

**INFLUENCIA DE ISOFACE (ÁCIDO 13-CIS RETINOICO) SOBRE LA
PROLIFERACIÓN CELULAR DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO
DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*)**

MANUELA RAMÍREZ LÓPEZ

Directora

Marleny Salazar Salazar

PhD Ciencias Biológicas

Codirector

Enrique Salas-Vidal

PhD Investigación Biomédica Básica

Asesor estadístico

Luis Hernando Hurtado Tobón

MSc en Estadística Matemática

Universidad del Quindío

Facultad de Ciencias de la Educación

Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental

Armenia, Quindío

2020

**INFLUENCIA DE ISOFACE (ÁCIDO 13-CIS RETINOICO) SOBRE LA
PROLIFERACIÓN CELULAR DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO
DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*)**

Autora

Manuela Ramírez López

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de Licenciada en
Biología y Educación Ambiental

Dirigido por:

Marleny Salazar Salazar

Docente del programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental

Doctora en Ciencias Biológicas

Universidad del Quindío

Facultad de Ciencias de la Educación

Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental

Armenia, Quindío

2020

Agradecimientos

A mis padres Gloria y Wilder quienes me han regalado la mejor experiencia de amor, han creído en mis sueños y los han apoyado incondicionalmente, a mi hermana y compañera de vida Alejandra quién siempre ha tenido las palabras justas en el momento indicado y ha creído en mí incluso cuando yo he dejado de hacerlo, les debo todo lo que soy, esta es una deuda que nunca podré saldar, una deuda de amor.

A la Doctora Marleny Salazar Salazar quién ha creído y confiado en mí desde el inicio de este proyecto y quién ha sido más que una docente; una amiga. A la universidad del Quindío y en especial al rector Ingeniero José Fernando Echeverry Murillo, al Vicerrector de extensión Ingeniero Luis Fernando Polonia Obando y al Programa de Licenciatura en Ciencias Naturales y Educación Ambiental quienes hicieron posible una de las mejores experiencias de mi vida; mi estancia en México la cual resumo diciendo *“El azar afortunado suele ser casi siempre el premio del esfuerzo perseverante.”* (Santiago Ramón y Cajal)

A Enrique Salas-Vidal, Dehni Schnabel e Hilda Lomelí por abrirme las puertas de su laboratorio, brindarme sus enseñanzas, paciencia y cariño durante mi estancia en el instituto de Biotecnología, a los estudiantes de maestría y doctorado; Arlen Ramírez, Jaime Carlos López, Valeria Macedo y Javier Méndez quienes me acompañaron durante el proceso y aportaron a él con sugerencias que me fueron muy útiles para su desarrollo.

A mis grandes amigos y hermanos de corazón Valentina Herrera y Fabián Loaiza quienes hicieron de la universidad la mejor etapa de mi vida, me enseñaron el significado de la verdadera amistad y me brindaron sus palabras de apoyo en los momentos difíciles, gracias por permanecer y creer en mí incondicionalmente. *“Según decía Carlos Amador Fonseca, amigo es el que critica de frente y elogia por la espalda. Y según dice la experiencia, el amigo de verdad es amigo en las cuatro estaciones. Los otros son amigos del verano, nomás”* (Día de la amistad, anónimo)

A Nadia Lucía Obando, Alba Carolina Molano y Mercedes Girón Vanderhuck quienes me enseñaron a amar la docencia, ver el mundo desde otras perspectivas y aportaron a mi formación como profesional de una manera que jamás olvidaré. *“La admiración ha sido una*

de mis mayores fuentes de gozo, pero al hacerme mayor pensé que no volvería a sentirla. Hasta conocerlas a ustedes” (Camus, 1951).

A mis compañeros del grupo de investigación en Biología y Educación Ambiental BIOEDUQ; Ángela Vargas, Kelly García, Carlos Hurtado, Santiago Pinzón y Jhon Alex Higueta con quienes compartí grandes momentos en el laboratorio y me apoyaron durante todo este proceso, estaré siempre agradecida por su presencia en mi vida.

A mis compañeras y amigas Kelly Ceballos y Angie Salazar con quienes pasé grandes momentos a lo largo de la carrera y quienes me han dado sus palabras de confianza y apoyo en todo momento.

El resultado de este proceso es fruto de su apoyo incondicional, **GRACIAS TOTALES.**

Dedicatorias

A mis padres y hermana quienes han dado todo por mí y me aman de manera incondicional.

Tabla de contenido

Lista de figuras	9
Lista de tablas	11
Lista de anexos	12
Glosario	13
Resumen	15
Abstract.....	16
Introducción.....	17
Marco teórico.....	18
Descripción del modelo biológico	18
Desarrollo embrionario del pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	18
Isotretinoína (Isoface 20mg).....	20
Generalidades de la proliferación celular	22
Generalidades de la vitamina A y sus derivados en el desarrollo embrionario	23
Genes Hox y su función en el desarrollo embrionario.....	23
Las histonas y su función a nivel celular	24
Apoptosis	24
Técnicas inmunohistoquímicas.....	26
Antecedentes.....	26
Planteamiento del problema	28
Justificación	29
Objetivos.....	29
Objetivo general.....	29
Objetivos específicos	29
Metodología.....	30

Mantenimiento de peces adultos y obtención de embriones.....	30
Instalaciones y condiciones de acuario	30
Alimentación y regulación del ciclo circadiano	30
Reproducción y obtención de embriones	30
Dilución del medicamento y determinación de concentraciones de trabajo.....	31
Proceso experimental	32
Inmunolocalización con fosfohistona H3 (PH3) y tinción para filamentos de actina	33
Montaje para visualización de imágenes y condiciones del microscopio de fluorescencia	33
Conteo de células en proliferación	33
Análisis estadístico.....	33
Resultados y discusión	33
Supervivencia de embriones durante las 24, 48 y 72 Hpf	33
Alteraciones en el desarrollo embrionario	36
Alteraciones craneales.....	36
Alteraciones en la formación de los somitas.....	37
Alteraciones en el desarrollo del eje anteroposterior	38
Proliferación celular y arresto del ciclo celular durante las 24Hpf.....	40
Conclusiones.....	42
Consideraciones finales	43
Bibliografía.....	43
Anexos	47

Lista de figuras

Figura 1. Fórmula estructural ácido 13-cis retinoico, tomada de Soria & Ribera, 2005.....	21
Figura 2. Esquema de la proliferación celular, tomado de Pierce, 2006.....	22
Figura 3. Mecanismo de la apoptosis y vías de iniciación, Tomado de Megías, Molist & Pombal, 2020.....	25
Figura 4. Representación gráfica del proceso experimental desarrollado, visualizándose una caja de cultivo de 28 pozos en la que se depositaron embriones en etapa de escudo yendo desde un grupo control con 10 individuos a la concentración más alta con tratamientos por triplicado.....	32
Figura 5. Efecto del tratamiento con isotretinoína (ácido 13- cis retinoico) en las 24 Hpf observándose las alteraciones letales para la concentración 0,01 µg/µL y las alteraciones subletales para las concentraciones de 0,0001 µg/µL a 0,002 µg/µL.....	34
Figura 6. Efecto del tratamiento con isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) a las 48 Hpf observándose el grupo control y las alteraciones subletales en las concentraciones de 0,0001 µg/µL; 0,00025 µg/µL y 0,0005 µg/µL.....	34
Figura 7. Efecto del tratamiento con isotretinoína (ácido 13- cis retinoico) a las 72 Hpf observándose el grupo control y los embriones muertos de concentraciones de 0,0001 µg/µL y 0,00025 µg/µL	35
Figura 8. Representación gráfica de análisis de varianza con respecto al tiempo entre concentraciones de tratamiento de isotretinoína (ácido 13- cis retinoico) en embriones de pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	35
Figura 9. Efectos del tratamiento con isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) en el desarrollo craneal del pez cebra (<i>Danio rerio</i>); A. Grupo control, región craneal en completo desarrollo, B. 0,0001 µg/ µL región craneal con desarrollo incompleto, C. 0,00025 µg/ µL región craneal sin desarrollo aparente, D. 0,0005 µg/ µL región craneal con desarrollo incompleto.	37
Figura 10. Efectos del tratamiento con isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) en el desarrollo de los somitas del pez cebra (<i>Danio rerio</i>); A. Grupo control, somitas en completo desarrollo, B. 0,0001 µg/ µL somitas con desarrollo incompleto, C. 0,00025 µg/ µL somitas con desarrollo incompleto D. 0,0005 µg/ µL somitas con desarrollo incompleto.	38

Figura 11. Efectos del tratamiento con isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) en el desarrollo del eje anteroposterior del pez cebra (*Danio rerio*); A. Eje anteroposterior completo, B. 0,0001 µg/ µL Eje anteroposterior incompleto, C. 0,00025 µg/ µL Eje anteroposterior incompleto, D. 0,0005 µg/ µL Eje anteroposterior incompleto 40

Figura 12. Efecto del tratamiento con isotretinoína (ácido 13 cis-retinoico) sobre la proliferación celular durante el desarrollo embrionario de pez cebra (*Danio rerio*); A. Grupo Control, B. 0,0001 µg/µL, C. 0, 00025 µg/µL, D. 0,0005 µg/µL 41

Figura 13. Representación gráfica de la proliferación celular por medio de un análisis de varianza entre el número de células en división detectadas y la concentración de isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*) 42

Lista de tablas

Tabla 1. Concentraciones de trabajo para evaluar el efecto de isotretinoína sobre la proliferación celular durante el desarrollo embrionario del pez cebra	31
Tabla 2. Análisis de varianza entre el tiempo de tratamiento y las concentraciones de isotretinoína durante las primeras 72 Horas post fecundación. ¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 3. ANOVA de un factor para el análisis de la proliferación celular en tres concentraciones de isotretinoína durante el desarrollo embrionario del pez cebra (Danio rerio)	42
Tabla 4. Relación entre categorías de concentración de isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) sobre la proliferación celular durante el desarrollo embrionario del pez cebra (Danio rerio).	42

Lista de anexos

Anexo 1 Protocolo de inmunofluorescencia de embriones completos	47
Anexo 2. Tinción para filamentos de actina con Alexa fluor 488.....	48

Glosario

- **ADH:** Alcohol deshidrogenasa
- **AR:** Ácido retinoico
- **ATRA:** Ácido retinoico all trans
- **BMP:** Factor de crecimiento óseo
- **CDKS:** Quinasas dependiente de ciclinas
- **Citocromo p450:** Enzimas responsables del metabolismo de la mayoría de los fármacos antineoplásicos
- **Cluster:** Grupo de genes
- **CRABP:** Cellular retinoic acid-binding protein, Proteína de unión al ácido retinoico celular
- **CRBP:** Proteína citoplasmática específica de unión al retinol
- **Decorionar:** Proceso mecánico que hace referencia a remover el corion que protege a los embriones
- **Dimorfismo sexual:** Se refiere a las diferencias en el aspecto físico (tamaño, forma, ornamentación y órganos de ofensa y defensa), aparte de los órganos reproductivos, entre los dos sexos de la misma especie.
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **DR4/5:** Proteína en la superficie de ciertas células que se une con TRAIL para la destrucción de células cancerosas
- **Eif3ba:** Línea mutante de pez cebra
- **Homeosecuencia:** Secuencia de genes encargados de la identidad de los segmentos o partes individuales del embrión
- **Hpf:** Horas post fecundación
- **IGFBP:** Factor de crecimiento similar a la insulina
- **kDa:** Kilodalton
- **KROX-20:** Factor de transcripción con tres dedos de zinc
- **LRAT:** Enzima lecitina retinol aciltransferasa
- **Medio ERM:** Medio de embrión
- **Morfógenos:** Señales posicionales que controlan el destino celular en el embrión.
- **PAX-2:** Factores de transcripción de tejidos

- **PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet derived growth factor)
- **Pf:** Post fecundación
- **PFA:** Paraformaldehído
- **RALDH:** Retinaldehído deshidrogenasa
- **RALDH:** Retinaldehído deshidrogenasa
- **RAR:** Receptor de ácido retinoico
- **RBP:** Proteína ligando del retinol
- **RDH:** Retinol deshidrogenasa
- **ROH:** Retinol
- **RXR:** Receptor x retinoide
- **SHH:** Familia de genes Sonic Hedhog
- **STRA6:** Receptor específico para retinol
- **Teratogenicidad:** Capacidad de un medicamento para causar daño y, en un sentido estricto, malformaciones en el feto durante cualquiera de sus etapas de desarrollo.
- **TNF:** Factor de Necrosis tumoral
- **TP53:** Proteína tumoral 53
- **TRAIL:** Ligando inductor de apoptosis

Resumen

El isoface (ácido 13-cis retinoico) es un medicamento derivado de la vitamina A comúnmente utilizado para el tratamiento de formas severas de acné por ser el más efectivo en el proceso de disminución de las glándulas sebáceas, la producción de sebocitos y la proliferación de *Propionibacterium acnes*. Entre sus efectos secundarios se encuentran desde los más frecuentes como la sequedad de la piel y las mucosas hasta aquellos como la teratogenicidad reportada en diferentes estudios. Motivo por el cual se evaluó su efecto en la proliferación celular durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

Para la determinación de dichos efectos se evaluaron 6 concentraciones entre las cuales se incluía la concentración óptima para evitar efectos secundarios de su uso 0,5 mg/kg en humanos extrapolada al peso de embriones de pez cebra, analizando los efectos fenotípicos y sobre la proliferación celular durante las primeras 72 horas del desarrollo embrionario. Los efectos fenotípicos se evaluaron mediante imágenes de microscopia convencional y la influencia en la proliferación celular se determinó mediante la inmunolocalización de la histona H3 fosforilada.

Los resultados encontrados respecto a la proliferación celular habían sido reportados anteriormente por otros estudios utilizando concentraciones más altas, con otros derivados de la vitamina A y con otros modelos biológicos, se evidenciaron además alteraciones letales y subletales entre las 24 horas post fecundación y la inducción de la apoptosis después de esta. Generando estos, aportes para el fortalecimiento del uso de anticonceptivos durante el tratamiento con isoface y la prevención de este medicamento durante etapas sensibles como el embarazo.

Palabras clave: isoface, pez cebra, proliferación celular, teratogenicidad, apoptosis, embarazo

Abstract

Isoface (13-cis retinoic acid) is a vitamin A-derived drug commonly used for the treatment of severe forms of acne because it is the most effective in the process of sebaceous gland depletion, sebocytes production, and proliferation of *Propionibacterium acnes*. Among its secondary effects are found from the most frequent such as dry skin and mucous membranes to those such as teratogenicity reported in different studies. This therefore why its effect on cell proliferation during the embryonic development of zebrafish was evaluated.

In order to determine these effects, 6 concentrations were evaluated, including the optimal concentration to avoid secondary effects of its use, 0.5 mg/kg in humans extrapolated to the weight of zebrafish embryos, analyzing the phenotypic effects and on cell proliferation during the first 72 hours of embryonic development. Phenotypic effects were evaluated by conventional microscopic images and the influence on cell proliferation was determined by immunolocalization of phosphorylated histone H3.

The results found regarding cell proliferation had been previously reported by other studies using higher concentrations, with other vitamin A derivatives and with other biological models, lethal and sublethal alterations were also evidenced between the 24 hours post fertilization and the induction of apoptosis after it. Generating these, contributions for the strengthening of contraceptive use during treatment with isoface and the prevention of this medicine during sensitive stages such as pregnancy.

Keywords: isoface, zebrafish, cell proliferation, teratogenicity, apoptosis, pregnancy

Introducción

El acné es una de las afecciones más comunes en adolescentes y adultos jóvenes caracterizado por una inflamación de los folículos polisebáceos que tiene como consecuencia la formación de comedones, pápulas, pústulas, nódulos, quistes, abscesos, flemones y lesiones en zonas como la cara, el tronco, el área central del tórax y la parte superior de la espalda de etiología diversa, existen varios tratamientos para dicha afección pero el que ha mostrado mayor efectividad es aquel que se realiza desde 1982 con isotretinoína, un derivado en forma cis de la vitamina A el cuál ha revolucionado el tratamiento de esta afección sobre todo en sus formas más severas por disminuir la comedogénesis, reducir el tamaño de la glándula sebácea en más del 90%, disminuir la proliferación de sebocitos basales, suprimir la producción de sebo e inhibir la diferenciación del sebocito terminal (GLEA, 2007) con efectos secundarios como resequedad en la piel, ojos y mucosas, hemorragias (sobre todo en mucosas y encías), cambios en el color de la piel y cansancio siendo estos los más leves y malformaciones en el oído externo, dismorfias faciales, anomalías oculares, alteraciones en el sistema nervioso central como hidrocefalia, microcefalia o anencefalia e incluso atrofia de cerebelo y alteraciones cardíacas en caso de ser utilizada en periodos sensibles como el embarazo (Ariño & Azparren, 2016).

En la actualidad el pez cebra se ha posicionado como una alternativa eficaz y segura para la investigación biomédica por características deseables para la misma como su alta tasa de fecundidad, su desarrollo externo dividido en etapas fácilmente identificables con técnicas de microscopía convencional, sus huevos translucidos, los bajos costos de mantenimiento y su homología genética con los seres humanos del 80% lo que permite que los datos obtenidos de una investigación con fármacos sean extrapolables teniendo en cuenta la importancia del modelo biológico en la investigación biomédica el presente estudio pretende generar un aporte a los registros ya existentes de efectos secundarios durante el embarazo, especialmente en los procesos de proliferación celular y las moléculas responsables del desarrollo embrionario.

Marco teórico

Descripción del modelo biológico

El Pez cebra (*Danio rerio*) se caracteriza por poseer una coloración verde aceitunada, dorada con tonalidades marrones y blancas hacia la parte abdominal con líneas de color azul que van desde los opérculos hasta la aleta caudal que recorren los costados de su cuerpo de manera longitudinal, presentan dimorfismo sexual en cuanto a la forma del cuerpo, ubicación de la papila genital, tamaño y coloración teniendo los machos un cuerpo delgado y comprimido con una papila genital poco notoria, una coloración dorada y un menor tamaño con respecto a las hembras que poseen un cuerpo abultado y más ancho, una papila genital distintiva y una coloración verde aceitunada (Armengol, 2017).

En el campo de la salud y la investigación biomédica básica se ha convertido en una necesidad para la evaluación de sustancias y procedimientos que garanticen el beneficio de los pacientes porque su ciclo celular está compuesto de divisiones celulares sincrónicas hasta la etapa de blástula en donde el ciclo se alarga y las divisiones celulares pasan a ser asincrónicas cuando el ciclo de división se encuentra entre las 512 y las 1000 células lo que hace propicio este estadio para el estudio de efectos de fármacos en dicho modelo (Mendieta-Serrano et al, 2013).

El pez cebra es un modelo biológico posicionado actualmente como una de las mejores alternativas para este tipo de investigación debido a que posee una alta tasa de fecundidad, un desarrollo rápido desde el estadio embrionario hasta el adulto, sus costos de mantenimiento son relativamente bajos, las características como su desarrollo embrionario y larval que ocurre externamente y el proceso para llegar a la edad adulta que se completa en aproximadamente tres meses, otra de sus ventajas es el cuerpo translúcido en las primeras etapas del desarrollo, que permite observar el funcionamiento de los órganos internos con técnicas de microscopía convencional en condiciones normales sin que se deba sacrificar al animal o extraerlo a microambientes artificiales (Vargas-Vargas, 2017).

Desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*)

Kimmel et al, 1995, establecieron la secuencia de las etapas del desarrollo embrionario del pez cebra así; cigoto, clivaje, blástula, gastrulación, segmentación, farínula, periodo de eclosión y periodo de larva temprana, descritos a continuación:

El periodo de cigoto comprende de los 0 a los 45 minutos en los que se da la primera división celular en donde el cigoto alcanza un diámetro aproximado de 0,07mm, durante esta etapa el corion se hincha y se levanta lejos del óvulo recién fertilizado activando los movimientos citoplasmáticos para iniciar la segregación del blastodisco vegetal y la migración hacia el polo animal, acción que se repetirá durante las primeras etapas de división celular. Las blastómeras se dividen a intervalos de 15 minutos, dichas divisiones describirán el proceso que se llevará a cabo hasta llegar a la etapa de 64 células aproximadamente a las 2 horas del desarrollo y en donde ya existe una capa envolvente del blastodisco, esta serie de divisiones reciben el nombre de clivaje.

Entre las 2 y las 5 horas post fecundación (Hpf) se da el proceso de blástula en donde se presenta un alargamiento del embrión y una pérdida de sincronía en las divisiones celulares en esta transición de la blástula media (TBM) las células comienzan a tener movilidad y se inicia la transcripción del genoma del cigoto, además se da una fusión de las células en el polo animal del blastodermo con las células vitelinas subyacentes formando la capa sincitial vitelina (CSV) y con esta inicia el fenómeno de migraciones celulares llamado epibolia que consiste en el desplazamiento de CSV y el blastodisco sobre la célula vitelina envolviéndola completamente hasta el final del periodo de gastrulación.

La gastrulación se da entre las 5 y las 10 horas post fecundación la epibolia continúa y da lugar a movimientos morfogenéticos de involución, convergencia y extensión que dan lugar al anillo germinal rodeando el perímetro del blastodermo, el primer movimiento es la epibolia de las células del blastodermo, los movimientos convergentes consisten en la acumulación local de células que dan lugar al escudo embrionario, cuyos movimientos de involución consisten en la formación de dos capas germinales el epiblasto (capa superior) y el hipoblasto (capa inferior) de las cuales derivarán tejidos como la epidermis, el sistema nervioso central, la cresta neural y las placas sensoriales y las estructuras comúnmente asociadas al mesodermo y endodermo respectivamente, el fin de la gastrulación está marcado porque la célula vitelina ha sido totalmente cubierta por el blastodermo.

Durante el periodo de segmentación que se da entre las 10 y las 24 horas post fecundación se forman los somitas en tronco y en cola, se hacen visibles los rudimentos de los órganos primarios, se diferencian morfológicamente las primeras células y aparecen los movimientos

del cuerpo. En los embriones de los animales cordados la neurulación ocurre en forma simultánea con el proceso de segmentación iniciando con un esbozo transitorio del SNC y a medida que esta avanza da origen a estructuras neurales claramente diferenciadas, llamadas neurómeros que formarán posteriormente el cerebro anterior-prosencefalo, medio-mesencefalo y posterior-romboencefalo, con el desarrollo de estas estructuras y especialmente del diencefalo se formarán los primordios ópticos, que darán origen a los ojos.

En el periodo de faríngrula el embrión de pez cebra se caracteriza por su organización bilateral, las aletas, la boca, las mandíbulas, los arcos branquiales, el sistema circulatorio, observándose el latido del corazón, la circulación sanguínea y la diferenciación de los melanóforos derivados de la cresta neural. En el tercer día Post fecundación (Pf) los embriones comienzan a eclosionar y reciben el nombre de larvas, pasados estos tres días la mayoría de los rudimentos de órganos se ha completado, la larva empieza a crecer, a mover las mandíbulas, las aletas pectorales y los ojos en búsqueda de alimento, en este periodo las contracciones musculares comienzan a ser sustituidas por movimientos coordinados que resultan en intentos de nado (Bortagaray & Rodríguez , 2016)

Isotretinoína (Isoface 20mg)

El ácido 13-cis retinoico o isotretinoína ($C_{20} H_{28} O_2$) (Fig 1) fue aprobado en el año 1982 para el tratamiento del acné severo y desde entonces es una excelente opción terapéutica para su tratamiento y para el de otras afecciones cutáneas como la rosácea, seborrea, hidradenitis supurativa, desórdenes de la queratinización y en la prevención del cáncer cutáneo. En el tratamiento del acné la isotretinoína actúa reduciendo hasta un 90% el tamaño de las glándulas sebáceas disminuyendo los sebocitos basales y la producción de sebo inhibiendo directamente la proliferación de *Propionibacterium acnes* reduciendo también la inflamación y el engrosamiento de la capa más externa la piel (Gómez-Flores et al, 2011).

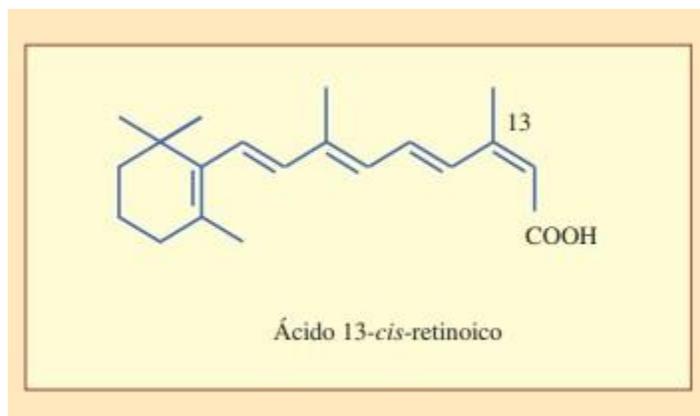


Figura 1. Fórmula estructural ácido 13-*cis* retinoico, tomada de Soria & Ribera, 2005

El mecanismo de acción de los retinoides está determinado por la acción sobre los receptores celulares específicos en los tejidos blandos, por medio de este mecanismo regulan la expresión de algunos genes activando la expresión génica y originando ARN mensajeros determinantes de las acciones de los retinoides en los órganos; en cuanto a la acción del ácido 13 *cis*-retinoico este se caracteriza por un 90% de actividad sebopresora modificando la composición de los lípidos cutáneos, disminuyendo glicéridos, ácidos grasos libres, tamaño de glándulas sebáceas e inhibiendo la proliferación de sebocitos, además, tiene una acción sobre la microbiota del organismo disminuyendo *Propionibacterium acnes* por la alteración del microclima folicular y actúa como un antiinflamatorio. Este derivado de la vitamina A actúa directamente en las glándulas sebáceas, disminuye la sebogénesis y normaliza la queratinización folicular cesando la proliferación bacteriana teniendo como resultado la cura del acné (Piquero, 2004).

Los efectos adversos por el uso de isotretinoína en periodos como el embarazo son la teratogenicidad, retrasando la eliminación de metabolitos provocando un aumento del paso de estos al embrión a través de la placenta por tres de los mecanismos por los cuales se cree que el ROH (retinol) atraviesa la placenta y entra en las células embrionarias: 1. Transferencia directa de ROH-RBP a través de la proteína específica RBP4 que implica la captación celular de retinol y la liberación de la proteína ligando del retinol (RBP); 2. La transferencia libre de ROH, y 3. La captación celular de ROH por medio de STRA6 (receptor específico para retinol) (Jiménez & Carreño, 2014); esta exposición genera una distorsión de las células de la cresta neural, las concentraciones plasmáticas elevadas de esta sustancia en etapas tempranas del desarrollo provocan la muerte celular que puede inducir abortos

espontáneos, pero en caso de que la gestación continúe pueden aparecer malformaciones en el oído externo, dismorfias faciales, anomalías oculares, alteraciones en el sistema nervioso central como hidrocefalia, microcefalia o anencefalia e incluso atrofia de cerebelo y alteraciones cardiacas (Ariño Arias et al, 2016).

Generalidades de la proliferación celular

La proliferación celular permite el crecimiento en número de todas las células a partir del cigoto y la renovación de células “viejas” o “dañadas” presentes en los tejidos de los seres vivos su función suele confundirse con el ciclo celular pero este es un modelo que esquematiza los procesos que tienen lugar en las células durante el proceso de proliferación (García-Quintana, 2005).

La replicación del material genético y su reparto entre las células resultantes de la mitosis tienen lugar en las fases S y M respectivamente, en las fases G1 y G2 del ciclo celular se produce la autovaloración de la capacidad celular para la transición a la fase siguiente y la integración de señales procedentes de otras células para iniciar o continuar el proceso de proliferación celular que a su vez se relaciona con los mecanismos de inducción, determinación, diferenciación y migración celular para dar origen a un organismo pluricelular (Fig 2) (García-Quintana, 2005).

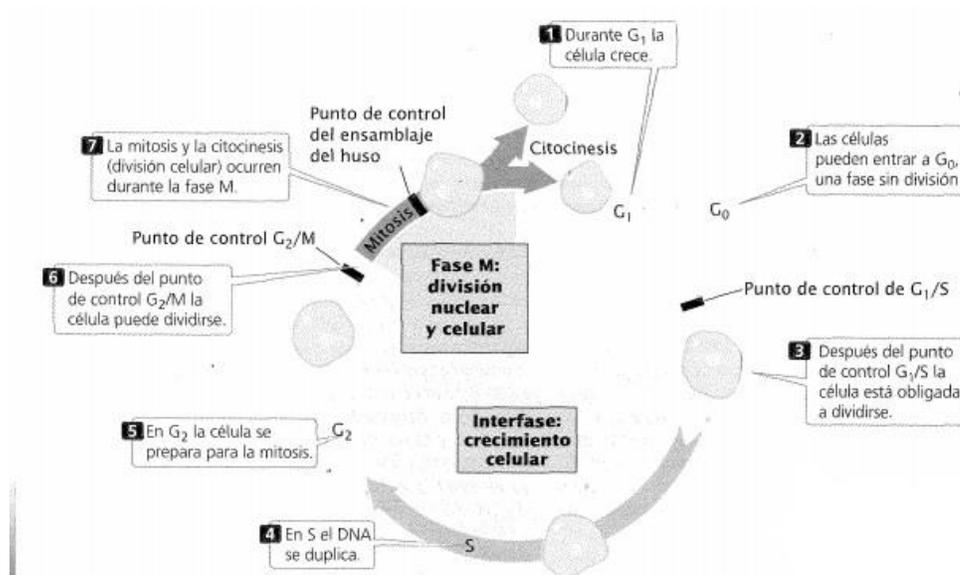


Figura 2. Esquema de la proliferación celular, tomado de Pierce, 2006

Generalidades de la vitamina A y sus derivados en el desarrollo embrionario

En procesos biológicos como la visión, la reproducción, el crecimiento, la modulación inmunitaria, la espermatogénesis y la embriogénesis es fundamental la vitamina A, mediadas por su forma fisiológicamente activa el ácido retinoico directamente involucrado en el crecimiento, diferenciación celular y transcripción de factores nucleares específicos por medio de receptores nucleares que actúan directamente sobre genes específicos, los receptores RAR y RXR (Jiménez & Carreño, 2014).

En el organismo el retinol tiene dos destinos; el almacenamiento y su metabolismo para convertirse en ácido retinoico por la acción de proteínas como la RBP (proteína de unión al retinol) y otras involucradas en la modulación celular (CRBP I, II y III) y RA (CRABP I y II) en etapas como el embarazo el ácido retinoico al ser sintetizado controla la expresión de números genes que influyen en la formación de órganos como el corazón, el cerebro, la medula espinal y los ojos por ello la deficiencia o exceso de vitamina A durante el desarrollo embrionario conllevan a alteraciones en la morfogénesis y organogénesis, que se evitan por medio del mecanismo de regulación del ácido retinoico, disponible en momentos determinados del desarrollo y en tejidos de alta importancia durante el mismo, por la acción de la enzima lecitina retinol aciltransferasa (LRAT) que mantiene la homeostasis en la oxidación del ácido retinoico durante el desarrollo embrionario (Jiménez & Carreño, 2014).

Genes Hox y su función en el desarrollo embrionario

Los genes Hox hacen parte de un sistema de regulación del desarrollo conservado como una unidad para llevar a cabo la función de asignar valores posicionales en un campo de células necesaria para el desarrollo de organismos pluricelulares, son una secuencia de unión al ADN denominada homeodominio constituida por 61 aminoácidos que juegan un papel fundamental en el desarrollo embrionario determinando el patrón de desarrollo a lo largo del eje anteroposterior especificando la identidad de los somitas y dando información posicional a lo largo de este eje para la regulación de la organogénesis, esta función está demostrada en artrópodos, cordados y nematodos (Negre, 2005). Los genes Hox se encuentran tanto en el desarrollo embrionario como en el adulto siendo relacionados con diversas patologías como el cáncer (Hernández et al, 2006).

Su clasificación es compleja dividiéndolos habitualmente en dos grupos: Genes Hox senso estricto y genes Hox senso Lato. Siendo los genes Hox senso estricto (s.e) o *antennapedia-type* o *clustered Hox genes*. Los que se encuentran agrupados en cuatro clusters de la A-D (Hox A-D) distribuidos en diferentes cromosomas, durante los primeros estadios del desarrollo embrionario juegan un papel central en el establecimiento de los somitas (Hernández et al, 2006).

Las histonas y su función a nivel celular

La longitud del material genético de organismos eucariotas y su diámetro celular superado por la gran cantidad de pares de bases que componen el material genético hacen indispensable procesos de compactación del mismo, en los cuales intervienen las histonas, proteínas de entre 10 y 16 kDa que efectúan la función de empaquetamiento de material genético al ensamblarse a una estructura llamada octámero compuesto por dos copias de cada histona H3, H4, H2A y H2B sobre las cuales se pliegan 147 pares de bases dando lugar al nucleosoma unidad base de la cromatina la cual provee un dinamismo estructural que regula el acceso al material genético para procesos como la transcripción, traducción y reparación (Espinoza, 2017).

En los procesos de traducción específicamente se lleva a cabo la fosforilación, la cual tiene lugar en residuos de treonina y serina relacionados directamente con el control transcripcional y mitótico. La fosforilación específica de las histonas H1 y H3 funciona como regulador de la transcripción aportando a la respuesta rápida de algunos genes, la progresión del ciclo celular y la reparación del ADN (Lara, 2009).

Apoptosis

La apoptosis es una forma fisiológica de suicidio celular que se da por la fragmentación del ADN siendo un proceso dependiente de energía y de la síntesis de nuevas proteínas y que se relaciona con el proceso de embriogénesis por el recambio celular y la eliminación de células que se encuentren infectadas, mutadas o dañadas (Búrgues et al, 2005).

Este proceso consta de dos fases, en la primera de ellas (D1) se producen los mecanismos moleculares que la originan y en la siguiente fase (D2) se produce la destrucción nuclear y citoplasmática que deja expuestos los restos celulares para que sean fagocitados por macrófagos. Esta serie de procesos fisiológicos y bioquímicos que caracterizan la apoptosis

Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas son aquellas que basadas en la afinidad entre antígenos y anticuerpos por la atracción que se produce entre dichas moléculas y hace que estas se aproximen y se unan, gracias a la alta afinidad de los anticuerpos que ayuda a que se puedan detectar cantidades muy pequeñas de moléculas en los tejidos. La mayoría de técnicas inmunohistoquímicas pueden ser aplicadas en tejidos fijados y pueden diferenciarse dos tipos de métodos, los directos en donde se utiliza un anticuerpo primario marcado que se unirá al antígeno específico, que hará posible su detección y localización. Los indirectos en donde el anticuerpo primario no está marcado y que será reconocido por un anticuerpo secundario marcado. Los marcajes inmunohistoquímicos se realizan con fluorocromos, con enzimas, con oro o con isótopos radioactivos. De estos procedimientos el más utilizado es el que se realiza con fluorocromos, moléculas químicas que absorben la luz a una determinada longitud de onda. Para su visualización se necesita un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros adecuados para el fluorocromo empleado (Pardo, 2017).

Antecedentes

Melnik 2017, presentó una revisión sobre la teratogenicidad de la isotretinoína titulada “Overexpression of p53 explains isotretinoin's teratogenicity” en donde expone los mecanismos por los cuales ésta ingresa al organismo y su efecto por la acción en las glándulas sebáceas, por medio de la isomerización intracelular de isotretinoína a ATRA (ácido retinoico todo (all) trans), que se relaciona con la apoptosis tanto de sebocitos como de células de la cresta neural. En los sebocitos el aumento de la expresión de estas proteínas pro-apoptóticas se da por la unión del factor de necrosis tumoral relacionado con el ligando inductor de la apoptosis (TRAIL)- TRAIL- receptor 1 y el factor de crecimiento similar a la insulina la proteína de unión 3 (IGFBP3), donde p53 regula el alza de expresión de dichos factores que a su vez inducen y alteran la expresión de diversos factores de transcripción como KROX-20 y PAX-2 que generan alteraciones en el anillo ótico, truncamiento y reducción del tamaño de los arcos faríngeos y alteraciones en el cerebro posterior.

Los factores de transcripción de los genes HOX se han identificado como promotores de P53, por su inducción por ATRA lo que mejora la expresión de P53, esta interacción (ATRA-HOX-P53) explica la teratogenicidad de los retinoides y hace especialmente susceptibles a

las células de la cresta neural y los sebocitos al poseer mayor capacidad para isomerizar ATRA. En el desarrollo de las células de la cresta neural del pez cebra mutante *eif3ba p53* juega un papel determinante porque dichas estructuras están asociadas con una marcada regulación positiva de P53 y la apoptosis pronunciada en el área craneal, lo que demuestra que una sobreexpresión de P53 aumentó la apoptosis en las células de la cresta neural, mientras que la deficiencia de las mismas facilita la supervivencia de dichas células. La apoptosis mediada por p53 inducida a su vez por isotretinoína explica su efecto reductor de sebo por la inducción de apoptosis de los sebocitos y sus efectos teratógenos por la apoptosis exagerada durante el desarrollo embrionario.

Navarro et al, 2018 en su trabajo “Dysregulatory effects of retinoic acid isomers in late zebrafish embryos”, mostraron los efectos transcriptómicos de la adición ectópica y la desactivación de vías de señalización fisiológicas (hormonales, nerviosas, inmunes) de ácido retinoico todo trans (ATRA) y ácido 9-cis retinoico en embriones de pez cebra en etapa post eclosión en concentraciones subletales, exponiendo peces en dos etapas del desarrollo, de 2 a 5 días y de 4 a 5 días Pf, incluyendo un control con DMSO 0,1% y soluciones de 100nM de cada uno de los tratamientos para cada etapa establecida con concentraciones de 100nM utilizando 50 larvas por triplicado, en ellas identificaron 15818 genes que dividieron en grupos (A,B,C) en los cuales A correspondió a los genes cuyo número de copias aumentó en todos los tratamientos y aquellos que estaban relacionados con la región extracelular, la actividad hormonal, unión a ADN específico de la secuencia, desarrollo del hígado y metabolismo del retinol mostrando efectos más fuertes en los embriones tratados con ATRA. El grupo B correspondió a genes con una representación insuficiente en todos los tratamientos pero relacionados con la membrana plasmática, y un grupo C relacionado con actividad enzimática y hormonal cuya abundancia relativa dependía de las concentraciones de ATRA o de 9-Cis RA. Permitiéndole al organismo responder a fluctuaciones de AR sin importar de donde provenga (endógeno/exógeno) con una abundancia relativa de ARNm relacionados con la membrana plasmática, el transporte y el metabolismo vinculado al efecto antiproliferativo de los retinoides.

Duester, 2008 En su revisión “Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis”, sobre la síntesis de ácido retinoico (AR) endógeno y enzimas retinaldehído

deshidrogenasa (RALDH), encontró que el ácido retinoico codifica muchos de los procesos que están regulados por factores de crecimiento de proteínas como la neurogénesis, cardiogénesis, extensión del eje del cuerpo, desarrollo de extremidades anteriores, así como el intestino anterior y los ojos. Y para su síntesis es necesaria la intervención de alcohol deshidrogenasas (ADH) y retinol deshidrogenasas (RDH) responsables de la oxidación de retinol a retinaldehído, seguido de una intervención de las retinaldehído deshidrogenasas (RALDH 1, 2, 3) que oxidan el retinaldehído a ácido retinoico el cual será conducido a la degradación por las enzimas citocromo p450 (CYP 26 A1, 26B1, 26C1) que influyen en el lugar donde se da la señalización y lo que pueda ocurrirle al embrión. El ácido retinoico no es producido por todas las células del cuerpo en todas las etapas del desarrollo pues este se produce con un patrón especial, el hígado secreta retinol y se transporta en niveles micromoleculares por la proteína de unión al retinol RPB4 que pone este a disposición de todas las células para su posible conversión a AR, el aumentar o disminuir los niveles de vitamina A o AR a los embriones puede inducir fácilmente efectos teratogénicos con alteraciones importantes en la organogénesis, pues por si solo el AR es fundamental para el desarrollo del cerebro posterior, la médula espinal, el corazón, los ojos, el esqueleto, las yemas de los dedos de las manos, los pulmones, el páncreas y el tracto genitourinario.

Planteamiento del problema

El acné es una de las afecciones dermatológicas más común en adolescentes y jóvenes adultos caracterizada por una inflamación crónica del folículo polisebáceo que se manifiesta en forma de comedones, pápulas, pústulas, nódulos, quistes, abscesos, flemones y lesiones que pueden ubicarse especialmente en zonas en donde abundan los folículos polisebáceos y con sensibilidad particular a andrógenos como la cara, el tronco, el área central del tórax y la parte superior de la espalda, con etiología diversa que pueden tener consecuencias cicatrizantes (GLEA, 2007)

Para su tratamiento existen diversos medicamentos tópicos y orales, pero desde 1982 se usa ampliamente la isotretinoína (ácido 13- cis retinoico) un agente sebosupresor que ha revolucionado el tratamiento de esta afección sobre todo en sus formas más severas por disminuir la comedogénesis, reducir el tamaño de la glándula sebácea en más del 90%,

disminuir la proliferación de sebocitos basales, suprimir la producción de sebo e inhibir la diferenciación del sebocito terminal (GLEA, 2007)

Entre sus efectos adversos se encuentra la teratogenia por su uso durante la etapa del embarazo clasificándose en la categoría X de la Food and Drug Administration (FDA) como uno de los fármacos con alto riesgo de generar daño permanente en el feto interfiriendo principalmente en la actividad y la migración de las células de las crestas neurales craneanas durante el desarrollo lo que causa diversas malformaciones (GLEA, 2007) lo cual nos llevó a la pregunta, ¿el uso de Isotretinoína durante el desarrollo temprano del pez cebra (*Danio rerio*) genera alguna alteración en sus patrones de proliferación celular?

Justificación

Con la realización del presente estudio se pretende realizar un aporte a los registros ya existentes de los efectos teratogénicos de la isotretinoína, comercializada en Colombia como Isoface y formulada para formas graves de acné en adolescentes y jóvenes adultos. Los resultados de este serán de especial utilidad sobre todo para mujeres en edad reproductiva y que se encuentren en tratamiento con isotretinoína como una alerta sobre el consumo de dicho medicamento durante el embarazo sobre todo en el primer trimestre del mismo.

En donde el modelo de pez cebra (*Danio rerio*) por su alta homología genética con los humanos aportará la información necesaria para la extrapolación de un referente de los efectos teratogénicos del uso de dicho medicamento durante el embarazo.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar los efectos del ácido 13 cis-retinoico (isotretinoína) sobre la proliferación celular en el desarrollo temprano del pez cebra (*Danio rerio*).

Objetivos específicos

Evaluar los efectos del tratamiento con isotretinoína sobre la proliferación celular en embriones de pez cebra (*Danio rerio*)

Determinar los efectos en el desarrollo presentados por embriones de pez cebra (*Danio rerio*) sometidos a tratamiento con isotretinoína en diferentes concentraciones.

Metodología

Mantenimiento de peces adultos y obtención de embriones

Instalaciones y condiciones de acuario

Los peces se encontraban en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Cuernavaca, Morelos en donde disponen de un animalario con peceras en acrílico adecuados para almacenar de 10 a 15 individuos por pecera separando líneas silvestres (wild type) de líneas transgénicas, contando con un equipo de osmosis inversa que purifica el agua de grifo liberándola de agentes contaminantes y teratogénicos que provee una recirculación constante de la misma por filtros de carbón activado los cuales retienen las impurezas generadas por los desechos de los peces y ayudan a evitar la acumulación de amonio en las peceras, dicho sistema se complementa con una combinación de sales y bicarbonato de sodio (NaHCO₃) para conservar las condiciones de pH de entre 7,2 y 8 y de temperatura entre los 25°C y 30° C.

Alimentación y regulación del ciclo circadiano

La regulación del ciclo circadiano de los peces en las instalaciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) cuenta con 14 horas de luz y 10 de oscuridad que provee el sistema de manera programada.

Su dieta se estableció con alimento vivo (*Artemia salina*) y procesado Zebra Feed, SPAROS Lda., intercambiado durante los horarios de alimentación (8:00 am; 12:00m; 3:00 pm; 6:00pm) para peces adultos y rotíferos para larvas en proceso de crecimiento.

Reproducción y obtención de embriones

Para la reproducción de los peces se realizó un procedimiento sencillo de separación de hembras y machos durante su último horario de alimentación (6:00 pm) haciendo uso de una pecera grande de acrílico, una malla de tela de 30x30 y una pecera pequeña, en donde se ubicaba la malla de hilos en la pecera grande y en ella se colocaban las hembras, la pecera pequeña se ubicó dentro de la pecera grande y en ella se depositaron los machos dejándolos hasta el día siguiente en condiciones de total oscuridad, en el siguiente horario de alimentación (8:00am) los peces se juntaron de 20 a 30 minutos con unas buenas condiciones de iluminación, necesarios para la ovoposición y fertilización de los huevos que

posteriormente se recolectaron y pasaron por un proceso de limpieza para la eliminación de desechos.

Dilución del medicamento y determinación de concentraciones de trabajo

La dilución del medicamento se realizó depositando todo el contenido de una capsula de ISOFACE (isotretinoína) 20mg en un tubo falcón de 50 ML, posteriormente se agregaron 20000 μ L de DMSO 100% (SIGMA catálogo 67-68-5) para obtener una solución stock con una concentración de 1 μ g/ μ L del medicamento, de la cual se realizaron las diluciones de trabajo final a una concentración de 0,1 μ g/ μ L.

Se establecieron 6 concentraciones de trabajo yendo desde 0,0001 μ g/ μ L hasta 0,01 μ g/ μ L cuya determinación se realizó teniendo en cuenta el peso de embriones en la etapa embrionaria de escudo (100 μ g) (Hachicho et al, 2015) y la dosis recomendada para adultos en tratamiento con isotretinoína (0,5 mg/kg) datos con los cuales se realizó una conversión de unidades (de miligramos y kilogramos a microgramos).

A partir de la dosis recomendada se realizó una regla de tres teniendo la dosis recomendada para humanos (μ g) extrapolada a peces (μ g) y el peso de un embrión (μ g) se realizó la operación y el valor resultante se multiplico por 10 que eran el total de embriones que iban a ser tratados por concentración, se buscaron dos concentraciones inferiores a la recomendada y dos superiores a ella que se establecieron siguiendo el mismo procedimiento para encontrar el equivalente de mg en μ g obteniendo concentraciones de 0,0001 μ g/ μ L (0,1 mg/kg), 0,00025 μ g/ μ L (0,25 mg/kg), 0,0005 μ g/ μ L (0,5 mg/kg), 0,001 μ g/ μ L (1 mg/kg), 0,002 μ g/ μ L (2 mg/kg) y 0,01 μ g/ μ L (10 mg/kg) obteniendo finalmente los volúmenes requeridos para realización del experimento (tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de trabajo para evaluar el efecto de isotretinoína sobre la proliferación celular durante el desarrollo embrionario del pez cebra

Concentraciones de trabajo	μ l de ERM (Medio de embrión) + DMSO1%	μ l de isotretinoína 0,1 μ g/ μ l por cada concentración de trabajo	Volumen final
0,0001 μ g/ μ l	299,7 μ l	0,3 μ l	300 μ l
0,00025 μ g/ μ l	299,25 μ l	0,75 μ l	300 μ l
0,0005 μ g/ μ l	298,5 μ l	1,5 μ l	300 μ l

0,001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	297 μl	3 μl	300 μl
0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	294 μl	6 μl	300 μl
0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	270 μl	30 μl	300 μl

Proceso experimental

Para el desarrollo experimental se hizo uso de un total de 190 embriones en etapa de escudo; 10 para grupo control y 30 por cada una de las concentraciones de trabajo establecidas que se distribuyeron en una placa de 28 pozos (10 en cada pozo) a las cuales se le agregaron 300 μl de medio de embrión (ERM) + DMSO 1% + concentración de medicamento a trabajar que se llevaron a incubación a 28° hasta los horarios establecidos para el monitoreo en las 24, 48 y 72 Hpf y la toma de fotografías en el estereoscopio con la ayuda del software uc480 Camera Manager, cambiando el medio con la dilución del medicamento en las 24Hpf por únicamente medio de embrión para la determinación final de las concentraciones de trabajo que generarán menos efectos letales en los embriones tratados y que serían utilizadas para la realización de procesos de inmunolocalización.

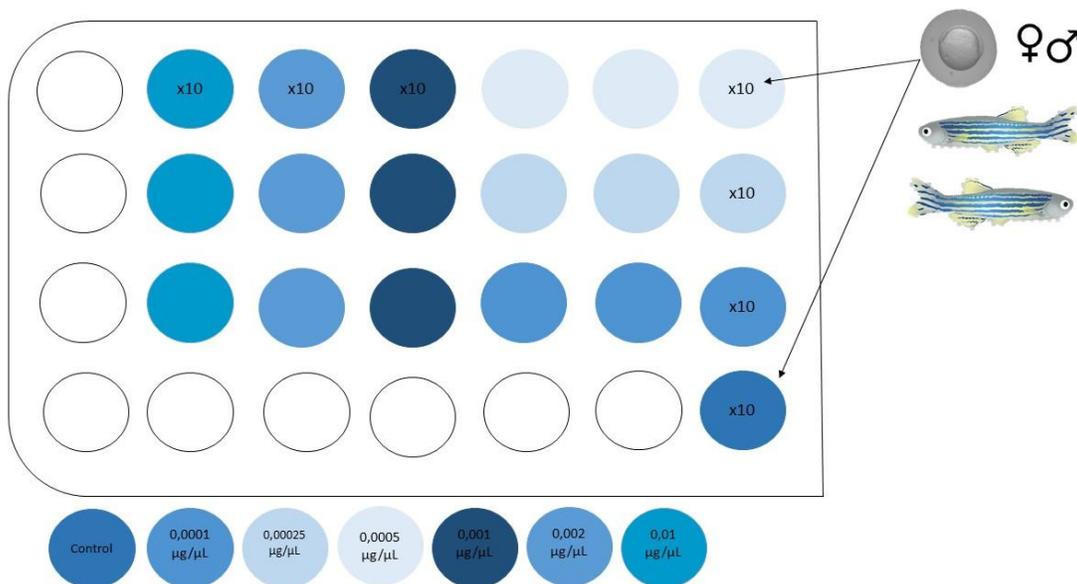


Figura 4. Representación gráfica del proceso experimental desarrollado, visualizándose una caja de cultivo de 28 pozos en la que se depositaron embriones en etapa de escudo yendo desde un grupo control con 10 individuos a la concentración más alta con tratamientos por triplicado

Inmunolocalización con fosfohistona H3 (PH3) y tinción para filamentos de actina

La inmunolocalización se realizó tomando embriones que llevaban 24 horas en tratamiento los cuales fueron decorionados y posteriormente fijados con paraformaldehído (OH (CH₂O)) al 4%, lavados con Buffer bloqueo (PBS 1x; BSA 0,1%; Triton X100 1%), incubados con un anticuerpo primario a 4°, anticuerpo secundario Alexa 488 anti conejo y faloidina Alexa 488 (ver anexo) para su posterior visualización en el microscopio de fluorescencia ZeissAxioscop a 5X 0.15 N.A., PlanNeofluoar.

Montaje para visualización de imágenes y condiciones del microscopio de fluorescencia

Para la visualización de los embriones se usó un gel de agarosa (invitrogen cat 15510-027) al 1% preparado en cajas de Petri de 60 x 15 mm en donde se ubicaron y orientaron los embriones fijados con el protocolo de inmunolocalización y posteriormente fueron cubiertos por una capa de metilcelulosa al 1,5% que los inmovilizaba y hacia más eficiente el proceso de fotografía de los embriones en el microscopio de fluorescencia Zeiss Axioscop a 5X 0.15 N.A en el software AxioCamMRc5:Live con una exposición de 210ms al 70%

Conteo de células en proliferación

El conteo de células en proceso de proliferación se realizó utilizando el software imageJ y el plugin 3D object counter, el cual teniendo en cuenta la exposición de la imagen resalta los puntos donde se emite con mayor intensidad la señal fluorescente y arroja un valor numérico como representación de la intensidad de dicha señal.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de análisis de varianza y ANOVA de uno y dos factores haciendo uso del software statgraphics quién a partir de las matrices de datos establecidas para cada uno de los criterios de evaluación realizó tablas y graficas que representaron los datos obtenidos en valores numéricos.

Resultados y discusión

Supervivencia de embriones durante las 24, 48 y 72 Hpf

Del ensayo de supervivencia de embriones para la prueba de concentraciones de trabajo final derivan alteraciones en el establecimiento del eje anteroposterior, desarrollo craneal, y

desarrollo de somitas. Durante las primeras 24 Hpf (Fig 5) se presentaron alteraciones en el desarrollo de las estructuras craneales como las protuberancias cerebrales y las vesículas ópticas con una reducción de embriones en tratamiento de 61,1 % por la muerte de los embriones en las concentraciones de trabajo más altas, durante las 48 Hpf las alteraciones observadas en el 10,52% de embriones vivos pertenecientes a las tres concentraciones más bajas fueron la no separación del vitelo y la cola, segmentación reducida, formación anormal del eje posterior y somitas no formados en la parte caudal del embrión (Fig 6) y finalmente en las 72 Hpf la totalidad de los embriones había muerto y se desintegraban con facilidad ante cualquier perturbación en el medio líquido en el que se encontraban inmersos (Fig 7).

En suma estas dinámicas de supervivencia y un análisis de varianza muestran la interacción entre sí, comprobando que determinadas concentraciones generaron diferentes efectos de acuerdo al tiempo de exposición (Tabla 2) (Fig 7).

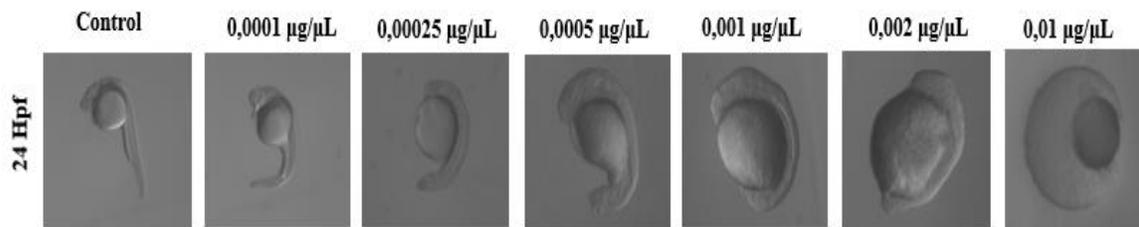


Figura 5. Efecto del tratamiento con isotretinoína (ácido 13- cis retinoico) en las 24 Hpf observándose las alteraciones letales para la concentración 0,01 µg/µL y las alteraciones subletales para las concentraciones de 0,0001 µg/µL a 0,002 µg/µL.

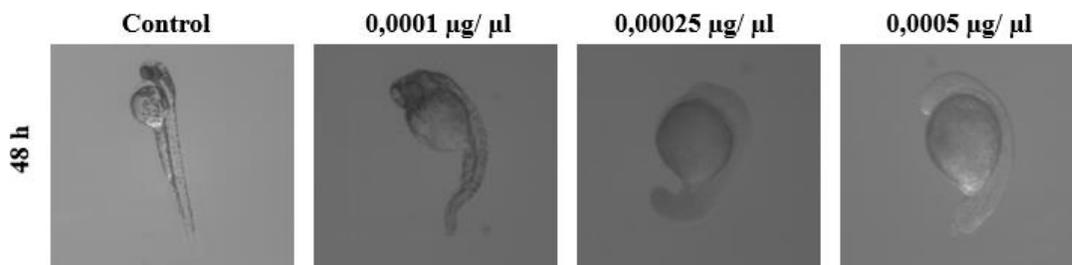


Figura 6. Efecto del tratamiento con isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) a las 48 Hpf observándose el grupo control y las alteraciones subletales en las concentraciones de 0,0001 µg/µL; 0,00025 µg/µL y 0,0005 µg/µL

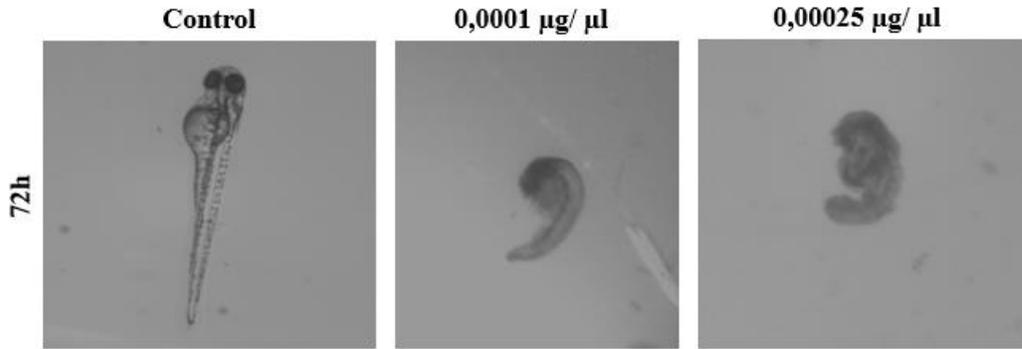


Figura 7. Efecto del tratamiento con isotretinoína (ácido 13- cis retinoico) a las 72 Hpf observándose el grupo control y los embriones muertos de concentraciones de 0,0001 µg/µL y 0,00025 µg/µL

Tabla 2. Análisis de varianza entre el tiempo de tratamiento y las concentraciones de isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) durante las primeras 72 Horas post fecundación.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Concentracion	1326,6	6	221,101	33,32	0,00001
B:Tiempo	1724,41	2	862,206	129,95	0,00001
INTERACTIONS					
AB	1548,92	12	129,077	19,45	0,00001
RESIDUAL	278,667	42	6,63492		
TOTAL (CORRECTED)	4878,6	62			

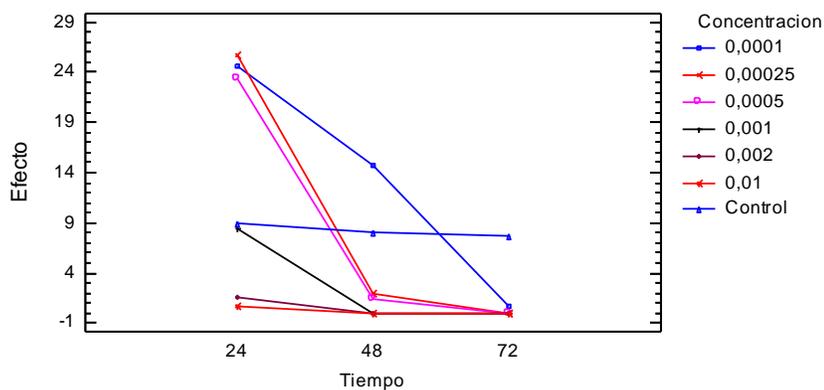


Figura 8. Representación gráfica de análisis de varianza con respecto al tiempo entre concentraciones de tratamiento de isotretinoína (ácido 13- cis retinoico) en embriones de pez cebra (*Danio rerio*)

Finalmente de la realización del protocolo de inmunolocalización de filamentos de actina derivan tres tipos de alteraciones identificables en los embriones en tratamiento con las concentraciones 0,0001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 0,00025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 0,0005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Alteraciones en el desarrollo embrionario

Alteraciones craneales

Por la influencia de las concentraciones de ácido retinoico en el desarrollo embrionario de estructuras craneales se resaltan las alteraciones en la formación de vesículas ópticas, plácoda ótica, arcos faríngeos, regiones cerebrales y la pigmentación en retina y piel durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*) encontrando embriones con un completo desarrollo de dichas estructuras y como conforme aumentó la concentración estas características se hacían más notorias (Fig 9) y que en resumen McGurk et al, 2014 relacionan con la sobreexpresión de los genes Sonic Hedhog (Shh), el factor de crecimiento óseo (BMP) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas responsables de la señalización de células de la cresta neural, epitelio adyacente, ectodermo y endodermo quienes expresan las moléculas necesarias para la morfogénesis del esqueleto craneofacial, quienes respectivamente regulan los movimientos morfogenéticos de los arcos, el patrón de migración de células de la cresta neural a nivel dorsal y ventral dentro de los mismos y el crecimiento del esqueleto craneofacial.

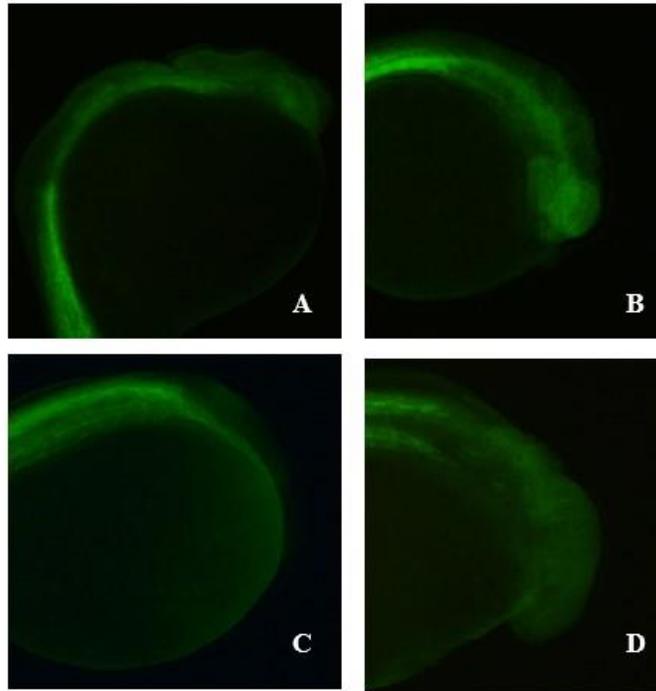


Figura 9. Efectos del tratamiento con isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) en el desarrollo craneal del pez cebra (*Danio rerio*); A. Grupo control, región craneal en completo desarrollo, B. 0,0001 µg/ µL región craneal con desarrollo incompleto, C. 0,00025 µg/ µL región craneal sin desarrollo aparente, D. 0,0005 µg/ µL región craneal con desarrollo incompleto.

Alteraciones en la formación de los somitas

La presencia del ácido retinoico durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*) generó alteraciones durante el desarrollo de los somitas encontrando efectos más marcados en las concentraciones más altas (Fig 10), con somitas completamente desarrollados en el grupo control los cuales se deformaron conforme aumentó la concentración del medicamento, estos efectos se relacionan con la producción de morfógenos que Durston et al, 1989 y Ojeda et al, 2014 describen como los responsables del desarrollo del eje anteroposterior, las extremidades y la diferenciación regional del sistema nervioso central por la regulación de la inducción neural mediante la expresión de ARN mensajero, el cual polariza una región celular que produce un morfógeno secretado en una región restringida del embrión, los somitas, generando un gradiente de concentración que regula la expresión de acuerdo a la concentración ácido retinoico en el patrón anteroposterior y su adecuado desarrollo. Cuando la síntesis de ARN mensajero se ve afectada por dichas concentraciones también se afecta la expresión de los genes Hox 4 en sentido 5' que Izpisúa-

Belmonte et al, 1991 relacionan con las alteraciones encontradas en esta región en el proceso experimental.

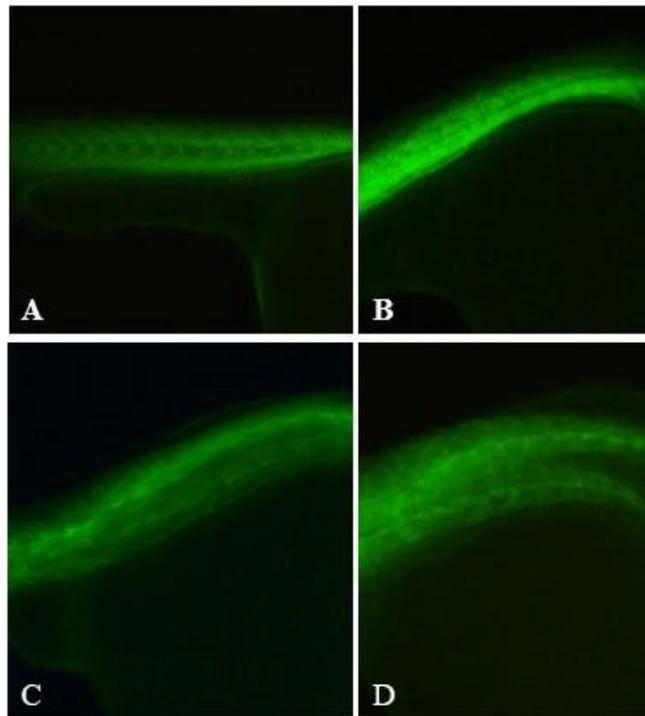


Figura 10. Efectos del tratamiento con isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) en el desarrollo de los somitas del pez cebra (*Danio rerio*); A. Grupo control, somitas en completo desarrollo, B. 0,0001 µg/ µL somitas con desarrollo incompleto, C. 0,00025 µg/ µl somitas con desarrollo incompleto D. 0,0005 µg/ µL somitas con desarrollo incompleto.

Alteraciones en el desarrollo del eje anteroposterior

El desarrollo del eje anteroposterior en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) se da entre la etapa de gástrula y la etapa de segmentación. En los embriones tratados con isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) se observa como la región posterior de los embriones en las concentraciones más altas (Fig 11) no está desarrollada, identificable por la no formación de esclerotomos, los somitas y la no separación de la aleta caudal y el vitelo que son la característica distintiva de un correcto desarrollo.

De acuerdo a ello Melnik, 2017 y Landau et al 2001 describen las alteraciones presentadas a nivel muscular por el efecto apoptótico de ISOFACE sobre células sensibles a la isomerización del medicamento como los sebocitos y las células de la cresta neural, durante los procesos apoptóticos desencadenados en dicho proceso los factores de transcripción

KROX-20 y PAX-2 que forman los primordios del sistema nervioso central y regionalizan la placa neural, generan una sobreexpresión de genes Hox, dicha sobreexpresión estimula la apoptosis por la activación del ligando inductor de apoptosis TRAIL y DR4/5 y aumentan los niveles normales de creatina quinasa que se reflejan en los daños musculares encontrados.

Las alteraciones en la homeosecuencia tanto en el desarrollo embrionario del pez cebra como del ser humano generan efectos en el desarrollo craneofacial, de somitas y de establecimiento del eje anteroposterior, Sadler, 2010 relaciona estos efectos con la tercera semana del desarrollo porque en ella se dan procesos similares como la separación del cerebro en regiones, establecimiento de la notocorda, la placa precordial y la placa neural por la expresión de genes de la homeosecuencia de la clase *Antennapedia* confiriendo valores posicionales a lo largo del eje anteroposterior, estos genes están regulados por la concentración de ácido retinoico (AR). En procesos como la formación de los pliegues neurales y los arcos faríngeos por acción de OTX1, EMX1 y EMX2 expresados en el prosencéfalo y el mesencéfalo especificando la identidad de estas áreas, el diseño dorsoventral controlado por la expresión de SHH y las proteínas morfogénicas óseas (BMP) 4 y 7, en el diseño ventral y del sistema nervioso central se expresa SHH que a su vez induce la expresión de NKX2.1 y en el diseño dorsal se expresan las BMP 4 y 7 en el ectodermo adyacente neural induciendo también a MSX1 en la línea media y LHX2 en la corteza que inician la cascada de genes para diseñar esta región.

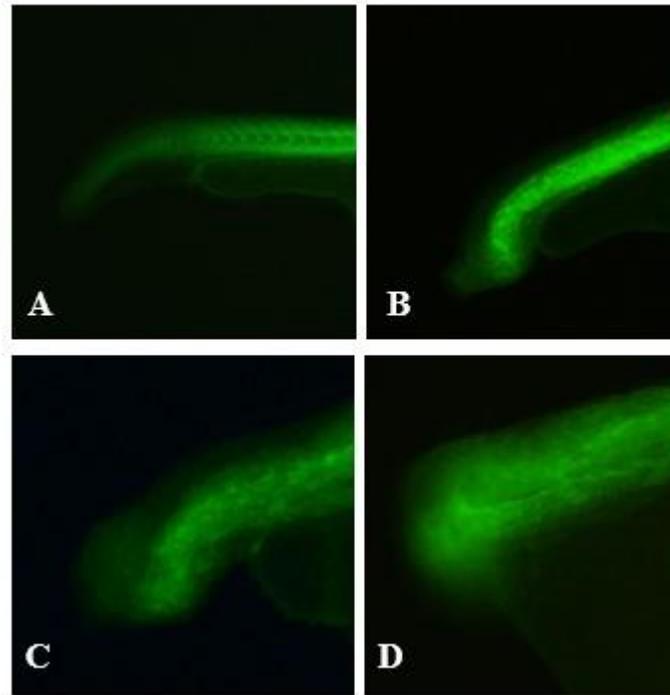


Figura 11. Efectos del tratamiento con isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) en el desarrollo del eje anteroposterior del pez cebra (*Danio rerio*); A. Eje anteroposterior completo, B. 0,0001 µg/ µL Eje anteroposterior incompleto, C. 0,00025 µg/ µL Eje anteroposterior incompleto, D. 0,0005 µg/ µL Eje anteroposterior incompleto

Proliferación celular y arresto del ciclo celular durante las 24Hpf

En concordancia con la variabilidad de proliferación exhibida entre grupos de 81,2 células en proliferación para el grupo control, 247,5 células para la concentración 0,0001 µg/ µL, 213,9 células para la concentración 0,00025 µg/ µL y 210,8 células para la concentración 0,0005 µg/ µL (Fig 12) (Fig 13) y de acuerdo a los datos proporcionados por el análisis de varianza (Tabla 3) se otorgó un carácter heterogéneo a los resultados de este proceso experimental, mostrando un resultado contrario al esperado.

Para estas dinámicas de proliferación Li et al, 2019 y Park et al, 2019 proponen que la señal luminosa captada no corresponde propiamente a los procesos de proliferación celular, sino a un arresto del ciclo celular por la inhibición del complejo ciclinas-CDKs (quinasas dependientes de ciclinas) el cual se ve afectado por altas concentraciones de ácido retinoico y que genera la regulación negativa de la ciclina E1 encargada directamente de la transición de la fase G1 a S, que junto con otros factores de transcripción relevantes en el ciclo celular

involucra la activación de p53 un potente inhibidor de las CDKs que interrumpe el paso de G1 a S y también el desarrollo normal del pez cebra.

Por su parte Búrges et al, 2005 describe estas señales luminosas como parte de la fase D2 de la apoptosis descrita como la fase en donde se produce la destrucción nuclear y citoplasmática, para este caso generada por altas concentraciones de ácido retinoico en los procesos de desarrollo embrionario, cuyo inicio está marcado por la activación de la vía del receptor de la muerte celular dependiente de la superfamilia génica de receptores del TNF (factor de necrosis tumoral) el cual posee un dominio de muerte que desencadena una cascada de eventos que llevan a la apoptosis por la unión de ligandos Fas presentes en la membrana celular a FADD / MORT-1 y FLICE formando un complejo de señalización de muerte inducida (DISC por sus siglas en inglés) y que activa la caspasa 8 siendo esta la señal de activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7 que constituyen la principal actividad de las células apoptóticas.

Estos datos constatan finalmente por medio de una ANOVA de un factor (Tabla 4) que la proliferación celular si se ve afectada por el suministro de diferentes concentraciones de isotretinoína con un P valor= 0,00001, siendo estadísticamente significativo por las diferencias entre cada uno de las concentraciones y el grupo control.

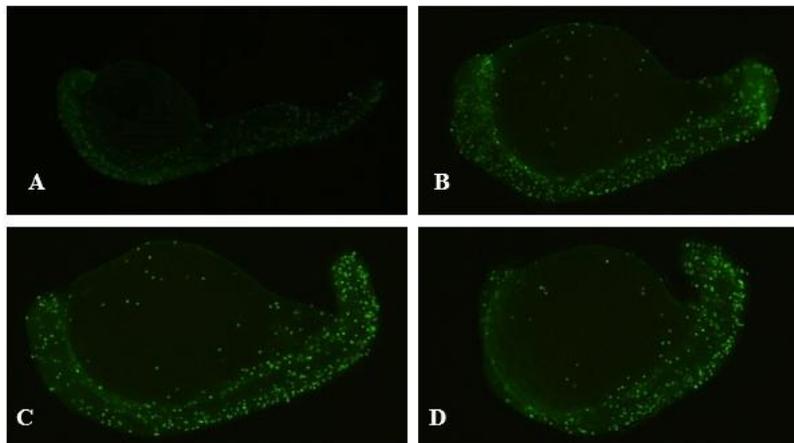


Figura 12. Efecto del tratamiento con isotretinoína (ácido 13 cis-retinoico) sobre la proliferación celular durante el desarrollo embrionario de pez cebra (*Danio rerio*); A. Grupo Control, B. 0,0001 µg/µL, C. 0,00025 µg/µL, D. 0,0005 µg/µL

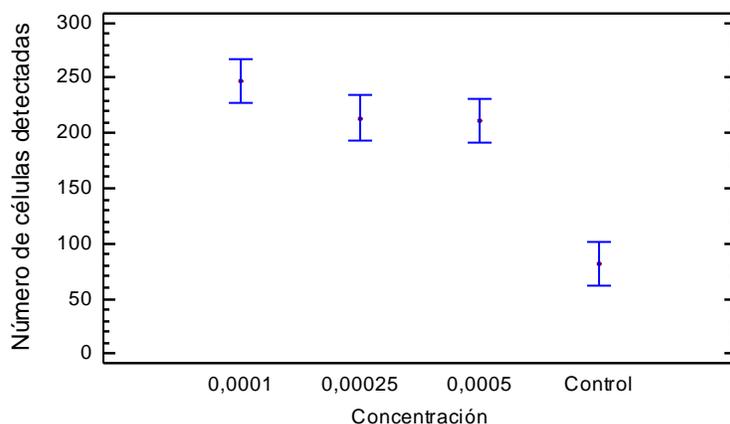


Figura 13. Representación gráfica de la proliferación celular por medio de un análisis de varianza entre el número de células en división detectadas y la concentración de isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*)

Tabla 3. ANOVA de un factor para el análisis de la proliferación celular en tres concentraciones de isotretinoína durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*)

Concentración	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation
0,0001	10	247,5	49,2911	19,9156%
0,00025	10	213,9	61,5602	28,7799%
0,0005	10	210,8	29,4611	13,9758%
Control	10	81,2	26,62	32,7832%
Total	40	188,35	77,0496	40,9077%

Tabla 4. Relación entre categorías de concentración de isotretinoína (ácido 13-cis retinoico) sobre la proliferación celular durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	161366,	3	53788,8	27,60	0,00001
Within groups	70162,6	36	1948,96		
Total (Corr.)	231529,	39			

Conclusiones

- El ácido 13-cis retinoico exhibe una aparente detención del ciclo celular y desencadena reacciones apoptóticas incluso en concentraciones más bajas a la sugerida como la dosis óptima 0,0005 µg/ µl ratificando la supervisión de su uso en etapas sensibles como la del embarazo.

- Los efectos asociados a miopatías representan una señal de alerta para el uso de ISOFACE 20mg porque dichos efectos pueden presentarse tanto en etapas embrionarias como en etapas adultas.
- Los efectos generados por el ácido 13 cis-retinoico en la proliferación celular de los embriones de pez cebra (*Danio rerio*) muestran la afectación directa de este a todas las moléculas que controlan y regulan dicho proceso durante el desarrollo embrionario.
- Finalmente esta investigación constituye un aporte a los estudios anteriormente realizados con este medicamento por otros investigadores en un modelo biológico emergente con amplias características deseables para la investigación biomédica.

Consideraciones finales

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante el desarrollo de nuestra investigación y los propuestos por la literatura investigada se sugiere el fortalecimiento de la prevención del uso del medicamento ISOFACE 20mg en casos diferentes a los del acné severo, buscando alternativas de medicamentos con efectos similares a la hora de tratar afecciones en la piel pero menos agresivos con células especialmente sensibles como las de la cresta neural durante el desarrollo embrionario.

Se sugiere además el fortalecimiento del uso de métodos anticonceptivos en mujeres adolescentes y adultas jóvenes en tratamiento con ISOFACE 20mg para disminuir casos de abortos espontáneos y malformaciones congénitas durante el embarazo.

Finalmente las campañas informativas a población adolescente y adulta joven en tratamiento con ISOFACE 20mg para evitar sucesos como la formulación del medicamento por periodos prolongados de tiempo que puede conducir a daños hepáticos y las ya mencionadas a lo largo de nuestra investigación.

Bibliografía

Ariño Arias , C., Armendáriz Patier, L., & Azparren García, L. (2016). Acné e isotretinoínas . *Tesis de Pregrado* . Madrid, Universidad Complutense de Madrid , España.

- Armengol Cubillos , M. (2017, Junio). *ResearchGate*. Retrieved from Pez cebra como modelo en investigación biomédica: <https://www.researchgate.net/publication/322245677>
- Blázquez S, V., & Tomás L, F. (2014). Efectos secundarios a nivel ocular de diversos grupos de fármacos (y III). *Gaceta optica*; 14.783, 20-23.
- Bortagaray, V., & Rodríguez , D. (2016). Evaluación de las propiedades embriotóxicas y teratogénicas de herbicidas a base de glifosato mediante el bioensayo de toxicidad embrio-larval en pez cebrá (Danio rerio). *Tesis de pregrado*. Montevideo, Uruguay: Universidad de la República .
- Búrgues G, J., Pontones M, J., Vera D, C., Jiménez C, J., & Ozonas M, M. (2005). Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urológicas Españolas*; 29 , 846-859.
- Duester, G. (2008). Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell* 134, 921-931.
- Durston, J., Timmermans, W., Hage, F., Hendriks, H., de Vries, N., Heideveld, M., & Nieuwkoop, P. (1989). Retinoic acid causes anteroposterior transformation in the developing central nervous system . *Nature* (340), 140-144.
- Espinoza Arratia , C. (2017). “ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LA HISTONA H3 CITOSÓLICA MAL PLEGADA POR EL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSOMA”. *Tesis de pregrado*. Universidad de Chile , Chile: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas .
- García-Quintana, C. (2005). Aceleración y frenado de la proliferación celular. *Anales de la Real academia de farmacia*: 71, 535-569.
- GLEA (Grupo Latinoamericano de Estudio del Acné). (2007). *Acné un enfoque global*. Buenos Aires, Argentina: Colegio Ibero-Latinoamericano de Dermatología.
- Gómez-Flores, M., García-Hidalgo, L., Fierro-Arias, L., Ruiz-Ávila, J., Herz-Ruelas, M., & Garza-Gómez, J. (2011). Uso de isotretinoína en acné común . *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* , 281-288.
- Hachicho, N., Reithel, S., Miltner, A., Heipieper, H., Küster, E., & Luckenbach, T. (2015). Body Mass Parameters, Lipid Profiles and Protein Contents of Zebrafish Embryos and Effects of 2,4-Dinitrophenol Exposure. *PLOS ONE* / DOI:10.1371, 1-19.
- Hernández, O., Marrero, A., & Rodríguez, J. (2006). ¿Qué son los genes Hox? Su importancia en la enfermedad vascular y renal. *NEFROLOGÍA* (26), 195-205.
- Izpisúa-Belmonte, J., Tickle, C., Dollé, P., Wolpert, L., & Duboule, D. (1991). Expression of the homeobox Hox-4 genes and the specification of position in chick wing development . *NATURE VOL 350* , 585-589.

- Jiménez C, Y., & Carreño M, E. (2014). El ácido retinoico en el desarrollo embrionario. *Sal y Soc Uptc.* 2014;1, 67-75.
- Kimmel, C., Ballard, C., Kimmel, S., Ullman, B., & Schilling, T. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, 203-253.
- Landau, M., Mesterman, R., Ophir, J., Mevorah, B., Alcalay, J., Harel, A., & Nevo, Y. (2001). Clinical Significance of Markedly Elevated Serum Creatine Kinase Levels in Patients with Acne on Isotretinoin. *Acta Dermatológica Venereol;* 81, 350-352.
- Lara Martín, E. (2009). ESTUDIO DE INHIBIDORES DE SIRTUINAS COMO FUTUROS AGENTES ANTITUMORALES. *Tesis de Doctorado*. Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid.
- Li, H., Wang, C., Li, L., Bu, W., Zhang, M., Wei, J., . . . Ma, P. (2019). Adapalene suppressed the proliferation of melanoma cells by S-phase arrest and subsequent apoptosis via induction of DNA damage. *European Journal of Pharmacology* 15;851, 174-185.
- McGurk, P., Lovely, B., & Eberhart, J. (2014). Analyzing Craniofacial Morphogenesis in Zebrafish Using 4D Confocal Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, 1-7.
- Melnik, B. (2017). Apoptosis May Explain the Pharmacological Mode of Action and Adverse Effects of Isotretinoin, Including Teratogenicity. *Acta Dermatoveneorologica;* 97, 173-181.
- Melnik, B. (2017). Overexpression of p53 explains isotretinoin's teratogenicity. *Experimental Dermatology*, 91-93.
- Mendieta-Serrano, M., Schnabel, D., Lomelí, H., & Salas-Vidal, E. (2013). Cell Proliferation Patterns in Early Zebrafish Development. *THE ANATOMICAL RECORD* (296), 759-773.
- Navarro, L., Oliveira, E., Casado, M., Barata, C., & Piña, B. (2018). Dysregulatory effects of retinoic acid isomers in late zebrafish embryos. *Environ Sci Pollut Res* (25), 3849-3859.
- Negre, B. (2005, Abril 22). Caracterización Genómica y Funcional de las Reorganizaciones del Complejo de Genes Hox en Drosophila. *Memoria para obtener el título de Doctora en Ciencias Biológicas*. Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Ojeda, G., López, Y., Díaz, M., & Rojas, M. (2014). Efecto de la Administración de Ácido Retinoico Sobre el Desarrollo del Esqueleto Axial en Embriones de Ratón Mus musculus. *International Journal of Morphology*, 1449-1456.
- Pardo C, N. (2017, Julio). Neurogénesis en el mesencéfalo del pez cebra adulto (Danio rerio). *Trabajo de fin de grado área de Biología Celular*. La Coruña, España: Universidad de la Coruña.

- Park, H., Lee, J.-Y., Park, S., Song, G., & Lim, W. (2019). Developmental toxicity of fipronil in early development of zebrafish (*Danio rerio*) larvae: disrupted vascular formation with angiogenic failure and inhibited neurogenesis . *Journal of Hazardous Materials* , 1-38.
- Piquero, J. (2004). Isotretinoína: Su uso en el acné adolescente . *Dermatología pediátrica latinoamericana* , 72-81.
- Sadler, T. (2010). *Langman Embriología Médica 11° edición* . Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Vargas-Vargas, R. (2017). Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anestesia en México Vol.29* , 86-96.

Anexos

Anexo 1 Protocolo de inmunofluorescencia de embriones completos

Día 1.

1. Colectar embriones por la mañana
2. Incubar los embriones en agua de embrión (medio ERM) a 28° hasta la etapa que se desean fijar los embriones (24 Hpf)
3. En un tubo eppendorf colocar de 10 a 20 embriones y remover la mayor cantidad de agua de embrión
4. Agregar 1,5 ml de paraformaldehido (PFA) al 4 % (PBS 10X; fosfato disódico (Na₂HPO₄); fosfato monosódico (NaH₂PO₄); cloruro de sodio (NaCl); cloruro de potasio (KCl); PBS 1X; PFA en polvo) al 4 % y guardar a 4° toda la noche.

Día 2.

5. Remover el PFA y lavar 3 veces con 1ml de Buffer bloqueo (PBS 1X; BSA 0,1%; triton X 100 1%)
6. Transferir los embriones a una caja Petri con Buffer bloqueo
7. Remover el corión con pinzas
8. Transferir los embriones con Buffer bloqueo a una caja de 48 pozos en grupos de 10 embriones con 200 µL por pozo
9. Lavar los embriones 3 veces con 200 µL de Buffer bloqueo
10. Agregar 200 µL de Buffer bloqueo e incubar a temperatura ambiente por lo menos 3 horas con agitación constante
11. Remover la mayor cantidad de Buffer bloqueo y agregar 200 µL de anticuerpo primario diluido en Buffer bloqueo 1:100
12. Incubar el anticuerpo primario durante toda la noche con agitación ligera a 4° cubierto de la luz

Día 3.

13. Remover la mayor cantidad del anticuerpo primario y lavar 3 veces durante 10 minutos con 200 µL de Buffer bloqueo para eliminar el anticuerpo primario que no se unió
14. Remover la mayor cantidad de Buffer de bloqueo y agregar 200 µL del anticuerpo secundario Alexa 647 diluido en Buffer de bloqueo 1:100
15. Incubar el anticuerpo secundario Alexa 647 a 4° durante toda la noche con agitación ligera.

Día 4.

16. Remover la mayor cantidad de anticuerpo secundario y lavar 3 veces durante 10 minutos con 200 μ L de Buffer bloqueo
17. Resuspender embriones en 400 μ L de Buffer bloqueo
18. Transferir los embriones a una caja Petri con Buffer bloqueo
19. Los embriones están listos para montaje de microscopía.

Anexo 2. Tinción para filamentos de actina con Alexa fluor 488

Día 1.

1. Colectar embriones por la mañana
2. Incubar los embriones en agua de embrión (medio ERM) a 28° hasta la etapa que se desean iniciar los tratamientos (escudo 6Hpf)
3. Incubar hasta las 24 Hpf y fijar los embriones
4. En un tubo eppendorf colocar de 10 a 20 embriones y remover la mayor cantidad de agua de embrión
5. Agregar 1,5 ml de paraformaldehido (PFA) al 4 % (PBS 10X; fosfato disódico (Na_2HPO_4); fosfato monosódico (NaH_2PO_4); cloruro de sodio (NaCl); cloruro de potasio (KCl); PBS 1X; PFA en polvo) y guardar a 4° toda la noche.

Día 2.

6. Remover el PFA y lavar 3 veces con 1ml de Buffer bloqueo (PBS 1X; BSA 0,1%; triton X 100 1%)
7. Transferir los embriones a una caja Petri con Buffer bloqueo
8. Remover el corión con pinzas
9. Transferir los embriones con Buffer bloqueo a una caja de 48 pozos en grupos de 10 embriones con 200 μ L por pozo
10. Lavar los embriones 3 veces con 200 μ L de Buffer bloqueo
11. Agregar 200 μ L de Buffer bloqueo e incubar a temperatura ambiente por lo menos 3 horas con agitación constante
12. Remover la mayor cantidad de Buffer bloqueo y agregar 200 μ L de anticuerpo primario diluido en Buffer bloqueo 1:100
13. Incubar el anticuerpo primario durante toda la noche con agitación ligera a 4° cubierto de la luz

Día 3.

14. Remover la mayor cantidad del anticuerpo primario y lavar 3 veces durante 10 minutos con 200 μ L de Buffer bloqueo para eliminar el anticuerpo primario que no se unió
15. Remover la mayor cantidad de Buffer de bloqueo y agregar 200 μ L del anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 diluido en Buffer de bloqueo 1:100

16. Incubar el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 a 4° durante toda la noche con agitación ligera.

Día 4.

17. Remover la mayor cantidad de anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 y lavar 3 veces durante 10 minutos con 200 µL de Buffer bloqueo

18. Resuspender embriones en 400 µL de Buffer bloqueo

19. Transferir los embriones a una caja Petri con Buffer bloqueo

20. Los embriones están listos para montaje de microscopía.