UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

TESIS

"Complejo remodelador de cromatina BAF y su subunidad Smarce1 en la retinogénesis del pez cebra"

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS CON ÁREA TERMINAL EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA:

ALEXIA MONTERO MOLINA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. HILDA MARÍA LOMELÍ BUYOLI

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CUERNAVACA, MOR., FEBRERO 2024

Comité tutoral

- **Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla (Presidente)**

Laboratorio de Biología del Desarrollo

Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM

- **Dra. María Angélica Santana Calderón (Secretario)**

Laboratorio de Inmunología Celular

Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM

- **Dra. Hilda María Lomelí Buyoli (Vocal)**

Departamento De Genética Del Desarrollo y Fisiología Molecular

Instituto de Biotecnología, UNAM

- **Dr. Ramón Antonio González García-Conde (Suplente)**

Laboratorio de Virología Molecular

Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM

- **M.C. Laura Socorro Ramírez Ángeles (Suplente)**

Departamento De Genética Del Desarrollo y Fisiología Molecular

Instituto de Biotecnología, UNAM

Agradecimientos

Se agradece el apoyo al presente trabajo proporcionado por:

Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA).

Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC).

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Instituto de Biotecnología (IBt).

Laboratorio 15, IBt UNAM.

Dra. Hilda María Lomelí Buyoli, tutora de tesis.

M. C. Laura Socorro Ramírez Ángeles, apoyo técnico de laboratorio y guía para este proyecto.

Dr. Enrique Salas Vidal, Dra. Denhi Schnabel Peraza, M. C. Arlen Ramírez Corona, M. C. Jaime Carlos López Rodríguez, M. C. Andrea Cázares Morales, M. C. Dulce I. Benítez Pacheco, Lic. Q.B. María Eugenia Moreno Guerrero, Lic. en C. Brenda Reza Medina, I.B Pedro Martín Gonzaga Sánchez, Carmen Magally Ibarra Cervantes, Paola García Rosales.

Jefatura de la Licenciatura en Ciencias, IICBA.

Jefatura de Servicios Escolares de Licenciatura, IICBA.

Unidad de Docencia y Formación de Recursos Humanos y Unidad de Biblioteca, IBt UNAM.

Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada UNAM.

Unidad de Cómputo, IBt UNAM.

Dedicatoria

A mi familia, Patricia, Martín y Lolita, lo son todo para mí.

A mi mejor amigo, Deziau.

A mis compañeros.

Los quiero a todos, con todo mi corazón.

Resumen

El complejo BAF es un remodelador de la cromatina, dependiente de ATP. Se encuentra en las células eucariotas y está conformado por 12 a 15 subunidades. SMARCE1 es una subunidad de BAF que se encuentra presente en todas las configuraciones del complejo.

Danio rerio, mejor conocido como el pez cebra, es un organismo modelo para estudiar el desarrollo en vertebrados así como enfermedades humanas; 70% de su genoma es homólogo al nuestro y comparte características similares en estructuras como la retina.

En humanos, mutaciones en *SMARCE1* se han visto relacionadas con problemas de la vista, tales como predisposición a melanoma ocular y Síndrome de Coffin-Siris, el cual conlleva, entre múltiples condiciones, a una alteración en la agudeza visual. Estudios previos en *Danio rerio* han demostrado que mutaciones en *smarce1* conducen a defectos en el desarrollo cardiaco, así como anormalidades en la retina.

En este proyecto, se buscó caracterizar el efecto de la mutante *smarce1*$^{-/-}$ en la expresión de marcadores genéticos (*ptf1a*, *vsx1*, *rho*) de distintos linajes neuronales de la retina. Para ello, se realizó hibridación in situ en la retina del pez cebra. Sin embargo, no fue posible generar las sondas para ptf1a y vsx1, de modo que se realizaron los ensayos únicamente para *rho*, un gen esencial para la función de los fotorreceptores llamados bastones. Este ensayo mostró diferencias significativas entre los embriones control y *smarce1*$^{-/-}$, lo que sugirió un papel importante de *smarce1* en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo de la retina.

Índice

Portada ……...1

Comité tutoral ……2

Agradecimientos ……...3

Dedicatoria ……4

Resumen ……5

1. Introducción ……...8

1.1. El complejo BAF……8

1.2. La subunidad SMARCE1……..8

1.3. *Danio rerio* como modelo de estudio……9

1.4. Desarrollo embrionario del pez cebra……10

1.5. Desarrollo de la retina en pez cebra y humano……11

1.6. Estructura y desarrollo de la retina en pez cebra……12

2. Antecedentes……...14

2.1. *SMARCE1* mutante……14

2.2. *smarce1* mutante en *Danio rerio*……14

2.3. Marcadores genéticos de neuronas retinales: *rho, vsx1, ptf1a*……15

3. Hipótesis ……...18

4. Objetivos ……....18

4.1. General……...18

4.2. Particular……...18

5. Materiales y Métodos ……19

5.1. Obtención de embriones de pez cebra……..19

5.2. Inhibición de melanogénesis……..19

5.3. Selección de embriones……..19

5.4. Hibridación *in situ*……19

5.5. Síntesis de sondas de los genes de interés para la hibridación *in situ*……22

5.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)……...22

5.5.2. Aislamiento de los productos obtenidos de la PCR……..23

5.5.3. Transcripción y purificación del transcrito……..23

5.5.4. Análisis de resultados……..24

6. Resultados ……..24

6.1. Síntesis de sondas para *ptf1a* y *vsx1*……24

6.1.1. *ptf1a*……25

6.1.2. *vsx1*……26

6.2. Síntesis de sonda para *rho*……28

6.3. Hibridaciones *in situ* para *rho*……29

7. Discusión ……31

7.1. Generación de sondas para *ptf1a* y *vsx1*……..31

7.2. Relación de BAF con *rho*……32

7.3. Expresión de *rho* reducida en larvas de peces cebra *smarce1*$^{-/-}$……...32

7.4. Implicaciones de la reducción de *rho* en la retina de peces cebra……33

8. Conclusiones ……..34

9. Bibliografía ……..35

1.Introducción

1.1. El complejo BAF

El complejo proteico SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non Fermentable*), también conocido como BAF (*BRG1/BRM-Associated Factor,* donde BRG1 se refiere a "Gen 1 Asociado a Brahma", y BRM a "Brahma") en mamíferos, se encuentra presente en todas las células de los eucariotas en las que se ha estudiado y tiene la capacidad de remodelar la estructura de la cromatina por medio de la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP). La cromatina es una estructura compuesta por ácido desoxirribonucleico (*desoxyribose nucleic acid*, por sus siglas en inglés "DNA") y proteínas asociadas a éste, tales como las histonas. Se ubica dentro del núcleo de las células eucariontes, y puede encontrarse en un estado compactado (heterocromatina), el cual limita la transcripción de genes, o relajado (eucromatina), que es transcripcionalmente activo[1].

El complejo BAF fue descubierto por medio de estudios en *Saccharomyces cerevisiae*, en los cuales se buscaban las mutaciones causantes del cambio de tipo de apareamiento (fenotipo *mating-type switching* SWI) y la falta de fermentación de sacarosa (fenotipo *sucrose non-fermenting* SNF). Así se identificaron los genes *swi1* y *snf2* que, tras purificarse, se vio que codificaban para proteínas que eran parte de un complejo asociado a la organización de la estructura de la cromatina[2,3].

A pesar de que en vertebrados al menos 28 genes son codificantes para subunidades de BAF, el complejo se conforma de entre 12 y 15 proteínas, lo que permite diferentes combinaciones de subunidades homólogas. No obstante, al núcleo del complejo siempre lo forman SMARCB1, SMARCC1, SMARCC2 y una subunidad ATPasa, la cual puede ser SMARCA2/BRM o SMARCA4/BRG1. Estas subunidades son necesarias y suficientes para la remodelación de la cromatina *in vitro*. El resto de las subunidades facilitan la unión de BAF al DNA, y son indispensables para el funcionamiento del complejo *in vivo*[3,4].

1.2. La subunidad SMARCE1

También llamada BAF57, SMARCE1 (*SWI/SNF-Related, Matrix-associated, Actin-dependent Regulator of Chromatin subfamily E, member 1*) es una subunidad de BAF que, a pesar de no formar parte del núcleo central del complejo, se ha encontrado en todas las configuraciones de BAF estudiadas en mamíferos y es esencial para la remodelación de la cromatina in *vivo*[3].

Contiene un grupo de alta movilidad (HMG) como dominio que aporta afinidad de unión al DNA, particularmente a regiones de curvas pronunciadas tales como el DNA cruciforme (*four-way junction DNA*), el cual se cree que tiene similitudes con las áreas donde el DNA entra y sale de los nucleosomas[5]; así como una región *coiled-coil* parecida a la de la cinesina (KLCC), la cual se sugiere que puede relacionarse con la dimerización, así como con la interacción con la proteína CoREST, un cofactor de la proteína represora REST, que actúa reprimiendo genes específicos de neuronas en células no neuronales[5,6]. Existe además un dominio rico en prolinas en el extremo N-terminal, involucrado en la interacción entre proteínas, al igual que una región rica en residuos ácidos del lado C-terminal, la cual se une a SMARCC1/SMARCC2, otorgándole estabilidad y protección a SMARCE1 frente a la ubiquitinación y por lo tanto, degradación[3,7].

SMARCE1 se localiza en el cromosoma 17 en humanos y en el cromosoma 3 en peces cebra (*smarce1*)[8,9,10]. A pesar de ser codificada por un único gen, SMARCE1 puede aportar a la diversidad de ensamblaje del complejo, ya que puede tener al menos tres isoformas con una parte del extremo N-terminal eliminada (N-BAF57) debido a *splicing* alternativo, ocasionando la pérdida del dominio rico en prolinas; estas isoformas en humano, ratón y rata se expresan en neuronas y se asocian en el complejo sustituyendo a BAF57, lo que plantea que los complejos con N-BAF57 llevan a cabo funciones particulares. Existe también otra isoforma sin una parte del C-terminal (C-BAF57)[3,11].

SMARCE1 se ve también relacionado con la regulación de la función de BAF durante las respuestas a hormonas esteroides, ya que se une por medio de sus dominios N-terminal y HMG a los receptores de andrógenos (AR); se ve implicado en la asociación de dichos receptores a la cromatina, y por lo tanto a la activación de genes específicos[12]. Además desempeña un papel en la actividad de los receptores de estrógeno (ER), puesto que al no funcionar de manera adecuada, disminuye la transcripción de los genes blanco de estos receptores[13].

1.3. *Danio rerio* como modelo de estudio

El pez cebra (*Danio rerio)* es un ciprínido de agua dulce originario del sudeste asiático, que se ha vuelto un organismo modelo para estudiar el desarrollo en vertebrados. Su fertilización externa facilita la manipulación de los hasta 200 huevos que una sola hembra puede llegar a poner en una cruza; los embriones son transparentes, lo que facilita la visualización de sus estructuras internas bajo el microscopio, y de rápido crecimiento; de

tal forma que los rudimentos de sus órganos primarios están presentes a las 24 horas post-fertlización (hpf). El genoma del pez cebra cuenta con al menos un ortólogo para 70% de los genes en humano y más del 80% de las proteínas humanas relacionadas con enfermedades, tienen un ortólogo en *Danio rerio*. Éste es el caso de SMARCE1/Smarce1, cuyas variantes patogénicas o mutantes se han visto implicadas, entre otras cosas, en alteraciones de la retina, en las cuales se enfocó en este proyecto[3,14-16].

1.4. Desarrollo embrionario del pez cebra

En *Danio rerio*, el huevo recién fertilizado se mantiene como un cigoto aproximadamente 40 minutos hasta que la primera división sucede y entra en el periodo de *cleavage*, donde ocurren divisiones rápidas, sincronizadas y meroblásticas, únicamente en el blastodisco en el polo animal; en el polo vegetal se encuentra el vitelo, el cual proveé al embrión con los nutrientes necesarios hasta que le sea posible alimentarse.

Entre las 512 y 1000 células, empieza la transición de la blástula media. Previamente, el desarrollo ha avanzado desde un control por mRNA sintetizado durante la ovogénesis y almacenado en el huevo (transcritos maternos), pero en esta etapa comienza la transcripción del genoma embrionario. Por otro lado, se observan movimientos del embrión por primera vez, los ciclos celulares se vuelven más largos y se comienza a formar la capa sincital vitelina (CSV) por la fusión de las células en el borde vegetal del blastodisco, con las del vitelo debajo. Después de las 4 hpf comienza la epibolia, donde la CSV y el blastodisco se expanden sobre el vitelo. La epibolia continúa hasta la etapa de gastrulación (5 ¼-10 hpf), donde movimientos morfogenéticos darán lugar a las capas germinales (ectodermo, mesodermo, endodermo).

La segmentación (10-24 hpf) y la neurulación en el pez cebra son procesos que se superponen. Cuando la segmentación inicia, la placa neural ya se ha dividido en múltiples regiones que dan lugar a distintas partes del sistema nervioso central; eventualmente, a partir la zona anterior se formará el cerebro, y con ello, los ojos. Para ello, ocurre la internalización de la placa neural, que hacia las 12 hpf lleva a la quilla neural. Ésta masa celular más tarde se redondea hasta convertirse en un cilindro que se ahueca, formando el tubo neural. Durante la segmentación también se generan las somitas del embrión y éste se alarga.

En el periodo de segmentación (10-24 hpf) se generan las somitas y el embrión se alarga. Más tarde, en la etapa de faríngula (24-48 hpf) el embrión comienza a enderezarse e inicia

el desarrollo de estructuras como las aletas, corazón y retina. Entre las 48 y 72 hpf es común que las larvas eclosionen; para este momento sus órganos primarios están formados[17].

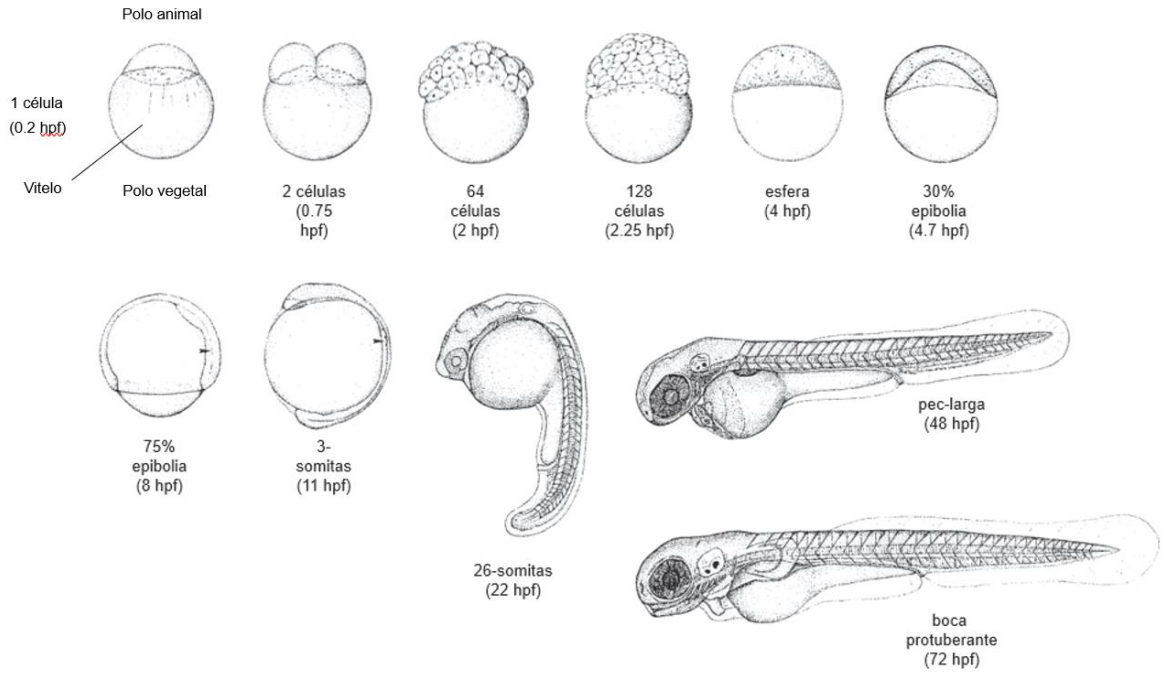

Figura 1. Estadios en el desarrollo embrionario del pez cebra. Adaptado de Kimmel, C., et al. (1995)[17].

1.5. Desarrollo de la retina en pez cebra y humano

Tanto en el pez cebra como en humanos, el desarrollo de la retina comienza con la formación de las vesículas ópticas. Esto sucede cuando, en humano, alrededor de la cuarta semana de gestación, se originan los surcos ópticos a cada lado del prosencéfalo, los cuales producen evaginaciones que resultan en la generación de estas vesículas[14]. En el pez cebra, a partir de la quilla neural los primordios ópticos se evaginan y dentro de estos se forman cavidades que se extienden para crear dichas vesículas a las 16 hpf[14,18].

En ambos organismos, las vesículas ópticas y el ectodermo superficial sobre estas (que pasará a formar la placoda del cristalino) se señalizan de manera recíproca, induciendo a formar las copas ópticas, que tendrán una capa externa que dará lugar al epitelio pigmentario retinal y una capa interna neuroepitelial que llevará a la retina (Fig. 2)[14].

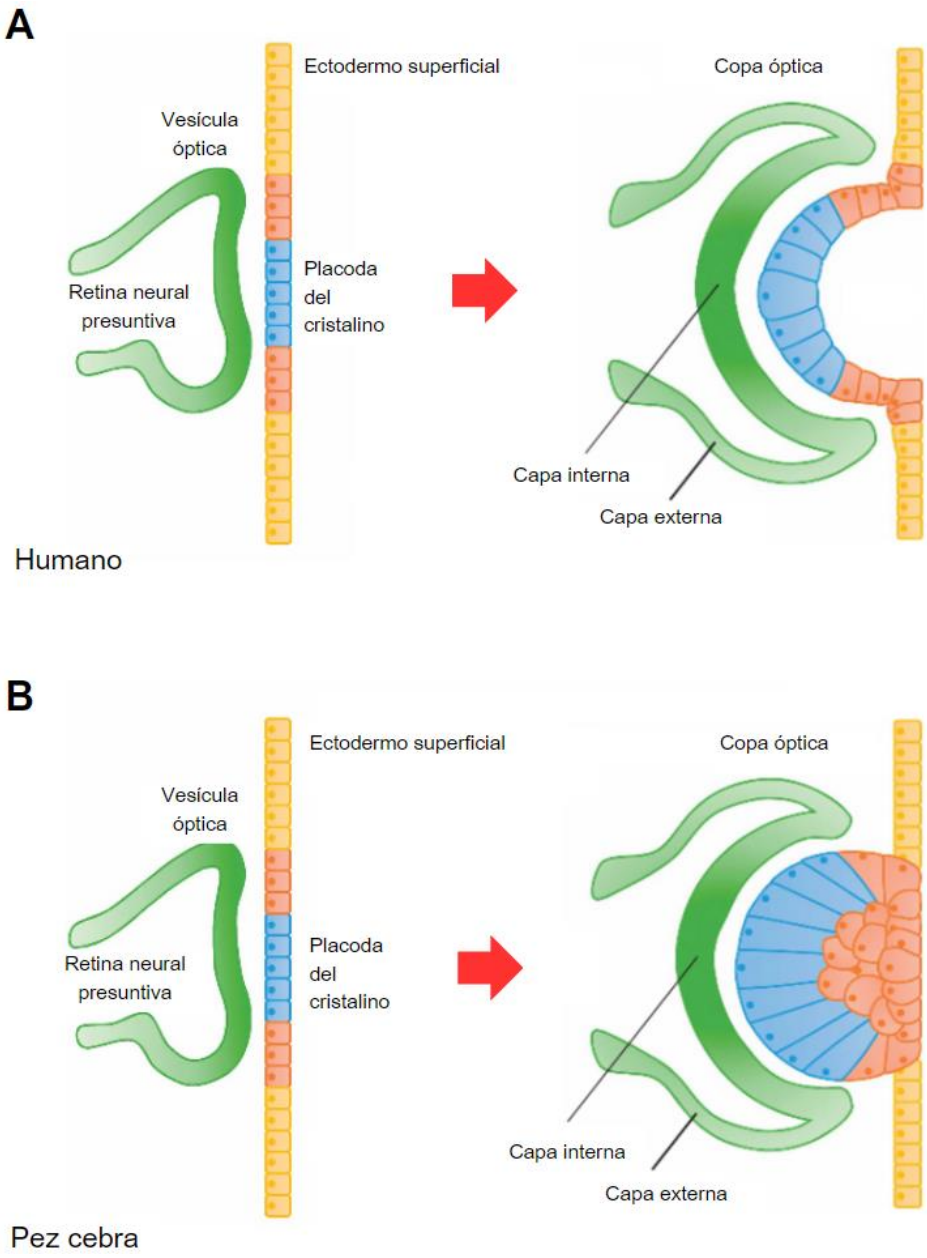

Figura 2. Desarrollo de la retina en humano (A) y pez cebra (B). Adaptado de Richardson, R., et al. (2016)[14]

1.6. Estructura y desarrollo de la retina en pez cebra

Como en la mayoría de los vertebrados, la retina se compone de múltiples capas. En la capa nuclear externa se recibe la luz y se transforma en señales por medio de células fotorreceptoras, que en *Danio rerio* son cuatro tipos de conos y un tipo de bastones, cuyos cuerpos celulares se localizan en esta capa. Los fotorreceptores extienden sus axones

hacia la capa plexiforme externa, donde hacen sinapsis con células bipolares y horizontales, debido a que sus prolongaciones se encuentran ahí. La capa nuclear interna alberga las somas de las células horizontales, bipolares, amácrinas y de Müller. La capa plexiforme interna contiene prolongaciones de las células amácrinas, ganglionares y bipolares, que hacen conexiones sinápticas. Por último, como su nombre sugiere, la capa de células ganglionares contiene los cuerpos de éstas, cuyos axones forman el nervio óptico, el cual transmite la información visual hacia el cerebro. Además, a lo largo de toda la retina se encuentran presentes las células de Müller, que son células gliales.[19,20]

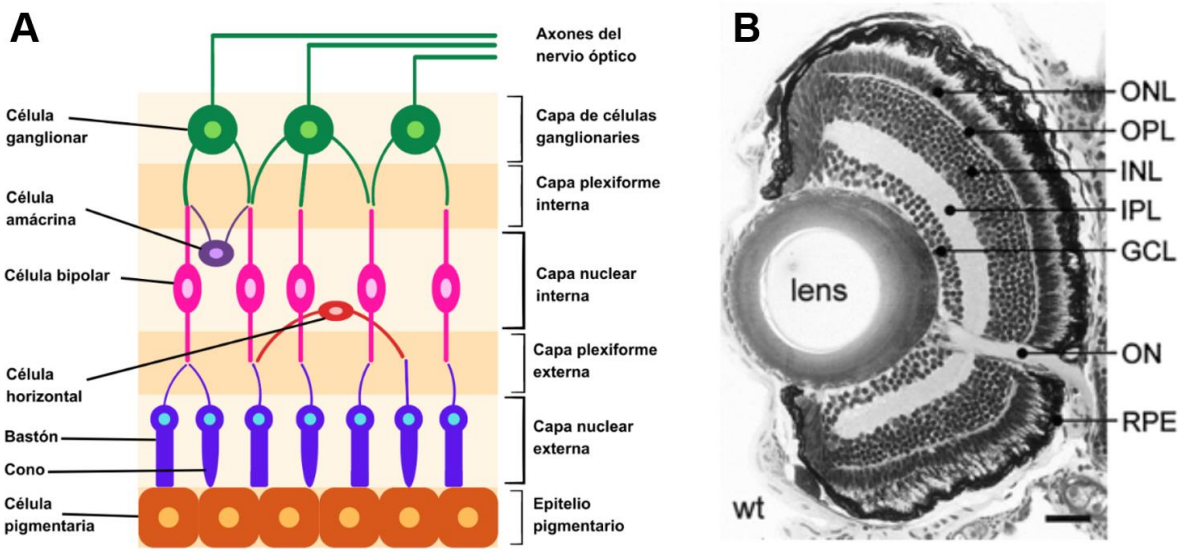

Figura 3. (A) Capas de la retina en vertebrados. (B) Histología de la retina en embrión de pez cebra WT. ONL, capa nuclear externa; OPL, capa plexiforme externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa celular ganglionar; ON, nervio óptico; RPE, epitelio pigmentario de la retina. Tomado de Neuhauss, S. C., et al. (1999)[21].

La diferenciación de las neuronas de la retina del pez comienza con las ganglionares, al aparecer sus primeras células postmitóticas alrededor de las 27 hpf en la región ventronasal del ojo. A éstas le siguen las células de la capa nuclear interna (amácrinas, horizontales y bipolares) cerca de las 38 hpf, y 10 horas después las neuronas de la capa nuclear externa. Es a las 72 hpf que se muestra función visual[14,22].

Los linajes neuronales de la retina expresan marcadores característicos cuando inician su diferenciación, tales como *atoh7* para las ganglionares, *ptf1a* para las células horizontales y amácrinas, *vsx1* para las bipolares, *rho* para los bastones y *sws2* para los conos[23-27].

2. Antecedentes

2.1. *SMARCE1* mutante

Mutaciones en este gen en humanos se asocian al Síndrome de Coffin-Siris, una discapacidad intelectual caracterizada por múltiples anomalías tales como un retraso en el desarrollo, en las capacidades cognitivas y afectaciones a la vista (reducción de la agudeza visual, relacionado a un mal funcionamiento de los fotorreceptores), entre otras. Variantes patogénicas de *SMARCE1* también se ven implicadas en la predisposición a melanoma ocular uveal, así como otros tipos de cáncer[16,28,29].

2.2. *smarce1* mutante en *Danio rerio*

Previamente en nuestro grupo de trabajo, para la tesis de Castillo-Robles, J.[3] ,se generaron mutaciones en el gen *smarce1* por medio de CRISPR/Cas9, las cuales debido a deleciones de pares de bases, ocasionaron el desplazamiento del marco de lectura abierto en la secuencia del transcrito de *smarce1*, lo que resultó en un codón de paro prematuro que llevó a la producción de un péptido carente de un carboxilo terminal regular.

En un primer trabajo, se centraron en el análisis de las afectaciones en el corazón en mutantes *smarce1*$^{-/-}$ descendientes de peces heterocigotos *smarce1*$^{+/-}$. Las mutantes homocigotas resultaron en defectos en el desarrollo endocardial, lo que llevó a un tubo cardíaco deforme; edema pericardial y el aumento en la expresión de factores de transcripción cardiacos.

Además, se observaron los efectos de la pérdida de Smarce1 sobre otras estructuras, tales como una curvatura anormal del cuerpo y una disminución en el tamaño de los ojos (Fig. 4)[10]. Tras analizar el transcriptoma de estas larvas de 5dpf, se reveló que el grupo de genes mayormente afectados en su expresión corresponde al de factores transcripcionales asociados a la fototransducción. Los genes de fototransducción se expresan en los fotorreceptores y codifican para factores que llevan a cabo la conversión de la luz en señales biológicas.

Tanto individuos silvestres como heterócigos smarce1$^{+/-}$ presentaron un fenotipo normal, aunque estos últimos mostraron una disminución en la expresión de Smarce1 en comparación con los embriones silvestres. Por otro lado, los embriones homócigos *smarce1*$^{-/-}$ presentaron el fenotipo anormal mencionado y la proteína se encontraba ausente por completo.

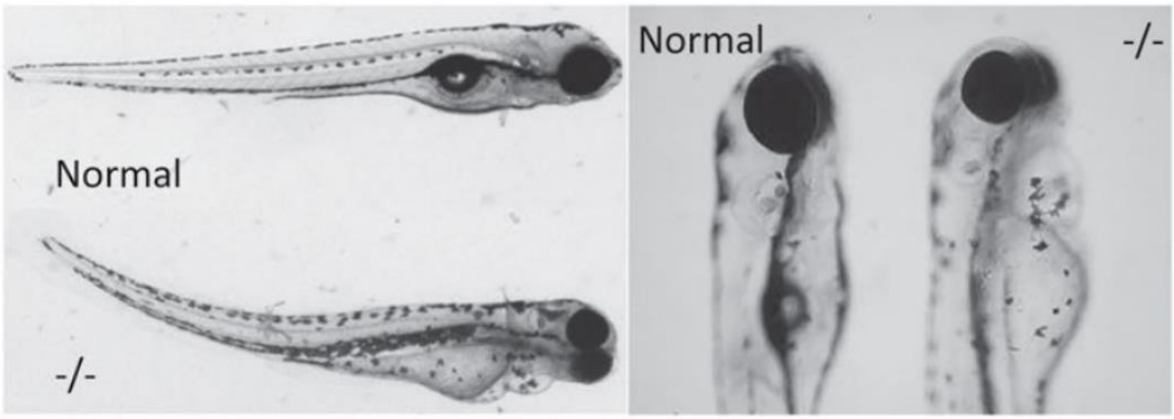

Figura 4. Fenotipo normal y anormal de peces cebra a los 4dpf, provenientes de una cruza de *smarce1*$^{+/-}$, donde el anormal (presente en todos los mutantes *smarce1*$^{-/-}$) se caracteriza por un edema cardiaco, curvatura en el eje corporal y menor tamaño del ojo. Tomado de Castillo-Robles J. (2019)[10].

En el laboratorio, la M. en C. Laura Socorro Ramírez Ángeles, ha analizado la afectación de *smarce1* mutante en la retina de peces de la línea transgénica SoFa (*Spectrum of Fates*). En estos peces se expresa fluorescencia en diferentes colores para marcadores característicos de cada uno de los linajes neuronales: *atoh7* para células ganglionares, *ptf1a* para células amácrinas y horizontales, y *crx* para células bipolares y fotorreceptores. Las observaciones de Laura Ramírez indican que en los mutantes *smarce1*$^{-/-}$ se presentan alteraciones en la retina, revelando una desorganización en las células horizontales, de modo que ya no se ven continuas; en las ganglionares, cuyos axones no se extienden correctamente; y en los fotorreceptores, de los cuales se ha visto una presencia ectópica en otras capas. Además, se mostró muerte en las células bipolares, un aumento en la proliferación de los fotorreceptores (donde lo que se muestra es la fosforilación de la h3, un marcador de mitosis) y una disminución en el tamaño del ojo (Fig. 5). Éste proyecto es una contribución a dicho trabajo.

Figura 5. Análisis de los efectos de la mutante *smarce1* en neuronas retinales y el tamaño del ojo, en peces cebra transgénicos SoFa. Vista ventral. Adaptado de Laura Socorro Ramírez Ángeles.

2.3. Marcadores genéticos de neuronas retinales: *rho, vsx1, ptf1a*

Como se mencionó previamente, los genes *rho, vsx1* y *ptf1a* son marcadores genéticos de diferentes neuronas en la retina, de modo que permiten observar los linajes celulares a los que corresponden. Por esta razón, se decidió seguir su expresión en el presente trabajo, con el motivo de analizar el efecto de la mutante *smarce1*$^{-/-}$ en neuronas retinales del pez cebra.

El fotopigmento rodopsina es una proteína codificada por el gen *rho*, la cual capta la luz en los bastones y como se mencionó antes, desencadena una respuesta llamada fototransducción[30]. En esta cascada de transducción visual participan una variedad de proteínas como receptores asociados a proteínas G, intercambiadores y canales de sodio, calcio, potasio, cinasas, etc. El resultado final es la apertura de canales iónicos que regulan la sinapsis. La expresión de *rho* se ha descrito en la retina de peces cebra silvestres a las 72 hpf; en Zhang, Y., et al.[31], concentrada tanto en la zona ventral como en la capa nuclear externa, y en Chen, H., et al.[32] también con una acumulación en la región ventral (Fig. 6).

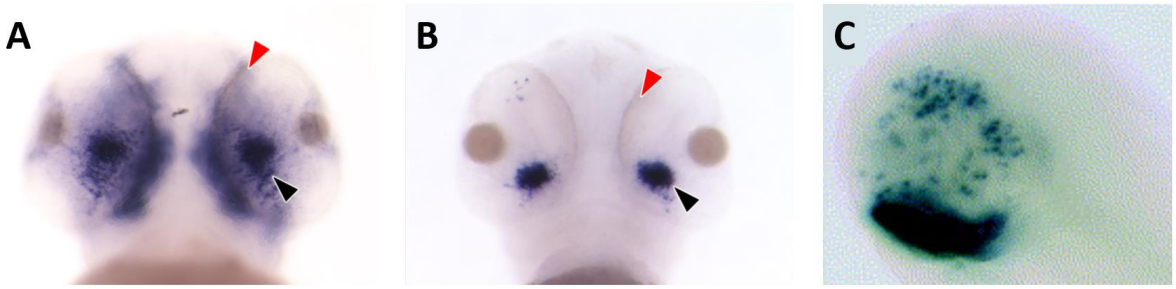

Figura 6. Expresión del gen *rho* en la retina de peces cebra silvestres a las 72 hpf. La flecha negra indica la tinción en la parte ventral y la flecha roja en la capa nuclear externa (A,B). Adaptado de Zhang, Y., et al. (2012). [31] (A,B) y Chen, H., et al. (2007). [32] (C).

Vsx1 es una homeoproteína que es requerida para la diferenciación de las células bipolares. Estas células hacen sinapsis con los conos y participan en la regulación de la percepción de la visión fotópica[25]. En peces cebra silvestres (72 hpf), la expresión de *vsx1* se visualizó en la parte externa de la capa nuclear interna (Fig. 7)[33].

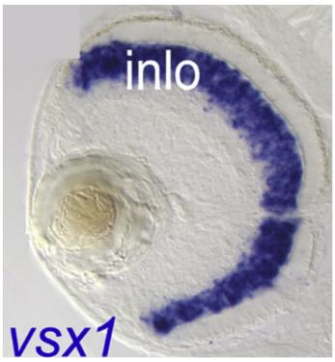

Figura 7. Expresión del gen *vsx1* en la retina de una larva de pez cebra silvestre a las 72 hpf, en la parte externa de la capa nuclear interna (*outer part of the inner nuclear layer*, "inlo"). Adaptado de Yokoi, H., et al. (2009). [33]

Ptf1a se expresa en las interneuronas inhibitorias (células horizontales y amácrinas) de la retina, y es importante para la determinación de sus destinos celulares[24]. En Jusuf, P., Harris, W.[24] se demostró una expresión en la retina de peces cebra silvestres (72 hpf) a partir de las 35 hpf hasta las 65 hpf (Fig. 8).

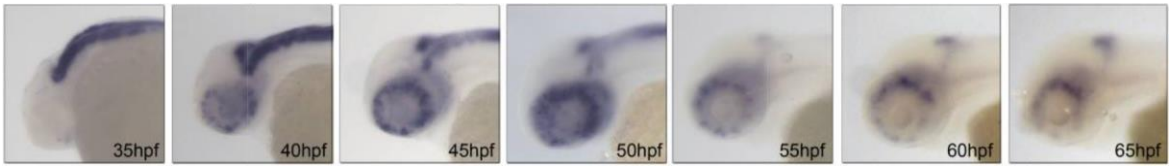

Figura 8. Expresión del gen *ptf1a* en la retina de una larva de pez cebra silvestre, desde las 35 hpf hasta las 65 hpf. Tomado de Jusuf, P., Harris, W. (2009).[24]

3. Hipótesis

La alteración en la expresión de *rho*, *vsx1* y *ptf1a* en peces cebra mutantes *smarce1*$^{-/-}$, afecta el desarrollo y determinación de los bastones, células bipolares, amácrinas y horizontales en la retina.

4. Objetivos

4.1. General

Evaluar los efectos de la pérdida de función del gen *smarce1* en la determinación y diferenciación de cuatro linajes neuronales de la retina: los bastones, las células bipolares, las amácrinas y las horizontales.

4.2. Particular

Identificar por medio de hibridación in situ de montaje completo (WISH), los patrones de expresión transcripcional de los genes *rho, vsx1* y *ptf1a*, en retinas de embriones de peces cebra control y mutantes *smarce1*$^{-/-}$.

5. Materiales y métodos

5.1. Obtención de embriones de pez cebra

Se cruzó un grupo de peces cebra adultos s*marce1*$^{+/-}$, crecidos con anterioridad en el laboratorio. Se colocó a los peces en cajas y estos fueron separados de acuerdo a machos y hembras de modo que no estuvieran en contacto físico, pero pudiesen mandarse señales por medio del agua que compartían durante la noche. Se encontraban además dentro de una red que les permitía tener movimiento, pero prevenía que se comiesen a los huevos una vez estos fueran liberados. Esto ocurrió a la mañana siguiente al retirar la separación y reducir el espacio de nado por medio de la inclinación de la caja, de modo que los peces pudiesen interactuar y tener un mayor roce entre ellos, estimulando su reproducción, así como el prender un foco para simular la luz solar, ya que en la naturaleza estos peces se reproducen al amanecer. Los embriones se lavaron con agua de acuario y se colocaron en cajas Petri, para incubarlos a 28°C hasta que llegaron a una fase del desarrollo deseada, donde se eligieron los peces que presentaron el fenotipo de la etapa seleccionada y fueron los utilizados para llevar a cabo experimentos, tratando de preservar la sincronización de los embriones.

5.2. Inhibición de melanogénesis

Previo a las 24 hpf los embriones se sometieron a un medio con feniltiourea (PTU) para evitar la melanogénesis[34], lo que facilita la observación de las tinciones que muestran la expresión de los genes de interés. Se realizó un cambio de medio una vez al día, incubándolos a 28°C hasta llegar a las 72 hpf.

5.3. Selección de embriones

Una vez cumplidas las 72 hpf, las larvas se separaron en dos grupos: las que presentaron un fenotipo anormal (mutantes *smarce1*$^{-/-}$) y las que mostraron un fenotipo normal (como embriones silvestres). El fenotipo anormal se ve caracterizado por la presencia de un edema cardiaco en las larvas, el cual en el trabajo de Castillo-Robles, J.[3], se confirmó por medio de la genotipificación de los peces, que es una forma correcta de identificar a los mutantes.

5.4. Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* de montaje completo (WISH) es una técnica que facilita el análisis de la expresión de genes, debido a que permite visualizar su distribución en diferentes tejidos

en las etapas del desarrollo por medio de sondas de ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*, por sus siglas en inglés “RNA”) antisensido marcadas con digoxigenina (DIG)[35].

Esta sonda se hibrida con su secuencia complementaria en la muestra biológica. La sonda marcada con DIG es reconocida por anticuerpos, los cuales están unidos a enzimas como la fosfatasa alcalina, que al entrar en contacto con su sustrato (BCIP, NBT) se produce un precipitado con una coloración que hace posible ver la reacción.

Se llevó a cabo una adaptación del protocolo “*High Resolution Whole Mount In Situ Hybridization within Zebrafish Embryos to Study Gene Expression and Function”* por Babykumari P. Chitramuthu y Hugh P.J. Bennett[35], del cual se describirá un resumen a continuación.

El PTU se retiró por medio de lavados con agua para embriones conteniendo dietilpirocarbonato (DEPC), un inactivador de RNasas. Posteriormente se sacrificaron por medio de inmersión en agua, siguiendo los lineamientos establecidos por los Institutos Nacionales de la Salud (NIH por sus siglas en inglés)[36]. Los embriones se fijaron con paraformaldehido (PFA) al 4% durante toda la noche, se lavaron con PBST (buffer fosfato salino [PBS], Tween 20 al 0.1%) y se deshidrataron gradualmente con metanol al 25%, 50% y 75% en PBST, de modo que pudieran almacenarse a -20°C hasta varios meses.

Para llevar a cabo la hibridación *in situ*, los embriones se rehidrataron y permeabilizaron con Proteinasa K (0.5 µl/ ml) para romper las membranas celulares, reacción que se detuvo con PFA al 4%. Más tarde, se agregó solución de prehibridación (Tabla 1), que posteriormente se cambió por solución de hibridación (Tabla 2) para la unión de la sonda a su secuencia blanco dentro de la muestra biológica. Los embriones permanecieron en ella toda la noche, a 70°C. Al día siguiente, los embriones se incubaron primero con buffer de bloqueo (Tabla 3) y posteriormente con el anticuerpo anti-DIG 1:2000 en nuevo buffer de bloqueo durante la noche, a 4°C. A continuación, el anticuerpo se retiró y se le agregó a los embriones solución AP– (Tabla 4), que después se reemplazó por AP+ (Tabla 5). Se añadió solución de revelado (realizada con AP+, Tabla 6) y se mantuvieron los embriones en oscuridad, a la espera de la señal. Una vez que fue posible observar la tinción que mostraba el patrón de expresión, se detuvo la reacción con solución STOP (Tabla 7) para después poder almacenar los embriones en glicerol a 4°C.

Reactivo	Concentración
Formamida	50%
Solución de citrato de sodio salino (SSC)	5X
Tween 20	0.1%
Ácido cítrico	10mM

Tabla 1. Solución de prehibridación

Reactivo	Concentración
Formamida	50%
SSC	5X
Tween 20	0.1%
Ácido cítrico	10 mM
Heparina	50 µg/ml
tRNA	50 µg/ml
Sonda	400 ng/ml

Tabla 2. Solución de hibridación

Reactivo	Concentración
PBST	1X
Suero de oveja/cabra	2%
Seroalbúmina bovina (BSA)	2 mg/ml
Blocking	0.2%
DMSO	1%

Tabla 3. Buffer de bloqueo

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 9.5	1 M
NaCl	5 M
Tween 20	1 µl/ml

Tabla 4. Solución AP-

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 9.5	1 M
NaCl	5 M
Tween 20	1 µl/ml
$MgCl_2$	1 M

Tabla 5. Solución AP+

Reactivo	Concentración
BCPI	3.5 µl/ml
NBT	3.5 µl/ml

Tabla 6. Solución de revelado

Reactivo	Concentración
PBST	1X
EDTA	1 mM
Tween 20	0.1%

Tabla 7. Solución STOP

5.5. Síntesis de sondas de los genes de interés para la hibridación *in situ*

5.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A través de reacciones en cadena realizadas por la enzima DNA polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific, F530L), aislada de la bacteria extremófila *Pyrococcus furiosus,* se amplificaron fragmentos de los genes *rho, vsx1* y *ptf1a*; cada uno mediante sus respectivos oligonucleótidos (Tabla 8), los cuales han sido previamente reportados para la generación de sondas[37]. Éstos tienen unida la secuencia promotora de la enzima T7 (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA) al oligo inverso, para la posterior transcripción. Se realizaron reacciones de 15 µl (Tabla 9) con las condiciones de PCR previamente reportadas para el uso de estos oligos[38].

Gen	Oligo directo	Oligo inverso	Tamaño de producto

			esperado (Primer-BLAST)
rho	GGC TAA AGT CGC TTG TAG TAC TGG	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG ACT CTC AAA ACT GTC TTT TGG T	884 pb
vsx1	GGA ACT CTC AAA AGA GGA AAA AGA G	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG AGC AAC AAC ATA AAA ACC CTT	720 pb
ptf1a	CAT TCA CAG GCT TAG ACT CTT TCT C	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG AAA AAG GCT GAA ACA CAG ATA G	897 pb

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos de interés de *rho, vsx1* y *ptf1a*

Reactivo	Cantidad
H_2O MiliQ	8.85 µl
Buffer Phusion HF	3 µl
Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)	0.3 µl
Oligonucleótidos	0.6 µl
cDNA de embriones de pez cebra	2 µl
DNA polimerasa	0.25 µl

Tabla 9. Reacción de PCR (15 µl)

5.5.2. Aislamiento de los productos obtenidos de la PCR

Se empleó el uso del Kit de Purificación de Productos de PCR de Alta Purificación (*High Pure PCR Product Purification Kit*) de la compañía Roche; así como precipitación del DNA por butanol. Los resultados se vieron cargando las muestras en un gel de agarosa, basando el tamaño de las bandas de acuerdo con el marcador de peso molecular de DNA "*GeneRuler DNA Ladder Mix*" (Thermo Scientific,).

5.5.3. Transcripción y purificación del transcrito

Para la generación de mRNA a partir del DNA molde, se utilizaron nucleótidos marcados con DIG, la enzima RNA polimerasa T7 (Roche, 10881775001) y el DNA previamente purificado; siempre tratando de mantener un ambiente libre de RNasas (Tabla 10).

El producto fue precipitado por medio de cloruro de litio (ClLi) 7.5 M y etanol absoluto, para después observarse al cargar una muestra en un gel de RNA realizado con agarosa, MOPS 1X y formaldehido 5%, tomando como referencia de tamaño al marcador de peso molecular de RNA *RiboRuler High Range RNA Ladder, ready-to-use*" (Thermo Scientific).

Reactivo	Cantidad
H_2O MiliQ	4 µl
Buffer	2 µl
Nucleótidos marcados con DIG	2 µl
Inhibidor de RNasas	1 µl
DNA	10 µl
RNA polimerasa T7	1 µl

Tabla 10. Transcripción para generar sonda de RNA (20 µl)

5.5.4. Análisis de resultados

Por medio de un microscopio de campo claro se observó la expresión de los genes de interés en los embriones de pez cebra, y se tomaron fotografías con la cámara de microscopio Axiocam 208 (ZEISS) para comparar los resultados entre peces con un fenotipo normal y anormal.

6. Resultados

6.1. Síntesis de sondas para *ptf1a* y *vsx1*

A pesar de seguir el mismo procedimiento descrito en la metodología previa para los tres genes, los resultados obtenidos no fueron los esperados y no fue posible sintetizar las sondas para *vsx1* y *ptf1a*. Por lo tanto, en este proyecto sólo se generó la sonda para el gen *rho.*

6.1.1. ptf1a

Se realizó la PCR para amplificar el fragmento de interés de ptf1a, esperando obtener una banda de aproximadamente 900 pb (Fig. 9, Tabla 8), sin embargo, se observaron también bandas inesperadas (Fig. 11A).

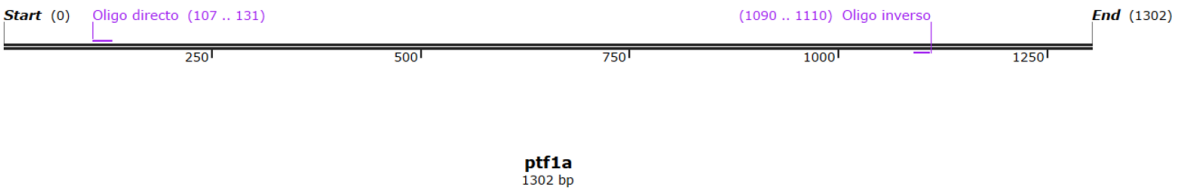

Figura 9. Secuencia de *ptf1a* en *Danio rerio* y los sitios de unión de sus oligos directo e inverso (Tabla 8). Desde el nucleótido 683, hasta el 789, se encuentra un intrón (NCBI). Esquema realizado con: SnapGene Viewer.

Con el fin de obtener una amplificación más precisa, se realizó una PCR con un oligo directo diferente (CCCACACAGTGACGCCTTA) junto con el oligo inverso original (Tabla 8). Se esperaba un producto de alrededor de 380 pb (Fig. 10), que se pudo observar en el gel (Fig. 11B). Con este producto se llevó a cabo la transcripción, sin embargo, al cargar la muestra en un gel de RNA, sólo se detectó una banda de tamaño mayor al DNA que se usó como templado (Fig. 11C).

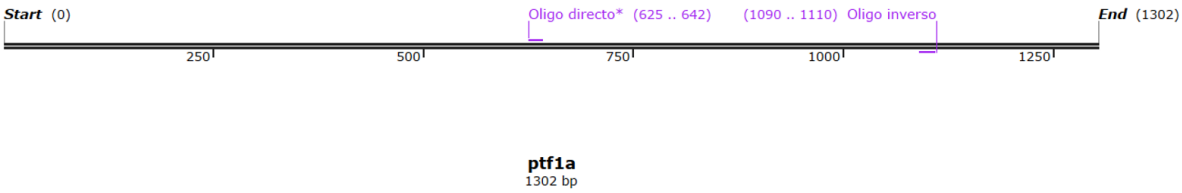

Figura 10. Secuencia de *ptf1a* en *Danio rerio* y los sitios de unión de sus oligos directo* (CCCACACAGTGACGCCTTA) e inverso (Tabla 8). Desde el nucleótido 683, hasta el 789, se encuentra un intrón (NCBI). Esquema realizado con: SnapGene Viewer.

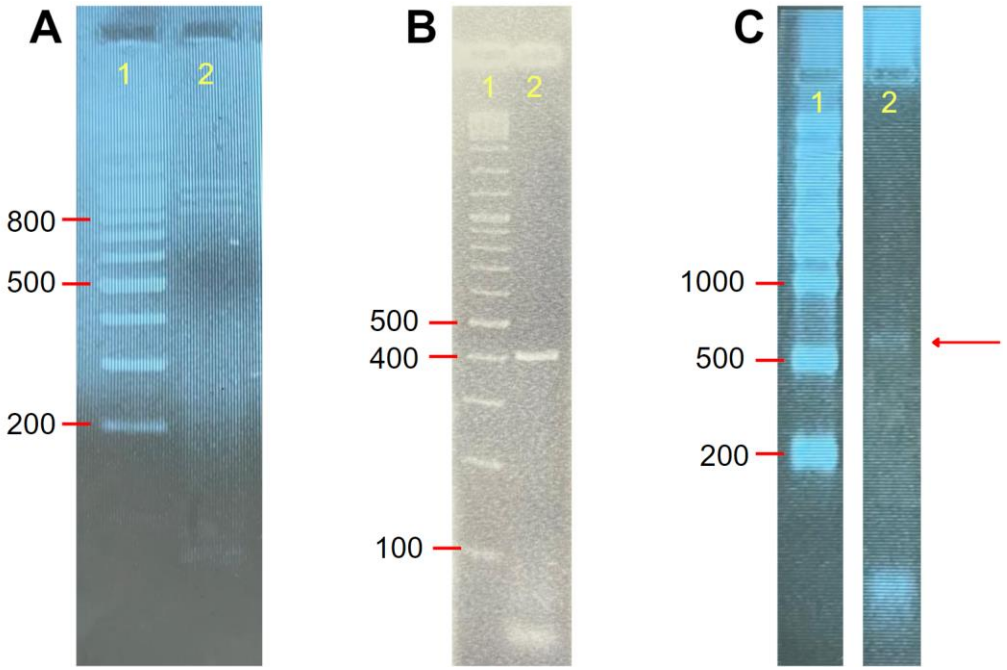

Figura 11. (A) Producto de PCR de *ptf1a* (~900 pb). (B) Producto de PCR de *ptf1a* (~380 pb). (C) Resultado de la transcripción del producto de PCR de ~380 pb.

6.1.2. vsx1

Se amplificó el fragmento de alrededor de 720 pb esperado para *vsx1* (Fig. 12, Tabla 8) y se observó en un gel de agarosa (Fig. 14A); posteriormente, se utilizó como templado para llevar a cabo la transcripción. Una muestra se esta reacción se cargó en un gel, donde no se detectó ningún producto. (Fig. 14B).

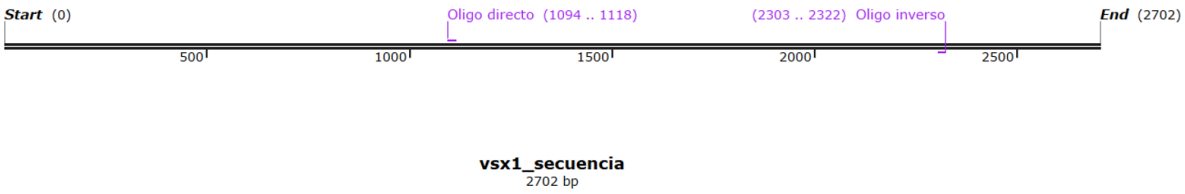

Figura 12. Secuencia de *vsx1* en *Danio rerio* y los sitios de unión de sus oligos directo e inverso (Tabla 8). Dentro de la secuencia entre oligos, se encuentran tres intrones: nucleótidos 1128-1220, 1345-1429, 1623-1943 (NCBI). Esquema realizado con: SnapGene Viewer.

Con un oligo directo distinto (TAGGTGAGCCAGCAGGAATG), pero manteniendo el inverso original (Tabla 8), se realizó una PCR donde se estimaba un producto de aproximadamente

400 pb (Fig. 13), mismo que se detectó en un gel, así como una banda entre 100 y 200 pb (Fig. 14C). El producto se transcribió y precipitó; sin embargo, las bandas observadas en el gel de RNA no fueron coincidentes con el peso esperado, mostrándose arriba de los 500 pb (Fig. 14D), lo que nuevamente sugirió que se trataba del DNA usado como templado. Para tener certeza de que lo observado en el gel fuera RNA, el producto de la transcripción se trató con la DNasa Turbo (Thermo Fisher), después de lo cual se vio que se perdió la banda esperada; sin embargo, se observó una de alrededor de 500 pb (Fig. 14E).

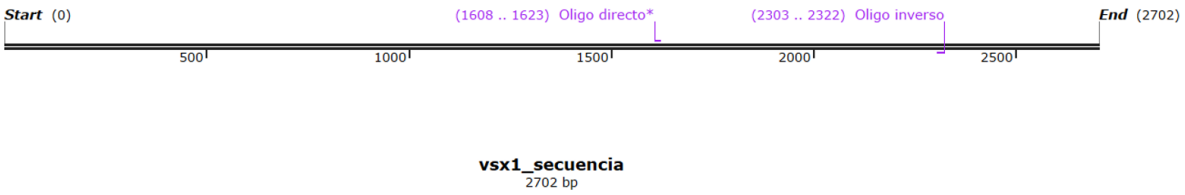

Figura 13. Secuencia de *vsx1* en *Danio rerio* y los sitios de unión de sus oligos directo (TAGGTGAGCCAGCAGGAATG), e inverso (Tabla 8). Desde el nucleótido 1623 al 1943, se encuentra un intrón (NCBI). Esquema realizado con: SnapGene Viewer.

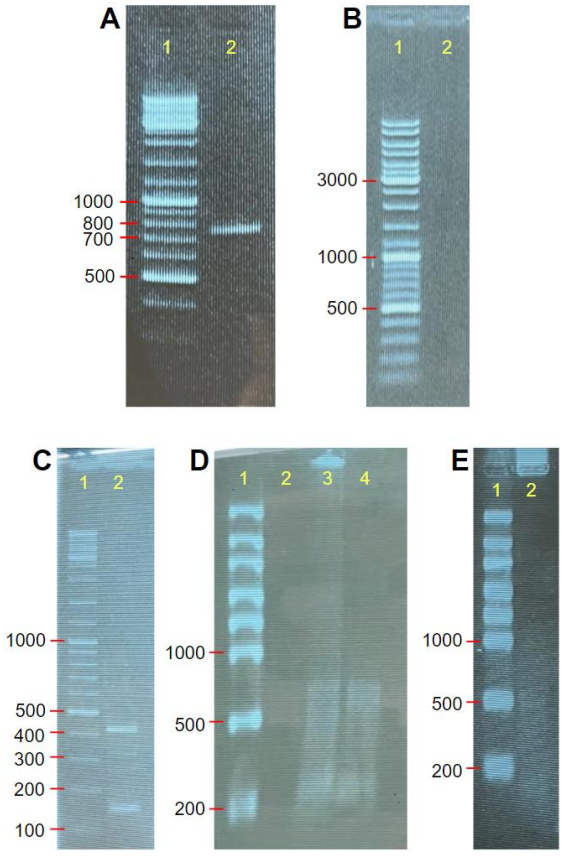

Figura 14. (A) Producto de PCR de *vsx1* (~720 pb). (B) Transcripción del producto de ~720 pb de *vsx1*. (C) Producto de PCR de vsx1 (~400 pb). (D) Transcripción del producto de ~400 pb de *vsx1* (carril 3) y su precipitación (carril 4). (E) Transcrito precipitado post-tratamiento con DNasa Turbo.

6.2. Síntesis de sonda para *rho*

El fragmento de interés de *rho*, genera un producto de PCR de aproximadamente 880 pb (Fig. 15, Tabla 8) coincidente con la banda observada en un gel de agarosa, de entre 800-900 pb (Fig. 16A).

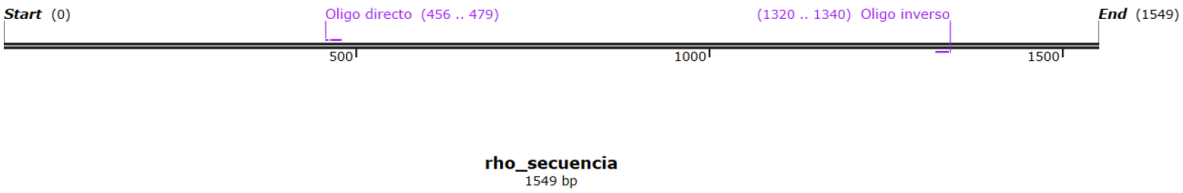

Figura 15. Secuencia de *rho* en *Danio rerio* y los sitios de unión de sus oligos directo e inverso (Tabla 8). Esquema realizado con: SnapGene Viewer.

Posteriormente, se aisló el producto y se realizó la transcripción y precipitación del transcrito (Fig. 16B), dando como resultado una sonda con una concentración de 275.1 ng/µl, de acuerdo con el Nanodrop.

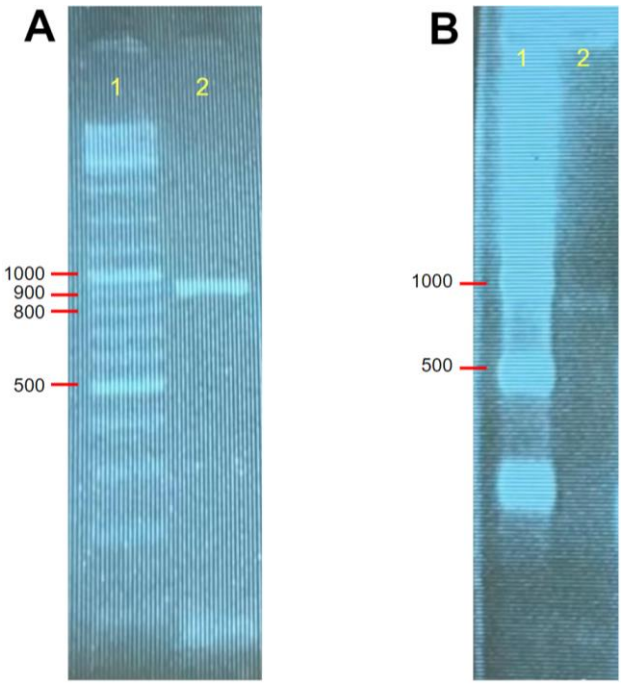

Figura 16. (A) Producto de PCR de *rho* (~880 pb). (B) Transcripción del producto de ~880 pb de *rho*.

6.3. Hibridaciones *in situ* para *rho*

Se realizaron dos ensayos independientes con larvas de 72 hpf, con un N total de 22 controles con fenotipo normal (las cuales no presentaban ninguno de los rasgos físicos característicos de la mutación descritos por Castillo-Robles, J.[3]), 16 con fenotipo anormal (*smarce1*$^{-/-}$) y 10 controles negativos (embriones de fenotipo normal que no fueron expuestos a la sonda). Cinco horas tras la exposición a la solución de revelado, se detuvo la reacción.

Los fenotipos de la expresión de *rho* se clasificaron en grupos: disperso y focalizado (ambos en la parte ventral de la retina); así como otro sin expresión. Si bien tanto el fenotipo de expresión dispersa, como el de focalizada, presentaron diferentes niveles de intensidad dentro de la misma categoría, se seleccionaron imágenes representativas de cada una de las poblaciones. (Fig. 17)

En 11 (50%) de las larvas control se visualizó un patrón de expresión disperso, mientras que en las otras 11 (50%) uno focalizado. Sin embargo, en el caso de los mutantes *smarce1* $^{-/-}$, 2 (12.5%) tuvieron un patrón disperso, 12 (75%) focalizado y 2 (12.5%) no presentaron

una expresión de *rho* visible; mostrando así una reducción en la expresión de *rho* en comparación a los embriones control (Fig. 18). Además de las diferencias en el patrón de expresión, se observó que independientemente de si era disperso o focalizado, la mayoría de los embriones mutantes presentaban una intensidad de señal más baja. Todas las larvas tomadas como control negativo mostraron una expresión nula del gen.

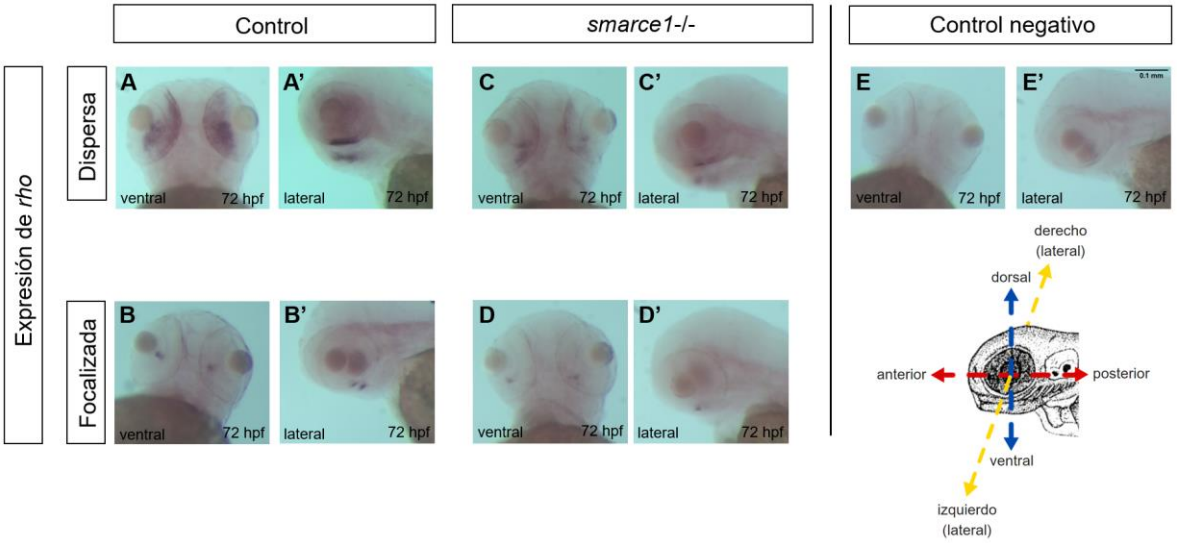

Figura 17. Vista ventral (A-E) y lateral izquierda (A'-E') de los diferentes fenotipos del patrón de expresión de *rho* en la retina en embriones de peces cebra de 72hpf: larvas control (A, A', B, B'), mutantes *smarce1*$^{-/-}$ (C, C', D, D') y un control negativo que no estuvo expuesto a la sonda (E, E'). Fotografías tomadas con aumento 8X, en Axiocam 208.

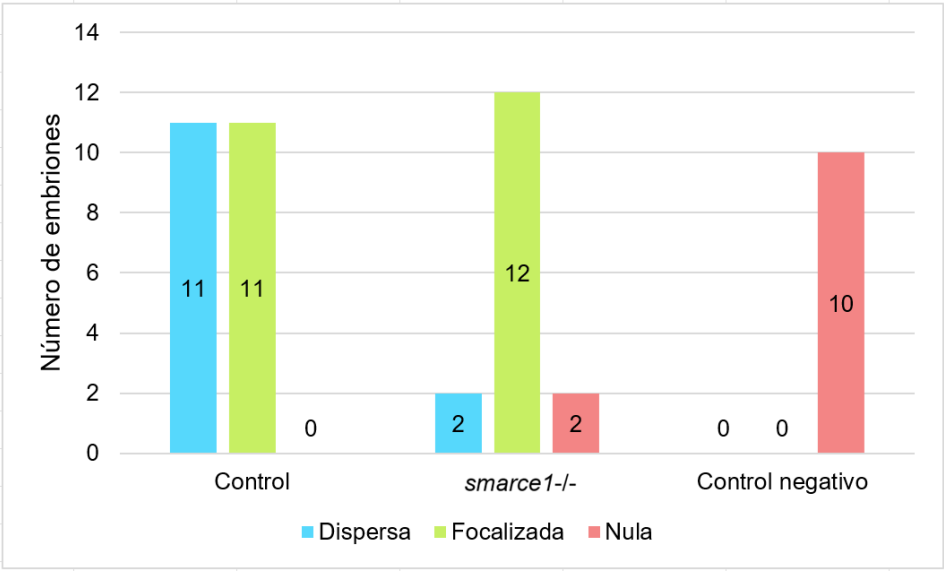

Figura 18. Número de embriones control, *smarce1*$^{-/-}$ y controles negativos que presentaron una expresión de *rho* dispersa, focalizada o nula.

En larvas de 5 dpf también se llevó a cabo un ensayo realizado bajo las mismas condiciones que para las larvas de 72 hpf. En todos los controles (N=10), a pesar de presentarse una coloración de fondo, es posible ver una tinción más concentrada en la parte ventral y dorsal de la retina (Fig. 19). En contraste, en cada uno de los embriones *smarce1*$^{-/-}$ (N=5), esta señal se observó únicamente en la zona ventral, con una menor intensidad. A diferencia de los peces cebra 72 hpf, no se observó una diferencia clara entre los patrones de expresión dentro de un mismo grupo de peces.

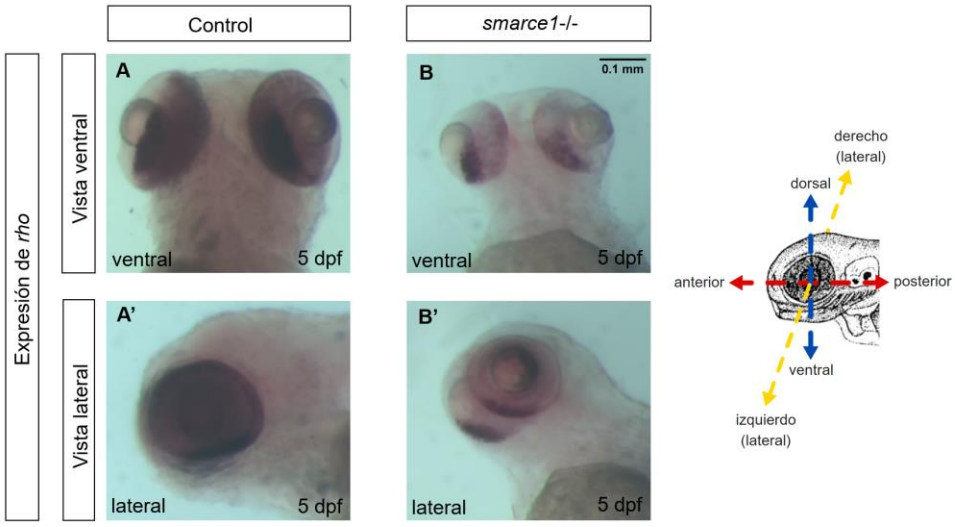

Figura 19. Vista ventral (A,B) y lateral izquierda (A',B') del patrón de expresión de *rho* en la retina en embriones de peces cebra de 5 dpf: larvas control (A, A') y mutantes *smarce1*$^{-/-}$ (B,B'). Fotografías tomadas con aumento 6.3X, en Axiocam 208.

7. Discusión

7.1. Generación de sondas para *ptf1a* y *vsx1*

El primer par de oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento de interés de *ptf1a* (Tabla 8), se une en el DNA genómico a una región que contiene un intrón de 107 pb (SnapGeneViewer, NCBI Gene ID: 368662). Si el RNA utilizado para la reacción no se encontraba purificado correctamente, es posible que estuviese contaminado con DNA

genómico, lo que llevaría a la amplificación de un producto con el intrón incluido (1004 pb) que resultaría en la aparición de las bandas de mayor tamaño al fragmento esperado que no incluía el intrón (Fig. 11A)

Adicionalmente, la presencia de bandas inesperadas puede asociarse a una unión inespecífica de los oligos; mientras que la ausencia de las bandas podría significar la degradación de la muestra, o bien, en el caso del tratamiento con DNasa Turbo (Fig. 14E) que las bandas observadas después de la transcripción eran el DNA que se usó como templado, como se mencionó anteriormente.

7.2. Relación de BAF con *rho*

La relación del complejo BAF, con *rho*, es algo que se ha estudiado anteriormente. Smarca4/Brg1, al igual que Smarce1, es una de las subunidades que conforman a BAF. Es una ATPasa que forma parte del núcleo del complejo. En Hensley, M. R., et al.[39], se reportó que ante la falta de Smarca4, los tipos celulares retinales pueden especificarse e incluso posicionarse en el lugar correcto, pero no diferenciarse completamente. Esto debido a que hay genes regulados por Smarca4 importantes para el desarrollo adecuado de la retina, asociados a la diferenciación y laminación de ésta; entre estos se encuentra *rho*, un gen de diferenciación retinal.

Al ser un remodelador de la cromatina, BAF participa en la regulación epigenética de una diversidad de genes. Los mecanismos que utiliza operan a nivel de modificar el acceso de factores transcripcionales a sitios regulatorios y de esta manera se ve implicado en la regulación de la transcripción. Debido a la gran cantidad de genes-blanco que pueden ser regulados a través de la remodelación de cromatina, es muy difícil determinar si los efectos de BAF en la expresión de *rho* son directos o indirectos. No obstante, es significativo que mutaciones en distintas subunidades del complejo como *smarca4 o smarce1,* tienen consecuencias similares en la expresión de *rho* (Hensley, M. R., et al.[39]).

7.3. Expresión de *rho* reducida en larvas de peces cebra *smarce1*$^{-/-}$

En el trabajo de Hensley, M. R., et al.[39], se muestra una expresión de *rho* focalizada en peces cebra silvestres a las 36 hpf, así como en Chen, H., et al.[32] a las 60 hpf; mientras que en este proyecto, fue uno de los patrones presentes en embriones de 72 hpf (Fig. 17). Por otra parte, el patrón de expresión dispersa de *rho* en la parte ventral de la retina a las 72 hpf (Fig. 17), se vio también en Chen, H., et al.[32] y Zhang, Y., et al.[31] en larvas de la misma edad. Estas diferencias de expresión observadas dentro de un mismo grupo de peces,

donde uno de los patrones coincide con los mostrados en peces más jóvenes, podría sugerir una diferencia en el desarrollo dentro del mismo conjunto de larvas, a pesar de las medidas que se tomaron para tratar de asegurar la sincronización de tiempo entre los experimentos; y debido a que la expresión focalizada fue la predominante en larvas mutantes *smarce1*$^{-/-}$ (Fig. 18), se puede inferir un retraso en el desarrollo de su retina. Alternativamente, las distinciones del patrón e intensidad observados podrían asociarse a diferencias metodológicas dentro de los ensayos de hibridación *in situ*, tales como la permeabilización de los embriones o el tiempo de revelado.

Las observaciones por Laura Ramírez de una mayor cantidad de células fotorreceptoras en proliferación en mutantes *smarce1*$^{-/-}$ (Fig. 5), podrían sugerir nuevamente un retraso en el desarrollo de la retina, donde las células permanecen en éste estadio del ciclo celular en lugar de diferenciarse.

Posterior al trabajo de Castillo-Robles, J., et al.[10], se realizó un RNAseq para analizar el transcriptoma de peces cebra de 5 dpf silvestres y mutantes *smarce1*$^{-/-}$, donde se obtuvo un resultado de 639.383 FPKM y 140.066 FPK respectivamente en la expresión de *rho*, revelando la disminución de su expresión en los mutantes. Estos datos concuerdan con la reducción de la expresión de *rho* que se detectó en los ensayos de hibridación in situ en este proyecto (Fig. 17, 18).

7.4. Implicaciones de la reducción de *rho* en la retina de peces cebra

La rodopsina es un fotopigmento que se localiza en la membrana de los discos de los segmentos externos de los bastones (*rod outer segment* por sus siglas en inglés “ROS”) de la retina del ojo. Se encuentra en altas concentraciones, favoreciendo a la captura de fotones.

En Zelinka, C., et al.[40], se introdujeron mutaciones en peces cebra silvestres AB a través del sistema CRISPR/Cas9 en el locus de *rho* (*rh1-1*), lo que ocasionó una alteración en la función del gen, lo que llevó a la ausencia de bastones en la retina central y a que estos únicamente se encontraran presentes cerca de la periferia de la retina (donde hay una neurogénesis constante); esto determinado por inmunomarcación de los bastones, sugiriendo que la expresión de *rho* en la retina en peces cebra es esencial para la supervivencia de los bastones. Los conos no se vieron afectados.

En otras mutantes se observó, por medio de inmunomarcación, que Rho no se encontraba únicamente en el segmento externo de los bastones, sino que también se encontraba en la

membrana plasmática del cuerpo celular, y en el segmento interno de los bastones. La disrupción en el tráfico de Rho debido a mutaciones en el gen, también se ha visto en humanos, roedores y ranas[40].

La retinitis pigmentosa (RP) es una enfermedad degenerativa que causa la muerte de los bastones de la retina y una pérdida de la vista progresiva, lo que puede resultar en ceguera. Con el fin de estudiar cómo afecta esta enfermedad en el pez cebra, en Santhanam, A., et al.[41] se generaron peces transgénicos que expresaban rodopsina de ratón que portaba la mutación P23H, la cual lleva a la acumulación de rodopsina mal plegada en el retículo endoplásmico, generando una respuesta que conduce a su degradación y por lo tanto, a la pérdida de fotorreceptores (como los bastones) y ceguera. Se observó una deslocalización de rodopsina, ROS atrofiados y la muerte de bastones en los peces transgénicos, características concordantes con las descritas en otros modelos de RP que presentaban la degeneración de la retina.

La disminución de la expresión de *rho* en mutantes *smarce1*$^{-/-}$, podría ser la causa de la reducción del tamaño de sus ojos que observó Laura Ramírez (Fig. 5); ya que la disminución de *rho* resultaría en la falta de diferenciación de los bastones y la muerte de éstos posteriormente, como se vio en Zelinka, C., et al.[40], teniendo un ojo más pequeño como consecuencia. Ante la falta de bastones también se vería afectado el proceso de fototransducción de los peces cebra y potencialmente ocasionar la pérdida de la vista, como se reportó en Santhanam, A. et al.[41]

8. Conclusiones

Los resultados de este proyecto muestran evidencia de que en ausencia de *smarce1*, se ve alterado el gen *rho* en la retina de *Danio rerio*, necesario para la diferenciación de los bastones.

Al comparar a grupos de larvas de pez cebra *smarce1*$^{-/-}$ y controles, tanto de 72 hpf como de 5 dpf, se observó en las mutantes smarce1$^{-/-}$ una disminución de la expresión de *rho*, así como un patrón de expresión anormal que podría sugerir un retraso en el desarrollo de la retina.

9. Bibliografía

1. Black, J. C., Whetstine, J. R. (2011). Chromatin Landscape. Epigenetics, 6(1), 9-15. https://doi.org/10.4161/epi.6.1.13331
2. Tang, L., et al. (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 102(2-3), 122-128. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.001
3. Castillo-Robles J. (2019). Caracterización de la función de BAF57, una subunidad del complejo SWI/SNF, durante el desarrollo embrionario de pez cebra (Danio rerio). Universidad Nacional Autónoma de México.
4. Li, Y., et al. (2017). Structural insights into BAF47 and BAF155 complex Formation. Journal of Molecular Biology, 429(11), 1650-1660. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.04.008
5. Wang, W., et al. (1998). Architectural DNA binding by a high-mobility-group/kinesin-like subunit in mammalian SWI/SNF-related complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(2), 492-498. https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.492
6. Battaglioli, E., et al. (2002). REST repression of neuronal genes requires components of the HSWI·SNF complex. Journal of Biological Chemistry, 277(43), 41038-41045. https://doi.org/10.1074/jbc.m205691200
7. Lomelí, H., Castillo-Robles, J. (2016). The developmental and pathogenic roles of BAF57, a special subunit of the BAF Chromatin-remodeling Complex. FEBS Letters, 590(11), 1555-1569. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12201
8. SMARCE1 Gene Expression - Gene - NCBI. (n.d.). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6605/?report=expression
9. Tissue expression of SMARCE1 - Staining in retina - The Human Protein Atlas. (n.d.). https://www.proteinatlas.org/ENSG00000073584-SMARCE1/tissue/retina
10. Castillo-Robles, J., et al. (2018). smarce1 mutants have a defective endocardium and an increased expression of cardiac transcription factors in zebrafish. Scientific Reports, 8(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-33746-8

11. Kazantseva, A., et al. (2009). N-terminally truncated BAF57 isoforms contribute to the diversity of SWI/SNF complexes in neurons. Journal of Neurochemistry, 109(3), 807-818. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06005.x

12. Link, K. A., et al. (2005). BAF57 governs Androgen Receptor Action and Androgen-Dependent Proliferation through SWI/SNF. Molecular and Cellular Biology, 25(6), 2200-2215. https://doi.org/10.1128/mcb.25.6.2200-2215.2005

13. García-Pedrero, J. M., et al. (2006). The SWI/SNF Chromatin Remodeling Subunit BAF57 is a critical regulator of estrogen receptor function in breast cancer cells. Journal of Biological Chemistry, 281(32), 22656-22664. https://doi.org/10.1074/jbc.m602561200

14. Richardson, R., et al. (2016). The Zebrafish Eye—A paradigm for investigating human ocular genetics. Eye, 31(1), 68-86. https://doi.org/10.1038/eye.2016.198

15. Zang, L. et al. (2022). Editorial: Zebrafish Models for Human Disease Studies. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 10. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.861941

16. Zárate, Y. A., et al. (2016). SMARCE1, a rare cause of Coffin-Siris syndrome: Clinical description of three additional cases. American Journal of Medical Genetics – Part A, 170(8), 1967-1973. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37722

17. Kimmel, C. B., et al. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203(3), 253-310. https://doi.org/10.1002/dvdy.24304

18. Araya, C., et al. (2015). Coordinating cell and tissue behavior during zebrafish neural tube morphogenesis. Developmental Dynamics, 245(3), 197-208. https://doi.org/10.1002/dvdy.24304

19. Bustabad, J. (2020). Caracterización de la retina del pez cebra (Danio rerio) durante su desarrollo mediante técnicas inmunohistoquímicas. Universidade da Coruña.

20. Gestri, G., et al. (2012). The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases. Developmental Neurobiology, 72(3), 302-327. https://doi.org/10.1002/dneu.20919

21. Neuhauss, S. C., et al. (1999). Genetic disorders of vision revealed by a behavioral screen of 400 essential loci in zebrafish. The Journal of Neuroscience, 19(19), 8603-8615. https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-19-08603.1999

22. Kay, J. N., et al. (2001). Retinal ganglion cell genesis requires lakritz, a zebrafish atonal homolog. Neuron, 30(3), 725-736. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00312-9

23. Song, W., et al. (2015). Atoh7 promotes the differentiation of Müller cells-derived retinal stem cells into retinal ganglion cells in a rat model of glaucoma. Experimental Biology And Medicine, 240(5), 682-690. https://doi.org/10.1177/1535370214560965

24. Jusuf, P. R., Harris, W. A. (2009). PTF1A is expressed transiently in all types of amacrine cells in the embryonic zebrafish retina. Neural Development, 4(1), 34. https//doi.org./10.1186/1749-8104-4-34

25. Ohtoshi, A., et al. (2004). Regulation of retinal cone bipolar cell differentiation and photopic vision by the CVC Homeobox gene VSX1. Current Biology, 14(6), 530-536. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.027

26. Avanesov, A., Malicki, J. (2010). Analysis of the retina in the Zebrafish model. En Methods in Cell Biology (pp. 153-204). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384892-5.00006-2

27. Meier, A., et al. (2018). Color processing in zebrafish retina. Frontiers in Cellular Neuroscience, 12. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00327

28. Abdel-Rahman, M. H., et al. (2020). Whole Exome Sequencing Identifies Candidate Genes Associated with Hereditary Predisposition to Uveal Melanoma. Ophthalmology, 127(5), 668–678. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.11.009

29. Shi, T., et al. (2021). Reduced photoreceptor outer segment layer thickness and association with vision in amblyopic children and adolescents with unilateral high myopia. Current Eye Research, 46(12), 1892-1899. https://doi.org/10.1080/02713683.2021.1942072

30. Park, P. S. (2014). Constitutively active rhodopsin and retinal disease. In Advances in pharmacology (pp. 1–36). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417197-8.00001-8

31. Zhang, Y., et al. (2012). The expression of irx7 in the inner nuclear layer of zebrafish retina is essential for a proper retinal development and lamination. PLOS ONE. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036145

32. Chen, H., et al. (2007). Expression of the G protein γT1 subunit during zebrafish development. Gene Expression Patterns, 7(5), 574–583. https://doi.org/10.1016/j.modgep.2007.01.003

33. Yokoi, H., et al. (2009). Expression profiling of zebrafish sox9 mutants reveals that Sox9 is required for retinal differentiation. Developmental Biology, 329(1), 1–15. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.01.002

34. Karlsson, J., et al. (2001). Generating Transparent Zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. Marine Biotechnology, 3(6), 0522-0527. https://doi.org/10.1007/s1012601-0053-4

35. Chitramuthu, B. P., Bennett, H. P. J. (2013). High resolution Whole Mount *In situ* Hybridization within zebrafish embryos to study gene expression and function. Journal of Visualized Experiments, 80. https://doi.org/10.3791/50644

36. NIH. (2009). Guidelines for Animal Study Proposals using Zebrafish in the NIH Intramural Research Program.

37. Li, W., et al. (2015). Zebrafish LBH-like is required for OTX2-mediated photoreceptor differentiation. International Journal of Biological Sciences, 11(6), 688-700. https://doi.org/10.7150/ijbs.11244

38. Li, X., et al. (2014). Expression characterization of testicular DMRT1 in both sertoli cells and spermatogenic cells of polyploid Gibel Carp. Gene, 548(1), 119-125. https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.07.031

39. Hensley, M. R., et al. (2011). Cellular expression of SMARCA4 (BRG1)-regulated genes in zebrafish retinas. BMC Developmental Biology, 11(1). https://doi.org/10.1186/1471-213x-11-45

40. Zelinka, C., et al. (2018). Targeted disruption of the endogenous zebrafish Rhodopsin locus as models of rapid rod photoreceptor degeneration. PubMed. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30210230/

41. Santhanam, A., et al. (2020). A zebrafish model of retinitis pigmentosa shows continuous degeneration and regeneration of rod photoreceptors. Cells, 9(10), 2242. https://doi.org/10.3390/cells9102242

VOTOS DE APROBATORIOS

SECRETARIA EJECUTIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la **C. MONTERO MOLINA ALEXIA** con número de matrícula **10030065** cuyo título es:

"Complejo remodelador de cromatina BAF y su subunidad Smarce1 en la retinogénesis del pez cebra"

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 4 de Junio de 2024

Atentamente
Por una humanidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVÁEZ PADILLA	**(PRESIDENTE)**
DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN	**(SECRETARIO)**
DRA. HILDA MARÍA LOMELÍ BUYOLI	**(VOCAL)**
DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE	**(SUPLENTE)**
DRA. LAURA SOCORRO RAMÍREZ ÁNGELES	**(SUPLENTE)**

MIE/VRRC/eae

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LAURA SOCORRO RAMÍREZ ÁNGELES | Fecha:2024-06-06 15:15:50 | FIRMANTE

DKjji99svBqCsXeghVL8HVzFco/ps9w75wZQ6GtY6yiGevIh6hWq57N0GfFHucBp8lKGVwkQ94Vr+x4KpVgdfuQlMWBkBNfvTgvNDbKlszmxGHWBXIh2fzR4m5xDJjuz1iByGIgO5psxQL+zmqOHqxMr86DZzBRk8GNqpR1AbukYTVWvvpIyFTrMdVFNDByNdFDjyqOzZuOF6dFuPUzMuca9FN9EJyAOwhp2gKNHEnLZJyoT53S71s1KNOmOwT0SelWjIFdWZdGCstlaG2kls6+IJrFe5b3DFKqhjbMLCJt4gThcugrbpnF4zr64W+na0apF+kMa/VSfun6/BS647w==

HILDA MARÍA LOMELÍ BUYOLI | Fecha:2024-06-06 16:40:14 | FIRMANTE

VEyaWMVwGWMdshzu2GunTVBGp505ZJWkWFCEYVuczsR/6pfYIKHnyftmfDcJwg3VxWxO+T4pBjTpwdFBIhn59NiRCDJ4DW7KDKgui/N1ywcMDxH7dWOgNt/si+z23frekYZhW7TTVNfVKfk8Rgcvgvuod+8YimCvIv5JtGxyV7vE30sPB5IB03qamRo5QfdY4ZkMaBM9XLx88TTNP+2J33AA6GDnCer9nvgUyCDOqQ4TGU0X4vpGPyc4FutSo5MUa7qhhFkT42Rs6wFC2ifsG9eoEzIczmO7xQBPY2Q6zdJmZwh2sMaXEBp3aYbU5xISYbg57qhABlkZKuLOsN/CJA==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2024-06-06 20:12:59 | FIRMANTE

d6GoBI7POwkLAiqUvCnnvcLCDIz61M0gswDXwwYC+yo5/uCvmzFC5kLkP1KNl2pye/WWIw03XAf18x34+JkaLDLVv8KZ3OSefvrv2AMb5bCmaYMvESsa1eaDwb4qQ2gwPjor+V6Ac8360QU1qLPKj93Kc00rEKrkcbfxcb1BEIvu+JQgguQ4U2XCM3xh+vtKu52QDK7M+P9kEGsbR+LTTH5hJatJQNwX8es8gAdJuETyVwdMPfg0Oz5/W/FOthHexHdEIQOPY/cVeBz2DZHzvtucYijulhUczjyH9t1Swb81Hv+VZtjvdFlwWzpDY3IG69htrogAadZ/uKr8RXUHWQ==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2024-06-06 22:19:06 | FIRMANTE

n2o5lnJuKilQ/oY7d2ywYQPMu6iupGXHuAL7UM8GqGuJtY7SxmPv2xFfMJeduNT1iMLlT3PXMXBfuBkFinZxG6WB5tPVMNI3BqkpL2FrcVw8xZZReRp+L/RYfotYw4Ip6A92Jnv/CvAiPoKJygDeT3dvTM8BQpJLRY0jGC8ihaUKu7n5+3mpjtWPssUkb4Lam49mE4CDIjwx7aHfDkxWYJ29MdUfXQ4kWu9qX+Ed/QMUqKfoI0gJ4Zvf3+OvJKabHunrxdwvGP6eYZ9SHKtXt/gt8ANm7BxS9DUHZEceRyPx7mX4HBQeAoUpIZxRMBp5olqZc/eApqvbGXBzROFeYg==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2024-06-07 17:47:47 | FIRMANTE

yZ57Tl09mRxz744pA1J5Zqi4GSg96U/CPDA6p5y9isYK+mO7yk5MPEJ9IlzZzZSomo8kFBtnBF638ibPq+OKyfeaHvo2qk4nKNoibugsu8OlzjU7GYBDFsIRxpGkbGth6JicW2xNiQhsYg0saBjdhrMDanlUoiQUTg1d3CFxr6IP8sWDrkzprL0hpPKuRD+DGop9OhboZhrLXZx/G3Fj+JaCO4EZZjTt/7d0jeNPUhV7AFnGkImNUWDfJCarUhr7anWFSdxCR6YX2Uc7cGL8PcgTrju50XUcrpb76+Xw9thk2LsuN8GHeInXnhR7DwuLLzdHlA/3VplXwz3eXukWMA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

ipDHz3gTx

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9wqAqpqmaCH6lipJicAvSlQ1qIFRgylA