriza por

tener de 5 a 7 rayas longitudinales azules desde el opérculo hasta su aleta caudal (Holtzman et al., 2016; Spence et al., 2008; Watanabe, 2017). Los machos pueden distinguirse de las hembras debido a sus aletas anales más largas y de coloración amarilla HOL. Su dieta en la naturaleza está constituida principalmente por insectos, larvas de insectos, nematodos y algunos crustáceos (Holtzman et al., 2016; Spence et al., 2008; Watanabe, 2017).

La distribución del pez cebrá en la naturaleza, incluye ríos, arroyos, canales secundarios, estanques y campos de arroz en países del continente asiático como Myanmar, Pakistán, India, Bangladesh y Nepal. Los peces cebrá prefieren aguas de bajo caudal con salientes vegetales con pocos depredadores, sin embargo, ocasionalmente pueden encontrarse en arroyos más profundos. Los arroyos de mayor tamaño son posibles vías para el movimiento de los peces entre poblaciones aisladas, aumentando así la diversidad genética (Arunachalam et al., 2013; Holtzman et al., 2016).

Los ambientes naturales para la reproducción del pez cebrá son estanques que se forman durante los monzones. Usualmente, estos estanques son tranquilos y poco profundos con piedras o arena que protege sus huevos de la depredación. Se ha encontrado ova madura durante la temporada seca, sin embargo, la reproducción se correlaciona de forma más consistente a la mayor disponibilidad de alimento durante la temporada de monzones (Spence et al., 2008).

Entre diferentes especies de peces, el pez cebrá tiene la base de datos más completa respecto a genómica, genética molecular y embriología. El pez cebrá es diploide y posee 26,206 genes que codifican a proteínas (Choi & Yu, 2015; Maldonado *et al.*, 2003). A diferencia de otras especies de vertebrados, el pez cebrá sufrió una ronda adicional de una duplicación de todo su genoma conocida como la duplicación del genoma teleósteo-específica (Howe et al., 2013).

A los genes duplicados resultado de este proceso se les denomina genes ortólogos. Estudios comparativos han determinado que 71.4% (14,623) de los genes humanos, de un total de 20,479 genes codificantes, cuentan con al menos un gen ortólogo bastante evidente en pez cebrá, dentro de estos, 47% de los genes humanos (9,528) tienen una relación uno a uno con un ortólogo de pez cebrá (Howe et al., 2013).

En general, la existencia de dos ortólogos presenta una ventaja, dado que, han acumulado mutaciones principalmente en regiones reguladoras y muestran un patrón de expresión similar al ortólogo humano puede presentarse con menor frecuencia un fenotipo letal en experimentos de pérdida de función, permitiendo así generar juicios más profundos sobre la función de los genes de interés. Por otra parte, es importante considerar que estos genes ortólogos suelen presentar redundancia funcional (Koster & Sassen, 2015).

#### **1.4. El pez cebra como modelo de investigación**

El pez cebra ha sido utilizado como modelo en distintas áreas de investigación desde 1960, pero no fue hasta que trabajos innovadores de científicos como George Streisinger, que a inicios de los años ochenta desarrolló técnicas para facilitar el análisis genético en pez cebra que sacaron a relucir su completo potencial como organismo modelo (Bradford et al., 2017).

La popularización del pez cebra como modelo para descubrir la función de los genes de los vertebrados, se debe a las distintas ventajas que ofrece *in vivo*. Entre ellas se encuentran la gran similitud fisiológica y genética con los humanos, su rápido desarrollo y fácil crianza, la alta conservación de sus genomas, la amplia disponibilidad de información genómica y la gran capacidad de generación de líneas transgénicas (Baldrige et al., 2021; Choi & Yu, 2015; Shankar et al., 2021; Watanabe, 2017).

La reciente generación de peces cebra adultos sin pigmentación como la línea *Casper* proporciona nuevas posibilidades para la visualización, por microscopía de fluorescencia para el marcaje de proteínas o estructuras celulares, permitiendo la ejecución de poderosas técnicas de captura de imágenes de lapso de tiempo para la observación de procesos biológicos y enfermedades (Goldsmith & Jobin, 2012).

Por otra parte, debido a que una hembra adulta puede desovar hasta 200 oocitos por semana y su crianza es rentable se pueden llevar a cabo fácilmente experimentos con poblaciones grandes (Koster & Sassen, 2015). Además, la fertilización y desarrollo de sus embriones es externo, esto aunado a la transparencia de los mismos permite

monitorear de manera detallada y no invasiva el desarrollo en distintas etapas, a nivel celular y subcelular (Koster & Sassen, 2015; Schmidt et al., 2013).

Los oocitos de pez cebra son grandes (0.7 mm) en comparación con otras especies de peces y se desarrollan rápidamente, con la presencia de precursores de los órganos más importantes dentro de las primeras 36 horas post-fertilización (hpf) (Spence et al., 2008). Entre las 48 y 72 hpf, el desarrollo de la mayoría de los órganos está casi completo, a excepción del tracto gastrointestinal que lo está a las 96 hpf. Después de las 76 hpf el hígado, páncreas y estómago están completamente desarrollados (Cassar et al., 2020). Durante los primeros 5 dpf los embriones no dependen de obtener alimento del medio para su desarrollo, absorben nutrientes de su reservorio energético en el vitelo.

Los embriones de pez cebra son accesibles para la edición genética utilizando técnicas como la inyección de RNA para la generación de líneas transgénicas, o , por otra parte, para la pérdida o disminución de la expresión de genes utilizando el sistema Crispr/Cas9 y morfolinós, respectivamente (Baldrige *et al.*, 2021; Maldonado *et al.*, 2003). También es posible realizar estudios de los efectos biológicos de químicos diluyendo estos compuestos en el agua en la que los embriones son criados, analizando los cambios fenotípicos o efectos tóxicos que se presenten (Koster & Sassen, 2015).

En resumen, por las características de este organismo, la variedad de métodos de edición génica, la posibilidad de documentar los efectos de éstos a través del tiempo y su relativa facilidad para realizarlos destacan las virtudes del pez cebra como modelo experimental.

#### **1.4.1. Regeneración de médula espinal en pez cebra**

Los peces cebra son usados como modelo en el estudio de órganos en distintas enfermedades humanas y en la regeneración, ejemplos de ello consisten en los realizados durante el desarrollo de su corazón contribuyendo significativamente a la comprensión de las enfermedades cardiovasculares, o, por otra parte, analizando el hígado del pez cebra en enfermedades como cáncer o el hígado graso alcohólico (Koster & Sassen, 2015). Los estudios más relevantes en regeneración comprenden; la



regeneración de aletas, corazón y componentes del sistema nervioso como el cerebro, la retina y la médula espinal (Hui et al., 2014). En lo que respecta a los estudios de la regeneración de médula espinal se genera un daño que los inmoviliza, no obstante, poseen la capacidad de eventualmente regenerar los axones descendientes y reestablecer las conexiones apropiadas, consiguiendo así su recuperación funcional (Tsata & Wehner, 2021).

La utilización del pez cebra para investigar la dinámica de reparación de la médula espinal ha guiado a la identificación de genes y clave y de los mecanismos regulatorios involucrados en el proceso de regeneración. Entre los genes y proteínas involucrados en esta dinámica se encuentran; *csrp1a*, molécula de adhesión L.I.I, sintenina-a, tenascina-C, *sox11b*, *fgf2*, *cntn2*, miostatina o *gdf8* (factor de crecimiento y diferenciación 8) y la proteína MVP (de las siglas en inglés major vault protein) (Ma et al., 2012; Tsata & Wehner, 2021; Yu & Schachner, 2013).

Dentro de los mecanismos regulatorios se sabe que algunos pueden favorecer la regeneración mientras que otros pueden actuar como factores inhibidores. Entre algunos de estos mecanismos podemos considerar la capacidad de las neuronas para re-expresar genes asociados al crecimiento y de esta manera regenerar sus axones (Ma et al., 2012). En 2011 Guo y colaboradores, mediante un análisis de microarreglos determinaron que existe una sobrerregulación de *sox11b* en las células ependimarias localizadas en el canal central de la médula espinal en precursores de neuronas recién diferenciados e interneuronas (Guo et al., 2011). Sus datos indican que *sox11b* promueve la determinación neuronal y la neurogénesis regenerativa y que, además, es esencial para la recuperación locomotora (Guo et al., 2011).

En 2012 Goldschmit y colaboradores, demostraron que las células similares a células gliales y células similares a neuronas ubicadas a lo largo del canal central de la médula espinal de pez cebra mostraron sobre regulación del ácido lisofosfatídico (LPA) inhibiendo de esta manera la respuesta regenerativa aguda (Goldshmit et al., 2012).

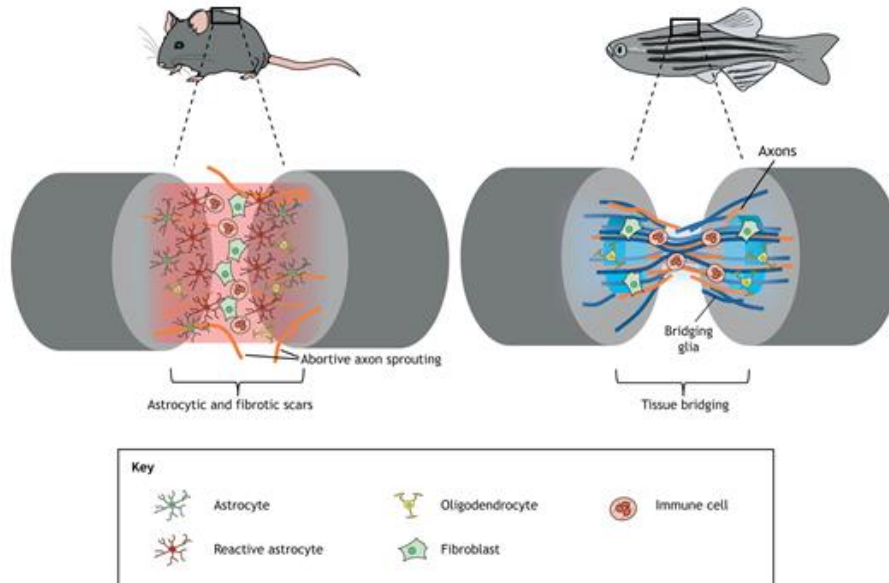
El éxito de la regeneración en el pez cebra adulto, depende de las propiedades intrínsecas y extrínsecas (un ambiente que permita la respuesta neuronal) de las neuronas, entre ellas se encuentran, la regeneración de las motoneuronas e

interneuronas alrededor del sitio de la lesión, así como, la formación de puentes gliales y axonales (Saraswathy et al., 2021; Yu & Schachner, 2013).

Al estudiar en 2009 el papel de las motoneuronas en la regeneración de médula espinal en pez cebra adulto Reimer y colaboradores, encontraron que la expresión de genes indicadores en las vías de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos, FGF por sus siglas en inglés, y de ácido retinoico se incrementa al lesionar la médula espinal (Reimer et al., 2009). En lo respectivo a la vía FGF el mRNA de *fgf3* y *sprouty4* (*spry4*) aumentó significativamente, mientras que, *fgf8a*, *fgf17b* y genes río abajo como *dusp6*, *pea3*, *spry1*, *spry2* mostraron poca o ninguna sobreexpresión (Reimer et al., 2009). Para la vía de ácido retinoico detectaron un incremento considerable en los niveles de mRNA en las subunidades de los receptores de ácido retinoico *rarb*, *rxrga*, *rxrgb* y en los genes *crabp2a* y *cyp26a*, mientras que, *raldh2* y *crabp2b* mostraron poco o ningún aumento en su expresión (Reimer et al., 2009).

En el caso de los puentes gliales que se forman en el sitio dañado, de acuerdo a Goldschmit y colaboradores, 2012, el gen *fgf8a* presenta un aumento considerable en su expresión a 3dpi (días post-lesión), de la misma forma que *fgf3*, *spry4*, *pea3* y *erm*. En el tiempo comprendido de las 2 a 3 semanas post-lesión *fgf8a* muestra una alta expresión en las células gliales, mientras que, *fgf3* muestra una disminución de la misma. Finalmente, FGFR2 es sobre regulado en células gliales en comparación con aquellas provenientes de médulas espinales sin lesión (Goldshmit et al., 2012).

Cigliola y colaboradores, 2020, describen de manera comparativa la dinámica celular desencadenada posterior a una lesión a la médula espinal en mamíferos (ratón) y en pez cebra (**Figura 7**). Después de un trauma en la médula espinal se construye una cicatriz en el sitio de la lesión constituida por fibroblastos, células inmunes inflamatorias y astrocitos hipertróficos, esto impide el crecimiento de los axones segmentados en los mamíferos. Por otra parte, en el pez cebra se induce la infiltración de las células inmunes seguido de la formación de puentes por las células gliales y tractos axonales, consiguiendo su regeneración (Cigliola et al., 2020).



**Figura 7.** Representación comparativa de los eventos posteriores a una lesión de la médula espinal (LME) en mamíferos y pez cebra. Imagen tomada de Cigliola *et al.*, 2020.

Debido a que los órganos y funciones de los genes se encuentran bien conservados entre los vertebrados el análisis del pez cebra provee información crucial sobre las funciones de los genes de otras especies, incluyendo al humano (Baldrige *et al.*, 2021). Gracias a estas razones, su estudio ha permitido validar genes candidatos de enfermedades humanas, identificar los mecanismos moleculares y fisiopatología de la enfermedad guiando así al descubrimiento de posibles nuevos fármacos o tratamientos (Baldrige *et al.*, 2021).

### 1.5. Proteínas Wnt

La familia Wnt de proteínas de señalización es una red compleja que involucra componentes evolutivos altamente conservados que permite el desencadenamiento de procesos involucrados en el crecimiento de los organismos, fungiendo diversos roles durante el desarrollo embrionario, entre los que se encuentran: la formación del mesodermo ventral y los movimientos convergentes de extensión en la gastrulación, la posteriorización de la placa neural, la inducción de las células de la cresta neural del ectodermo y la especificación a melanocitos de estas mismas (Abu-Elmagd *et al.*, 2006; Garcia-Morales *et al.*, 2009; Nikaido *et al.*, 2013). También son cruciales en eventos como la organogénesis, la constitución del patrón estructural de vertebrados, en el

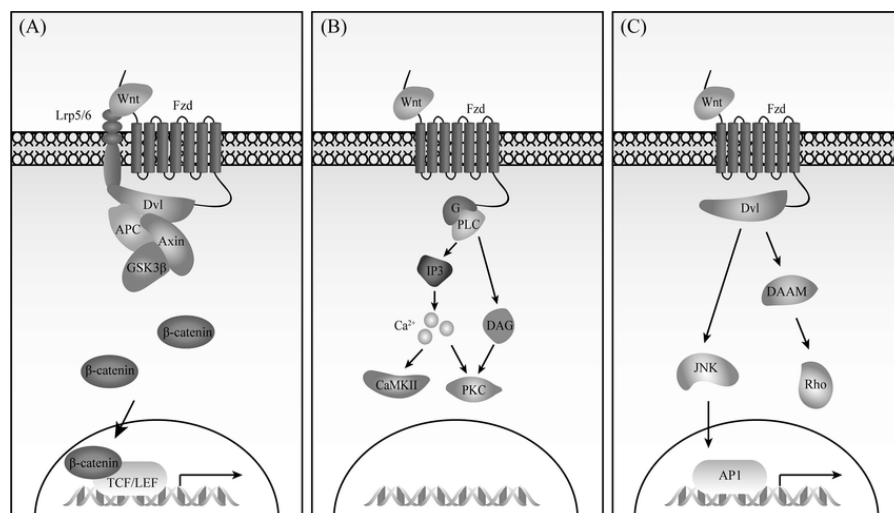
mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos, regeneración, plasticidad, reparación, entre otros (Dijksterhuis et al., 2014; Nikaido et al., 2013).

Se han descrito un total de 19 Wnt las cuales contienen un patrón conservado de 23 o 24 residuos de cisteína. Después de su expresión estas proteínas son susceptibles a modificaciones postraduccionales como glicosilaciones y palmitolaciones, que les confieren características hidrofóbicas, esenciales para las funciones desempeñadas por esta cascada de señalización (Larasati et al., 2022; Ramos et al., 2015).

### 1.6. Vías de señalización Wnt

Existen distintas vías de señalización Wnt las cuales se encuentran clasificadas como canónicas (dependientes de  $\beta$ -catenina) o no canónicas (aquellas independientes de  $\beta$ -catenina). Las vías no canónicas incluyen la vía de señalización mediada por Wnt/Ca<sup>2+</sup> la cual orchestra el destino celular dorsoventral, así como, la vía de polaridad celular planar o PCP (del inglés tissue/planar cell polarity), implicada en los reposicionamientos citoesqueléticos y la polimerización de actina (Agostino & Pohl, 2019; De, 2011).

Se conoce que Wnt1, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b y Wnt9b participan en la señalización canónica, mientras que, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7a, Wnt8b, Wnt10b y Wnt11 en la no canónica (De, 2011; Larasati et al., 2022). En la siguiente figura se muestran los esquemas simplificados de estas tres cascadas de señalización (**Figura 8**):



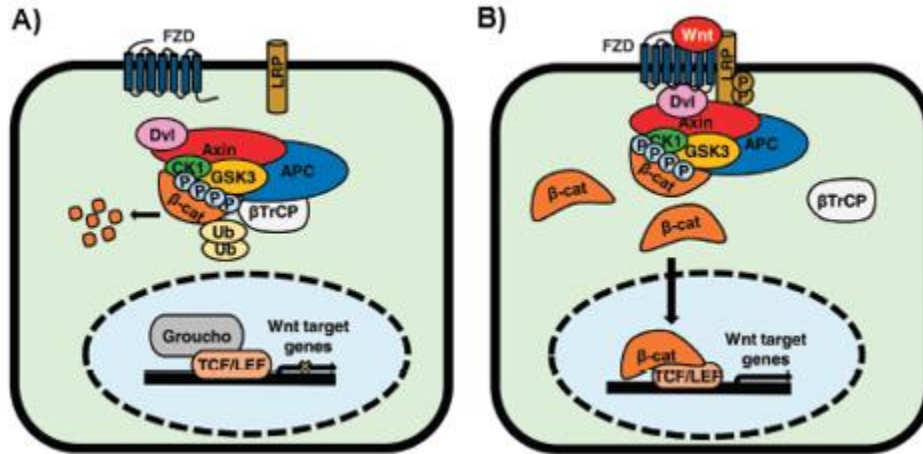
**Figura 8.** Vías de señalización Wnt (A) Vía de señalización Wnt/  $\beta$ -catenina (vía canónica). (B) Vía de señalización Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ . (C) Vía de señalización de Polaridad celular planar o PCP. Imagen tomada de Sun *et al.*, 2021.

### 1.6.1. Vía de señalización canónica

La vía de señalización canónica de Wnt es la más estudiada, ésta se encarga de regular la cantidad del coactivador  $\beta$ -catenina controlando así programas clave de expresión de genes del desarrollo. En la ausencia de Wnt, la  $\beta$ -catenina en el citoplasma es constantemente degradada por la acción del complejo de Axina, compuesto por la proteína de andamiaje Axina, el producto de gen supresor de tumores de la poliposis coli adenomatosa (APC), caseína quinasa 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ), y la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) (MacDonald *et al.*, 2009).

La región amino terminal de  $\beta$ -catenina es fosforilada secuencialmente por CK1 $\alpha$  y GSK3, resultando en su reconocimiento por  $\beta$ -Trcp y la subunidad E3 de la ubiquitina ligasa, así como, la subsecuente ubiquitinización y degradación proteosomal de  $\beta$ -catenina. La continua eliminación de  $\beta$ -catenina evita que esta se transloque al núcleo e interactúe con TCF/LEF (el factor de células T/ factor estimulador linfoide) y Groucho que son proteínas de unión a DNA, formando un complejo y mediando así la represión de los genes diana de Wnt (MacDonald *et al.*, 2009; Nusse & Clevers, 2017).

La vía Wnt/ $\beta$ -catenina es activada cuando un ligando Wnt se une al receptor de membrana Frizzled y a su correceptor LRP 5 o LRP 6 guiando a la dimerización y cambio conformacional de estos dos receptores (Nusse & Clevers, 2017). La formación de un complejo Wnt-Fzd-LRP con el reclutamiento de la proteína intracelular de andamiaje Dishevelled (Dvl) resulta en la fosforilación de LRP5/6, activación y reclutamiento del complejo de Axina hacia los receptores. Estos eventos guían a la inhibición de la fosforilación de  $\beta$ -catenina mediada por Axina y de esta manera a la estabilización de  $\beta$ -catenina, que se acumula y viaja al núcleo para formar complejos con TCF/LEF, activando así la expresión de los genes diana de la cascada de señalización (**Figura 9**) (MacDonald *et al.*, 2009).



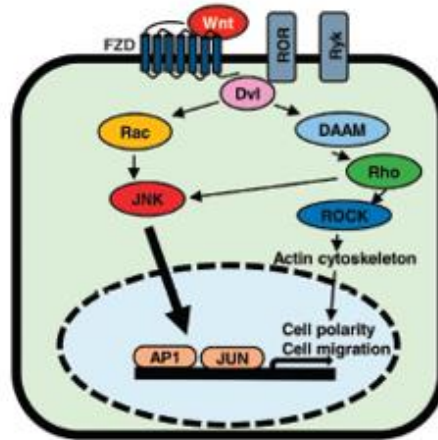
**Figura 9.** Vía de señalización Wnt/β-catenina. **A)** Vía en estado inactivo. **B)** Vía en estado activo. Imagen tomada de Pohl *et al.*, 2017.

### 1.6.2. Vías de señalización no canónicas

Las vías no canónicas o independientes de β-catenina comprende a un creciente número de complejas rutas de señalización: la vía de polaridad celular planar (PCP), Wnt/Ca<sup>2+</sup>, WNT/cAMP, WNT/ROR, WNT/RAP, WNT/RAC y WNT/RHO. Algunos autores consideran que estas rutas son tan diversas que clasificarlas como no canónicas o independientes de β-catenina es una sobresimplificación (Dijksterhuis *et al.*, 2014).

#### 1.6.2.1. Vía de polaridad celular planar (PCP)

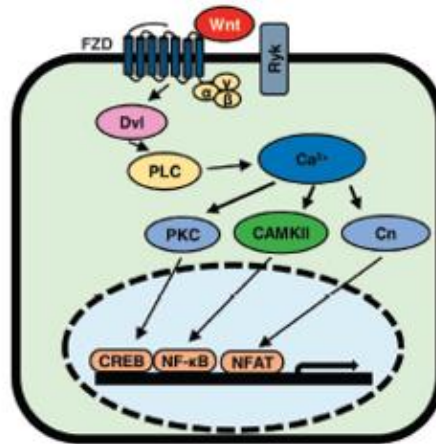
La vía de polaridad celular planar regula la organización y polaridad celular, a través de la organización del citoesqueleto. Los ligandos de Wnt se unen a los receptores Frizzled y correceptores incluyendo ROR, RyK y PTK. Dishevelled interactúa con Rac1 y el activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 1 (DAAM1). Rac1 activa la quinasa c-jun N-terminal (JNK), guiando a la polimerización de actina, mientras DAAM1 activa a Rho, el cual, a su vez activa a la quinasa asociada a Rho (ROCK) para coordinar los arreglos citoesqueléticos de las células (**Figura 10**) (Pohl *et al.*, 2017).



**Figura 10.** Vía de señalización Wnt de polaridad celular planar en estado activo (No se muestra el correceptor PTK). Imagen tomada de Pohl *et al.*, 2017.

### 1.6.2.2. Vía Wnt/Ca<sup>2+</sup>

La vía Wnt/Ca<sup>2+</sup> se desencadena a través de la unión de Wnt a Frizzled, que interactúa con las proteínas G y Dishevelled. Estas interacciones pueden activar la fosfodiesterasa GMPc específica o fosfolipasa C (PLC por sus siglas en inglés), ocasionando la liberación de calcio intracelular. Esto resulta en la activación downstream de las proteínas de señalización PKC (proteína quinasa C), CaMKII (proteína quinasa II dependiente de calmodulina) y calcineurina (Cn). CaMKII activa al factor nuclear kappa B (NF-κB), que puede regular la adhesión celular y la migración. PKC también puede activar a NF-κB y además al factor de transcripción CREB. Calcineurina por su parte puede de fosforilar al factor nuclear asociado a células T o NFAT por sus siglas en inglés, activándolo y controlando así la expresión de distintos genes neuronales, de las células cardíacas y del músculo esquelético o también de genes proinflamatorios en linfocitos (**Figura 11**) (De 2011; Pohl *et al.* 2017).



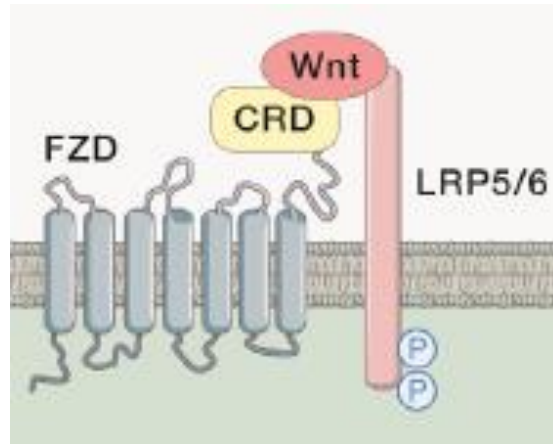
**Figura 11.** Diagrama de la vía de señalización Wnt/Ca<sup>2+</sup> en estado activo. Imagen tomada de Pohl *et al.*, 2017.

Además, Wnt5a induce la activación de la señalización Wnt/Ca<sup>2+</sup> dependiente de CaMKII, CaMKII fosforila la quinasa del factor de crecimiento transformante  $\beta$ -activado (TGF- $\beta$ ), que activa a la quinasa similar a Nemo (NLK). Esta cascada antagoniza a la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina mediante la fosforilación de TCF4 por la NLK y previene que el complejo  $\beta$ -catenina-TCF4 se una al DNA (Pohl *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha demostrado que Wnt5a actúa como transductor de la cascada de señalización mediada por calcio en presencia de los receptores Fzd2, Fzd3, Fzd4, Fzd5 y Fzd6 (De, 2011; Dijksterhuis *et al.*, 2014).

### 1.7. Receptores Frizzled

La cascada de señalización Wnt es transducida principalmente por receptores de la familia Frizzled (Fzd) y sus correceptores, conocidos como proteínas relacionadas a receptores de lipoproteínas de baja densidad (LRP por sus siglas en inglés) 5 y 6. Las proteínas Fzd poseen siete dominios transmembrana siendo bastante similares a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) clásicos, además de, un dominio N-terminal rico en cisteína (CRD) en la parte extracelular cuya función es reconocer a Wnt (**Figura 12**) y un C-terminal con un motif KTxxxW requerido para la transducción de la señal a la proteína citoplasmática Dishevelled (DVL) (Nikaido *et al.*, 2013; Schenkelaars *et al.*, 2015).





**Figura 12.** Esquema general de una proteína Frizzled y sus correceptores LRP-5 o LRP-6. Imagen tomada de Nusse & Clevers, 2017.

Los Frizzled constituyen una gran familia en vertebrados, son expresados en distintos tejidos y órganos a lo largo de todo el cuerpo especialmente en los sistemas nervioso, cardiovascular y gastrointestinal, algunos de ellos también se expresan durante la embriogénesis temprana y están involucrados en la inducción del mesodermo dorsal y en la gastrulación. Se han identificado 10 genes *fzd*, la mayoría de ellos con capacidad variable de activar la señalización por  $\beta$ -catenina, además de que, la redundancia funcional entre los miembros de la familia *fzd* es altamente prevalente (El-Messaoudi & Renucci, 2001; Schulte, 2015).

En la **Tabla 1.**, se describen de manera general algunas de las particularidades y los posibles ligandos Wnt con los que interactúan estos receptores.

**Tabla 1.** Particularidades de los receptores frizzled y ligandos Wnt con los que interactúan.

Receptor	Función descrita	Ligandos Wnt	Referencias
<b>Fzd1</b>	Ha sido asociado con poseer efecto neuroprotector en combinación con Wnt3a contra la neurotoxicidad inducida por el péptido $\beta$ -amiloide, en células PC12 y en neuronas del hipocampo de rata.	Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt5a, Wnt7b.	(Chacón <i>et al.</i> , 2008), (Gazit <i>et al.</i> , 1999), (Koval <i>et al.</i> , 2011) y (Z. Wang <i>et al.</i> , 2005).

<b>Fzd2</b>	Tiene la capacidad de impulsar cascadas de señalización, tanto dependientes, como independientes de $\beta$ -catenina. Hay evidencia de que la inactivación de este gen en el ratón puede afectar el cierre del tubo neural.	Wnt2, Wnt3, Wnt3a y Wnt5a, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b y Wnt8b.	(Alrefaei <i>et al.</i> , 2019) y (Dijksterhuis <i>et al.</i> , 2014).
<b>Fzd3</b>	La pérdida de Fzd3 en la médula espinal guía a defectos en la transmisión de la información sensorial entre el cerebro y las extremidades del ratón. También, es de particular interés en la leucemia linfocítica crónica de células B (LLC) dados sus niveles significativamente superiores.	Wnt2, Wnt3a y Wnt5a.	(Kaucká <i>et al.</i> , 2013), (Larasati <i>et al.</i> , 2022) y (H. X. Wang <i>et al.</i> , 2009).
<b>Fzd4</b>	Es esencial en la vascularización de la retina, mutaciones en Fzd4 se han ligado con enfermedades como la vitreorretinopatía exudativa familiar (VREF) en embriones de <i>Xenopus laevis</i> .	Wnt2, Wnt2b, Wnt3a, Wnt5a y Wnt7b.	(Dijksterhuis <i>et al.</i> , 2014), (Larasati <i>et al.</i> , 2022) y (Y. Wang <i>et al.</i> , 2006)
<b>Fzd5</b>	Se expresa en las células de Paneth en las criptas intestinales del ratón, las cuales secretan péptidos y proteínas inmunomoduladoras para regular la flora intestinal. Además, se ha acumulado evidencia de conexión con su ligando Wnt5a en modelos de	Wnt2, Wnt3a, Wnt5a, Wnt7a, Wnt9b y Wnt10b.	(Dijksterhuis <i>et al.</i> , 2014), (Larasati <i>et al.</i> , 2022) y (van Es <i>et al.</i> , 2005).

	enfermedades como el Alzheimer (ratón) y la artritis reumatoide (fribroblastos sinoviales).		
<b>Fzd6</b>	Se le ha atribuido tener un rol importante en la vía PCP de Wnt participando en la orientación de los folículos capilares, de las células sensoriales auditivas y en el cierre del tubo neural, en el ratón.	Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b y Wnt7a.	(Heinonen <i>et al.</i> , 2011), (Koval <i>et al.</i> , 2011) y (Y. Wang <i>et al.</i> , 2006).
<b>Fzd7</b>	Se encarga de modular la reparación del tejido en el intestino y estómago de ratón ante lesiones, manteniendo las poblaciones celulares de sus epitelios. Exhibe una alta expresión en distintos tipos de cáncer y se correlaciona con diagnósticos menos favorables en la LLC, estudiado en células B de pacientes no tratados. La supresión de <i>fzd7a</i> y <i>fzd7b</i> en embriones de pez cebra afecta los movimientos de convergencia y extensión durante la gastrulación, su inhibición con morfolinós resulta en defectos pronunciados en el ectodermo y mesodermo.	Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8b, Wnt9b, Wnt10b y Wnt11.	(Alrefaei, 2021), (Flanagan <i>et al.</i> , 2017), (Flanagan <i>et al.</i> , 2015), (Kaucká <i>et al.</i> , 2013), (Larasati <i>et al.</i> , 2022) y (Nikaido <i>et al.</i> , 2013).
<b>Fzd8</b>	Existe evidencia de que su sobreexpresión podría estar correlacionada con la progresión y metástasis en el cáncer gástrico	Wnt3a y Wnt9b.	(Chen <i>et al.</i> , 2020), (Dijksterhuis

	(muestras de tejido de carcinoma gástrico) y en el de próstata (líneas celulares RWPE-1, DU145, LNCaP, 22Rv1, PC-3 y VCaP).		<i>et al.</i> , 2014) y (Li <i>et al.</i> , 2017).
<b>Fzd9</b>	Se ha demostrado que tiene un rol clave en la tumorigénesis inducida por myc en los islotes pancreáticos de ratón.	Wnt2.	(H. X. Wang <i>et al.</i> , 2010) y (Zacarías-Fluck <i>et al.</i> , 2021).
<b>Fzd10</b>	Muestra una fuerte expresión en el sistema nervioso central del ratón durante su desarrollo embrionario. También, es requerido para la proliferación celular y en la especificación de neuronas del tubo neural en embriones de pollo.	Wnt1, Wnt3a y Wnt7b.	(Alrefaei <i>et al.</i> , 2019), (Koval <i>et al.</i> , 2011), (Z. Wang <i>et al.</i> , 2005) y (Yan <i>et al.</i> , 2009).

Actualmente se encuentran registradas 14 secuencias de genes *fzd* de pez cebra en la base de datos Ensembl ([http://www.ensembl.org/Danio\\_rerio/Info/Index](http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index)) enlistadas como sigue; *fzd1*, *fzd2*, *fzd3a*, *fzd3b*, *fzd4*, *fzd5*, *fzd6*, *fzd7a*, *fzd7b*, *fzd8a*, *fzd8b*, *fzd9a*, *fzd9b*, and *fzd10*.

### 1.7.1. Frizzled 7

El gen *fzd7* está altamente conservado evolutivamente, se han identificado ortólogos en vertebrados como; peces, rana, pollo, ratón, perro, vaca y chimpancé, y en invertebrados como nematodos e insectos (Vincan *et al.*, 2007). *Fzd7* es capaz de modular la transmisión de las vías canónicas y no canónicas de Wnt, en el caso de la señalización canónica, se exhibe en distintos tejidos durante el desarrollo, manteniendo la homeostasis y participando en las enfermedades de varios organismos incluidos los humanos. Esto sucede gracias a su asociación con ligandos como Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8b y Wnt9b (Larasati *et al.*, 2022;g Phesse *et al.*, 2016).

Ha sido demostrado que el gen *fzd7* también puede activar vías independientes de  $\beta$ -catenina como la vía PCP interactuando con Wnt5a, Wnt5b, Wnt7a, Wnt8b, Wnt10b y Wnt11 o la vía Wnt/Ca<sup>2+</sup> asociándose con Wnt5a. A su vez, es requerido para el movimiento celular y la polaridad en el desarrollo de los vertebrados, sugiriendo la posibilidad que otros genes *fzd* estén involucrados en la progresión de las células de la cresta neural y puedan proveerles especificidad (Larasati et al., 2022; Nikaido et al., 2013).

El gen *fzd7* presenta expresión en el intestino y estómago de ratón encargándose de la homeostasis gastrointestinal, regulando la regeneración del tejido en el intestino ante lesiones del mismo, mientras que, en el estómago se ocupa de mantener las poblaciones celulares del epitelio gástrico (Flanagan et al., 2017; Flanagan et al., 2015). Además, se expresa en las neuronas neo-corticales del cerebro humano regulando la identidad neuronal como receptor de Wnt3 y controlando la expresión de los factores de transcripción de Foxp (Park et al., 2021).

En la rana *Xenopus laevis* *fzd7* ha sido identificado como un receptor clave para la inducción de las células de la cresta neural y la migración a través de las vías de señalización mediadas por BMP (siglas en inglés de Bone Morphogenetic Protein) y Wnt (Abu-Elmagd et al., 2006). En el ratón y pollo se expresan *Mfzd7* y *Chfzd7* durante el desarrollo temprano de la retina, variando en ubicación y tipo celular de acuerdo a la etapa de desarrollo. También existen estudios que sugieren que *Chfzd7* se encuentra activo en la regulación de la expresión de N-Cadherina durante el proceso de condrogénesis mesenquimal en las extremidades (Cevik-Tufan et al., 2002; Van Raay & Vetter, 2004).

### **1.8. Frizzled 7 en pez cebra**

Existen dos genes homólogos de *fzd7* en pez cebra resultado de la duplicación de su genoma *fzd7a* y *fzd7b*, a continuación, se describen ambos genes y los patrones de expresión que presentan.

### 1.8.1. Fzd7a

El gen *fzd7a* se localiza en el cromosoma 9, se ha identificado su expresión en el neuroectodermo posterior al 80% de epibolia, en la placa neural durante la gastrulación tardía se expresa en el mesodermo presomítico en formación. Durante la somitogénesis diferentes regiones de expresión se encuentran bien definidas a lo largo del sistema nervioso central (SNC). También es expresado en el cerebro anterior, específicamente en el diencéfalo, y el mesencéfalo, mientras que en el cerebro posterior se detecta en la unión del mesencéfalo-rombencéfalo (El-Messaoudi & Renucci, 2001; Busch-Nentwich *et al.*, 2013).

Alrededor del estadio 12-somitas, *fzd7a* se expresa en la parte anterior del tubo neural. A partir del estadio 5-somitas se expresa a través de dos rayas bilaterales del mesodermo lateral, desde la unión del mesencéfalo-rombencéfalo hasta el extremo del conducto pronéfrico. Después de la etapa 20-somitas su expresión en las somitas decae progresivamente. Mientras que, a las 24 horas de desarrollo es expresado en la parte dorsal de toda la médula espinal y en el tegmento del rombencéfalo y mesencéfalo (El-Messaoudi & Renucci, 2001). En la **Figura 13** se presenta un esquema general de la expresión de *fzd7a* de acuerdo a información presente en la base de datos ZFIN (de las siglas en inglés Zebrafish Information Network).



**Figura 13.** Esquema general de la expresión del gen *fzd7a* en pez cebra. Imagen tomada y traducida de la base de datos ZFIN.

### 1.8.2. Fzd7b

Por otra parte, *fzd7b* se localiza en el cromosoma 6, este presenta expresión materna y en la gástrula temprana. Exhibe expresión uniforme al 30% de epibolia, al igual que, en el margen del blastodermo y en el escudo durante la etapa que lleva el mismo nombre.

Alrededor del 85% de epibolia varios marcos de expresión se han delimitado, el mesodermo precordial, una amplia región cerca del límite de los presuntos mesencéfalo y el rombencéfalo, así como, en el mesodermo presomítico (Ungar & Calvey, 2002; Busch-Nentwich *et al.*, 2013).

En la somitogénesis temprana, su expresión se presenta en el mesodermo y es ligera en las somitas recién formadas con un patrón segmental. El SNC muestra expresión intensa en el diencéfalo y en el mesencéfalo rostral, a las 26 hpf la expresión en el diencéfalo ventral es más prominente. La expresión a través de la mayoría del SNC se da en la posición ventral y media. A las 48 horas de desarrollo se presenta una débil expresión en los arcos faríngeos y el brote de la aleta (Ungar & Calvey, 2002). En la **Figura 14** se presenta un esquema general de la expresión de *fzd7b* de acuerdo a información de la base de datos ZFIN.



**Figura 14.** Esquema general de la expresión del gen *fzd7b* en pez cebra. Imagen tomada y traducida de la base de datos ZFIN.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los tratamientos disponibles para lesiones de la médula espinal en el humano no son efectivos para revertir esta condición, dado que, el uso de fármacos y cirugías se limitan a reducir los síntomas, estabilizar la columna y prevenir la agudización de las lesiones en la mayoría de los casos, consecuencia de la incapacidad de reconexión axonal que permita la recuperación de la función locomotora. Caso contrario el pez cebra, de forma innata regenera sus axones durante la etapa embrionaria, juvenil e incluso en la adultez. El pez cebra es un excelente modelo para el estudio de los factores implicados en la regeneración axonal y con alto potencial para descubrir posibles dianas terapéuticas.

El receptor *fzd7* presenta expresión en diversos tejidos, incluido el sistema nervioso central, por lo que podría estar relacionado con la inducción de neuronas y la reconexión de los axones. Datos no publicados de García-Morales y colaboradores mencionan que la inyección de mRNA de *fzd7* en embriones de *Xenopus laevis* sobre expresan neuronas específicas de la médula espinal, lo que podría evidenciar la participación de *fzd7* en la inducción de este tipo de neuronas y, posiblemente, su expresión durante la regeneración en el pez cebra. Sin embargo, su expresión durante la regeneración de la médula espinal en este organismo aún no ha sido estudiada.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Evaluar la expresión del gen *fzd7* durante el desarrollo embrionario y en la regeneración de la médula espinal de alevines de pez cebra.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Diseñar oligonucleótidos para amplificar los genes de *fzd7* y  $\beta$ -actina.
- Optimizar las condiciones de PCR para amplificar los genes de *fzd7* y  $\beta$ -actina.
- Analizar la expresión del gen *fzd7* en distintos estadios embrionarios de pez cebra mediante RT-PCR punto final.
- Analizar la expresión del gen *fzd7* durante la regeneración de la médula espinal de embriones y alevines de pez cebra mediante RT-PCR.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. *Bioética*

Los adultos, embriones y alevines fueron mantenidos en cautiverio según normas internacionales (ASPA, 1986, Reino Unido). Los métodos de anestesia y eutanasia se encuentran avalados por el ASPA y la Guía de Manejo de animales de laboratorio (NIH, 2009. USA).

### 4.2. *Mantenimiento de organismos*

El Laboratorio de Biología Molecular y del Desarrollo (LaBiMoDe) cuenta con una colonia propia de pez cebra. Los organismos se mantuvieron bajo condiciones estándar (Westerfield, 2007) separados por sexos en acuarios de 40 L a una temperatura de 28 °C, fotoperiodo luz:oscuridad de 14:10 y se alimentaron diariamente con alimento peletizado y vivo.

### 4.3. *Diseño de oligonucleótidos*

Los oligonucleótidos para *fzd7a* se diseñaron a partir de la secuencia de RNA específica de *Danio rerio* con índice de acceso AJ301617.1 presente en el banco de datos del NCBI, en conjunto con herramientas bioinformáticas como Primer 3 y BLAST para el diseño, análisis y validación de los oligonucleótidos. La determinación del tamaño de amplicón del producto de *fzd7a* se realizó mediante la herramienta primer-BLAST del NCBI. Todos los oligonucleótidos se sintetizaron por Merck.

Para el gen *fzd7b* se utilizaron las secuencias reportadas por Ungar y Calvey, 2002, 5'-CCGCATTTTGGGTCATTTTCTCATAG-3' para el oligonucleótido sentido y 5'-AATACATCGCACATCTTTTGACAG-3' para el anti-sentido. Se utilizó a  $\beta$ -actina como control utilizando las secuencias 5'-CTTGCGGTATCCACGAGAC-3' para el oligonucleótido sentido y 5'-GCGCCATACAGAGCAGAA-3' para el anti-sentido, reportadas por Zou *et al.*, 2009.

#### **4.4. Obtención de embriones**

Los embriones se obtuvieron mediante cruce artificial en acuarios de 10L bajo condiciones estándar. Los estadios se determinaron mediante microscopía óptica y de acuerdo al desarrollo del pez cebrá a 28 °C (**Anexo I.**) (Kimmel *et al.*, 1995).

#### **4.5. Obtención de oocitos**

Los oocitos se colectaron de acuerdo a Westerfield, 2007 al comienzo del ciclo de luz por la mañana, se anestesió a una hembra en una solución de triclaína al 0.2% durante 2 min o hasta no observar movimientos operculares, se enjuagó en agua de tanque y se absorbió el exceso, posteriormente se colocó en una esponja acondicionada a la hembra y se presionó suavemente de manera firme en los costados del abdomen hasta la expulsión de los oocitos. Se reunieron los oocitos con una espátula estéril, se colectaron en un microtubo y se colocó a la hembra en un tanque separado para su recuperación.

#### **4.6. Recolección de embriones y extracción de RNA**

Los embriones se colectaron en los siguientes estadios 30% epibolia, escudo, 80% epibolia, 25 somitas, 24 horas y 48 horas, posteriormente, se maceraron en 1 mL de TRI Reagent® para extraer el RNA de acuerdo con lo descrito por *Toni y cols.* Se añadieron 100 µL de cloroformo, se homogeneizó pipeteando por 15 seg, se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 3 min y se centrifugó a 12.000 xg durante 15 min a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo con 100 µL adicionales de cloroformo, la extracción con cloroformo se repitió una ocasión más. Se transfirió el sobrenadante a un tubo con 250 µL de isopropanol, se mezcló a mano por inversión 20 veces, se incubó a TA durante 10 min y se centrifugó a 12.000 xg durante 10 min a 4 °C (Toni *et al.*, 2018).

Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se añadió 1 mL de etanol al 75% al pellet y se centrifugó a 7,500 xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, repitiendo el lavado con 1 mL de etanol 75% 2 veces más. Después del último lavado se realizó una centrifugación rápida para remover el sobrenadante residual. Se mantuvieron los tubos abiertos a TA durante 5 min y se calentaron a 65 °C durante 2 min para evaporar cualquier etanol residual (Toni *et al.*, 2018). Por último, se resuspendió el pellet en 30

$\mu$ L de agua libre de nucleasas, se midió su concentración en un espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 y se almacenó a -80 °C.

#### **4.7. Lesión en médula espinal en embriones**

La lesión en médula espinal en los embriones se realizó de acuerdo a Wehner *et al.*, 2017. La anestesia se efectuó en una solución al 0.02% de tricaina por 2 min o hasta observar disminución total en su movimiento. Después se colocó a los embriones de 24 hpf sobre un portaobjetos en posición lateral, retirando el exceso de agua y se realizó la lesión con una aguja 30G en la médula espinal a nivel del poro anal, posteriormente fueron colocados en agua de tanque estéril para su recuperación. Además, se lesionaron 10 embriones solo con una punción en músculo en la misma región como control. Los experimentos se realizaron por duplicado, con 70 individuos por grupo.

#### **4.8. Recolección de embriones lesionados y extracción de RNA**

Los embriones se lesionaron a las 24 horas post-fertilización (hpf) y se colectaron 10 especímenes de cada tiempo pasadas 0, 1, 2, 4, 24 y 48 horas post-lesión (hpl), después de ello, se maceraron en TRI Reagent® para la extracción de RNA como se ha descrito en la sección 4.4. Como control se utilizaron embriones de 24 horas no lesionados y lesionados en músculo a la altura de la médula espinal colectados a las 0 hpl. Los experimentos se realizaron por duplicado.

#### **4.9. Síntesis de cDNA**

La RT-PCR se realizó de manera estandarizada con 1  $\mu$ g de RNA, la retro transcriptasa M-MLV (Roche) 200 u/ $\mu$ L combinada con Oligo (dT)<sub>15</sub> (Promega) 500 nM, RNAsin (Promega) 40 u/ $\mu$ L, buffer M-MLV 10x, dNTPmix (Promega) 10 mM y agua libre de nucleasas, conformando una reacción de 25  $\mu$ L. Empleando el siguiente ciclado en el termociclador Eppendorf 5332 Mastercycler® Personal; 5 min a 70 °C, 70 min a 42 °C, y 10 min a 4 °C. Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### **4.10. PCR**

Primero se optimizaron las condiciones de PCR para cada uno de los oligonucleótidos, se utilizó una rampa de temperatura para determinar la temperatura de alineamiento

(T<sub>m</sub>) óptima. Con las condiciones optimizadas para los oligonucleótidos de *fzd7a*, *fzd7b* y del control β-actina se prepararon reacciones de PCR utilizando la enzima DNA polimerasa GoTaq® G2 (Promega) 5 u/μL, en conjunto con dNTPmix (Promega) 10 mM, "Green buffer 5x" (Promega) y agua libre de nucleasas. Utilizando una cabina de PCR UVC/T-AR de Biosan para preparar las reacciones con el ensamble de reacción de la **Tabla 2**. Realizando la amplificación en un termociclador Select cycler™ (Select Bioproducts) utilizando el siguiente ciclado 5 min de desnaturalización inicial a 95 °C, 35 ciclos desnaturalización; 45 seg a 95 °C, alineamiento; 45 seg a la T<sub>m</sub> óptima para cada primer, extensión; 1 min a 72 °C) y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR se almacenaron a -20 °C, los amplicones se observaron en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE de pH 8.0, con SYBR Green en un sistema blueGel™.

**Tabla 2.** Ensamble de reacción de PCR para una reacción de 25 μL con DNA polimerasa GoTaq.

Reactivos	Agua libre de nucleasas	Green buffer 5X	dNTPmix 10 mM	Oligo sentido 10 μM	Oligo anti-sentido 10 μM	GoTaq® G2 5 u/ μL	cDNA
[Final]	N/A	1x	0.2 mM	0.5 μM	0.5 μM	1.25 u/ μL	1 μg
Rx	15.875 μL	5 μL	0.5 μL	1.25 μL	1.25 μL	0.125 μL	1 μL

#### 4.11. *Evaluación de la reconexión axonal*

Los embriones y alevines se evaluaron visualmente utilizando un microscopio óptico (Leica). Se analizó un grupo de 5 individuos integrados por 1 no lesionado, 2 lesionados en músculo y 2 lesionados en médula. Los individuos de estudio fueron catalogados como recuperados cuando se observó continuidad en la médula en el sitio de la lesión (al menos un fascículo).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Alineamiento de secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de los genes *fzd7a* y *fzd7b*

El pez cebra presenta dos genes homólogos de *fzd7*; *fzd7a* y *fzd7b*; podría intuirse que este par de genes no presenten diferencias significativas en sus secuencias aminoacídicas o nucleotídicas, sin embargo, no se encontró esta información puntual en la literatura. En lo que respecta a las secuencias peptídicas Quesada-Hernández y colaboradores, 2010 realizaron el alineamiento de *fzd7a* y *fzd7b* mutantes en ratón, a pesar de ello, no indican el porcentaje de similitud entre las mismas. Razón que motivó a realizar este análisis específicamente para los homólogos de pez cebra utilizando la herramienta T-Coffee.

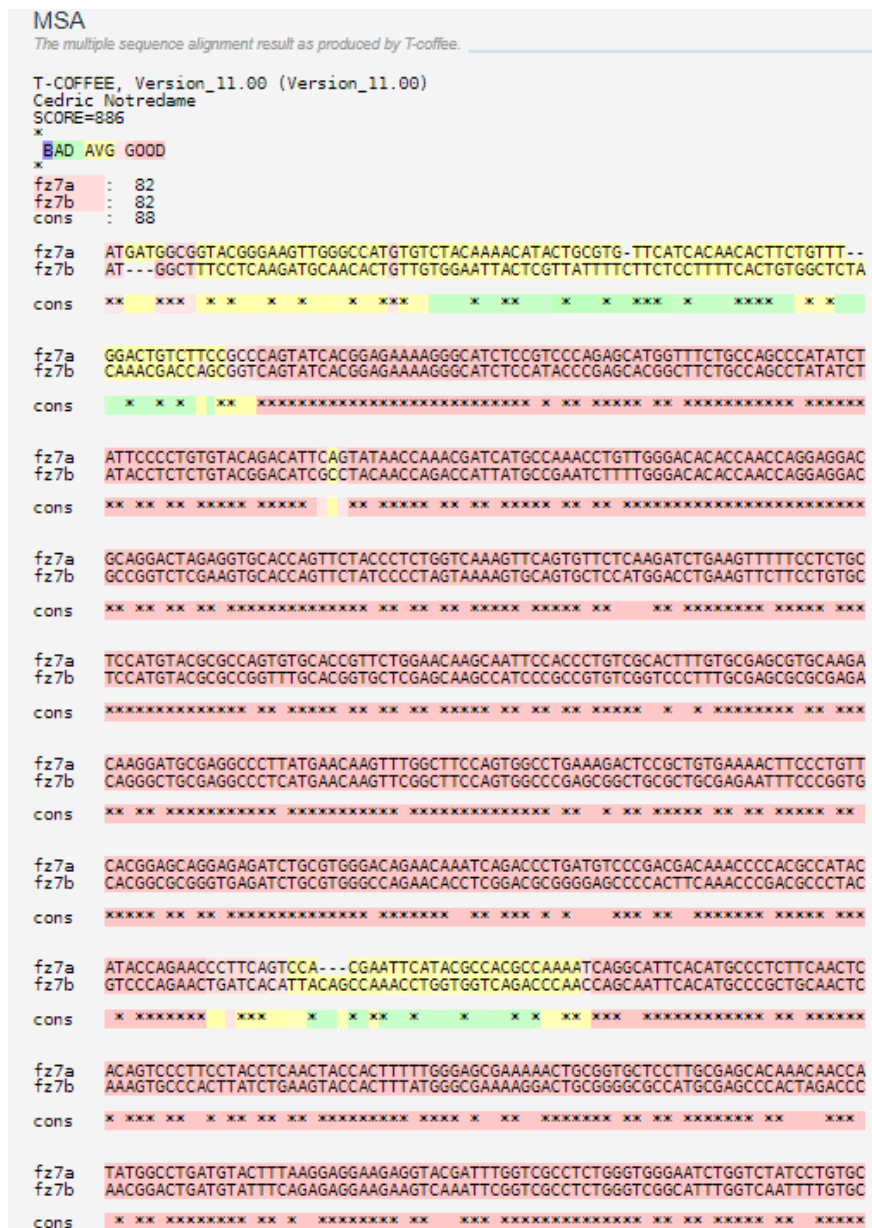
El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de *fzd7a* y *fzd7b* se efectuó de la siguiente manera: se descargaron las secuencias en formato FASTA del banco de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) con índices de acceso AAM00192.1 y AAK49948.1 respectivamente. Enseguida, se seleccionaron dentro de T-Coffee y se realizó el alineamiento.

Como se observa en la **Figura 15** las secuencias tiene una alta similitud dado que el programa arrojó un porcentaje de 98%. En el análisis realizado se observa en la **Figura 15** los siete dominios transmembrana (en rosa), que se caracterizan por poseer aminoácidos hidrofóbicos, por ejemplo, el dominio transmembrana 1 con un 68% en su composición. El-Messaoudi & Renucci, 2001 reportan conservación de hasta el 86% interespecies (ratón, rana de garras negras, y pez cebra), por lo tanto, no es extraña la alta conservación observada en este análisis entre *fzd7a* y *fzd7b* en pez cebra consecuencia de la duplicación de su genoma.

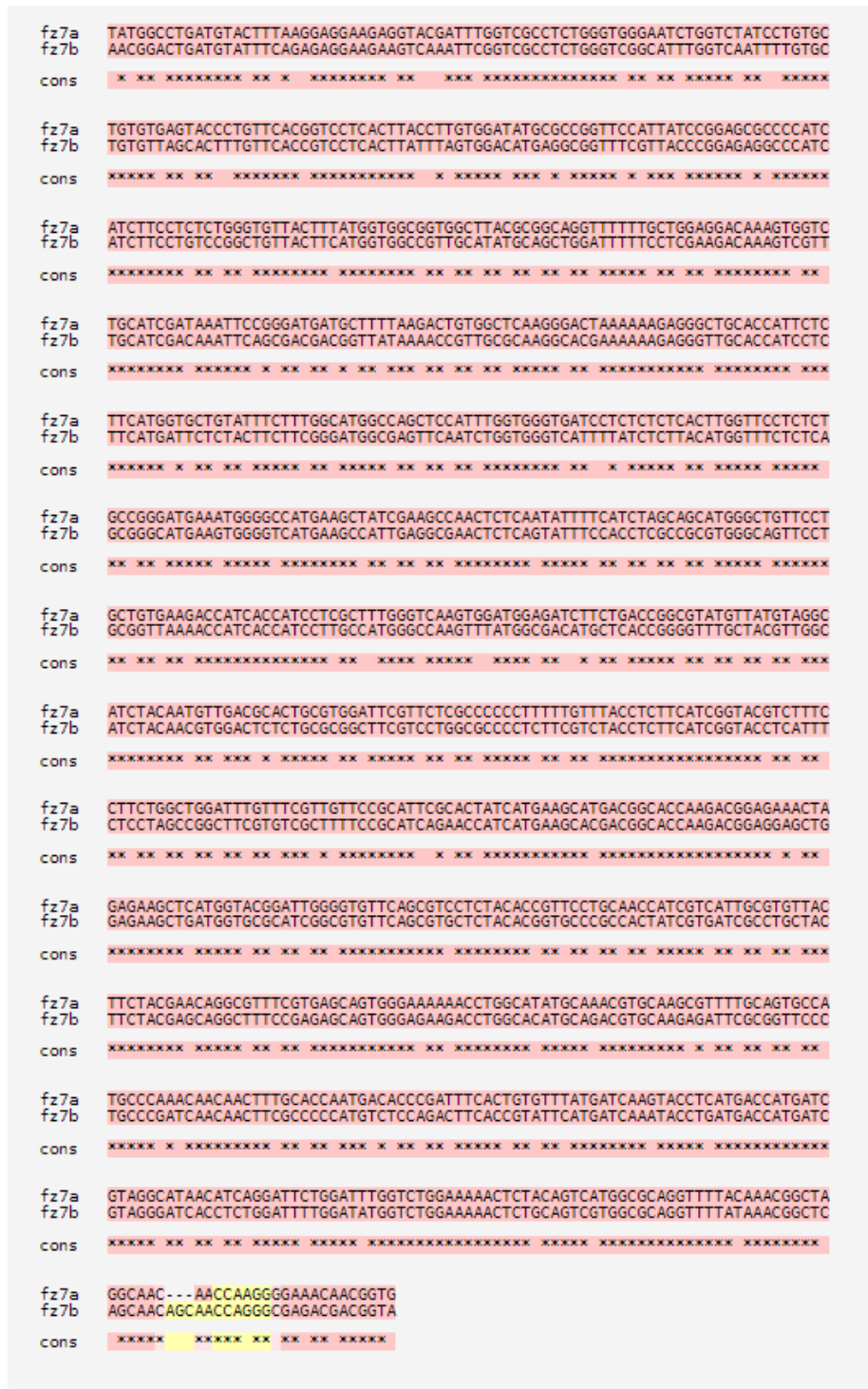
Es interesante el analizar los resultados mostrados en la **Figura 15** que indican que la menor similitud se encuentra en el CRD del extremo N-terminal, cuya función es reconocer al ligando Wnt específico para cada homólogo y cada miembro de la familia Frizzled, situación que aún permanece siendo poco clara. También podría suministrar información sobre su relación con fenómenos como la persistente redundancia funcional o las distintas respuestas celulares dentro de la cascada de señalización Wnt, lo que



Además, al no encontrar información puntual respecto a las diferencias existentes en sus secuencias nucleotídicas, se realizó un alineamiento de ellas sirviéndonos también del programa T-Coffee como se describe a continuación: En primera instancia, se descargaron las secuencias en formato FASTA de la base de datos del NCBI con índices de acceso AF336124.1 (*fzd7a*) y AF336123.1 (*fzd7b*), respectivamente. Después, se seleccionaron dentro del programa y se realizó el alineamiento de la secuencia codificante. Las secuencias de nucleótidos de *fzd7a* y *fzd7b* tienen un porcentaje de similitud de 88%, como se observa en la **Figura 16**.







**Figura 16.** Alineamiento de secuencias nucleotídicas de los genes *fzd7a* y *fzd7b* de pez cebra en T-Coffee.

## 5.2. Diseño de oligonucleótidos

### 5.2.1. Diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen *fzd7a*

Para el diseño de los oligonucleótidos para *fzd7a* se utilizó la secuencia en formato FASTA de este gen, presente en la base de datos del NCBI, con índice de acceso AJ301617.1. A partir de Primer 3 obtuvieron cinco opciones de pares de oligonucleótidos estableciendo los siguientes parámetros en el diseño: limitando el tamaño del producto entre 500-700 pb, una longitud del oligonucleótido de 20 pares de bases, un porcentaje de GC del 40-60% y con una temperatura de alineamiento (Tm) óptima de 56 °C debido a que se buscaba realizar una reacción multiplex para *fzd7a* y  $\beta$ -actina, cuatro pares de oligonucleótidos diseñados por el software se indican en la **Figura 17**.

El software presenta cinco opciones con las mejores características, siendo de manera general la primera la óptima, en este caso no fue así, este par tenía un valor de “any\_th” alto (no mostrado en la **Figura 17**) como se observa también en el anti-sentido del segundo par de oligonucleótidos y en el sentido del cuarto par de oligonucleótidos (6.18 y 11.44 respectivamente). El valor “any\_th” está relacionado con la formación de estructuras secundarias, un valor óptimo es de 0.00 o cercano a él. Por esta razón se descartaron tanto el oligonucleótido principal, como el segundo y cuarto par de oligonucleótidos adicionales. El valor “3’\_th” se relaciona con estructuras secundarias en el extremo 3’ de los oligonucleótidos, mientras que, el valor “hairpin” con la formación de estructuras anulares, encontrándose en el caso de los cuatro pares de oligonucleótidos adicionales en el valor óptimo.

```
KEYS (in order of precedence):
>>>>> left primer
<<<<< right primer

ADDITIONAL OLIGOS
start len tm gc any_th 3'_th hairpin asp
1 LEFT PRIMER 3 20 56.10 45.00 0.00 0.00 0.00 0.00 GOCCTTCCTCAAAATGCAAC
RIGHT PRIMER 555 20 55.95 45.00 0.00 0.00 0.00 CAGGTTGGCTGTAATGTGA ←
PRODUCT SIZE: 553, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00
2 LEFT PRIMER 625 20 56.03 45.00 0.00 0.00 0.00 TTTATGGCGAAAAGGACTG
RIGHT PRIMER 1270 20 56.13 50.00 6.18 0.00 0.00 ATGAGGTACCGATGAAGAGG
PRODUCT SIZE: 646, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00
3 LEFT PRIMER 1080 20 55.95 50.00 0.00 0.00 0.00 GCGGAAGTCTCAGTATTTCC
RIGHT PRIMER 1655 20 55.86 45.00 0.23 0.00 0.00 CTGTTGCTGAGCCGTTTATA
PRODUCT SIZE: 576, PAIR ANY_TH COMPL: 6.64, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00
4 LEFT PRIMER 271 20 56.05 45.00 11.44 0.00 0.00 TCCATGGACCTGAAGTTCTT
RIGHT PRIMER 780 20 56.19 45.00 0.00 0.00 0.00 ATAAGTGAGGACGGTGAACA
PRODUCT SIZE: 510, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

Statistics
con too in in not no tm tm high high high high
sid many tar excl ok bad GC too too any_th 3'_th hair- poly end
ered Ns get reg reg GCN clamp low high compl compl pin X stab ok
Left 0942 0 0 0 0 3024 0 43 1449 0 1 22 35 0 2378
Right 0823 0 0 0 0 2567 0 25 1659 0 0 12 65 0 2495
Pair Stats:
considered 465, unacceptable product size 457, primer in pair overlaps a primer in a better pair 66, ok 0
libprimer3 release 2.4.0
```

**Figura 17.** Opciones de pares de oligonucleótidos de *fzd7a* sugeridas por Primer 3. La flecha indica el par seleccionado para posteriores análisis y síntesis.

Las secuencias elegidas consisten en; 5'-GGCTTTCCTCAAATGCAAC-3' para el oligonucleótido sentido y 5'- CAGGTTTGGCTGTAATGTGA-3' para el anti-sentido. Se utilizó la herramienta BLAST® del NCBI para comprobar que los oligonucleótidos seleccionados se unan específicamente a un solo locus, que de acuerdo con Busch-Nentwich y colaboradores se encuentra en el cromosoma 9. El análisis indica que el par de oligonucleótidos elegido comparte una alta similitud con secuencias del genoma del pez cebra, contando con una cobertura del 100% para todas aquellas coincidencias cuyo locus se encuentra en el cromosoma 9, para aquellos con otros locus hay coberturas menores al 90% y esto indica que no habría unión inespecífica para ninguno de los oligonucleótidos (**Figura 18-19**).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	92.7	100%	0.027	100.00%	56856035	<a href="#">LR812071.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio frizzled class receptor 7a (fzd7a) mRNA</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	2735	<a href="#">NM_131139.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	92.7	100%	0.027	100.00%	57297968	<a href="#">OX063298.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio strain T5D chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	92.7	100%	0.027	100.00%	56811974	<a href="#">CP068743.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	92.7	100%	0.027	100.00%	57070137	<a href="#">LR812046.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	92.7	100%	0.027	100.00%	56263738	<a href="#">LR812602.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio strain Nadia (NA) genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	66.4	100%	0.027	100.00%	57525603	<a href="#">LR812577.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio strain Cooch Behar (CB) genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	92.7	100%	0.027	100.00%	54069560	<a href="#">LR812552.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio frizzled homolog 7a mRNA (cDNA clone MGC:85603 IMAGE:6520247) complete cds</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	2653	<a href="#">BC068322.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-62A12 in linkage group 9, complete sequence</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	204067	<a href="#">CR407547.14</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio frizzled homolog 7a mRNA (cDNA clone MGC:65759 IMAGE:6789281) complete cds</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	2780	<a href="#">BC056280.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio frizzled 7b mRNA, complete cds</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	2768	<a href="#">AF336123.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio partial mRNA for Frizzled 7 protein (fz7 gene)</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	1680	<a href="#">AJ301617.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio genome assembly chromosome 2</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	30.2	82.8	85%	26	100.00%	63032945	<a href="#">OX063291.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio strain T5D chromosome 2</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	30.2	56.5	75%	26	100.00%	59455749	<a href="#">CP068736.1</a>

**Figura 18.** Alineamiento del oligonucleótido sentido de *fzd7a* con herramienta BLAST®.

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio frizzled class receptor 7a (fzd7a) mRNA</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	2735	<a href="#">NM_131139.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio frizzled homolog 7a mRNA (cDNA clone MGC:85603 IMAGE:6520247) complete cds</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	2653	<a href="#">BC068322.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio frizzled homolog 7a mRNA (cDNA clone MGC:65759 IMAGE:6789281) complete cds</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	2780	<a href="#">BC056280.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio frizzled 7b mRNA complete cds</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	2768	<a href="#">AF336123.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio partial mRNA for Frizzled 7 protein (fz7 gene)</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	1680	<a href="#">AJ301617.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio Zg07 gene, partial cds</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	525	<a href="#">U49411.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	92.7	100%	0.027	100.00%	56856035	<a href="#">LR812071.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	92.7	100%	0.027	100.00%	57297968	<a href="#">CX063298.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio strain T5D chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	92.7	100%	0.027	100.00%	56811974	<a href="#">CP068743.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	66.4	100%	0.027	100.00%	57070137	<a href="#">LR812046.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	66.4	100%	0.027	100.00%	56263738	<a href="#">LR812602.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio strain Nadia (NA) genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	92.7	100%	0.027	100.00%	57525603	<a href="#">LR812577.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Danio rerio strain Cooch Behar (CB) genome assembly chromosome 9</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	92.7	100%	0.027	100.00%	54069560	<a href="#">LR812552.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-62A12 in linkage group 9 complete sequence</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	40.1	40.1	100%	0.027	100.00%	204067	<a href="#">CR407547.14</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-219M7 complete sequence</a>	<a href="#">Danio rerio</a>	32.2	32.2	80%	6.6	100.00%	160843	<a href="#">CU182082.8</a>

**Figura 19.** Alineamiento del oligonucleótido anti-sentido de *fzd7a* con herramienta BLAST®.

Además, se realizó la comprobación del tamaño del producto de los oligonucleótidos para *fzd7a* empleando la herramienta primer-BLAST del NCBI (**Figura 20**), donde se comprobó la longitud reportada en Primer 3 (**Figura 17**) 553 pb (pares de bases). Una vez realizadas estas confirmaciones se decidió sintetizar el par de oligonucleótidos mostrados en la **Figura 17**.

Primer-BLAST » JOB ID:vrRguKfeqnaNSK9Noi2LF9g2mk31JYFQ9A

Primer-BLAST Results

Input PCR template: none  
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Danio rerio)  
 Other reports: [Search Summary](#)

**Detailed primer reports**

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGCTTTCCTCAAATGCAAC	20	56.10	45.00	4.00	0.00
Reverse primer	CAGGTTTGGCTGTAATGTGA	20	55.95	45.00	3.00	1.00

Products on target templates  
 >NM\_131139.2 Danio rerio frizzled class receptor 7a (fzd7a), mRNA

```

product length = 553
Forward primer 1 GGCTTTCCTCAAATGCAAC 20
Template      443 ..... 462

Reverse primer 1 CAGGTTTGGCTGTAATGTGA 20
Template      995 .....A. 976
  
```

**Figura 20.** Longitud del amplicón para el gen *fzd7a* determinado con la herramienta primer-BLAST.

### 5.2.2. Diseño de oligonucleótidos para amplificar *fzd7b*

Al no encontrarse reportado en la literatura el tamaño de amplicón resultante de los oligonucleótidos para *fzd7b* elegidos, la determinación de su longitud se realizó con la herramienta primer-BLAST del NCBI, obteniendo como resultado una longitud de 287 pb (Figura 21).

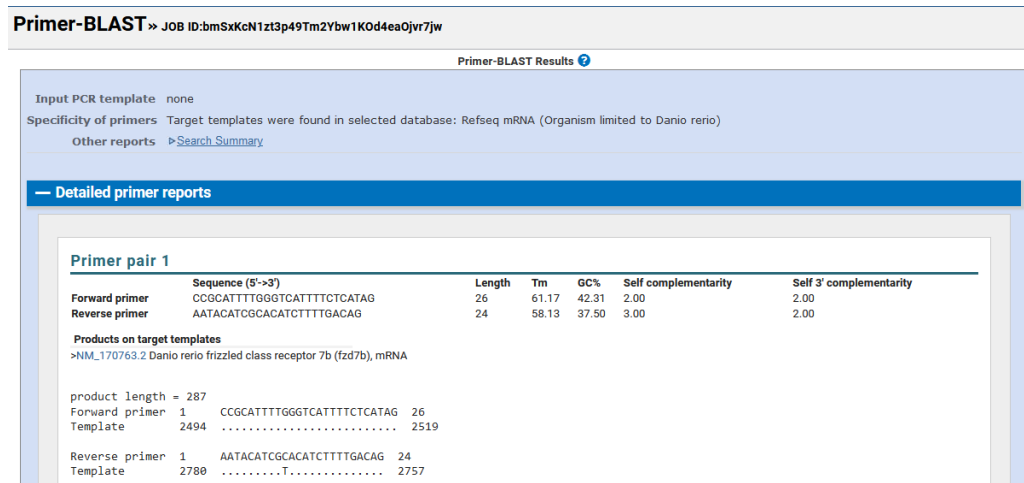
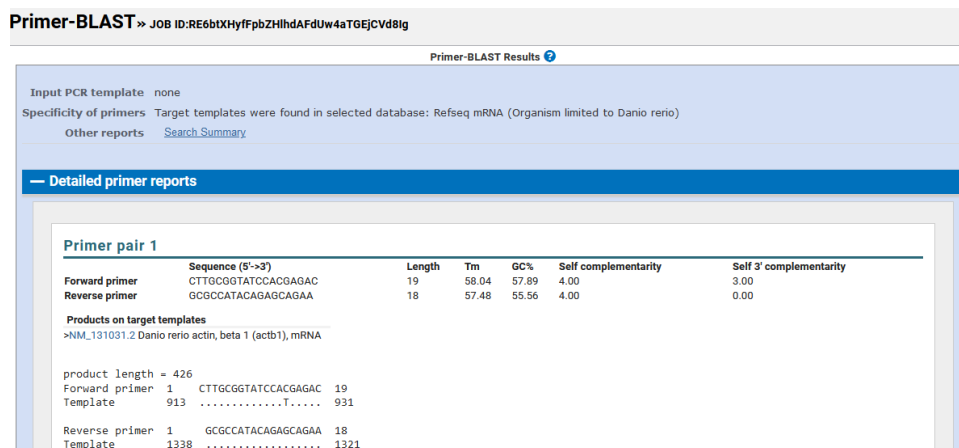


Figura 21. Longitud del amplicón para el gen *fzd7b* determinado con la herramienta primer-BLAST.

### 5.2.3. Diseño de oligonucleótidos para amplificar $\beta$ -actina

Se realizó la comprobación del tamaño de amplicón del gen de control interno  $\beta$ -actina utilizando la herramienta primer-BLAST del NCBI, obteniendo como resultado una longitud de 426 pb (Figura 22), presentando una diferencia mínima de 13 pares de bases con lo reportado por Zou y colaboradores, 2009 (413 pb).



**Figura 22.** Longitud del amplicón para  $\beta$ -actina determinado con la herramienta primer-BLAST.

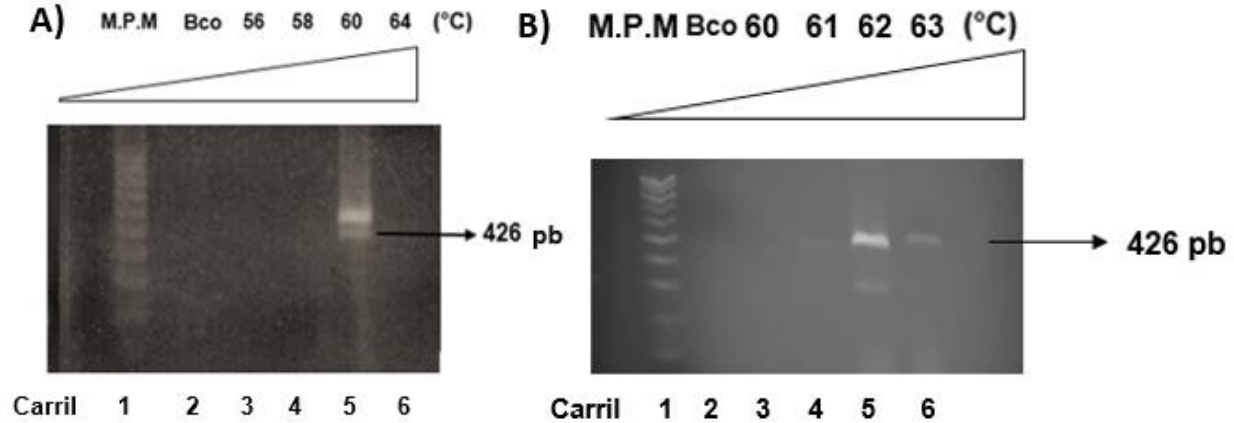
### **5.3. Optimización de PCR**

#### **5.3.1. Optimización de PCR para amplificar el gen $\beta$ -actina**

El gen  $\beta$ -actina se ha utilizado extendidamente como control interno en protocolos de PCR debido a que su abundancia dentro de las células es relativamente estable. La proteína  $\beta$ -actina es uno de los componentes estructurales del citoesqueleto encargado del crecimiento, la migración celular y el mantenimiento de la forma celular, que también ha mostrado ser esencial durante el desarrollo embrionario (Bunnell et al., 2011; Dormoy-Raclet et al., 2007). Para la optimización del gen de control interno  $\beta$ -actina se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Zou y colaboradores, 2009, quienes emplearon una  $T_m$  de 56 °C, no obstante, era necesario confirmarlo bajo las condiciones de nuestro laboratorio. Se realizó una PCR empleando una rampa con temperaturas de alineamiento de 56-64 °C, cDNA de embriones de 24 horas de desarrollo y el ensamble de reacción de la **Tabla 2**.

Enseguida se realizó una electroforesis en gel de agarosa, en la que hubo amplificación en el carril 5 correspondiente a la  $T_m$  de 60 °C (**Figura 23A**), el tamaño de amplicón fue el esperado para  $\beta$ -actina (426 pb) de acuerdo al análisis bioinformático de la sección 5.4.3. En el mismo carril se encontró una banda adicional localizada alrededor de los 300 pb, lo que nos indica un posible producto inespecífico. Al no coincidir con la  $T_m$  esperada de 56 °C, no fue posible ensamblar una reacción múltiple con *fzd7a*, entonces, se estableció una nueva rampa de temperatura de 60 °C a 63 °C y el mismo cDNA. Como se observa en la **Figura 23B** hubo amplificación con las temperaturas de 61 °C, 62 °C y 63 °C las cuales también se encuentran alrededor de los 400 pb, coincidiendo con el tamaño de amplicón esperado para  $\beta$ -actina (426 pb).

En el carril 5, correspondiente a la  $T_m$  de 62 °C se encontró un posible producto no específico alrededor de los 300 pb, a pesar de ello, la banda de interés se encontraba en el tamaño de amplicón esperado, además, esta banda es la más brillante, nítida y uniforme por lo que se eligió esta temperatura de alineamiento como la óptima para realizar las reacciones posteriores del control interno.

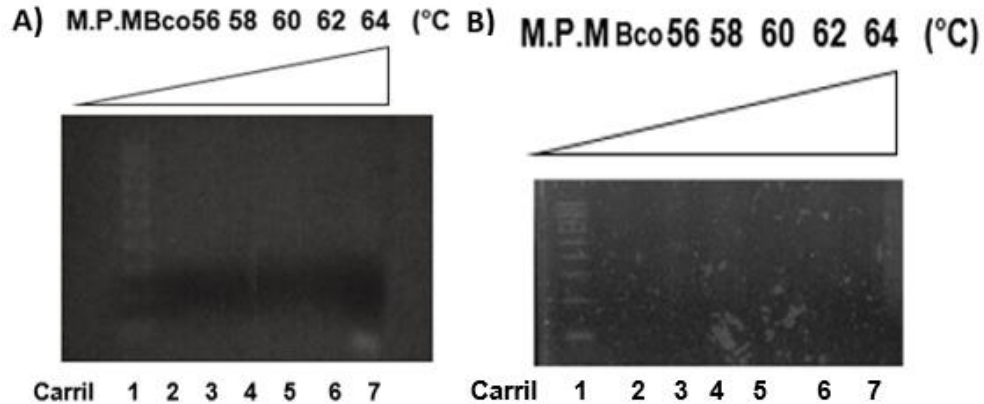


**Figura 23.** Electroforesis de la optimización de la PCR para la amplificación del gen  $\beta$ -actina. **A)** Rampa de temperaturas de alineamiento de 56 °C a 64 °C con cDNA de embriones de 24 horas. **B)** Rampa de temperaturas de alineamiento de 60 °C a 63 °C con cDNA de embriones de 24 horas.

### 5.3.2. Optimización de PCR para amplificar el gen *fzd7a*

Para la optimización de los oligonucleótidos para *fzd7a* se utilizaron los oligonucleótidos de diseño propio descritos en la sección 4.8 en conjunto con cDNA de embriones 24 horas, ensamblando una PCR como se muestra en la **Tabla 2**, con una rampa de temperaturas de alineamiento ( $T_m$ ) de 56 °C a 64 °C. Como se aprecia no hubo amplificación en ningún carril (**Figura 24A**). Se repitió el ensayo con nuevas alícuotas de oligonucleótidos y cDNA de oocitos, utilizando valores de  $T_m$  de 56, 58, 60, 62 y 64 °C, sin obtener una banda (**Figura 24B**), razón por la cual se decidió descartar a este gen para análisis subsecuentes y, en consecuencia, la PCR múltiple para *fzd7a* y el control interno no fue llevada a cabo. La principal hipótesis de que no existieran amplicones en ninguno de los ensayos consiste en que probablemente no se realizó con la  $T_m$  adecuada siendo posible probar temperaturas menores, sin embargo, esto no se realizó debido a que la  $T_m$  óptima establecida en el diseño es de 56 °C y la reportada por la empresa sintetizadora en el certificado de análisis se encontraba entre 60 °C y 64 °C, razones por las que era más probable obtener un producto en este rango de temperaturas (56 °C a 64 °C). No obstante, no se descarta que se prueben en futuros trabajos otras alternativas para los oligonucleótidos del gen *fzd7a*.





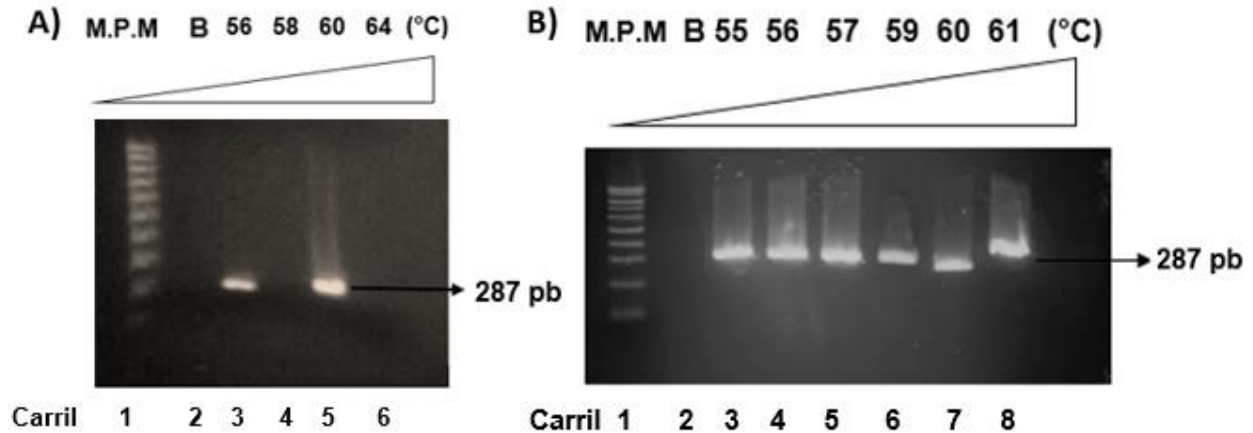
**Figura 24.** Electroforesis de la optimización de la PCR para la amplificación del gen *fzd7a* (rampa de temperatura de 56 °C a 64 °C). **A)** cDNA de embriones de 24 horas. **B)** cDNA de oocitos y nuevas alícuotas de oligonucleótidos.

### 5.3.3. Optimización de PCR para amplificar el gen *fzd7b*

En el caso de *fzd7b* se emplearon los oligonucleótidos reportados por Ungar y Calvey, 2002, quienes emplearon una  $T_m=58$  °C. De manera similar al gen de control interno fue necesario confirmar esto, motivo por el cual, se realizó una PCR utilizando una rampa de temperaturas de alineamiento ( $T_m$ ) de 56 °C a 64 °C y cDNA de embriones de 24 horas. Enseguida se realizó una electroforesis (**Figura 25A**), donde se observa amplificación en los carriles de 56 °C y 60 °C. El tamaño de estas bandas es el esperado, ya que, el amplicón es de 287 pb, de acuerdo al análisis bioinformático de la sección 5.4.2.

Estos resultados difieren de la  $T_m=58$  °C esperada, sin embargo, fueron de gran utilidad para encontrar la temperatura de alineamiento óptima. Considerando esto, se diseñó una rampa más amplia de 55 °C a 61 °C y cDNA de embriones de 24 horas. El gel se presenta en la **Figura 25B**, donde se distingue que en todos los carriles existió amplificación, además, el tamaño de estos productos es el esperado (287 pb). Dado que, la banda con la temperatura de alineamiento de 56 °C es la más brillante, grande y uniforme se eligió como la  $T_m$  estándar de las reacciones posteriores para los oligonucleótidos de *fzd7b*.



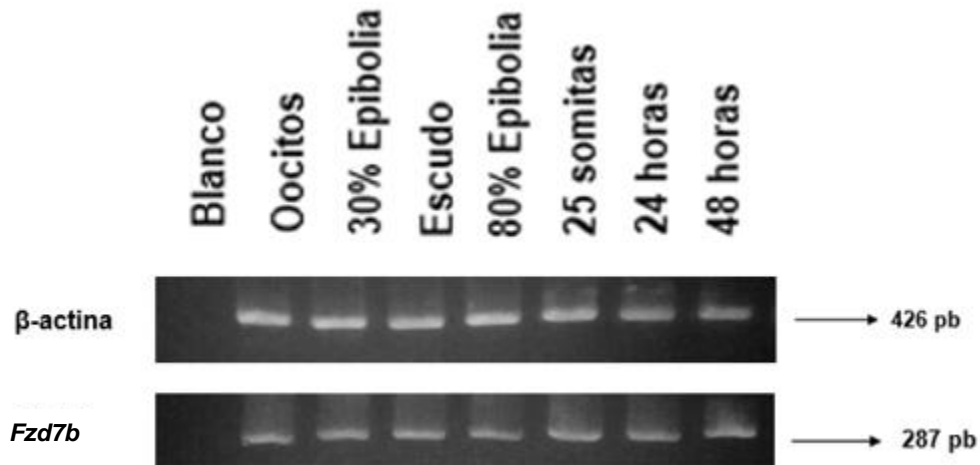


**Figura 25.** Electroforesis de la optimización de la PCR para la amplificación del gen *fzd7b*. **A)** Rampa de temperatura de 56 °C a 64 °C con cDNA de embriones de 24 horas. **B)** Rampa de temperatura de 55 °C a 61 °C con cDNA de embriones de 24 horas.

#### 5.4. Análisis de la expresión del gen *fzd7b* durante el desarrollo embrionario del pez cebra

Se evaluó la expresión del gen *fzd7b* en distintos estadios embrionarios de desarrollo del pez cebra. Como se observa en la **Figura 26** el gen *fzd7b* se expresa en todos los estadios evaluados, se detectó la presencia de *fzd7b* materno al observar la expresión en oocitos, Ungar y Calvey, 2002, reportan de manera similar este fenómeno, sin embargo, ellos lo estudiaron durante las primeras etapas del periodo de blástula (sin especificar algún estadio en particular), no obstante, al ser este un oocito ya fecundado es incorrecto concluir que la expresión de *fzd7b* es de origen materno puesto que ya existió una recombinación del material genético de los progenitores. Por otra parte, en este trabajo se evaluó su expresión en oocitos, confirmando que la expresión de *fzd7b* es provista maternamente debido a que, en ese momento con certeza, aún no ha sucedido la recombinación genética con el gameto paterno.

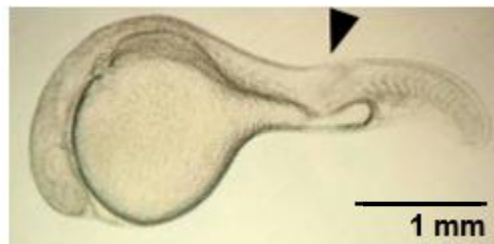
Coincidiendo con los resultados de estos mismos autores, se detectó expresión en los estadios 30% de epibolia, escudo y 48 hpf. También se evaluaron los estadios de 80% de epibolia, 25 somitas y 24 hpf detectando expresión de *fzd7b* uniforme durante las primeras 48 horas de desarrollo.



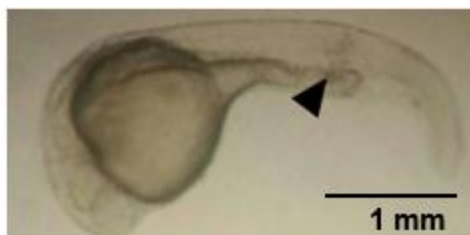
**Figura 26.** Expresión del gen *fzd7b* en distintos estadios de desarrollo embrionario del pez cebra.

### 5.5. Lesión de médula espinal de embriones de pez cebra

Se lesionaron 60 embriones de 24 horas de desarrollo mediante una punción en la médula espinal a nivel del poro urogenital (**Figura 27**). Además, se lesionaron 10 adicionales al mismo nivel de la médula espinal pero sólo lesionando músculo para utilizarse como control (**Figura 28**). Se muestra la imagen del control de embriones de 24 horas no lesionados (**Figura 29**).



**Figura 27.** Embrión de 24 horas de desarrollo con una lesión en médula espinal (vista lateral). Se aprecia la pérdida de continuidad de la estructura. El sitio de la punción se indica con una flecha (magnificación 4x).



**Figura 28.** Embrión de 24 horas de desarrollo con una lesión en el músculo a nivel de poro anal (vista lateral). Se aprecia continuidad en la médula espinal. El sitio de la punción se indica con una flecha (magnificación 4x).

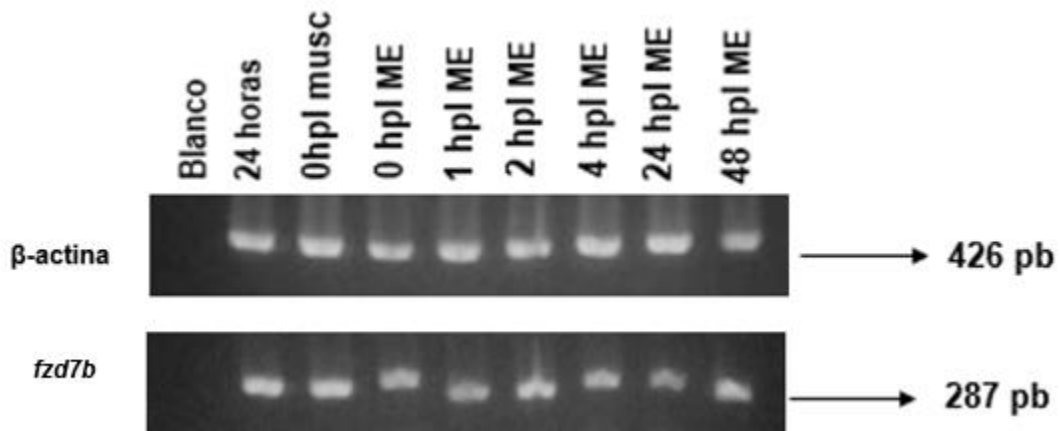


**Figura 29.** Embrión de 24 horas de desarrollo no lesionado (vista lateral). La flecha indica el poro anal (magnificación 4x).

### 5.6. Análisis de la expresión del gen *fzd7b* durante la regeneración de la médula espinal de embriones y alevines de pez cebra

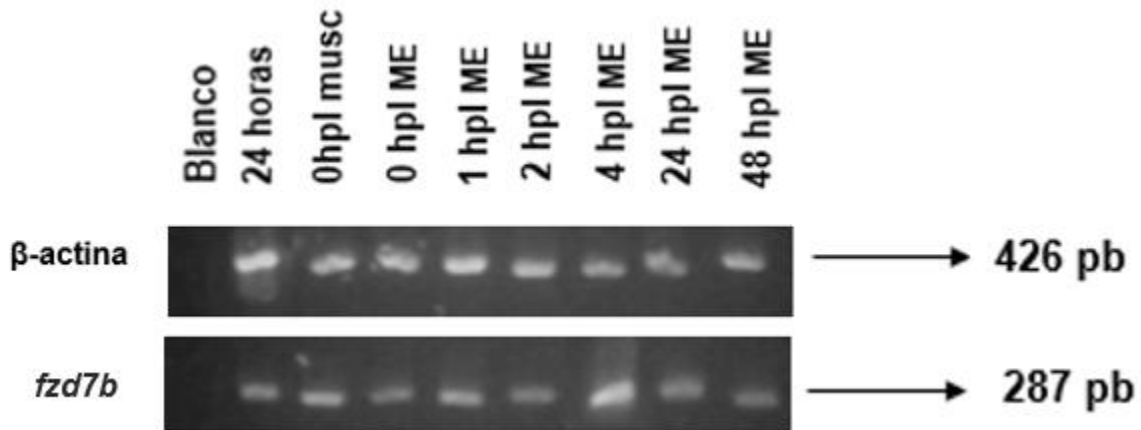
Se evaluó la expresión del gen *fzd7b* a partir de las 0 horas post-lesión (0 hpl) hasta las 48 hpl. Como control se utilizaron embriones de 24 horas no lesionados y lesionados en músculo a la altura de la médula espinal (ME) colectados a las 0 hpl.

Como se aprecia en la **Figura 30** se observó expresión en todos los momentos post-lesión evaluados. Se destaca que los amplicones de *fzd7b* a diferencia del control interno exhiben menor intensidad de brillo y grosor. Además, las bandas de 0 a 48 hpl ME poseen menor brillo y grosor que las de 24 hpf y 0 hpl musc, sugiriendo que la magnitud de su expresión podría verse ligeramente reducida a esos tiempos.



**Figura 30.** Expresión del gen *fzd7b* durante la regeneración de médula espinal (ME) en embriones y alevines de pez cebra, colectados a distintos tiempos post-lesión (Repetición 1).

Se realizó la repetición del ensayo obteniéndose la confirmación de los resultados, esto se presenta en la **Figura 31**.



**Figura 31.** Expresión del gen *fzd7b* durante la regeneración de médula espinal (ME) en embriones y alevines de pez cebra, colectados a distintos tiempos post-lesión (Repetición 2).

### 5.7. Evaluación de la reconexión de la médula

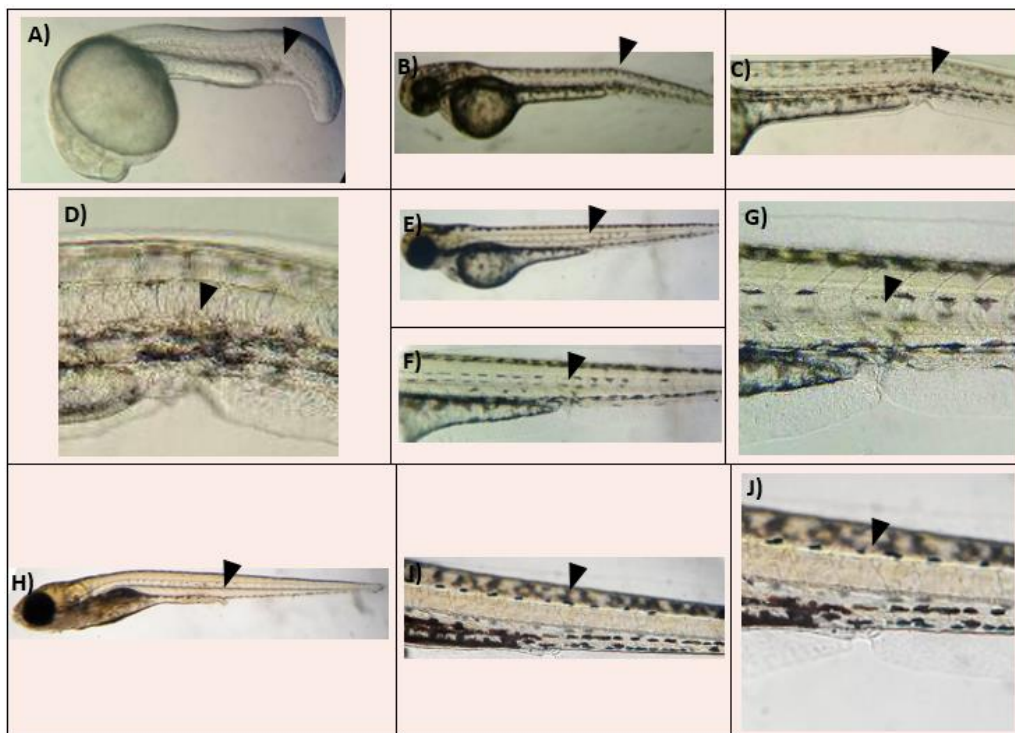
Se realizó la evaluación de la regeneración de la médula espinal, desde las cero horas post-lesión (0 hpl) hasta los ocho días post-lesión (8 dpl), específicamente, 0 hpl, 24 hpl, 48 hpl, 4 dpl, 6 dpl, 8 dpl. A su vez, se documentó el desarrollo normal de individuos no lesionados hasta los cinco días post-fertilización (1 dpf, 2 dpf, 3 dpf y 5 dpf) como un control de la calidad de los embriones (**Figura 32**). Se utilizó un microscopio óptico analizando a un grupo de cinco individuos: uno no lesionado, dos lesionados en músculo y dos en médula.



**Figura 32.** Desarrollo normal de individuos no lesionados (vista lateral). **A)** 24 horas de desarrollo o 1dpf, magnificación 10x. **B)** 2 dpf. **C)** 3 dpf. **D)** 5 dpf (magnificación 4x).

En primera instancia se evaluó la regeneración de la lesión muscular, en la **Figura 33A** se muestra la lesión en músculo a las 0 hpl, comparándola con un individuo no lesionado con el mismo tiempo de desarrollo (**Figura 32A**) podemos distinguir de manera clara el sitio y magnitud de la misma. A 24 hpl puede notarse una desviación ligera del tronco inferior causada por la punción (**Figura 33B**), como referencia un individuo que no presenta daño se observa en la **Figura 32B**. A mayor magnificación se distingue una regeneración parcial de la herida (**Figura 33C-D**). A 48 hpl se aprecia una disposición totalmente recta del tronco inferior (**Figura 33E-F**), similar a la de un alevín de 3 dpf no lesionado (**Figura 32C**). El músculo presenta un 90% de regeneración, pero se distingue que aún está cicatrizando (**Figura 33G**).

En el cuarto día post-lesión (4dpl), existe continuidad en el músculo y las somitas se ven nítidas, como se observa en la **Figura 33H-J**, además el alevín es comparable a uno no lesionado de 5 dpf (**Figura 32D**) razones por las que los individuos fueron catalogados como recuperados.



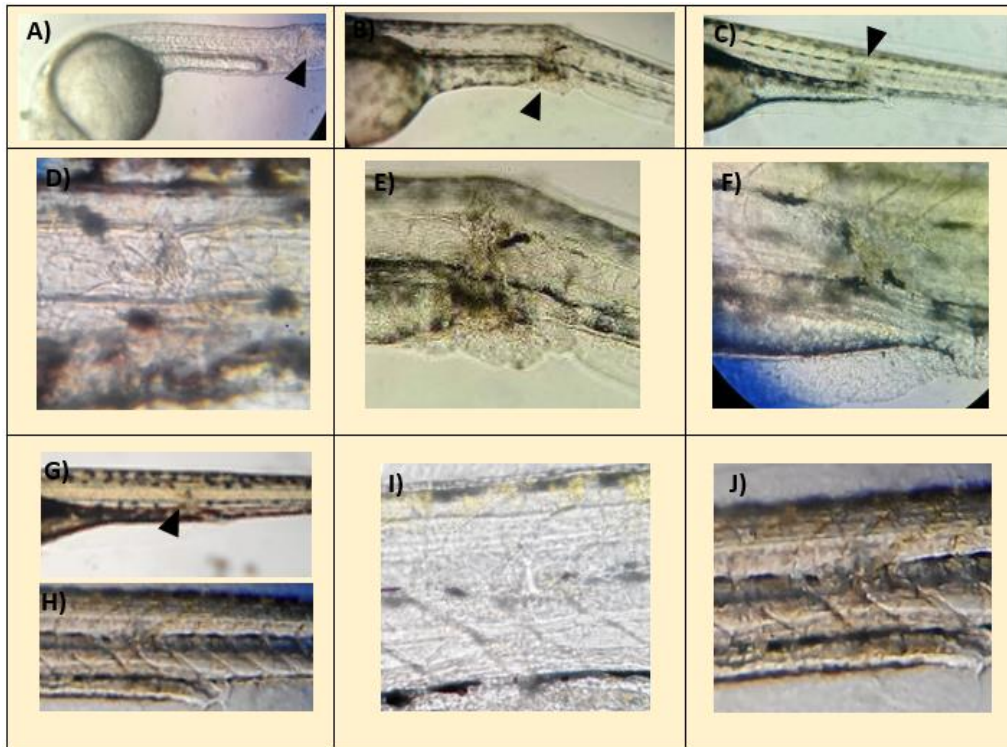
**Figura 33.** Evaluación de la regeneración de músculo en embriones lesionados (vista lateral). El sitio de la lesión se indica con una flecha. A) 0 hpl (magnificación 10x). B) 24 hpl (magnificación 4x). C) 24 hpl (magnificación 10x). D) 24 hpl (magnificación 40x). E) 48 hpl (magnificación 4x). F) 48 hpl (magnificación 10x). G) 48 hpl (magnificación 40x). H) 4 dpl (magnificación 4x). I) 4 dpl (magnificación 10x). J) 4 dpl (magnificación 40x).

Posteriormente se evaluó la regeneración axonal; en el primer día post-lesión, se observa una clara discontinuidad en el sitio de la lesión a las 0 hpl (**Figura 34A**). A las 24 hpl se aprecia la persistencia de la herida en la médula (**Figura 34B**), mientras que es notorio que el músculo ha comenzado a regenerarse, sin embargo, hay presencia de tejido disgregado en el intestino (**Figura 34E**). En la **Figura 34C** se indica el área lesionada a las 48 hpl, puede apreciarse una considerable reducción de su tamaño. Además, a magnificación 40x se observa un fascículo en la médula, esto nos indica el comienzo de la formación de un puente axonal, el sitio de la lesión es más estrecho y el tejido que se encontraba disgregado a las 24 hpl ha sido parcialmente reconstituido **Figura 34F**.

A las 48 hpl los embriones mostraron actividad natatoria provocada por contacto lo cual coincide con lo identificado por Wehner y colaboradores, 2017, donde dentro de los dos primeros dpl reportan este tipo de respuesta. Por otra parte, observaron la generación de puentes axonales a partir de 1 dpl en el 57% de los individuos, y de más del 80% de su población (n=112) hacia los 2 dpl, fenómeno que se observó hasta el 4 dpl en este trabajo, a diferencia de este estudio ellos realizaron una lesión más pronunciada a los 3 dpf seccionando parte de las somitas. No obstante a pesar de no identificar visualmente un puente axonal a las 48 hpl (2dpl), la actividad natatoria observada nos sugiere la formación de un fascículo y la recuperación de la función por debajo del sitio de la lesión.

De manera consistente con la lesión en músculo, en el 4 dpl el músculo se había regenerado (**Figura 34D**), por su parte la médula exhibió continuidad observándose un puente axonal. En el sexto día se observan estructuras internas aún en proceso de regeneración en el objetivo 10x (**Figura 34G**), de la misma manera que en el 40x, aunque en este último se aprecia mayor continuidad en la médula en comparación a los 4 dpl (**Figura 34I**). Para el octavo día posterior a la lesión (8 dpl) (**Figura 34H,J**), la médula mostraba continuidad, alrededor de un 90% de regeneración, y por este motivo los individuos se catalogaron como recuperados de la lesión.





**Figura 34.** Evaluación de la reconexión axonal en embriones lesionados (vista lateral). El sitio de la lesión se indica con una flecha. A) 0 hpl (magnificación 10x). B) 24 hpl (magnificación 10x). C) 48 hpl (magnificación 10x). D) 4 dpl (magnificación 40x). E) 24 hpl (magnificación 40x). F) 48 hpl (magnificación 40x). G) 6 dpl (magnificación 10x). H) 8 dpl (magnificación 10x). I) 6 dpl (magnificación 40x). J) 8 dpl (magnificación 40x).

## 6. CONCLUSIONES

Los oligonucleótidos seleccionados para los genes *fzd7b* y  $\beta$ -actina son funcionales, se consiguió optimizar la PCR para dos de los tres pares de oligonucleótidos propuestos, siendo *fzd7a* el único que no se logró amplificar. En consecuencia, los análisis de la expresión del gen *fzd7a* durante el desarrollo embrionario y en la regeneración de médula espinal de embriones y alevines no se ejecutaron.

El análisis de la expresión del gen *fzd7b* mediante RT-PCR en distintos estadios de desarrollo embrionario del pez cebra sugiere que durante las primeras 48 horas post-fertilización ésta no varía significativamente, además, se pudo constatar la procedencia materna de este homólogo en oocitos de pez cebra. Por su parte, el análisis de su expresión durante la regeneración de médula espinal de embriones y alevines indica que las lesiones en músculo no alteran la expresión de este gen a las 0 hpl, mientras que, en la médula espinal, los resultados sugieren una reducción ligera en la expresión de *fzd7b* de 0 hpl a 48 hpl.

Finalmente, respecto a la evaluación de la reconexión axonal, los embriones lesionados solo en músculo se recuperaron de la lesión al cuarto día post-lesión. En el caso de la regeneración de médula se observó la formación de un fascículo y la presencia de actividad natatoria provocada por contacto a las 48 hpl, esto último coincide con lo identificado por Wehner y colaboradores, 2017. Se identificó la generación de puentes axonales en los alevines a partir de los 4 dpl. A los 8 dpl, la lesión en médula espinal estaba aproximadamente 90% regenerada y los individuos se clasificaron como recuperados de la lesión.



## 7. PERSPECTIVAS

Al revisar la literatura referente a expresión de genes o regeneración de médula espinal en embriones podemos detectar que gran proporción de la mismas utilizan técnicas de alta resolución como inmunofluorescencia (IF), hibridación *in situ* (ISH), entre otras, o, por otra parte, ejecutan inyecciones de RNA, ablaciones con láser o electro ablaciones mediante el uso de equipos más sensibles. En el caso del laboratorio LaBiMoDe se presentan distintas limitaciones técnicas que impiden efectuar tales ensayos, sin embargo, recientemente se han conseguido avances importantes en la estandarización de la técnica de hibridación *in situ*, gracias a la cual, sería posible complementar los datos obtenidos en este trabajo.

Aunque hay información disponible en la literatura de estudios que utilizan ISH para analizar los patrones de expresión de ambos homólogos del gen *fzd7* durante el desarrollo embrionario, al momento, no hay estudios que la hayan empleado durante la regeneración de ME en embriones. En los resultados derivados de este trabajo se ha comprobado que *fzd7b* se expresa durante la regeneración de médula, no obstante, debido a las características de la PCR no podemos determinar las zonas específicas en que la expresión está llevándose a cabo, lo que acentúa la relevancia de considerar la implementación de ISH en futuros análisis de expresión génica, esto podría mejorar nuestra comprensión de su funcionamiento en los procesos biológicos en estudio.

Además, se sugiere robustecer el análisis de la expresión del gen *fzd7b* en embriones lesionados en ME, complementándolo con inmunofluorescencia, para de esta manera precisar la localización de la expresión de este receptor, y, asimismo, estudiar las poblaciones celulares involucradas en el proceso de regeneración.

También se sugiere ampliar los tiempos de estudio para la lesión de músculo para corroborar si en efecto se ve alterada la expresión del gen *fzd7b* en momentos posteriores a la ejecución de la punción en esta estructura o más adelante durante el proceso de regeneración de la misma. Para el caso de *fzd7a*, tras diseñar unos oligonucleótidos funcionales su estudio podría brindar una excelente oportunidad para aplicar las técnicas complementarias propuestas y determinar si se encuentra involucrado en la regeneración de la médula espinal.

Finalmente, se exhorta a profundizar en el estudio de la región extracelular del CRD de *fzd7*, ya que, para entender la especificidad que los homólogos de *fzd7* en pez cebra mantienen con los distintos Wnt además de ofrecernos información de su relación con fenómenos como la redundancia funcional o las distintas respuestas celulares que los Frizzled producen dentro de la señalización Wnt, podría ser muy importante en la búsqueda y diseño de fármacos contra el cáncer, o en la medicina regenerativa que tengan como objetivo ésta vía.

## 8. REFERENCIAS

- Abu-Elmagd, M., Garcia-Morales, C., & Wheeler, G. N. (2006). Frizzled7 mediates canonical Wnt signaling in neural crest induction. *Developmental Biology*, 298(1), 285–298. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.037>
- Agostino, M., & Pohl, S. (2019). Comment on: “Wnt binding affinity prediction for putative frizzled-type cysteine-rich domains”. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms20194884>
- Alrefaei, A. (2021). Frizzled receptors (FZD) play multiple cellular roles in development, in diseases, and as potential therapeutic targets. *Journal of King Saud University - Science*, 33(8). <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101613>
- Alrefaei, A., Münsterberg, A., & Grant, N. (2019). *FZD10 regulates cell proliferation and mediates Wnt1 induced neurogenesis in the developing spinal cord.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/690263>;
- Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., & Mayden, R. L. (2013). Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0803>
- Baldrige, D., Wangler, M. F., Bowman, A. N., Yamamoto, S., Schedl, T., Pak, S. C., Postlethwait, J. H., Shin, J., Solnica-Krezel, L., Bellen, H. J., & Westerfield, M. (2021). Model organisms contribute to diagnosis and discovery in the undiagnosed diseases network: Current state and a future vision. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01839-9>
- Bradford, Y. M., Toro, S., Ramachandran, S., Ruzicka, L., Howe, D. G., Eagle, A., Kalita, P., Martin, R., Moxon, S. A. T., Schaper, K., & Westerfield, M. (2017). Zebrafish models of human disease: Gaining insight into human disease at ZFIN. *ILAR Journal*, 58(1), 4–16. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw040>
- Bunnell, T. M., Burbach, B. J., Shimizu, Y., & Ervasti, J. M. (2011).  $\beta$ -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Molecular Biology of the Cell*, 22(21), 4047–4058. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0582>
- Butler, A. B., & Hodos, W. (2005). Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation: Second Edition. En *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation: Second Edition (2a.)*.

<https://doi.org/10.1002/0471733849>

- Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S., & Zon, L. I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 33(1), 95–118.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>
- Cevik-Tufan, A., Daumer, K. M., & Tuan, R. S. (2002). Frizzled-7 and limb mesenchymal chondrogenesis: Effect of misexpression and involvement of N-cadherin. *Developmental Dynamics*, 223(2), 241–253.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.10046>
- Chacón, M. A., Varela-Nallar, L., & Inestrosa, N. C. (2008). Frizzled-1 is involved in the neuroprotective effect of Wnt3a against A $\beta$  oligomers. *Journal of Cellular Physiology*, 217(1), 215–227. <https://doi.org/10.1002/jcp.21497>
- Chen, W., Liu, Z., Mai, W., Xiao, Y., You, X., & Qin, L. (2020). FZD8 Indicates a Poor Prognosis and Promotes Gastric Cancer Invasion and Metastasis via B-Catenin Signaling Pathway. *Annals of clinical and laboratory science*, 50(1), 13–23.
- Choi, V. W. Y., & Yu, K. N. (2015). Embryos of the zebrafish *Danio rerio* in studies of non-targeted effects of ionizing radiation. *Cancer Letters*, 356(1), 91–104.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.10.020>
- Cigliola, V., Becker, C. J., & Poss, K. D. (2020). Building bridges, not walls: Spinal cord regeneration in zebrafish. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 13(5).  
<https://doi.org/10.1242/dmm.044131>
- De, A. (2011). Wnt / Ca<sup>2+</sup> signaling pathway : a brief overview The Non-canonical Wnt Signaling Cascade. *Acta Biochimica et Biophysica Hungarica*, 43(10), 745–756.  
<https://doi.org/10.1093/abbs/gmr079>. Advance
- Dijksterhuis, J. P., Petersen, J., & Schulte, G. (2014). WNT/Frizzled signalling: Receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3. *British Journal of Pharmacology*, 171(5), 1195–1209. <https://doi.org/10.1111/bph.12364>
- Dormoy-Raclet, V., Ménard, I., Clair, E., Kurban, G., Mazroui, R., Di Marco, S., von Roretz, C., Pause, A., & Gallouzi, I.-E. (2007). The RNA-Binding Protein HuR Promotes Cell Migration and Cell Invasion by Stabilizing the  $\beta$ - actin mRNA in a U-

- Rich-Element-Dependent Manner . *Molecular and Cellular Biology*, 27(15), 5365–5380. <https://doi.org/10.1128/mcb.00113-07>
- Dorrian, R. M., Berryman, C. F., Lauto, A., & Leonard, A. V. (2023). Electrical stimulation for the treatment of spinal cord injuries: A review of the cellular and molecular mechanisms that drive functional improvements. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17(February). <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1095259>
- El-Messaoudi, S., & Renucci, A. (2001). Expression pattern of the frizzled 7 gene during zebrafish embryonic development. *Mechanisms of Development*, 102, 231–234. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00491-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00491-3)
- Felten, D. L., O'Banion, M. K., & Maida, M. E. (2021). *Netter's Atlas of neuroscience* (4a Ed.). Elsevier Ltd.
- García-Gómez, A., Gutiérrez Gutiérrez, C. L., Barthelemy Mirabal, M. Á., Pradere Pensado, J. C., & Díaz Gómez, E. (2013). Caracterización de pacientes con traumatismo de médula espinal. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 42(2), 201–209.
- Garcia-Morales, C., Liu, C. H., Abu-Elmagd, M., Hajjhosseini, M. K., & Wheeler, G. N. (2009). Frizzled-10 promotes sensory neuron development in *Xenopus* embryos. *Developmental Biology*, 335(1), 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.021>
- Gazit, A., Yaniv, A., Bafico, A., Pramila, T., Igarashi, M., Kitajewski, J., & Aaronson, S. A. (1999). Human frizzled 1 interacts with transforming Wnts to transduce a TCF dependent transcriptional response. *Oncogene*, 18(44), 5959–5966. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202985>
- Goldshmit, Y., Sztal, T. E., Jusuf, P. R., Hall, T. E., Nguyen-Chi, M., & Currie, P. D. (2012). Fgf-dependent glial cell bridges facilitate spinal cord regeneration in Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 32(22), 7477–7492. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0758-12.2012>
- Goldsmith, J. R., & Jobin, C. (2012). Think small: Zebrafish as a model system of human pathology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1155/2012/817341>
- Guo, Y., Ma, L., Cristofanilli, M., Hart, R. P., Hao, A., & Schachner, M. (2011).

Transcription factor Sox11b is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *Neuroscience*, 172(0), 329–341.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.026>

Guy, S. D., Mehta, S., Casalino, A., Côté, I., Kras-Dupuis, A., Moulin, D. E., Parrent, A. G., Potter, P., Short, C., Teasell, R., Bradbury, C. L., Bryce, T. N., Craven, B. C., Finnerup, N. B., Harvey, D., Hitzig, S. L., Lau, B., Middleton, J. W., O'Connell, C., ... Loh, E. (2016). The CanPain SCI Clinical Practice Guidelines for Rehabilitation Management of Neuropathic Pain after Spinal Cord: Recommendations for treatment. *Spinal Cord*, 54(S1), S14–S23. <https://doi.org/10.1038/sc.2016.90>

Heinonen, K. M., Vanegas, J. R., Lew, D., Krosil, J., & Perreault, C. (2011). Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway. *PLoS ONE*, 6(4), 2–13.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019279>

Holtzman, N. G., Kathryn Iovine, M., Liang, J. O., & Morris, J. (2016). Learning to fish with genetics: A primer on the vertebrate model *Danio rerio*. *Genetics*, 203(3), 1069–1089. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.190843>

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503.

<https://doi.org/10.1038/nature12111>

Hui, S. P., Sengupta, D., Lee, S. G. P., Sen, T., Kundu, S., Mathavan, S., & Ghosh, S. (2014). Genome wide expression profiling during spinal cord regeneration identifies comprehensive cellular responses in zebrafish. *PLoS ONE*, 9(1).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084212>

Kaucká, M., Plevová, K., Pavlová, Š., Janovská, P., Mishra, A., Verner, J., Procházková, J., Krejčí, P., Kotašková, J., Ovesná, P., Tichý, B., Brychtová, Y., Doubek, M., Kozubík, A., Mayer, J., Pospíšilová, Š., & Bryja, V. (2013). The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of b-lymphocyte migration. *Cancer Research*, 73(5), 1491–1501.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1752>

Koster, R., & Sassen, W. A. (2015). A molecular toolbox for genetic manipulation of zebrafish. *Advances in Genomics and Genetics*, 151.

<https://doi.org/10.2147/agg.s57585>

Koval, A., Purvanov, V., Egger-Adam, D., & Katanaev, V. L. (2011). Yellow submarine of the Wnt/Frizzled signaling: Submerging from the G protein harbor to the targets. *Biochemical Pharmacology*, 82(10), 1311–1319.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.005>

Larasati, Y., Boudou, C., Koval, A., & Katanaev, V. L. (2022). Unlocking the Wnt pathway: Therapeutic potential of selective targeting FZD7 in cancer. *Drug Discovery Today*, 27(3), 777–792. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.12.008>

Li, Q., Ye, L., Xin, Z., Wang, M., Lin, C., Huang, S., Guo, W., Lai, Y., Du, H., Li, J., Song, L., & Peng, X. (2017). FZD8, a target of p53, promotes bone metastasis in prostate cancer by activating canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Cancer Letters*, 402, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.029>

Ma, L., Yu, Y. M., Guo, Y., Hart, R. P., & Schachner, M. (2012). Cysteine- and glycine-rich protein 1a is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *European Journal of Neuroscience*, 35(3), 353–365. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07958.x>

MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9–26.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>

Nikaido, M., Law, E. W. P., & Kelsh, R. N. (2013). A Systematic Survey of Expression and Function of Zebrafish frizzled Genes. *PLoS ONE*, 8(1).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054833>

Noback, C. R., Strominger, N. L., Demarest, R. J., & Ruggiero, D. A. (2005). *The Human Nervous System; Structure and Function*. (6a Ed.). HUMANA PRESS.

Nusse, R., & Clevers, H. (2017). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, 169(6), 985–999.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>

Padilla-Zambrano, H., Ramos-Villegas, Y., Raphael Alvis-Miranda, H., Joaquin, A. F.,

- Rafael Moscote-Salazar, L., & Rafael Moscote, L. (2017). Pathophysiology of spinal trauma. *Revista Mexicana de Neurociencia Septiembre-Octubre*, 18(5), 46–53.
- Park, Y., Lofton, M., Li, D., & Rasin, M. R. (2021). Extrinsic regulators of mrna translation in developing brain: Story of wnts. *Cells*, 10(2), 1–21.  
<https://doi.org/10.3390/cells10020253>
- Pérez-Estudillo, A. C., Sánchez A., D., López-Meraz, M. L., Morgado-Valle, C., Beltran-Parrazal, L., Coria-Avila, G. A., Hernández A, M. E., & Manzo D, J. (2018). Therapeutic applications for spinal cord injury. *Revista de Neurobiología*, 1(21), 141118. [www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2018/21/21.html](http://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2018/21/21.html)
- Pheesse, T., Flanagan, D., & Vincan, E. (2016). Frizzled7: A promising achilles' heel for targeting the Wnt receptor complex to treat cancer. *Cancers*, 8(5), 1–33.  
<https://doi.org/10.3390/cancers8050050>
- Pohl, S. G., Brook, N., Agostino, M., Arfuso, F., Kumar, A. P., & Dharmarajan, A. (2017). Wnt signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis*, 6(4), 1–12.  
<https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.14>
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2004). Studying the Nervous Systems of Humans and Other Animals. En *Neuroscience* (3a Ed., pp. 154–159). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.62132-3>
- Quesada-Hernández, E., Caneparo, L., Schneider, S., Winkler, S., Liebling, M., Fraser, S. E., & Heisenberg, C. P. (2010). Stereotypical cell division orientation controls neural rod midline formation in zebrafish. *Current Biology*, 20(21), 1966–1972.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.009>
- Ramos, M., Monserrat, A. Z., Garcia Castro, B., Jave Suarez, L. F., & Aguilar Lemarroy, A. (2015). Vía de señalización Wnt y cáncer cervicouterino. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(33), S218-24.
- Reimer, M. M., Kuscha, V., Wyatt, C., Sörensen, I., Frank, R. E., Knüwer, M., Becker, T., & Becker, C. G. (2009). Sonic hedgehog is a polarized signal for motor neuron regeneration in adult zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 29(48), 15073–15082.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4748-09.2009>



- Saraswathy, V. M., Zhou, L., Burris, B., Dogra, D., Reischauer, S., & Mokalled, M. H. (2021). Myostatin is a negative regulator of adult neurogenesis in zebrafish. *bioRxiv*, 2021.08.18.456778.  
<http://biorxiv.org/content/early/2021/08/19/2021.08.18.456778.abstract>
- Schenkelaars, Q., Fierro-Constain, L., Renard, E., Hill, A. L., & Borchellini, C. (2015). Insights into Frizzled evolution and new perspectives. *Evolution and Development*, 17(2), 160–169. <https://doi.org/10.1111/ede.12115>
- Schmidt, R., Strähle, U., & Scholpp, S. (2013). Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. *Neural Development*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>
- Schulte, G. (2015). Frizzleds and WNT/ $\beta$ -catenin signaling - The black box of ligand-receptor selectivity, complex stoichiometry and activation kinetics. *European Journal of Pharmacology*, 763, 191–195.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.031>
- Shankar, P., McClure, R. S., Waters, K. M., & Tanguay, R. L. (2021). Gene co-expression network analysis in zebrafish reveals chemical class specific modules. *BMC Genomics*, 22(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07940-4>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Stil, A., & Drapeau, P. (2016). Neuronal labeling patterns in the spinal cord of adult transgenic Zebrafish. *Developmental Neurobiology*, 76(6), 642–660.  
<https://doi.org/10.1002/dneu.22350>
- Sun, Y., Wang, W., & Zhao, C. (2021). Frizzled receptors in tumors, focusing on signaling, roles, modulation mechanisms, and targeted therapies. *Oncology Research*, 28(6), 661–674. <https://doi.org/10.3727/096504020X16014648664459>
- Toni, L. S., Garcia, A. M., Jeffrey, D. A., Jiang, X., Stauffer, B. L., Miyamoto, S. D., & Sucharov, C. C. (2018). Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX*, 5, 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.011>
- Tsata, V., & Wehner, D. (2021). Kow How to Regrow--Axon Regeneration in the Zebrafish Spinal Cord. *Seminars in Anesthesia*, 19(4), 287–289.

















<https://doi.org/10.1053/sa.2000.17794>






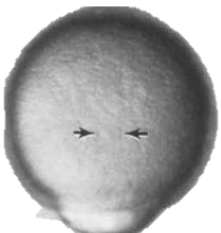






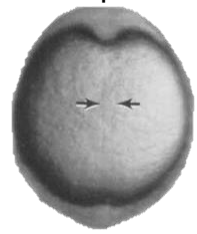
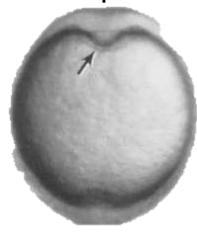


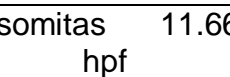
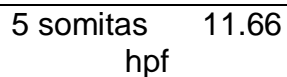
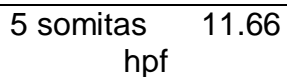
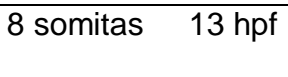
- Ungar, A. R., & Calvey, C. R. (2002). Zebrafish *frizzled7b* is expressed in prechordal mesoderm, brain and paraxial mesoderm. *Mechanisms of Development*, 118(1–2), 165–169. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00221-6)
- Van Raay, T. J., & Vetter, M. L. (2004). Wnt/Frizzled signaling during vertebrate retinal development. *Developmental Neuroscience*, 26(5–6), 352–358. <https://doi.org/10.1159/000082277>
- Vincan, E., Swain, R. K., Brabletz, T., & Steinbeisser, H. (2007). *Frizzled7* dictates embryonic morphogenesis: implications for colorectal cancer progression. 4558–4567.
- Wang, H. X., Li, T. Y., & Kidder, G. M. (2010). WNT2 regulates DNA synthesis in mouse granulosa cells through beta-catenin. *Biology of Reproduction*, 82(5), 865–875. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080903>
- Wang, H. X., Tekpetey, F. R., & Kidder, G. M. (2009). Identification of WNT/ $\beta$ -CATENIN signaling pathway components in human cumulus cells. *Molecular Human Reproduction*, 15(1), 11–17. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan070>
- Wang, Y., Guo, N., & Nathans, J. (2006). The role of *Frizzled3* and *Frizzled6* in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *Journal of Neuroscience*, 26(8), 2147–2156. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4698-05.2005>
- Wang, Z., Shu, W., Lu, M. M., & Morrisey, E. E. (2005). Wnt7b Activates Canonical Signaling in Epithelial and Vascular Smooth Muscle Cells through Interactions with Fzd1, Fzd10, and LRP5. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 5022–5030. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.12.5022-5030.2005>
- Watanabe, M. (2017). Gap junction in the teleost fish lineage: Duplicated connexins may contribute to skin pattern formation and body shape determination. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00013>
- Wehner, D., Tsarouchas, T. M., Michael, A., Haase, C., Weidinger, G., Reimer, M. M., Becker, T., & Becker, C. G. (2017). Wnt signaling controls pro-regenerative Collagen XII in functional spinal cord regeneration in zebrafish. *Nature*



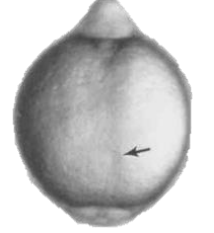



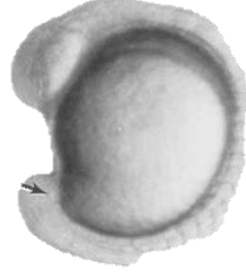
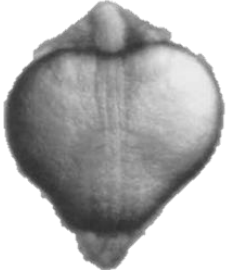
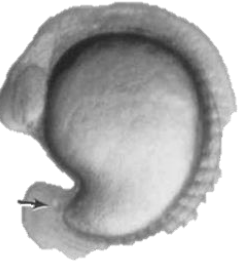
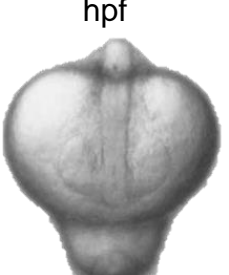

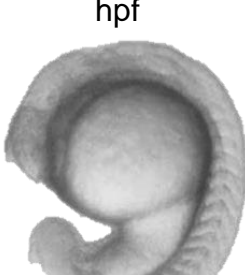


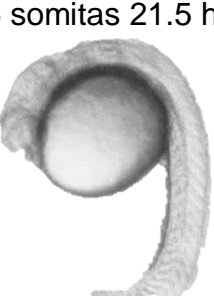

- Communications*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00143-0>
- Yan, Y., Li, Y., Hu, C., Gu, X., Liu, J., Hu, Y. A., Yang, Y., Wei, Y., & Zhao, C. (2009). Expression of Frizzled10 in mouse central nervous system. *Gene Expression Patterns*, 9(3), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2008.11.001>
- Yu, Y., & Schachner, M. (2013). Syntenin-a promotes spinal cord regeneration following injury in adult zebrafish. *European Journal of Neuroscience*, 38(2), 2280–2289. <https://doi.org/10.1111/ejn.12222>
- Zacarias-Fluck, M. F., Jauset, T., Martínez-Martín, S., Kaur, J., Casacuberta-Serra, S., Massó-Vallés, D., del Pozo, E. S., Martín-Fernández, G., González-Larreategui, Í., López-Estévez, S., Brown-Swigart, L., Beaulieu, M. E., Whitfield, J. R., Madan, B., Virshup, D. M., Evan, G. I., & Soucek, L. (2021). The Wnt signaling receptor Fzd9 is essential for Myc-driven tumorigenesis in pancreatic islets. *Life Science Alliance*, 4(5), 1–10. <https://doi.org/10.26508/LSA.201900490>
- Zou, S., Kamei, H., Modi, Z., & Duan, C. (2009). Zebrafish IGF genes: Gene duplication, conservation and divergence, and novel roles in midline and notochord development. *PLoS ONE*, 4(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007026>









## 9. ANEXOS

**Anexo I.** Tabla de desarrollo normal de *Danio rerio* a 28 °C, Kimmel *et al.*, 1995.

1 célula 0.25 hpf 	4 células 1 hpf 	8 células 1.25 hpf 	16 células 1.5 hpf 
Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3	Estadio 4
32 células 1.75 hpf 	64 células 2 hpf 	256 células 2.5 hpf 	Alta 3.33 hpf 
Estadio 5	Estadio 6	Estadio 7	Estadio 8 – Lateral
	Oblonga 3.7 hpf 		Esfera 4 hpf 
Estadio 8.5 Alta a oblonga	Estadio 9	Estadio 9.5 Oblonga a esfera	Estadio 10 – Lateral
Domo 4.33 hpf 	30% epibolia 4.66 hpf 	50% epibolia 5.25 hpf 	Anillo germinal 5.66 hpf 
Estadio 11 - Lateral	Estadio 12 - Lateral	Estadio 13 - Lateral	Estadio 14 - Lateral

Anillo germinal 5.66 hpf 	Escudo 6 hpf 	Escudo 6 hpf 	70% epibolia 7.7 hpf 
<b>Estadio 14 – Polo animal</b>	<b>Estadio 15 – Lateral</b>	<b>Estadio 15 – Polo animal</b>	<b>Estadio 16 – Ventral</b>
75% epibolia 8 hpf 	80% epibolia 8.4 hpf 	90% epibolia 9 hpf 	90% epibolia 9 hpf 
<b>Estadio 16.5 - Lateral</b>	<b>Estadio 17 - Dorsal</b>	<b>Estadio 18 - Lateral</b>	<b>Estadio 18 - Ventral</b>
Brote 10 hpf 	Brote 10 hpf 	2 somitas 10.66 hpf 	2 somitas 10.66 hpf 
<b>Estadio 19 - Lateral</b>	<b>Estadio 19 - Anterior</b>	<b>Estadio 20 - Lateral</b>	<b>Estadio 20 - Anterior</b>
2 somitas 10.66 hpf 	2 somitas 10.66 hpf 	4 somitas 11.33 hpf 	4 somitas 11.33 hpf 
<b>Estadio 20 – Dorsal</b>	<b>Estadio 20 – Ventral</b>	<b>Estadio 21 -Lateral</b>	<b>Estadio 21 - Dorsal</b>
5 somitas 11.66 hpf 	5 somitas 11.66 hpf 	5 somitas 11.66 hpf 	8 somitas 13 hpf 

			
Estadio 22 - Lateral	Estadio 22 - Anterior	Estadio 22 - Ventral	Estadio 23 - Lateral
10 somitas 14 hpf	10 somitas 14 hpf	13 somitas 15.5 hpf	14 somitas 16 hpf
			
Estadio 24 - Lateral	Estadio 24 - Anterior	Estadio 25 - Lateral	Estadio 26 - Dorsal
15 somitas 16.5 hpf	15 somitas 16.5 hpf	15 somitas 16.5 hpf	17 somitas 17.5 hpf
			
Estadio 27 - Lateral	Estadio 27 - Dorsal	Estadio 27 - Anterior	Estadio 28 - Lateral
20 somitas 19 hpf	20 somitas 19 hpf	25 somitas 21.5 hpf	25 somitas 21.5 hpf
			
Estadio 29 - Lateral	Estadio 29 - Anterior	Estadio 30 - Lateral	Estadio 30 - Dorsal
Prim 5		Prim 15	

	
Estadio 31 (24 hpf)	Estadio 32 (30 hpf)
Prim 25	36 hpf
	
Estadio 33 - Lateral	
Prim 25	36 hpf
	
Estadio 33 - Dorsal	
Long pec	48 hpf
	
Estadio 34 - Lateral	
Long pec	48 hpf
	
Estadio 34 - Dorsal	
Pec fin	60 hpf
	
Estadio 35 - Lateral	
Pec fin	60 hpf
	
Estadio 35 - Dorsal	

Protruding mouth

72hpf



Estadio 36 - Lateral

Protruding mouth

72hpf



Estadio 36 – Dorsal