



FACULTADE DE CIENCIAS

GRADO EN BIOQUÍMICA

D.^a Iria Correal Pérez

**Caracterización fenotípica de una línea de pez cebrá
mutante para el gen *rft1***

**Caracterización fenotípica dunha liña de peixe cebrá
mutante para o xene *rft1***

**Phenotypic characterization of a mutant zebrafish
line for the *rft1* gene**

Trabaja Fin de Graáo
Junio 2025

Índice

Índice	2
Resumen	4
Resumo	5
Abstract.....	6
1. Introducción	7
1.1. Glicosilación.....	7
1.2. Tipos de glicosilación.....	7
1.3. N-glicosilación	8
1.4. Trastornos congénitos de la glicosilación	10
1.5. RFT1	12
1.6. El pez cebra como modelo experimental	14
1.6.1. <i>El pez cebra y la regeneración tisular</i>	17
2. Objetivos.....	20
3. Material y métodos	21
3.1. Cuidado y mantenimiento de los peces cebra	21
3.2. Regeneración de aleta.....	21
3.2.2. <i>Regeneración de la aleta</i>	21
3.3. Recogida de muestras	22
3.4. Genotipado	22
3.4.1. <i>Extracción de ADN</i>	22
3.5. Análisis estadístico	24
4. Resultados.....	25
4.1. Curva Kaplan-Meier.....	25
4.1.1. <i>Amplificación y genotipo</i>	25

4.1.2.	<i>Cálculo de la curva de Kaplan-Meier</i>	26
4.1.3.	<i>Análisis de la curva de Kaplan-Meier</i>	28
4.2.	Regeneración de aleta caudal	29
4.2.1.	<i>Análisis de la regeneración de aleta caudal</i>	29
5.	Discusión	36
5.1.	Análisis de la tasa de supervivencia asociada a cada genotipo	36
5.2.	Análisis de la regeneración de aleta caudal.....	38
6.	Conclusiones	41
7.	Bibliografía	42

Resumen

La glicosilación es una modificación postraducciona, de la cual existen varios tipos, que tiene lugar en diferentes compartimentos celulares. Cualquier alteración en genes, como por ejemplo *RFT1*, implicados en esta ruta causa los llamados trastornos congénitos de la glicosilación (CDG). El gen *RFT1* podría codificar para un transportador que participa en la vía de N-glicosilación. En el presente trabajo, se utilizó el pez cebra como modelo experimental para esclarecer algunos de los efectos de la mutación en este gen.

El objetivo de la investigación fue determinar la repercusión que tenía la mutación en la supervivencia y en la regeneración tisular.

Para alcanzar los objetivos, se llevaron a cabo genotipados, cortes de aleta y varios análisis estadísticos.

Los resultados obtenidos mostraron que los individuos homocigotos para la mutación contaban con una menor tasa de supervivencia, así como una regeneración de la aleta caudal significativamente inferior en comparación con los individuos heterocigotos y de tipo salvaje. Además, estos síntomas se correlacionaban con los descritos en pacientes que padecían un CDG. Con todo esto, se concluyó que la mutación en el gen *rft1* afectaba al desarrollo larval del pez cebra, así como impedía la correcta regeneración tisular, en este caso, de la aleta caudal.

PALBRAS CLAVE: glicosilación; N-glicosilación; CDG; *RFT1*; pez cebra; embriones; supervivencia; regeneración.

Resumo

A glicosilación é unha modificación postraducciona, da cal existen varios tipos, que teñen lugar en diferentes compartimentos celulares. Calquera alteración en xenes, como por exemplo *RFT1*, implicados nesta ruta causa os chamados trastornos conxénitos da glicosilación (CDG). O xene *RFT1* podería codificar para un transportador que participa na vía de N-glicosilación. No presente traballo, utilizouse o peixe cebra como modelo experimental para esclarecer algúns dos efectos da mutación neste xene.

O obxectivo de investigación foi determinar a repercusión que tiña a mutación na supervivencia e na rexeneración tisular.

Para acadar os obxectivos, leváronse a cabo xenotipados, cortes de aleta e varias análises estatísticas.

Os resultados obtidos mostraron que os individuos homocigotos para a mutación contaban cunha menor taxa de supervivencia, así como unha rexeneración da aleta caudal significativamente inferior en comparación cos individuos heterocigotos e de tipo salvaxe. Ademais, estes síntomas correlacionábanse cos descritos en pacientes que padecían un CDG. Con todo isto, concluíuse que a mutación no xene *rft1* afectaba o desenvolvemento larval do peixe cebra, así como impedía a correcta rexeneración tisular, neste caso, da aleta caudal.

PALABRAS CLAVE: glicosilación; N-glicosilación; CDG; *RFT1*; peixe cebra; embrións; supervivencia; rexeneración.

Abstract

Glycosylation is a post-translational modification, of which there are several types, taking place in different cell compartments. Any alteration in genes, such as *RFT1*, involved in this pathway causes so-called congenital glycosylation disorders (CDG). The *RFT1* gene could encode for a transporter that participates in the N-glycosylation pathway. In the present work, zebrafish was used as an experimental model to elucidate some of the effects of mutation on this gene.

The aim of the research was to determine the impact of the mutation on survival and tissue regeneration.

To achieve the objectives, genotyping, fin cutting and various statistical analyses were carried out.

The results obtained showed that homozygous individuals for the mutation had a lower survival rate, as well as a significantly lower caudal fin regeneration compared to heterozygote and wild-type individuals. In addition, these symptoms were correlated with those described in patients with CDG. With all this, it was concluded that the mutation in gene *rft1* affected the larval development of zebrafish, as well as preventing the correct tissue regeneration, in this case, the caudal fin.

KEY WORDS: glycosylation; N-glycosylation; CDG; *RFT1*; zebrafish; embryos; survival; regeneration.

1. Introducción

1.1. Glicosilación

La glicosilación es un proceso metabólico postraduccional complejo que resulta en la unión covalente de una cadena de oligosacáridos, llamada glicano a proteínas y lípidos. Este proceso enzimático se lleva a cabo en tres compartimentos diferentes de la célula: el citosol, el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi. Los glicoconjugados sintetizados pueden seguir dos destinos diferentes: ser incorporados a la membrana plasmática o secretados fuera de la célula. Se estima que aproximadamente el 2% del genoma expresado codifica proteínas que participan directa o indirectamente al proceso de glicosilación mediante la producción, regulación o la unión de los glicanos a sus dianas (1, 2).

Es imprescindible que esta ruta esté perfectamente regulada ya que juega un papel fundamental en funciones de gran importancia en el organismo. La glicosilación es clave para múltiples procesos de desarrollo, crecimiento y señalización celular. Es un elemento clave en la interacción entre las células y su entorno. Un ejemplo de esto es el rol de los glicoconjugados en la activación de la respuesta inmunitaria (3,4).

Es necesario la participación de distintas disciplinas o tecnologías para poder comprender la complejidad de la glicosilación, ya que cada una ofrece perspectivas únicas. Entre ellas está la proteómica, que permite cuantificar las glicoproteínas y los enzimas implicados en la ruta. La glicoproteómica posibilita la cuantificación de cambios específicos en la composición de los glicanos. Por último, la glicómica proporciona una caracterización estructural detallada de los glicanos (5).

1.2. Tipos de glicosilación

Existen diferentes tipos de glicosilación de acuerdo con el tipo de enlace entre la cadena del oligosacárido y el péptido (3):

- I. **N-glicosilación:** El péptido y el oligosacárido se unen a través de un grupo amida de residuos de asparagina.
- II. **O-glicosilación:** El péptido y el oligosacárido se unen a través del grupo hidroxilo, de residuos de serina o treonina principalmente.

Las glicoproteínas derivadas de la ruta de N-glicosilación comparten una estructura común de glicano formada por 14 azúcares, y se diferenciarán unas de otras debido a las últimas modificaciones sufridas en el aparato de Golgi. Sin embargo, en el caso de la O-glicosilación las distintas clases de glicoconjugados se van a distinguir en función del monosacárido que se une a la proteína obteniendo así una mayor variedad de O-glicanos (1).

1.3. N-glicosilación

La N-glicosilación es una modificación de glicanos altamente conservada y son miles las proteínas que están N-glicosiladas. A su vez, esta modificación está involucrada en numerosos procesos fisiológicos como el plegamiento de proteínas. Cualquier alteración en la estructura de los glicoconjugados puede derivar en el desarrollo de diferentes enfermedades. Por consiguiente, es clave comprender la ruta de N-glicosilación y dilucidar los mecanismos que regulan esta vía biosintética (6).

La glicosilación de proteínas tipo N ocurre fundamentalmente en dos orgánulos celulares: el aparato de Golgi y el RE. La síntesis del N-glicano se inicia en la cara citoplasmática del RE. Distintos monosacáridos se transfieren a un portador lipídico, el dolicol pirofosfato, gracias a las glicosiltransferasas, altamente específicas. Los sustratos de estas enzimas serán 7 azúcares, 5 manosas y 2 N-acetilglucosaminas, activados por nucleótidos (UDP-Man y UDP-GlcNAc). Finalmente, el glicano precursor unido a dolicol pirofosfato resultante es $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (7-9).

La siguiente fase de esta ruta consiste en la translocación del intermediario unido a lípido a través de la membrana del RE hacia su cara luminal por la acción de una flippasa, donde se continuará la síntesis del glicoconjugado. En el lumen, donde se completa el ensamblaje del oligosacárido con la adición de otros 7 monosacáridos. En este caso, se adicionan 4 unidades de manosa y 3 glucosas, para finalmente obtener el oligosacárido unido a lípido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (7-9).

A continuación, la oligosacariltransferasa (OST), un complejo proteico oligomérico de membrana, cataliza la transferencia del oligosacárido precursor a residuos de asparagina en las cadenas polipeptídicas nacientes. La secuencia aceptadora se caracteriza por el motivo Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (Figura 1) (8).

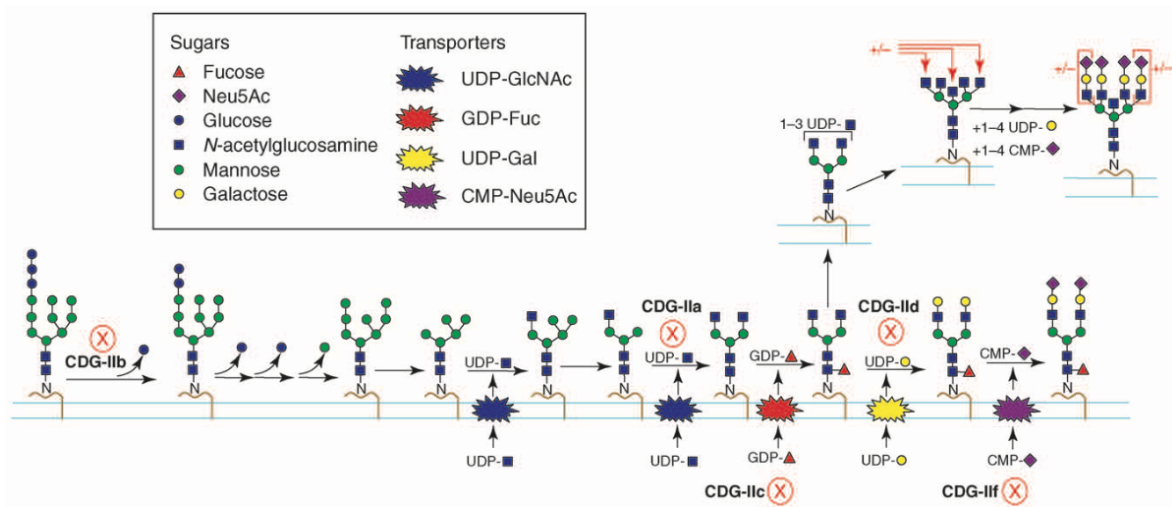


Figura 2. Ruta de N-glicosilación. Adición y eliminación de monosacáridos. Imagen obtenida de Freeze et al. (8)

1.4. Trastornos congénitos de la glicosilación

Los trastornos congénitos de la glicosilación (CDG), reportados por primera vez en la década de 1980 por Jaak Jaeken, constituyen una familia de enfermedades metabólicas hereditarias causadas por defectos en los genes importantes para el proceso de glicosilación de proteínas y lípidos. Debido al rápido avance de las técnicas genómicas y metabolómicas, los CDG son una categoría de rápida expansión (Figura 3) (1,2,10,).

Se trata de un grupo de trastornos, normalmente con herencia autosómica recesiva, muy heterogéneo, multisistémicos y en rápido crecimiento. Siguen siendo un campo de estudio activo y cada vez es mayor el número de subtipos conocidos además de los descubrimientos relacionados con los mecanismos de la enfermedad y el desarrollo de terapias (10,11).

Se ha propuesto un sistema de clasificación basado en el modo de acción, recogiendo así 8 categorías (2):

- Trastornos de la síntesis e interconversión de monosacáridos.
- Trastornos de la síntesis y transporte de azúcares-nucleótidos.
- Trastornos de la glicosilación de proteínas N-unidas.
- Trastornos de la glicosilación de proteínas O-unidas.
- Trastornos de la glicosilación de lípidos.
- Trastornos del tráfico vesicular.
- Trastornos de múltiples vías de glicosilación.
- Trastornos de la degradación de glicoproteínas o glicanos.

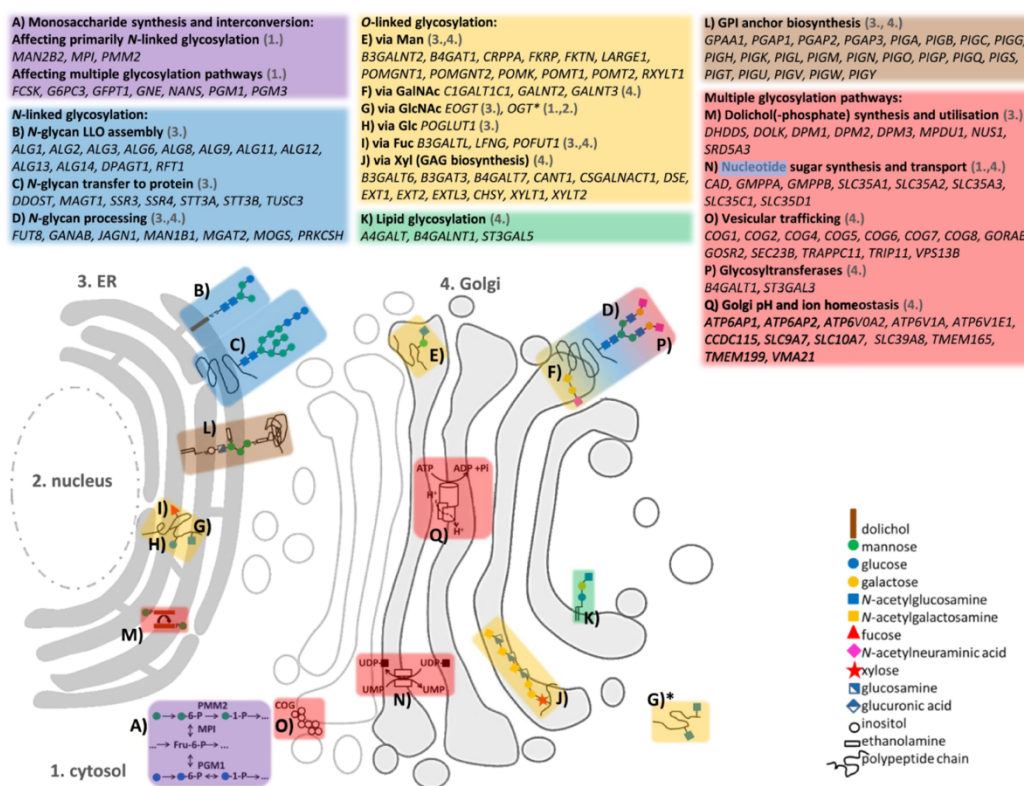


Figura 3. Localización y clasificación de algunos de los CDG. Imagen obtenida de Ondruskova et al. (1).

Los síntomas más característicos de los CDG están relacionados con discapacidades neurológicas y del desarrollo. Sin embargo, su naturaleza multisistémica también causa graves problemas en diferentes órganos y sistemas (12).

En el caso de la N-glicosilación se distinguen 2 tipos diferentes de CDG (13-15):

- **CDG tipo I (CDG-I):** Los defectos moleculares afectan a la etapa de ensamblaje del precursor oligosacárido unido a lípidos en el RE o en la transferencia de esta a las cadenas polipeptídicas. Este grupo es el que recoge la mayor parte de los CDG.
- **CDG tipo II (CDG-II):** Incluye defectos en el procesamiento o remodelación del glicano en el aparato de Golgi.

El análisis del enfoque isoelectrico de la transferrina se utiliza como prueba de cribado para detectar defectos de N-glicosilación tipo I y tipo II. Además, se han sumado al diagnóstico de estas patologías nuevos marcadores como la apolipoproteína C-III. Aunque, el diagnóstico de subtipos específicos se confirma mediante pruebas genéticas dirigidas a un solo gen, paneles de secuenciación de próxima generación para genes CDG, o secuenciación del exoma completo (16).

1.5. RFT1

Las glicosiltransferasas son unas de las enzimas clave para el proceso de glicosilación. En la actualidad, las identidades de las glicosiltransferasas necesarias para el proceso de glicosilación han sido determinadas. Además, varias de estas enzimas han sido caracterizadas estructuralmente. Sin embargo, existen otras proteínas y transportadores que participan en el proceso de N-glicosilación que todavía siguen siendo una incógnita. Un ejemplo es la proteína encargada de translocar el oligosacárido unido a lípido a través de la membrana del RE.

La identidad de la proteína que transloca el intermediario oligosacárido a través de la membrana del RE es motivo de controversia todavía. Esta proteína fue reportada por primera vez por Helenius y Aebi en los 2000. Algunos estudios bioquímicos indican que podría ser un transportador lipídico tipo escramblasa, capaz de equilibrar el oligosacárido unido a lípido entre las dos caras de la membrana e independiente de ATP. Cuando se descubrió el RFT1-CDG se observó que la deficiencia de la proteína RFT1 resultaba en la acumulación del intermediario, disminución del producto final de la N-glicosilación e hipoglicosilación de N-glicoproteínas. Por todo esto, RFT1 se propuso como la escramblasa, con base en estudios genéticos en levaduras (Figura 4) (17).

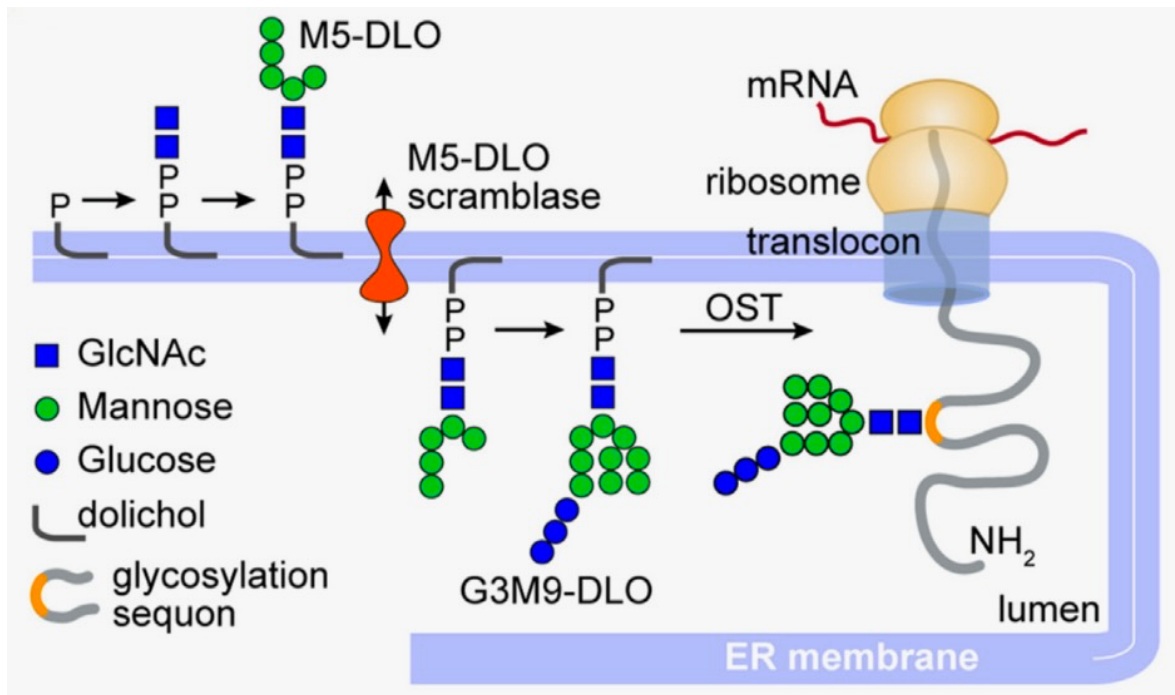


Figura 4. Ilustración de la actividad escramblasa en la ruta de N-glicosilación. Imagen obtenida de Hirata et al. (17)

A pesar de estos hallazgos, diversas investigaciones determinaron que RFT1 no es necesario para el intercambio en la membrana del RE in vitro. En estos estudios se emplearon vesículas reconstituidas y microsomas, y células de un organismo eucariota. Además, la actividad de translocación podía ser separada de RFT1 mediante diversos métodos. Sin embargo, se plantea la posibilidad de que de que algunos organismos hayan retenido proteínas redundantes en sus genomas durante la evolución de la N-glicosilación y por lo tanto, podría explicar algunas de las discrepancias en la literatura sobre el papel de RFT1 (17,18).

En 2008 Haeuptle y sus colaboradores identificaron al primer paciente con deficiencia de RFT1. Describieron a una niña pequeña que presentaba retraso psicomotor marcado, hipotonía convulsiones, hepatomegalia y coagulopatía. Esta mostraba una acumulación del intermediario Man₅-GlcNAc₂-DolPP una reducción de la proteína N-glicosilada final (19).

En investigaciones en el 2009 se identificó un único gen ortólogo humano de la proteína RFT1 de levadura. Este codifica una proteína de 541 aminoácidos, con un 22% de identidad con la RFT1 de levadura (7). En la actualidad, según predicciones realizadas con programas informáticos, RFT1 humana posee 14 dominios transmembrana. El extremo N-terminal y C-terminal se ubican en el lado citoplasmático (Figura 5) (17). En el caso del pez cebra, esta proteína no ha sido caracterizada por el momento.

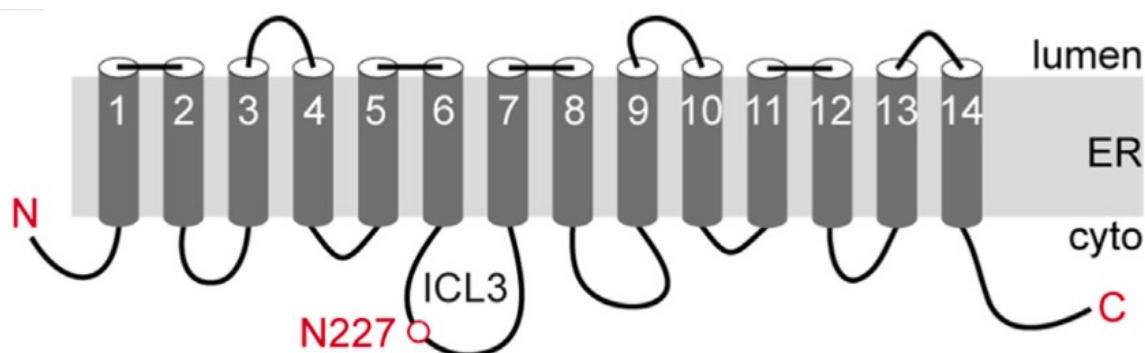


Figura 5. Predicción Alpha de la proteína codificada por el gen *RFT1*. Imagen obtenida de Hirata et al. (17).

La conservación funcional de las proteínas RFT1 en levadura y humano destaca el papel esencial de RFT1 en eucariotas inferiores y superiores. Pero todavía no hay una opinión unánime acerca del papel de esta proteína.

1.6. El pez cebra como modelo experimental

La necesidad de un organismo modelo que sea capaz de reproducir los síntomas metabólicos y que sirva para estudiar el desarrollo de enfermedades humanas ha llevado a la utilización de diversas especies animales a lo largo de los años. Entre todas, los roedores han tenido gran protagonismo en la investigación biomédica gracias a la existencia de protocolos estandarizados para el diagnóstico, el tratamiento entre otros. A pesar de todo esto, determinados factores los hacen relativamente diferentes a los humanos. Los roedores cuentan con diferentes requerimientos dietéticos o distintos estilos de vida lo que resulta un obstáculo para su uso en investigaciones biomédicas. Por consiguiente, se ha impulsado la utilización de sistemas modelos alternativos entre los que se encuentra el pez cebra (20). Este pez ha permitido estudiar y desarrollar terapias frente a diferentes trastornos del

desarrollo, mentales o metabólicos que afectan a parte de la población. Gracias a investigaciones que han usado el pez cebra como modelo ha mejorado el diagnóstico y tratamiento, así como la calidad de vida de múltiples pacientes.

El pez cebra, *Danio rerio*, es un pequeño pez teleósteo originario de los ríos del sur y este de India. Este pez presenta unas características físicas ventajosas que han resultado en su uso como modelo experimental en los laboratorios. La primera vez que se propuso a *Danio rerio* como modelo para la investigación genética fue con el trabajo de George Streisinger entre 1970 y 1980. En la actualidad, cada vez son más los laboratorios que utilizan el modelo de pez cebra para el estudio de enfermedades humanas (21-22).

El uso del pez cebra como modelo animal presenta diversas ventajas en el estudio del desarrollo y de las enfermedades de vertebrados frente a otros modelos, como los roedores, que lo hacen ideal para su uso en la investigación. Por un lado, su tamaño y anatomía son características clave. Para empezar su tamaño adulto es relativamente pequeño, de 2 a 3 cm, por lo que hace más fácil su manipulación a diferencia de los ratones cuyo tamaño es mucho mayor en edades adultas. Además, el mantenimiento de *Danio rerio* en acuarios para su uso en el laboratorio, es más sencillo y requiere un menor espacio que los roedores, suponiendo así un menor costo de mantenimiento de instalaciones. Asimismo, en las primeras etapas de su desarrollo el pez cebra posee un cuerpo transparente lo que permite obtener imágenes in vivo para seguir en detalle procesos de desarrollo en investigaciones relacionadas con el descubrimiento de fármacos o patogénesis. Sus características reproductivas también son importantes. Poseen un tiempo generacional muy rápido y tiene la capacidad de producir grandes cantidades de descendencia a diferencia de los modelos de mamíferos que necesitan meses para ello (Figura 6). Para continuar, la fertilización externa de los huevos hace posible seguir el desarrollo in vivo, cosa que en organismos como los ratones no es posible (20-23).

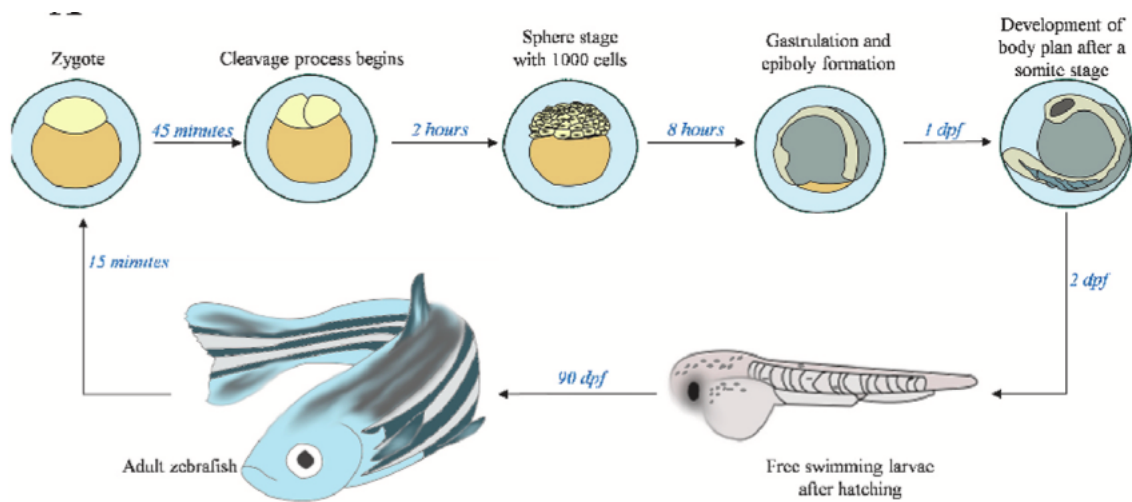


Figura 6. Esquema del ciclo de vida del pez cebra. Imagen obtenida de Adhish et al. (23)

Por otro lado, la genética del pez cebra es la idónea para emplearlo como modelo de enfermedades humanas. A través de la realización de cribas genéticas en pez cebra se lograron identificar mutaciones que producían unos efectos observables que se parecían a los detectados en enfermedades humanas (24).

El pez cebra es un vertebrado y como consecuencia comparte una relación más cercana con los humanos que los modelos invertebrados empleados a lo largo de la historia. A diferencia de *C. elegans* y *Drosophila melanogaster* posee características fisiológicas y anatómicas similares a los organismos superiores lo que sugiere que su genoma es más parecido al de los seres humanos. De hecho, es posible encontrar ortólogos de la mayoría de los genes humanos que muestran patrones de expresión similares. La comparación con el genoma de referencia humano mostraba que más del 70% de los genes humanos tienen al menos un ortólogo evidente en el pez cebra y que las proteínas resultantes comparten un 70% de identidad (Figura 7) (20-26). Todo esto lo hacía un modelo perfecto para estudiar enfermedades y distintos procesos patogénicos en vertebrados.

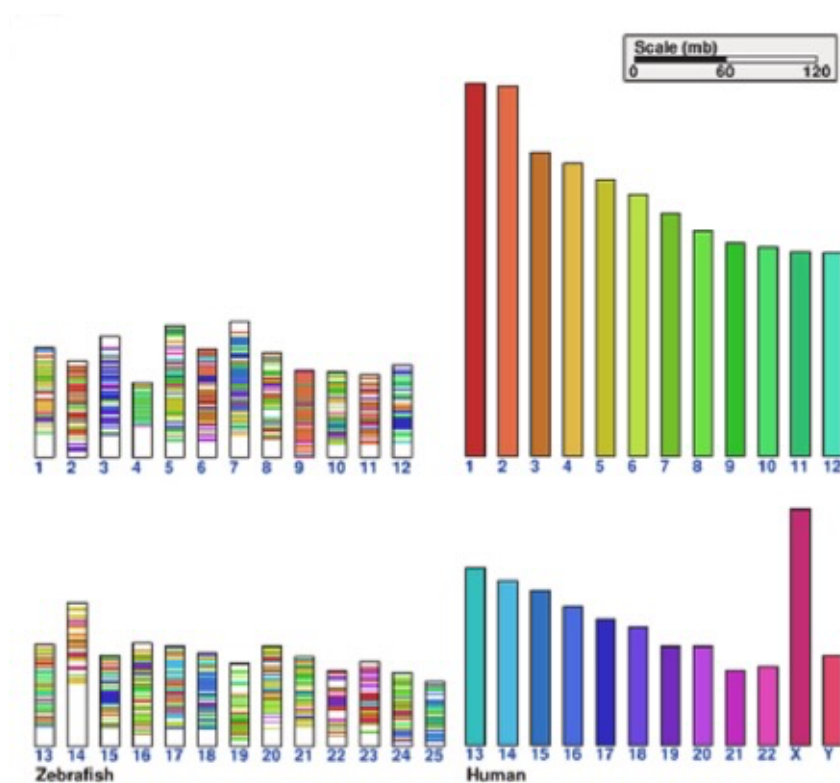


Figura 7. Comparación del genoma humano y del pez cebra. Imagen obtenida de Adhish et al. (23).

1.6.1. El pez cebra y la regeneración tisular

El número de aplicaciones del pez cebra como modelo animal en el laboratorio es cada vez más extenso. Entre sus usos, se encuentra el empleo de *Danio rerio* como modelo de regeneración tisular. La reparación de tejidos y la regeneración de órganos son procesos clave para mantener la integridad estructural y la funcionalidad de los órganos después de una lesión. Cada vez son más los estudios de regeneración que utilizan el pez cebra como modelo gracias a la existencia y mejora de las herramientas genéticas, como la transgénesis y la edición genómica (27,28).

Ciertos modelos vertebrados presentan una capacidad de regeneración limitada, restringida a ciertos tejidos o a un periodo de tiempo concreto. Sin embargo, el pez cebra posee un mayor grado de capacidad regenerativa en múltiples órganos y tejidos lo que lo convierte

en un modelo animal poderoso para comprender los mecanismos moleculares que se encuentran detrás de la señalización regenerativa.

Un ejemplo de los tejidos que el pez cebra es capaz de regenerar y que es muy usado en investigación son sus aletas. Mientras que los mamíferos la amputación de estructuras como la cola o las mismas aletas en mamíferos marinos resulta únicamente en la formación de una cicatriz rica en colágeno, el pez cebra es capaz de restaurar completamente todos los tipos celulares, la arquitectura del tejido incluso su función (27-29). Concretamente, el estudio de la regeneración de apéndices en pez cebra se utiliza ampliamente en investigación. La capacidad de los peces teleósteos, como es el caso del pez cebra, para regenerar aletas amputadas fue descrita por primera vez en 1786 por Broussonet. Sin embargo, no fue hasta casi 100 años después cuando alcanzó su uso en investigaciones genéticas (30).

El estudio de la regeneración de las aletas presenta diversas ventajas. Entre ellas, la amputación parcial de estas no tiene efectos perjudiciales importantes y la regeneración se puede monitorizar de forma sencilla en animales vivos. Aunque, todas las aletas del pez cebra presentan capacidad regenerativa, la más comúnmente usada es la aleta caudal. Esto es debido a que es la aleta más grande lo que facilita la manipulación y la observación (28-30).

Tras la amputación de las aletas se suceden una serie de acontecimientos que permiten regenerar el tejido. Para empezar, células del sistema inmune, como los macrófagos, son reclutados y se forma un epitelio que cubrirá la herida. Este epitelio, rápidamente se convierte en una estructura multicapa. Finalmente, se forma el blastema, un conjunto de células proliferativas e indiferenciadas que darán lugar a los diferentes tipos celulares (Figura 8) (29-31).

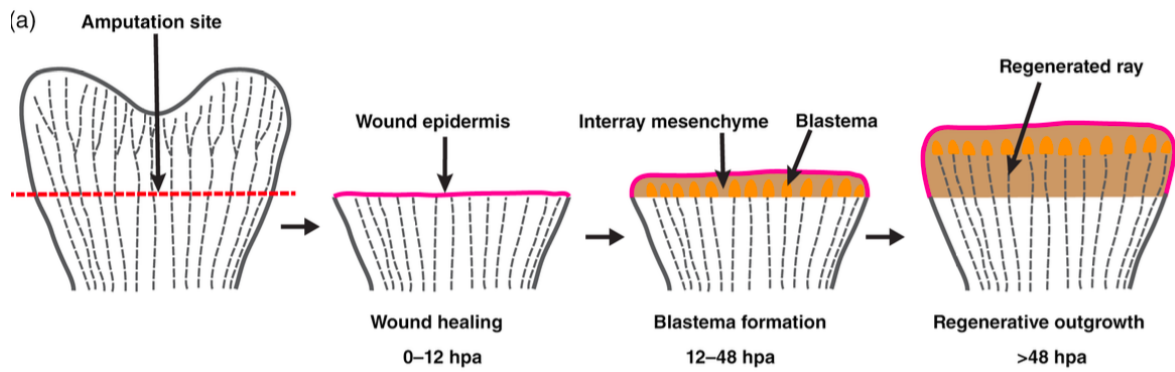


Figura 8. *Proceso de regeneración de la aleta caudal. Imagen obtenida de Sehring et al. (29)*

En conclusión, el pez cebra es y seguirá siendo un modelo clave para el estudio de patologías humanas. Para este estudio en concreto, es muy importante para el estudio de enfermedades ultra-raras como el caso de los CDG. Este tipo de investigaciones son fundamentales para conseguir un diagnóstico más rápido y un tratamiento más efectivo.

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo se centra en profundizar y ampliar el conocimiento del proceso de glicosilación, empleando para ello el modelo de pez cebra mutante para el gen *rft1*.

Por tanto, los objetivos específicos son:

- Evaluación del efecto de la mutación en la supervivencia.
- Evaluación del efecto de la mutación en la capacidad de regeneración de la aleta caudal en embriones.

3. Material y métodos

3.1. Cuidado y mantenimiento de los peces cebra

Los peces cebra de la cepa AB utilizados para los experimentos se mantuvieron en las instalaciones de acuicultura del Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física de la Universidad de Santiago de Compostela. Se mantuvieron a 28 °C con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, de acuerdo con protocolos previamente descritos (Westerfield, 2000; Aleström et al. 2019). Todos los experimentos que involucraron animales siguieron las directrices de la Comunidad Europea y del Gobierno Español sobre el cuidado y la experimentación con animales (Directiva 2012/63/UE y RD 53/2013) y fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad de Santiago de Compostela y el gobierno de la Xunta de Galicia.

3.2. Regeneración de aleta

3.2.1. Corte de aleta caudal

Se recogieron embriones de 48 horas post-fertilización (hpf) y se anestesiaron con metanosulfonato de triclaína (MS-222) 200 mg/L. Se colocaron los embriones anestesiados en una placa separados e identificados para mantener la trazabilidad del genotipo. A continuación, con la ayuda de la lupa, y el empleo de una aguja quirúrgica, se cortó la aleta caudal de cada uno de los individuos. El corte se realiza justo por detrás de la notocorda. Finalmente, se saca una fotografía de cada embrión con el corte realizado usando el estereomicroscopio Nikon AZ-STD (Nikon, Japón). Para asegurar una buena interpretación y reproducibilidad de los resultados es necesario realizar todas las fotos con el pez en posición lateral. Luego fueron transferidos a una placa de 24 pocillos que contenía medio E3 para su recuperación.

3.2.2. Regeneración de la aleta

A los 3 días post-amputación (dpa), se vuelve a sacar una fotografía de cada uno de los embriones que se le ha cortado la aleta caudal.

3.3. Recogida de muestras

Para el estudio de supervivencia, se recogieron los embriones que murieron durante los 15 primeros días de desarrollo. El último día, los embriones restantes fueron eutanasiados.

Cada embrión se depositó en un pocillo que contenía la resina Chelex 5% en agua destilada, en placas de 96 pocillos para proceder a su genotipado.

3.4. Genotipado

3.4.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras contenidas en Chelex 5% se realizó en un termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Primero se utilizó un programa de 95 °C 15 minutos. A continuación, las muestras fueron agitadas en un vortex durante 1 minuto y posteriormente, a cada pocillo se le adicionaron 5 µL de proteinasa K. Las muestras se centrifugaron y se volvieron a llevar al termociclador donde se utilizó el programa 56 °C 3 horas y finalmente 95 °C 10 minutos. Se obtiene así el ADN de cada uno de los embriones.

3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del ADN extraído se llevó a cabo mediante PCR. Los cebadores empleados son los mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. *Cebadores usados para realizar la PCR*

Cebadores	Secuencia de los cebadores	T _m
RFT1ex5-60F	AACCTCTCTGGGTCTTGCAC	60°C
RFT1ex5-60R	GGCACTGCAAGCACAGTCTA	60°C

La amplificación se realizó en un volumen final de 10,4 μL por cada una de las muestras. Este incluía 5 μL de Mezcla Promega 3; 0,7 μL de cada cebador (10 μM en agua Milli-Q); 3 μL de agua Milli-Q y 1 μL de muestra de ADN de cada uno de los embriones.

La PCR se realizó en un termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) utilizando el siguiente programa: 1 ciclo de 95 °C 10 minutos; 40 ciclos de 94 °C 30 segundos, 56 o 58 °C 30 segundos, 72 °C 30 segundos y finalmente 72 °C 10 minutos.

Tabla 2. Programa empleado para realizar la PCR.

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Paso 1: Desnaturalización	1	95°C	10 minutos
Paso 2: Alineamiento	40	94°C	30 segundos
		56/58°C	30 segundos
		72°C	30 segundos
Paso 3: Extensión	1	72°C	10 minutos

3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos amplificados se hacen migrar en una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se empleó tampón TAE 0,5x y tinción SYBR™ safe para poder observar las diferentes bandas. Para la migración de los fragmentos de ADN, se mezcló cada producto de PCR con 1 μL de azul de bromofenol 10x. Se aplicó un voltaje de 100 V durante aproximadamente 1 hora. Finalmente, para la visualización de las bandas resultantes se utilizó una lámpara ultravioleta.

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico y los gráficos de la curva de supervivencia se generaron utilizando Microsoft Excel versión 16.97 (25051114, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE.UU.).

Para el análisis de las fotos de regeneración de aleta caudal, se utilizó el programa Fiji (ImageJ, versión 21.0.7/1.54p, NIH, EE.UU.).

Para el análisis de las diferencias de longitud de aleta caudal regeneradas entre los distintos grupos se analizaron mediante un ANOVA de Welch, debido a que las varianzas fueron desiguales. Para las comparaciones entre los grupos se utilizó el test post-hoc de Games-Howell, ya que tanto las varianzas como los tamaños de muestras no fueron homogéneos. Se utilizó el programa jamovi (versión 2.6.26).

4. Resultados

4.1. Curva Kaplan-Meier

4.1.1. Amplificación y genotipo

Se realizó la PCR de los embriones muertos a lo largo de 15 días. El objetivo era amplificar la zona donde se encuentra el gen *rft1* para determinar el genotipo de cada uno de los embriones. La mutación en el gen *rft1* se trata de una inserción de 71 pb.

Como se muestra en la Figura 8, dependiendo del genotipo que presenta el embrión, el producto de amplificación se presenta de tres formas diferentes en el gel de agarosa. Esto dependen de si se trataba de ADN de un embrión homocigoto (Hom) para la mutación, heterocigoto (Het) o de tipo salvaje (WT, por sus siglas en inglés) (Figura 9).

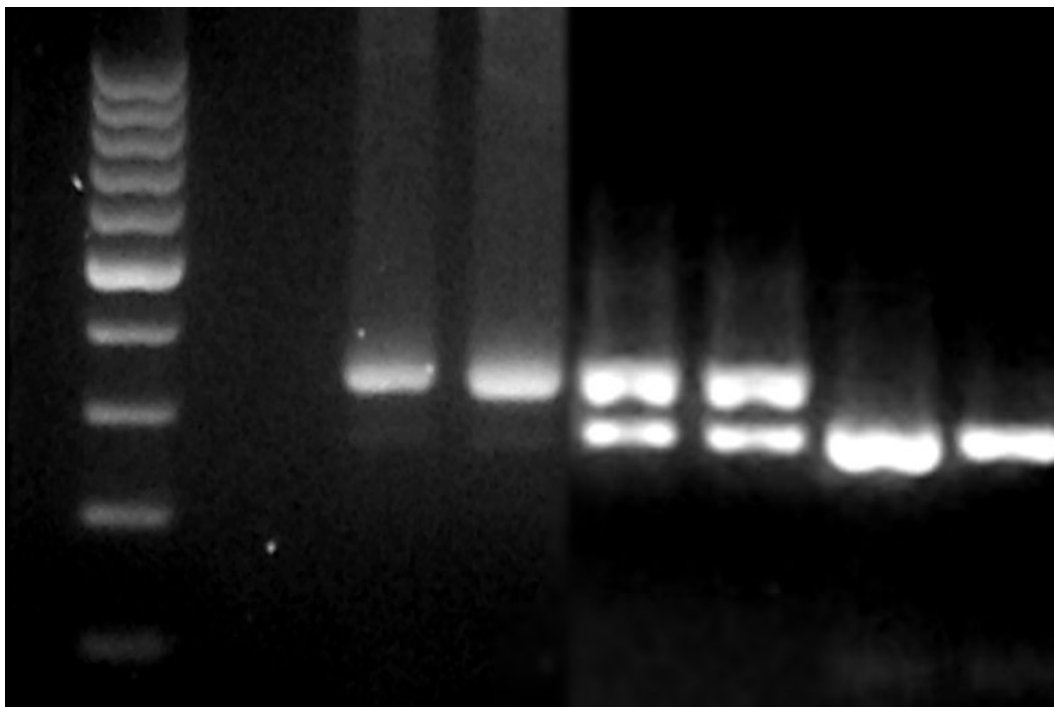


Figura 9. Visualización de los amplicones en gel de agarosa. De izquierda a derecha se observa el marcador molecular, dos muestras homocigotas, dos heterocigotas y dos WT.

4.1.2. Cálculo de la curva de Kaplan-Meier

Se utilizó la curva de Kaplan-Meier para realizar el análisis de la supervivencia a lo largo del tiempo de cada uno de los genotipos. Obteniendo así 3 curvas. En el eje de abscisas se representó la edad embrionaria, desde las 24 hpf hasta los 15 dpf. Y en el eje de ordenadas la tasa de supervivencia.

Para el cálculo de cada una de las curvas de Kaplan-Meier, en primer lugar, se ordenaron los tiempos de desarrollo de menor a mayor, desde 0,5 dpf hasta los 14 dpf. También se representaron los eutanasiados. Por otro lado, para construir la gráfica, se añade el tiempo 0 dpf. En total, 16 tiempos diferentes de desarrollo.

Para el siguiente paso, se construyó una columna que recogía el número de embriones que murieron en cada tiempo. A continuación, se determinó el número de casos que habían sobrevivido hasta el tiempo t más el número de individuos que habían muerto en el tiempo t .

Conocidos estos datos, se prosiguió con el cálculo de la tasa de supervivencia ($S(t)$). Esta se calculó como fracción acumulativa. Para ello, primero se calcula la fracción de individuos que sobreviven en el momento t que se está analizando. Esto es, 1 menos la proporción de embriones que han muerto en el tiempo t considerando como total los individuos que han sobrevivido hasta ese momento más los que han muerto en ese momento t . Finalmente, la fracción obtenida se multiplica por la tasa de supervivencia correspondiente a la edad de desarrollo anterior (32).

En la tabla 3 se recogen los datos de la tasa de supervivencia para los 3 genotipos.

Tabla 3. Datos para construir las curvas Kaplan-Meier.

Tiempo (dpf)	$S_{Hom}(t)$	$S_{Het}(t)$	$S_{WT}(t)$
0	1,0000	1,0000	1,0000
0,5 dpf	0,9697	0,9751	0,9537
1 dpf	0,9596	0,8292	0,9444
2 dpf	0,8990	0,7616	0,8704
4 dpf	0,8485	0,7580	0,8519
5 dpf	0,8485	0,7473	0,8426
6 dpf	0,7677	0,7367	0,8426
7 dpf	0,4242	0,7117	0,8333
8 dpf	0,1616	0,6940	0,8148
9 dpf	0,0303	0,6797	0,7870
10 dpf	0,0101	0,6335	0,7222
11 dpf	0,0101	0,4520	0,6111
12 dpf	0,0000	0,3452	0,5556
13 dpf	0,0000	0,2420	0,3981
14 dpf	0,0000	0,1495	0,2222
Eutanasiados (E)	0,0000	0,1495	0,2222

4.1.3. Análisis de la curva de Kaplan-Meier

En las primeras horas del desarrollo, todos los grupos de organismos presentan una tasa de supervivencia similar, aunque con pequeñas diferencias. Es en el 1 dpf cuando la curva de los embriones heterocigotos diverge del resto mientras que, no es hasta los 6 dpf que la curva de los individuos homocigotos se diferencia de la correspondiente a los individuos de tipo salvaje.

Según se puede observar en las gráficas la curva relativa a los embriones homocigotos para la mutación presenta una pendiente mucho más pronunciada a partir de los 6 dpf que el resto de los grupos de individuos. Por lo tanto, a partir de este momento del desarrollo tienen un peor pronóstico de supervivencia que el resto de los grupos. Tanto es así, que a partir de los 10 dpf, la probabilidad de supervivencia de los embriones homocigotos es nula.

Por otro lado, la curva de los embriones heterocigotos y de los embriones de tipo salvaje sigue una trayectoria similar. Ambas curvas son casi paralelas. Esto significa que, los grupos tienen experiencias de supervivencias similares. Sin embargo, los heterocigotos presentan tasas de supervivencia menores que los de tipo salvaje. Ambos grupos de individuos presentan una zona de la gráfica, entre los 2 dpf y los 6 dpf, en la cual la pendiente es muy pequeña. Esto quiere decir que, este es un período relativamente estable para ambos grupos de individuos. A partir de los de los 7 dpf la tasa de supervivencia comienza a disminuir de forma progresiva en ambos grupos de embriones. Es desde los 7 dpf cuando las curvas comienzan a descender, alcanzando una pendiente más pronunciada desde los 10 dpf. Desciende así bruscamente la tasa de supervivencia tanto de los individuos de tipo salvaje como los heterocigotos para la mutación, pero sin llegar a un 100% de mortalidad como los embriones homocigotos.

La representación de las tres curvas de Kaplan-Meier se observa en la Figura 10.

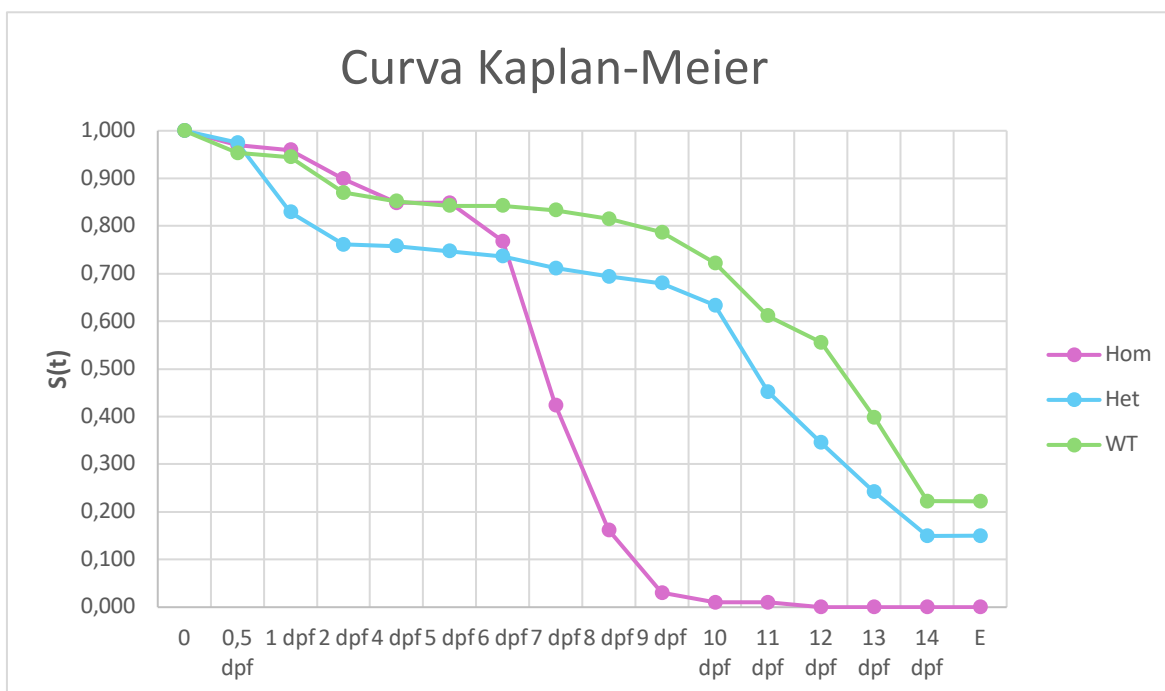


Figura 10. *Curvas de Kaplan-Meier de los embriones homocigotos, heterocigotos y de tipo salvaje.*

4.2. Regeneración de aleta caudal

Se realizó un corte de la aleta caudal a los 2 dpf. A la hora de realizar el corte, se trató de no dañar el músculo ni la vena caudal ya que esto podría afectar a la regeneración del tejido y dificultar la interpretación de los resultados.

A los 3 dpa, se volvió a tomar una foto de la aleta caudal de cada uno de los embriones. La razón de que la fotografía se tomara de nuevo a los 3 dpa es que, transcurrido este tiempo, ya deberían de haber regenerado la aleta prácticamente por completo.

4.2.1. Análisis de la regeneración de aleta caudal

Para el análisis de la regeneración de cola se tomaron fotografías a 96 embriones de diferentes genotipos. A continuación, se determinó si existía o no regeneración de la aleta caudal de cada uno de los embriones, estableciendo una clasificación en función de cuánto fue el tejido regenerado: completa, incompleta o no existía regeneración. Y se procedió al genotipado de los embriones para vincular estos fenotipos observados con el genotipo correspondiente.

Como se puede observar en estas imágenes, los individuos homocigotos (A-B) presentan una regeneración de la aleta caudal mucho menor que aquellos embriones que son de tipo salvaje (E-F). De hecho, en los individuos homocigotos solo se observa cicatrización. En el caso del grupo de embriones heterocigotos (C-D), la regeneración de la aleta caudal es similar que los individuos de tipo salvaje, aunque se observan diferencias en la longitud del tejido regenerado siendo mayor en los de tipo salvaje.

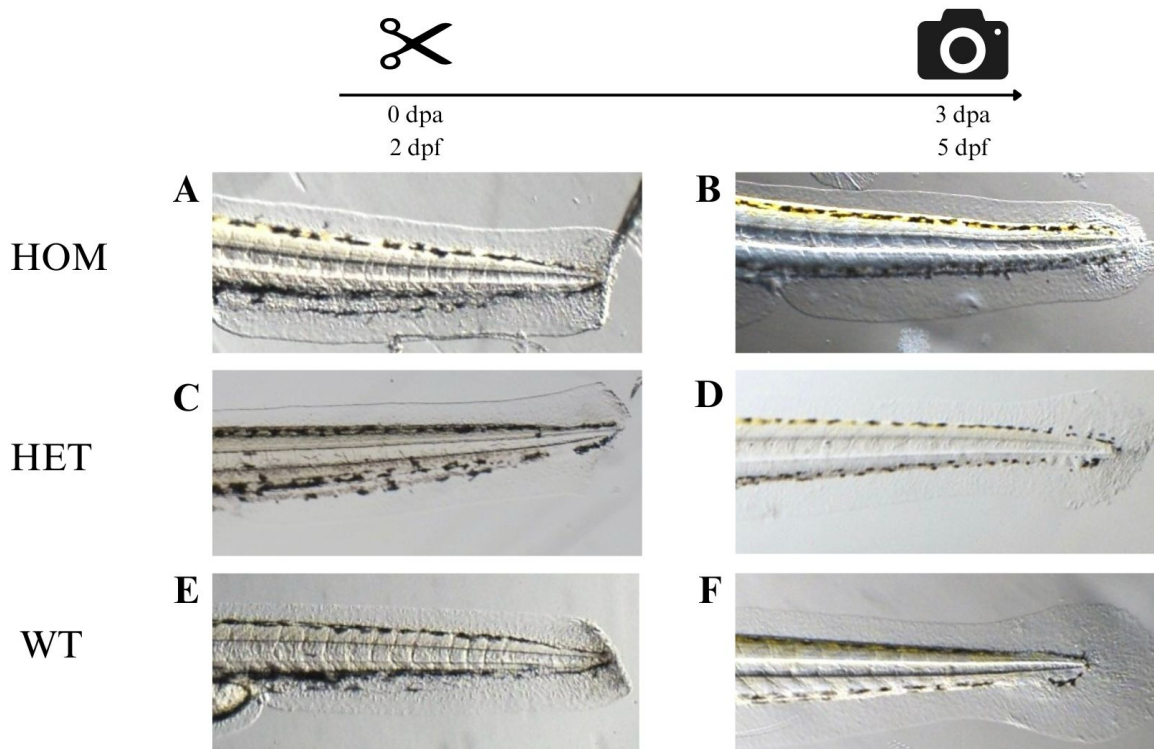


Figura 11. *Regeneración de la aleta caudal tras la amputación en embriones de pez cebra observada con un estereomicroscopio.*

Posteriormente, se midió la longitud de lo que había regenerado el tejido en píxeles. Después se hizo la conversión a unidades del Sistema Internacional. Concretamente se presentaron las longitudes en micrómetros (μm).

Para el siguiente paso, se agruparon los datos de longitud de cada genotipo en diferentes tablas. Para evitar una interpretación errónea de los resultados, se descartaron aquellos embriones en los que el músculo pudiera afectar a la regeneración de los resultados. Se realizó el promedio longitudes de regeneración de cada uno de los grupos. En la Tabla 4 se muestra la regeneración media en micrómetros y el porcentaje correspondiente de cada grupo de individuos.

Tabla 4. Datos para construir el gráfico de barras de la regeneración de cola asociada a cada genotipo

Genotipo	Regeneración (μm)	Regeneración (%)
Hom	123,040	56,963
Het	158,677	73,289
WT	160,323	75,143

Además, para asegurarse de que existen diferencias entre los diferentes grupos se realizó un análisis estadístico mediante un ANOVA de Welch, debido a que las varianzas fueron desiguales. El análisis mostró que existían diferencias significativas en la longitud regenerada de la aleta caudal entre los tres genotipos ($F(2;38,6) = 4,53$; $p = 0,017$).

A continuación, para determinar qué grupos difieren entre sí y con qué valor de significación lo hacen, se realizó un test post-hoc Games-Howell. Se decidió un valor de significación de 0,05. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Comparación entre los diferentes genotipos con el p valor correspondiente.

	Valor p	Significación
Hom vs WT	0,015	*
Hom vs Het	0,022	*
Het vs WT	0,839	-

Finalmente, se realizó un gráfico de barras donde se representó en el eje de abscisas los genotipos de cada uno de los grupos de embriones, y en el eje de ordenadas la regeneración media asociada a cada uno de ellos.

El gráfico de barras se observa en la Figura 12.

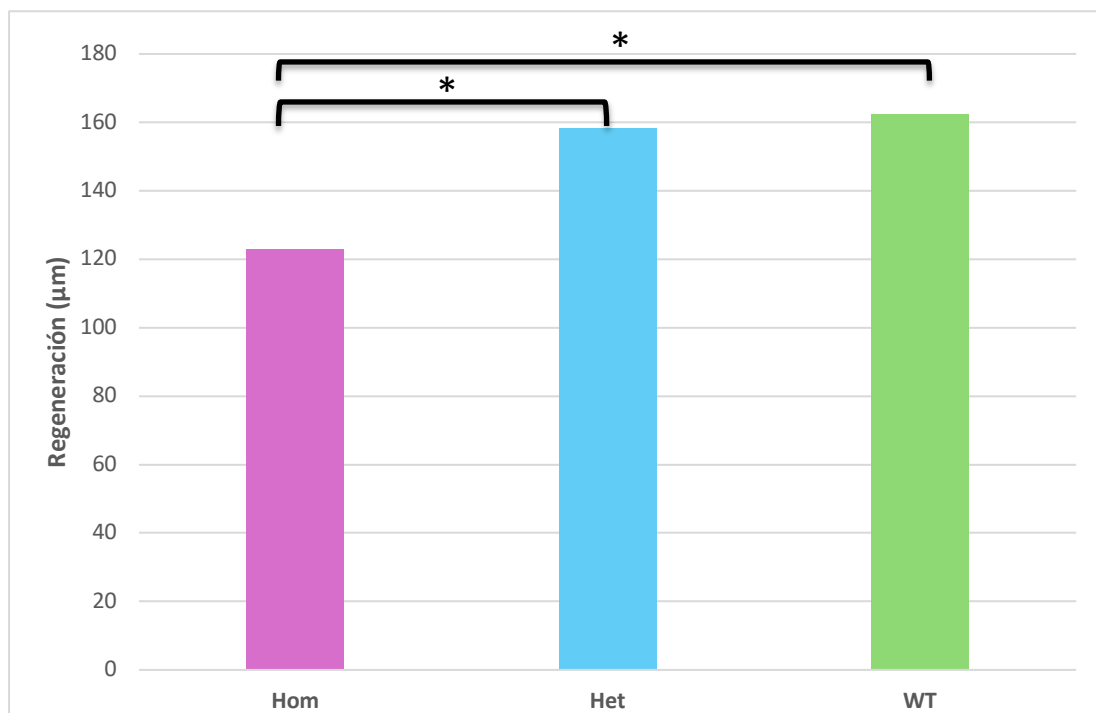


Figura 12. Gráfico de barras de la regeneración de la aleta caudal del cada genotipo.

Para poder observar la dispersión de todos los datos de cada uno de los grupos se realizó un diagrama de dispersión representando cada uno de los datos individuales de longitud de aleta caudal regenerada. Este se muestra en la Figura 13.

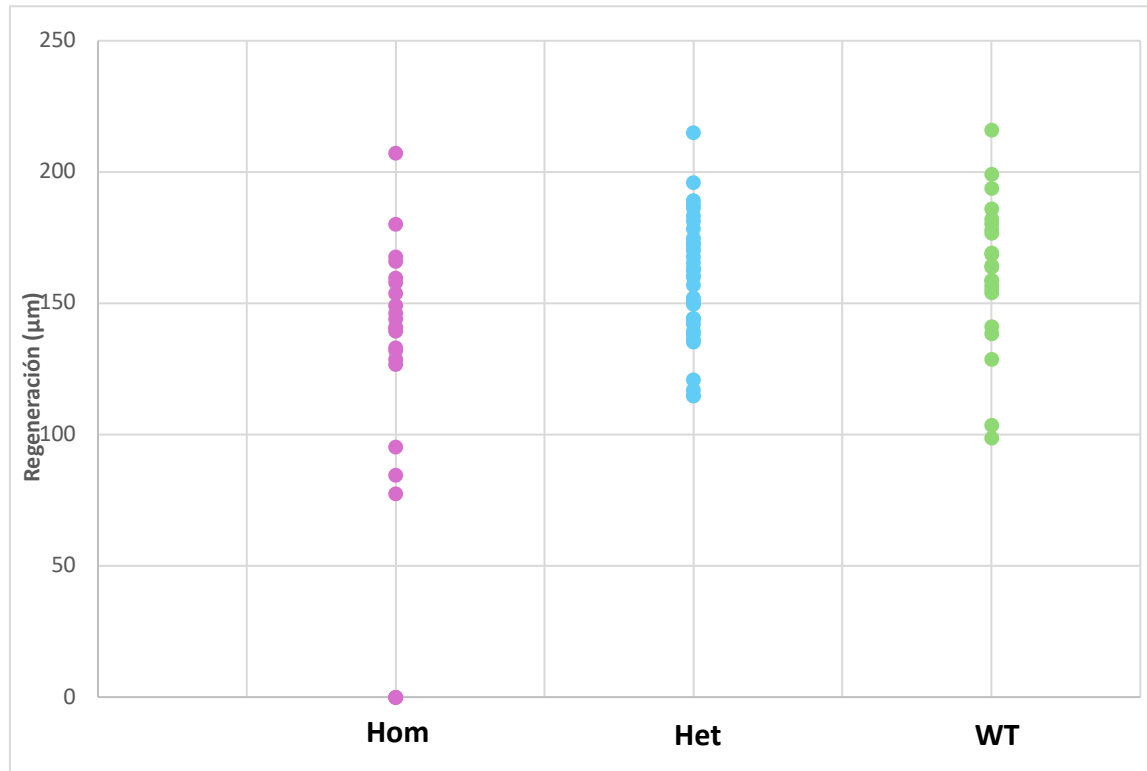


Figura 13. Diagrama de puntos de todos los datos de regeneración de cada uno de los genotipos

Según lo que se observa en la Figura 10, existen diferencias en la regeneración de la aleta caudal entre los distintos grupos de embriones de pez cebra.

Por un lado, se puede observar que los embriones homocigotos para la mutación en *rft1* presentan un porcentaje de regeneración menor que el resto de los genotipos. El porcentaje medio de regeneración en este caso es de 56,96 %. Además, en la Figura 11 se muestran que son algunos individuos homocigotos presentan una regeneración nula.

No obstante, entre los individuos heterocigotos para la mutación y los de tipo salvaje la diferencia de regeneración de la aleta caudal. Menos de 2%. El grupo de los embriones heterocigotos es muy heterogéneo ya que, hay algunos embriones que presentan regeneración incompleta. Mientras que, otros individuos regeneran el tejido en un 80%. En el caso de los individuos de tipo salvaje, no a todos los embriones se cortó por completo la aleta caudal y como consecuencia, el porcentaje de regeneración es menor. Sin embargo, en ambos grupos es muy similar.

Además, según los p valores obtenidos se observa que existen diferencias significativas en la regeneración de aleta caudal entre los homocigotos y el resto de los grupos de individuos. Sin embargo, no pasa lo mismo entre los embriones de genotipo heterocigoto para la mutación y los de tipo salvaje.

Adicionalmente, se calculó el porcentaje de individuos que regeneraban completamente la aleta caudal en cada uno de los genotipos. El total de individuos se calculó descartando aquellos que al realizar el corte fue dañado el músculo o la vena caudal.

En la Tabla 6 se muestra el porcentaje de individuos que presentan una regeneración completa de cada genotipo.

Tabla 6. Datos para construir el gráfico de barras del porcentaje de individuos que regeneran por completo la aleta caudal de cada genotipo.

Genotipo	Individuos regeneración completa (%)
Hom	65,217
Het	94,872
WT	100

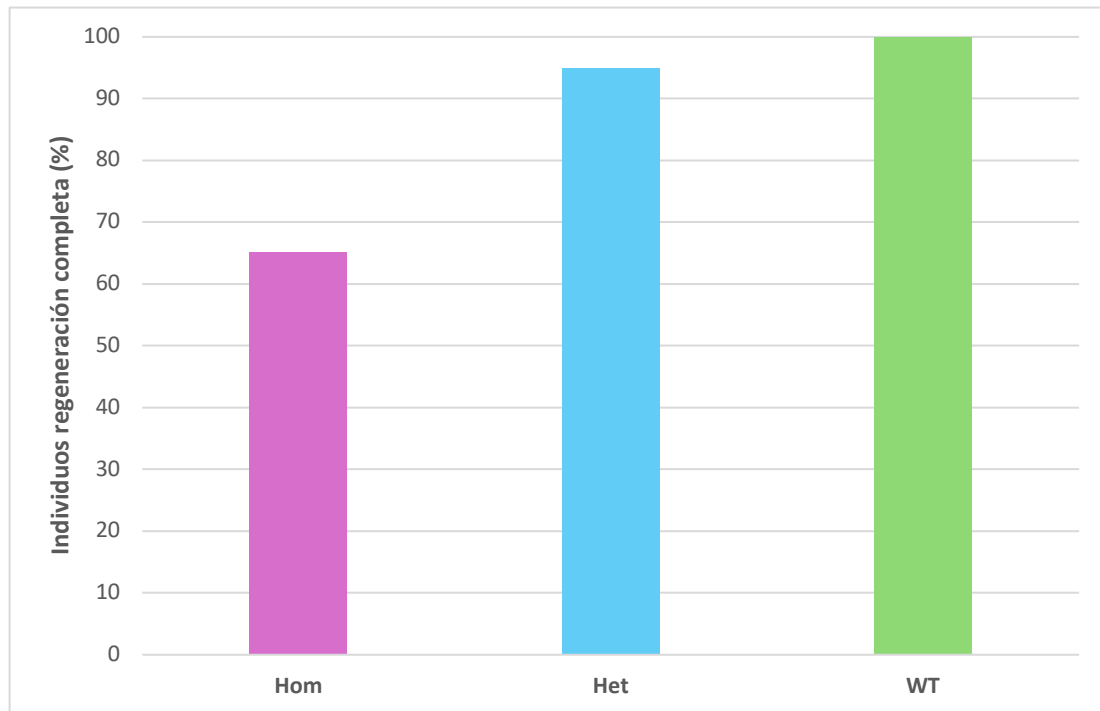


Figura 14. *Gráfico de barras del porcentaje de embriones con regeneración completa en cada genotipo.*

En la gráfica se evidencia como existe diversidad entre los 3 genotipos en cuanto al número de embriones capaces de regenerar la aleta caudal de forma completa.

Para empezar, el grupo de embriones con genotipo homocigoto cuenta con un menor número de individuos que regeneren de manera normal la aleta caudal en comparación con los genotipos restantes. El 35% de los embriones de este grupo presentan una regeneración incompleta o inexistente.

Por otra parte, los valores de los porcentajes son muy similares. Aunque presentan ligeras diferencias. La totalidad de los individuos de tipo salvaje regeneran completamente el tejido. Sin embargo, el 94% de los embriones de genotipo heterocigoto los capaces de completar la regeneración. A diferencia de los homocigotos, en este grupo de individuos solo hay individuos con regeneración incompleta, pero ninguno que no regenere nada del tejido.

5. Discusión

En este estudio se probó el efecto de la mutación del gen *rft1* en el modelo animal pez cebra. Concretamente se estudió la tasa de supervivencia durante los 15 primeros días de desarrollo de los embriones de pez cebra. También se determinó la repercusión de los defectos en el gen *rft1* sobre la regeneración de la aleta caudal.

5.1. Análisis de la tasa de supervivencia asociada a cada genotipo

La representación de las diferentes curvas de Kaplan-Meier evidencian que la mutación el gen que codifica para la escramblasa de la ruta de N-glicosilación Rft1, impide que los embriones de pez cebra lleguen a la edad adulta.

La tasa de supervivencia de los individuos homocigotos desciende a partir de los 6 dpf hasta llegar a una mortalidad de la totalidad de los embriones a partir de los 10 dpf. Durante este período del desarrollo, el pez cebra triplica su longitud y experimenta múltiples cambios en la transformación de las aletas, el patrón de pigmentación y la morfología general encaminándose a la configuración juvenil. Comienza a emerger los radios de la aleta caudal en las regiones ventral y dorsal de la aleta, la aleta anal se vuelve redondeada y la aleta dorsal pasa de ser un pliegue, a formar los radios de la aleta y adquirir una forma redondeada (33).

Se observaron tasas de supervivencia bajas en cuanto a los embriones de tipo salvaje. Esto puede deberse a que no consiguen alcanzara determinados hitos. Por ejemplo, a los 10 dpf comienza la respiración branquial en lugar de la cutánea. Se demostró que la supervivencia del pez cebra a la hipoxia severa disminuye a medida que avanza el desarrollo de 5 a 10 dpf, especialmente a los 10 dpf, justo cuando se produce la transición del tipo de respiración (34). Además, en larvas de pez cebra la hipoxia aguda severa limita el desarrollo cerebral de estas lo que puede tener consecuencias en su supervivencia (35).

En el caso de los individuos con genotipo heterocigoto, se puede observar como el descenso de la tasa de supervivencia no es tan pronunciado como el de los individuos homocigotos y en ningún momento se alcanza una tasa de supervivencia nula. Ambos genotipos presentan mortalidades mayores que los embriones de tipo salvaje. Todo esto evidencia, que el gen

rft1 es esencial para el correcto desarrollo del pez cebra. Y que la pérdida de su actividad causa el 100% de muerte en estados más avanzados del desarrollo.

Estos mismos resultados se observaron en otros modelos. En 2018, se observó que una la deficiencia en el gen *pmm2*, que codifica para la enzima fosfomutasa 2 (Pmm2), es clave para el desarrollo del pez cebra. El estudio de supervivencia realizado se llevó a cabo con el método de Kaplan-Meier. Los resultados que se obtuvieron respaldan los obtenidos en el estudio presentado en este trabajo. La curva de los individuos homocigotos para *pmm2* presenta una pendiente pronunciada a partir de los 6-7 dpf y alcanza el 100% de la mortalidad a los 12 dpf, poco más tarde que los individuos homocigotos para *rft1*. Al igual que pasaba con los embriones que se utilizaron para estudiar la mutación en *rft1* en el presente trabajo, los individuos heterocigotos y de tipo salvaje presentaban experiencias de supervivencia similares; con tasas de supervivencia menores en los embriones heterocigotos. Ambos grupos también permanecen viables durante las 2 semanas que dura el estudio (36).

Asimismo, se realizaron ensayos con morfolinós de pez cebra para determinar la supervivencia en casos de deficiencia del gen *mpi*, que codifica para la enzima fosfomanosa isomerasa (Mpi). En este caso, al igual que los homocigotos para el gen *rft1*, la pérdida total de la función de la proteína Mpi provoca tasas de mortalidad bajas en los primeros días del desarrollo pero que aumentan de forma brusca a medida que este avanza (37). También se realizaron investigaciones acerca del efecto de la pérdida de función del complejo dolicol-fosfato manosa sintasa (Dpms) en el desarrollo embrionario del pez cebra. Se observó que la pérdida de función del gen *dpm1*, que codifica para una subunidad del complejo, causa disminución en la tasa de supervivencia y la muerte de los embriones de pez cebra en las primeras 2 semanas de desarrollo, al igual que se mostró con la mutación de *rft1* (38).

Se puede concluir que la función de las distintas proteínas implicadas en la glicosilación de las proteínas es clave para el desarrollo del pez cebra. Entre todos ellos, en este estudio se observaron los efectos de la mutación de la escramblasa Rft1, evidenciando que es vital para la supervivencia de este modelo.

Lo observado durante este experimento se correlaciona con la experiencia de pacientes que sufren este tipo de trastornos. En una investigación donde se analizó la mortalidad de 37

pacientes afectados, se observó que los CDG complican que estos lleguen a la edad adulta. Siendo dos tercios de los pacientes los que fallecían en los tres primeros años de vida. Esto pone de manifiesto la gravedad de este grupo de enfermedades. Con todo, existe mucha variabilidad entre los distintos tipos de CDG (39).

En 2021, otro estudio se empleó el método de Kaplan-Meier para evaluar la supervivencia de pacientes con un tipo concreto de CDG. Se pudo observar, que de igual manera que acontecía con los peces cebra, se daba una alta mortalidad en edades tempranas del desarrollo. En este caso estaban asociadas a la insuficiencia respiratoria. Este síntoma se debía a otras complicaciones como el retraso motor o la debilidad muscular (40).

Todos estos descubrimientos resaltan la importancia de la investigación en enfermedades raras, como la descrita en el presente trabajo. Así como, el rol crucial que desempeña el pez cebra como organismo modelo en enfermedades humanas.

5.2. Análisis de la regeneración de aleta caudal

Una gran parte de los tejidos de mamíferos poseen la capacidad de regeneración y reparación. La glicosilación tiene un rol importante en estos procesos. Investigaciones recientes apuntan que la glicosilación es clave para el desarrollo biológico, la reparación tisular y la regeneración.

Diversos organismos multicelulares han desarrollado múltiples estrategias para responder a lesiones, como la amputación. Entre ellos se encuentra el pez cebra. En este estudio se evaluó la regeneración de la aleta caudal en embriones de 2 dpf tras la amputación de esta. Esta regeneración se conoce como regeneración epimórfica que consiste en la formación de una masa con alta proliferación de células no diferenciadas que recibe el nombre de blastema (25). En la etapa temprana de la regeneración, que corresponde a la cicatrización de la herida y al inicio de la formación del brote, tienen lugar procesos vitales como la activación del sistema inmunológico, transducción de diversas señales, entre otros. Es durante estos procesos cuando la glicosilación de proteínas desempeña un papel fundamental en la regeneración del tejido (41).

Como se observó en el experimento realizado, existen diferencias en la regeneración de la aleta caudal de pez cebra cuando alguna proteína implicada en el proceso de glicosilación se encuentra comprometida. Como consecuencia de que aquellos en los que lesiones en el músculo han sido descartados para el cálculo de estos porcentajes, se puede concluir que los defectos en la regeneración de la aleta caudal observada en estos embriones durante el experimento son debidos solamente a los efectos de la mutación en el gen *rft1*.

Lo que se evidenció en embriones de genotipo homocigoto en el estudio realizado es un inicio de cicatrización del tejido que no forma la masa proliferativa. Además, los análisis estadísticos confirmar con un alto nivel de significación que existen diferencias en la regeneración del tejido de los individuos homocigotos y los de tipo salvaje.

Por todo esto, y teniendo en cuenta que aquellos individuos cuya regeneración se pudo ver comprometida por las lesiones en el músculo fueron descartados, se puede concluir que la mutación en *rft1* parece estar relacionada con la regeneración en pez cebra, sería necesario profundizar más en la investigación para descubrir la causa subyacente de este fenotipo.

Sin embargo, la N-glicosilación no es la única que participa en este proceso de la regeneración de la aleta caudal como se ha demostrado en el presente trabajo. En un estudio se determinó que la O-glicosilación era necesaria durante la regeneración de la aleta caudal del pez cebra. Para ello se emplearon inhibidores de la ruta de glicosilación. Durante este estudio se determinó que la O-glicosil-N-acetilación (O-GlcNAc) aumenta durante el proceso de regeneración y por tanto, se concluye que está implicada en la regeneración de la aleta. También se pudo demostrar que la O-GlcNAc forma parte de la regulación de las respuestas inflamatorias que tienen lugar durante la etapa de cicatrización y que influye en la señalización en la respuesta de los macrófagos durante el proceso de regeneración. Por último, se determinó que durante el proceso de regeneración se producen cambios en el patrón de glicosilación (42).

La glicosilación no solo participa en la regeneración de los apéndices, sino que también participa en la regeneración de órganos como el corazón. La remodelación de la glicosilación de membrana desempeña un papel crítico en la regeneración del corazón del pez cebra. En el caso particular de la regeneración cardíaca la sialilación, es decir la adición de ácido siálico. Existe una regulación diferencial de la sialilación y las estructuras

glicosiladas. Mientras que, las estructuras O-glicosiladas sialiladas disminuyen durante la regeneración cardíaca, las estructuras N-glicosiladas sialiladas aumentan. Todo esto sugiere que la glicosilación es crucial en las diferentes fases de la regeneración del corazón del pez cebra, así como pasaba con la aleta caudal (43).

Estas alteraciones en la regeneración observadas en el pez cebra se pueden relacionar con diferentes anomalías observadas en pacientes con CDG.

Por un lado, a menudo presentan anomalías en la coagulación y por consiguiente da lugar a complicación trombóticas y hemorrágicas. Se determinó que esto es debido al desequilibrio entre factores procoagulantes y anticoagulantes. En los seres humanos todos estos factores de coagulación están glicosilados, lo que explica que la hipoglicosilación cause complicaciones en la coagulación de heridas. Sobre todo, se han reportados niveles disminuidos de antitrombina en varios CDG. Todo esto conforma el papel esencial de la glicosilación en la hemostasia y la coagulación (44-47).

Por otra parte, las manifestaciones cutáneas también forman parte del amplio espectro clínico de los CDG. Los pacientes con CDG I padecen de pezones invertidos o de acúmulos de grasa, presentes principalmente en lactantes o niños pequeños. Asimismo, algún tipo de CDG lleva asociado la aparición de ictiosis entre otros (48).

De igual manera, en 2013 se describió un nuevo CDG donde el fenotipo estaba restringido únicamente a la piel. Se definió al POFUT1-CDG como el primer trastorno de glicosilación específico de la piel. El gen POFUT1 codifica la proteína O-fucosiltransferasa que transfiere residuos de fucosa, un monosacárido. El cuadro clínico presentó alteraciones en la pigmentación (48).

Se ha observado que una gran parte de los CDG en los humanos se manifiestan con trastornos del desarrollo. Y es que la N-glicosilación regula procesos como la miogénesis. El análisis de células musculares humanas sanas e inmortalizadas con distrofia reveló cambios en la unión de lectinas a moléculas como las integrinas. Esto sugiere que existen alteraciones en la glicosilación. Se identificaron cambios en la abundancia de diversas enzimas implicadas en el proceso de glicosilación, así como la galactosiltransferasa (5).

6. Conclusiones

- El análisis de la supervivencia demuestra que mutaciones en el gen *rft1* tiene repercusión sobre la tasa de supervivencia durante el desarrollo del pez cebra. Concretamente, la mutación de ambos alelos causa la muerte de la totalidad de los embriones a los 10 dpf.
- La mutación en el gen *rft1* provoca alteraciones en la regeneración de la aleta caudal en embriones de pez cebra. Se determinó que, esta mutación provocaba que algunos de los embriones contaran con una regeneración nula y que aquellos que conseguían regenerar parte del tejido, regeneraban una menor cantidad en comparación con los otros genotipos.

7. Bibliografía

1. Ondruskova N, Cechova A, Hansikova H, Honzik T, Jaeken J. *Congenital disorders of glycosylation: Still “hot” in 2020*. Vol. 1865, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V.; 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129751>
2. Ng BG, Freeze HH, Himmelreich N, Blau N, Ferreira CR. *Clinical and biochemical footprints of congenital disorders of glycosylation: Proposed nosology*. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2024 May 1;142(1). <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2024.108476>
3. Sparks SE. *Inherited disorders of glycosylation*. Vol. 87, *Molecular Genetics and Metabolism*. 2006. p. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.11.004>
4. Monticelli M, Ferro T, Jaeken J, dos Reis Ferreira V, Videira PA. *Immunological aspects of congenital disorders of glycosylation (CDG): a review*. Vol. 39, *Journal of Inherited Metabolic Disease*. Springer Netherlands; 2016. p. 765–80. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9954-9>
5. Blazev R, Ashwood C, Abrahams JL, Chung LH, Francis D, Yang P, et al. *Integrated glycoproteomics identifies a role of N-glycosylation and galectin-1 on myogenesis and muscle development*. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2021;20. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.002166>
6. Hirata T. y Kizuka Y. *N-glycosylation*. En: Lauc G. y Trbojević-Akmačić I, editores. *The Role of Glycosylation in Health and Disease*. Cham: Springer Nature Switzerland; 2021. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1325). p 3-24
7. Haeuptle MA, Pujol FM, Neupert C, Winchester B, Kastaniotis AJJ, Aebi M, et al. *Human RFT1 Deficiency Leads to a Disorder of N-Linked Glycosylation*. *American Journal of Human Genetics*. 2008 Mar 3;82(3):600–6. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.12.021>

8. Freeze HH, Aebi M. *Altered glycan structures: The molecular basis of congenital disorders of glycosylation*. Vol. 15, Current Opinion in Structural Biology. 2005. p. 490–8. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.08.010>
9. Helenius, J., Ng, D., Marolda, C. *et al. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein*. Nature 2002. Vol 415, 447–450. <https://doi.org/10.1038/415447a>
10. Bogdańska A, Lipiński P, Szymańska-Rożek P, Jezela-Stanek A, Rokicki D, Socha P, et al. *Clinical, biochemical and molecular phenotype of congenital disorders of glycosylation: long-term follow-up*. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2021 Dec 1;16(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01657-5>
11. Brasil S, Pascoal C, Francisco R, Marques-da-Silva D, Andreotti G, Videira PA, et al. *CDG therapies: From bench to bedside*. Vol. 19, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2018.
12. Francisco R, Brasil S, Poejo J, Jaeken J, Pascoal C, Videira PA, et al. *Congenital disorders of glycosylation (CDG): state of the art in 2022*. Vol. 18, Orphanet Journal of Rare Diseases. BioMed Central Ltd; 2023. <https://doi.org/10.1186/s13023-023-02879-z>
13. Bammens R, Mehta N, Race V, Foulquier F, Jaeken J, Tiemeyer M, et al. *Abnormal cartilage development and altered N-glycosylation in Tmem165-deficient zebrafish mirrors the phenotypes associated with TMEM165-CDG*. Glycobiology. 2014 Mar 31;25(6):669–82. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv009>
14. Potelle S, Morelle W, Dulary E, Duvet S, Vicogne D, Spriet C, et al. *Glycosylation abnormalities in Gdt1p/TMEM165 deficient cells result from a defect in Golgi manganese homeostasis*. Human Molecular Genetics. 2016 Apr 15;25(8):1489–500. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw026>

15. Höck M, Wegleiter K, Ralser E, Kiechl-Kohlendorfer U, Scholl-Bürgi S, Fauth C, et al. *ALG8-CDG: Novel patients and review of the literature*. Vol. 10, Orphanet Journal of Rare Diseases. BioMed Central Ltd.; 2015. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0289-7>
16. al Teneiji A, Bruun TUJ, Sidky S, Cordeiro D, Cohn RD, Mendoza-Londono R, et al. *Phenotypic and genotypic spectrum of congenital disorders of glycosylation type I and type II*. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2017 Mar 1;120(3):235–42. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.12.014>
17. Hirata E, Sakata K taro, Dearden GI, Noor F, Menon I, Chiduzza GN, et al. *Molecular characterization of Rft1, an ER membrane protein associated with congenital disorder of glycosylation RFT1-CDG*. *Journal of Biological Chemistry*. 2024 Aug 1;300(8). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107584>
18. Chen S, Pei CX, Xu S, Li H, liu YS, Wang Y, et al. *Rft1 catalyzes lipid-linked oligosaccharide translocation across the ER membrane*. *Nature Communications*. 2024 Dec 1;15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48999-3>
19. Vleugels W, Haeuptle MA, Ng BG, Michalski JC, Battini R, Dionisi-Vici C, et al. *RFT1 deficiency in three novel CDG patients*. *Human Mutation*. 2009 Oct;30(10):1428–34. <https://doi.org/10.1002/humu.21085>
20. Choi TY, Choi TI, Lee YR, Choe SK, Kim CH. *Zebrafish as an animal model for biomedical research*. Vol. 53, *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature; 2021. p. 310–7. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00571-5>
21. Razali K, Othman N, Mohd Nasir MH, Doolaanea AA, Kumar J, Ibrahim WN, et al. *The Promise of the Zebrafish Model for Parkinson's Disease: Today's Science and Tomorrow's Treatment*. Vol. 12, *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A.; 2021. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.655550>
22. Lardelli, M. *Using zebrafish in human disease research: Some advantages, disadvantages and ethical considerations*. In: *Proceedings of the 2008 ANZCCART Conference, Auckland, New Zealand, 29 June–1 July 2008*; pp. 23–28.

23. Adhish M, Manjubala I. *Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases—A review of models*. Vol. 9, Heliyon. Elsevier Ltd; 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14557>
24. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. *The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome*. Nature. 2013 Apr 25;496(7446):498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
25. Bohaud C, Johansen MD, Jorgensen C, Ipseiz N, Kremer L, Djouad F. *The Role of Macrophages During Zebrafish Injury and Tissue Regeneration Under Infectious and Non-Infectious Conditions*. Vol. 12, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.707824>
26. Goldsmith JR, Jobin C. Think small: *Zebrafish as a model system of human pathology*. Vol. 2012, Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/817341>
27. Marques IJ, Lupi E, Mercader N. *Model systems for regeneration: Zebrafish*. Development (Cambridge). 2019;146(18). <https://doi.org/10.1242/dev.167692>
28. Zhao C, Yang Z, Li Y, Wen Z. *Macrophages in tissue repair and regeneration: insights from zebrafish*. Vol. 13, Cell Regeneration. Springer; 2024. <https://doi.org/10.1186/s13619-024-00195-w>
29. Sehring IM, Weidinger G. *Recent advancements in understanding fin regeneration in zebrafish*. Vol. 9, Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology. John Wiley and Sons Inc.; 2020. <https://doi.org/10.1002/wdev.367>
30. Lebedeva L, Zhumabayeva B, Gebauer T, Kisselev I, Aitasheva Z. *Zebrafish (Danio rerio) as a Model for Understanding the Process of Caudal Fin Regeneration*. Vol. 17, Zebrafish. Mary Ann Liebert Inc.; 2020. p. 359–72. <https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1926>

31. Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD. *The zebrafish as a model for complex tissue regeneration*. Vol. 29, Trends in Genetics. 2013. p. 611–20. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2013.07.003>
32. D'Arrigo G, Leonardis D, Abd Elhafeez S, Fusaro M, Tripepi G, Roumeliotis S. *Methods to Analyse Time-to-Event Data: The Kaplan-Meier Survival Curve*. Vol. 2021, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Limited; 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/2290120>
33. Singleman C, Holtzman NG. *Growth and maturation in the zebrafish, Danio Rerio: A staging tool for teaching and research*. Zebrafish. 2014 Aug 1;11(4):396–406. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0976>
34. Burggren W, Abramova R, Bautista NM, Fritsche Danielson R, Dubansky B, Gupta A, et al. *A larval zebrafish model of cardiac physiological recovery following cardiac arrest and myocardial hypoxic damage*. Biology Open [Internet]. 2024 Sep 15;13(9). <https://doi.org/10.1242/bio.060230>
35. Mikloska K v., Zrini ZA, Bernier NJ. *Severe hypoxia exposure inhibits larval brain development but does not affect the capacity to mount a cortisol stress response in zebrafish*. Journal of Experimental Biology. 2022 Jan 1;225(2). <https://10.1242/jeb.243335>
36. Mukaigasa K, Tsujita T, Nguyen VT, Li L, Yagi H, Fuse Y, et al. *Nrf2 activation attenuates genetic endoplasmic reticulum stress induced by a mutation in the phosphomannomutase 2 gene in zebrafish*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018;115(11):2758–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714056115>
37. Chu J, Mir A, Gao N, Rosa S, Monson C, Sharma V, et al. *A zebrafish model of congenital disorders of glycosylation with phosphomannose isomerase deficiency reveals an early opportunity for corrective mannose supplementation*. DMM Disease Models and Mechanisms. 2013 Jan;6(1):95–105. <https://doi.org/10.1242/dmm.010116>

38. Marchese M, Pappalardo A, Baldacci J, Verri T, Doccini S, Cassandrini D, et al. *Dolichol-phosphate mannose synthase depletion in zebrafish leads to dystrophic muscle with hypoglycosylated α -dystroglycan*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016 Aug 12;477(1):137–43. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.033>
39. Alharbi H, Horikoshi S, Jenkins SM, Scaglia F, Lam C, Morava E, et al. *Causes of mortality in the congenital disorders of glycosylation*. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2025 Mar 1;144(3). <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2025.109052>
40. Bayat A, Kløvgaard M, Johannesen KM, Stefan Barakat T, Kievit A, Montomoli M, et al. *Deciphering the premature mortality in PIGA-CDG – An untold story*. *Epilepsy Research*. 2021 Feb 1;170. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2020.106530>
41. Yue Z, Yu Y, Gao B, Wang D, Sun H, Feng Y, et al. *Advances in protein glycosylation and its role in tissue repair and regeneration*. Vol. 40, *Glycoconjugate Journal*. Springer; 2023. p. 355–73. <https://doi.org/10.1007/s10719-023-10117-8>
42. Jia L, Zheng H, Feng J, Ding Y, Sun X, Yu Y, et al. *Upregulation of Protein O-GlcNAcylation Levels Promotes Zebrafish Fin Regeneration*. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2025 Apr 1;24(4). <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2025.100936>
43. Spelat R, Ferro F, Contessotto P, Aljaabary A, Martin-Saldaña S, Jin C, et al. *Metabolic reprogramming and membrane glycan remodeling as potential drivers of zebrafish heart regeneration*. *Communications Biology*. 2022 Dec 1;5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04328-2>
44. Pascreau T, Auditeau C, Borgel D. *Hemostatic defects in congenital disorders of glycosylation*. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2023 Mar 1;7(3). <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100142>

45. Radenkovic S, Bleukx S, Engelhardt N, Eklund E, Mercimek-Andrews S, Edmondson AC, et al. *Coagulation abnormalities and vascular complications are common in PGMI-CDG*. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2024 Aug 1;142(4). <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2024.108530>
46. Wicker C, Roux CJ, Goujon L, de Feraudy Y, Hully M, Brassier A, et al. *Association between acute complications in PMM2-CDG patients and haemostasis anomalies: Data from a multicentric study and suggestions for acute management*. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2023 Nov 1;140(3). <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107674>
47. Linssen M, Mohamed M, Wevers RA, Lefeber DJ, Morava E. *Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG*. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2013 May;109(1):107–11. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.02.006>
48. Rymen D, Jaeken J. *Skin manifestations in CDG*. Vol. 37, *Journal of Inherited Metabolic Disease*. Kluwer Academic Publishers; 2014. p. 699–708. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9678-7>