



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

# Grado en Biología

## Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Proyecto de investigación: El pez cebra (*Danio rerio*) como modelo animal para el estudio de los mecanismos epigenéticos implicados en la artrosis.**

**Proxecto de investigación: O peixe cebra (*Danio rerio*) como modelo animal para o estudo dos mecanismos epixenéticos implicados na artrose.**

**Research project: Zebrafish (*Danio rerio*) as an animal model for the study of the epigenetic mechanisms involved in osteoarthritis.**

**Nuria González Vidal**

Curso: 2021 – 2022

Convocatoria: Junio

*Director Académico: Dr. Mónica Folgueira Otero*

*Director Académico: Dr. M<sup>a</sup> Carmen de Andrés González*

DE ANDRES  
GONZALEZ  
MARIA DEL  
CARMEN -  
28776647J

Firmado  
digitalmente por DE  
ANDRES GONZALEZ  
MARIA DEL CARMEN  
- 28776647J  
Fecha: 2022.06.23  
10:50:07 +02'00'

## ÍNDICE

**RESUMEN**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. CONTENIDO DEL PROYECTO: ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA.....</b>                | <b>1</b>  |
| 1.1. Artrosis (OA, <i>Osteoarthritis</i> ).....   | 1         |
| 1.2. Estructura y composición del cartílago articular.....  | 2         |
| 1.3. Papel de la epigenética en la OA.....  | 4         |
| 1.3.1. MicroARNs.....   | 5         |
| 1.3.2. MicroRNA 140 (miR-140) en la OA.....   | 6         |
| 1.4. El pez cebra como modelo animal para el estudio de la OA.....                                  | 6         |
| 1.5. Referencias bibliográficas.....  | 10        |
| <b>2. CONTENIDO DEL PROYECTO: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>                                    | <b>12</b> |
| <b>3. CONTENIDO DEL PROYECTO: INTERÉS PARA EL AVANCE DE LOS CONOCIMIENTOS Y DE LA SOCIEDAD.....</b> | <b>13</b> |
| <b>4. CONTENIDO DEL PROYECTO: PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN DE LOS RESULTADOS.....</b>             | <b>13</b> |
| <b>5. VIABILIDAD DEL PROYECTO: METODOLOGÍA.....</b>   | <b>13</b> |
| TAREA 1. Importación, cría y mantenimiento del pez cebra.....                                       | 13        |
| TAREA 2. Silenciamiento y microinyección para la inducción de la OA.....                            | 14        |
| TAREA 3. PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR).....                                  | 15        |
| TAREA 4. Western Blot.....  | 15        |
| TAREA 5. Análisis histológico de la articulación de la mandíbula.....                               | 16        |
| - Eutanasia.....  | 16        |
| - Fijación y descalcificación.....  | 16        |
| - Inclusión.....  | 16        |
| - Tinciones.....  | 17        |
| - Inmunofluorescencia.....  | 18        |
| - Procesamiento de las imágenes.....  | 19        |
| - Evaluación histológica, Score OARSI.....  | 19        |
| TAREA 6. Análisis estadístico.....  | 21        |
| <b>6. VIABILIDAD DEL PROYECTO: PLAN DE TRABAJO.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>7. ESTIMACIÓN PRESUPUESTARIA: DESTINO DE LA AYUDA SOLICITADA.....</b>                            | <b>23</b> |
| <b>8. IMPLICACIONES ÉTICAS Y/O BIOSEGURIDAD.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>9. CONCLUSIONES O HECHOS QUE SE PRETENDE ALCANZAR.....</b>                                       | <b>24</b> |
| <b>10. CONCLUSIONS OR MILESTONES TO BE ACHIVED.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>25</b> |

## RESUMEN

La artrosis (*osteoarthritis*, OA) es la forma más común de artritis, consistiendo en el desgaste y pérdida progresiva del cartílago articular hialino, siendo la principal causa de dolor y discapacidad a nivel mundial. Aunque ha sido ampliamente estudiada en modelos animales mamíferos, en el presente proyecto se propone el pez cebra (*Danio rerio*) como alternativa para el estudio de la enfermedad, ya que este posee una articulación sinovial en la mandíbula, muy similar a la de los humanos. Se ha visto que la modulación de los microARNs en la articulación puede tener un importante efecto en la OA, en concreto el miR-140, el cual está reducido en el tejido con OA. De este modo, se inyectará el anti-miR-140 en los embriones *wild type* para silenciarlo. Posteriormente, mediante una serie de tinciones histológicas y técnicas inmunohistoquímicas, se valorará, según el score OARSI, como afecta este microARN al cartílago articular y los cambios osteoartroticos que se producen en la mandíbula del pez cebra. Creando, de este modo, una línea para futuras investigaciones en el tratamiento de la enfermedad.

**Palabras clave:** Pez cebra, artrosis, modelos animales, cartílago articular, microARN.

## RESUMO

A artrose (*osteoarthritis*, OA) é a forma máis común de artrites, consistindo no desgaste e perda progresiva do cartilaxe articular hialino, sendo a principal causa de dor e discapacidade a nivel mundial. Aínda que foi amplamente estudada en modelos animais mamíferos, no presente proxecto propónse o peixe cebra (*Danio rerio*) como alternativa para o estudo da enfermidade, xa que este posúe unha articulación sinovial na mandíbula, moi similar á dos humanos. Veuse que a modulación dos microARNs na articulación pode ter un importante efecto na OA, en concreto, o miR-140, o cal aparece reducido no tecido con OA. Deste modo, inxectarase o anti-miR-140 nos embrións *wild type* para silencialo. Posteriormente, mediante unha serie de tincións histolóxicas e técnicas inmunohistoquímicas, valorarase, segundo o score OARSI, como afecta este microARN ao cartilaxe articular e os cambios osteoartroticos que se produce na mandíbula do peixe cebra. Creando, deste modo, unha liña para futuras investigacións no tratamento da enfermidade.

**Palabras clave:** Peixe cebra, artrose, modelos animais, cartilaxe articular, microARN.

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis, consisting of the progressive wear and tear and loss of hyaline joint cartilage, and is the main

cause of pain and disability worldwide. Although it has been extensively studied in mammalian animal models, this project proposes the zebrafish (*Danio rerio*) as an alternative for the study of the disease, as it has a synovial joint in the jaw, very similar of humans. It has been shown that modulation of miRNAs in the joint can have an important effect on OA, in particular miR-140, which is reduced in OA tissue. Thus, anti-miR-140 will be injected into *wild type* embryos to silence it. Subsequently, a series of histological staining and immunohistochemical techniques will be used to assess, according to the OARSI score, how this miRNA affects articular cartilage and the osteoarthritic changes that occur in the zebrafish jaw. Creating a line for future research into the treatment of the disease.

**Key words:** Zebrafish, osteoarthritis, animal models, articular cartilage, microRNA.

# 1. CONTENIDO DEL PROYECTO: ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA.

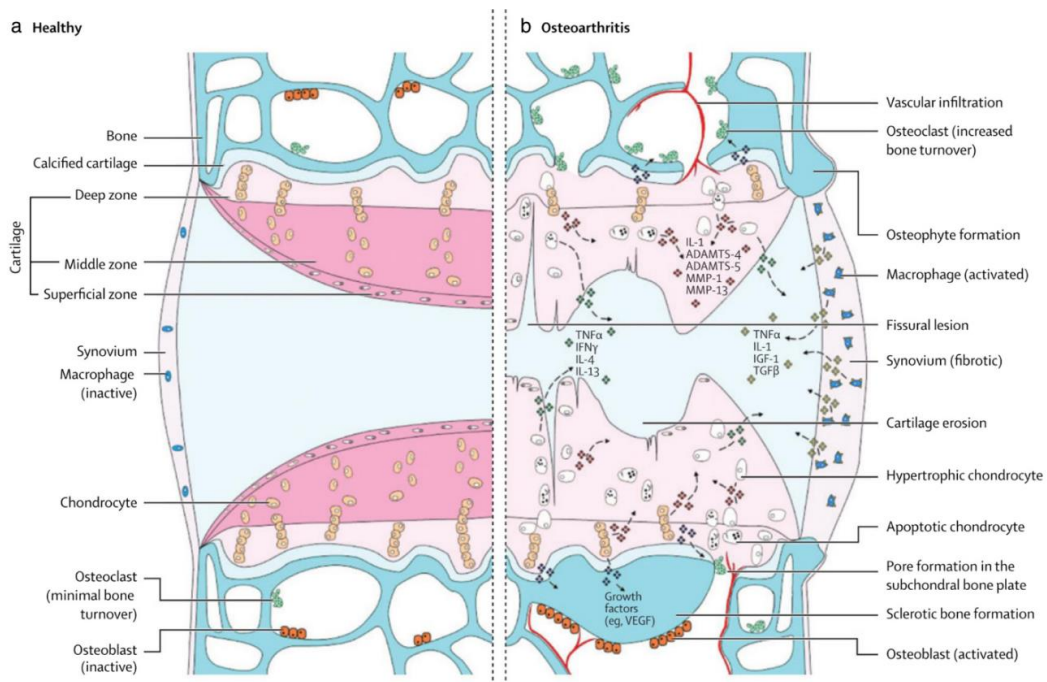
## 1.1. Artrosis (*Osteoarthritis*, OA)

La artrosis u osteoartritis (OA) es la forma más común de artritis, consistiendo principalmente en el desgaste y pérdida progresiva del cartílago articular hialino impulsada por una serie de mediadores inflamatorios (Loeser *et al.*, 2012). Es una enfermedad que puede causar dolor mecánico y rigidez en las articulaciones, lo que desemboca en una limitación en la movilidad y calidad de vida en los pacientes que la padecen (Felson *et al.*, 2000). La OA es una de las principales causas de dolor y discapacidad en adultos de edad avanzada (Loeser *et al.*, 2012).

La OA se clasifica como primaria o secundaria en función de la etiología de la enfermedad. La **OA primaria** es un fenómeno natural debido a cambios degenerativos en la articulación; se divide en localizada y generalizada en función de si afecta a una o a tres o más articulaciones. Por otro lado, la **OA secundaria** es una condición que se asocia a causas y/o factores de riesgo que conducen a que se produzca la enfermedad en la articulación como, por ejemplo, traumatismos (Kuyinu *et al.*, 2016).

Existen una serie de factores de riesgo que propician la susceptibilidad de padecer esta enfermedad, como pueden ser la edad, la obesidad o lesiones articulares graves. Cada vez existen más evidencias de la influencia de otros factores, como los factores sistémicos (genética, nutrición y dietética, densidad ósea) y los factores biomédicos (debilidad muscular, laxitud articular) (Felson *et al.*, 2000).

A pesar de la naturaleza multifactorial de la OA, los cambios patogénicos observados en las articulaciones tienen características comunes que afectan a toda la estructura de la articulación como puede ser la degradación del cartílago articular, el engrosamiento del hueso subcondral, la formación de osteofitos (protuberancias óseas), diferentes grados de inflamación del sinovio y la degeneración de ligamentos. Además, también puede haber cambios en los músculos periarticulares, aquellos que rodean a la articulación (Loeser *et al.*, 2012) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Vías de señalización y cambios estructurales que se producen en la articulación enferma con OA (b) respecto a la articulación normal sana (a). Fuente: Kuyinu *et al.*, 2016.

## 1.2. Estructura y composición del cartílago articular.

El cartílago articular es un tejido especializado que se encuentra en las superficies de las articulaciones que participan en el movimiento mecánico, ya que es resistente al desgaste y está diseñado para distribuir cargas. Proporciona una superficie lisa con un coeficiente de fricción bajo, permitiendo un correcto movimiento de la articulación durante el desplazamiento (Loeser *et al.*, 2012). El cartílago articular se puede considerar una forma especializada de cartílago hialino, estando también formado por condrocitos y una densa matriz extracelular (MEC) cuya composición consiste en agua, colágeno y proteoglicanos (Pearle *et al.*, 2005). La función de la MEC es mantener la estructura mecánica del cartílago articular, así como el mantenimiento de la homeostasis en el entorno extracelular. De este modo, se caracteriza por tener capacidad viscoelástica y por tener una baja capacidad de regeneración y baja capacidad metabólica (Nugent, 2015).

El cartílago articular está estructurado en cuatro regiones principales (Fox *et al.*, 2009) (**Figura 2**):

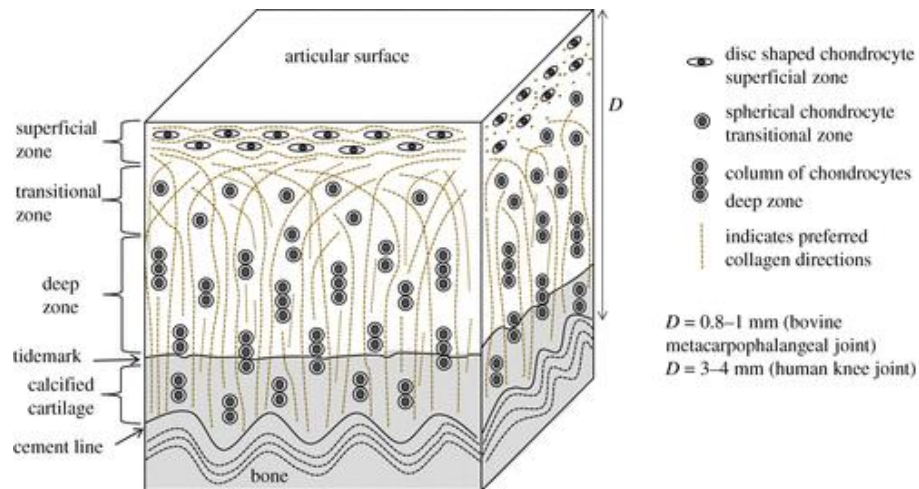
- La **zona superficial** es la encargada de proteger las capas subyacentes de las tensiones, está formada por fibras de colágeno dispuestas tangencialmente y presenta numerosos condrocitos de forma aplanada y dispuestos paralelamente a la superficie. Además, está en

contacto con el líquido sinovial y representa entre el 10% y el 20% del grosor total del cartílago.

- La **zona de transición** se sitúa entre la zona superficial y la zona profunda. En ella encontramos fibras de colágeno más gruesas dispuestas de forma oblicua, así como proteoglicanos y, además, contiene una baja densidad de condrocitos, los cuales presentan una forma redondeada. Esta capa representa del 40% al 60% del grosor total del cartílago.

- La **zona profunda** se encarga de proporcionar una mayor resistencia contra las fuerzas de compresión, gracias a la disposición perpendicular de las fibras de colágeno muy gruesas, donde los condrocitos dispuestos en columnas se encuentran paralelamente situados a ellas. Además, presenta mayor cantidad de proteoglicanos y ocupa el 30% del total del cartílago.

- La **zona calcificada** se ocupa de la fijación del cartílago al hueso mediante el anclaje de las fibras de colágeno. En esta capa los condrocitos están hipertrofiados.



**Figura 2.** Estructura del cartílago articular sano. Fuente: Mansfield *et al.*, 2019.

En el cartílago articular sano existe un equilibrio entre anabolismo y catabolismo, el cual se ve alterado con la OA, siendo más importantes los procesos catabólicos, dando lugar a una proliferación celular hipertrófica acompañada de una remodelación de la MEC y calcificación del cartílago (Loeser *et al.*, 2012). Esto es debido al incremento de varias vías inflamatorias donde uno de los mediadores más importantes es la citoquina interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Nugent, 2015), la cual aumenta la producción de proteínas de la MEC y enzimas de degradación (Loeser *et al.*, 2012), como pueden ser las desintegrinas o metaloproteinasas con motivos de trombospondina (ADAMTS) o las

metaloproteinasas de la matriz (MMPS) (Shen *et al.*, 2017), que degradan el agregano (proteoglicano) y colágeno respectivamente (Nagase *et al.*, 2006).

Además de las citoquinas proinflamatorias, también los factores de necrosis y las quimiocinas son capaces de inducir y activar estas enzimas catabólicas (Goldring & Otero, 2011), degradando así el cartílago (Sacitharan, 2019).

La OA produce cambios estructurales y bioquímicos en el cartílago, como pueden ser el reblandecimiento, fibrilación o erosiones debido a la pérdida de capas cartilaginosas y necrosis celular, entre otros. La degradación proteolítica de los proteoglicanos reduce la longitud de la cadena e inhibe la formación de complejos macromoleculares, aumentando la permeabilidad de la MEC y reduciendo la rigidez de compresión del tejido (Pearle *et al.*, 2005). Una vez se degrada la red de colágeno, parece que esta no puede revertirse (Loeser *et al.*, 2012).

### **1.3. Papel de la epigenética en la OA.**

La epigenética hace referencia a cambios en la expresión de los genes que ocurren sin cambios en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN). En la regulación epigenética existen tres modificaciones principales: (1) los cambios en la metilación del ADN, que alteran covalentemente la estructura del ADN, (2) la modificación postraduccional de las histonas, que altera la conformación de la cromatina y, (3) los ARN no codificantes (como los microARN) que actúan tanto a nivel transcripcional como postranscripcional en la regulación de la expresión del ARN mensajero (ARNm). En algunos casos estas modificaciones epigenéticas son estables y pasan a generaciones futuras, pero también pueden ser dinámicas y cambiar en respuesta a cambios ambientales (Shen *et al.*, 2017). Las modificaciones epigenéticas están asociadas a un número de condiciones patológicas que probablemente se produzcan como resultado de factores ambientales y el envejecimiento, que son factores de riesgo para la OA (Barter *et al.*, 2012).

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo a los nucleótidos de citosina situados en posición 5' respecto a una guanina y, es llevada a cabo por las ADN metiltransferasas (*DNA methyltransferase*, DNMT) para convertir la citosina a 5-metilcitosina, y generalmente está asociada con represión génica. Esta modificación reversible es frecuente en los sitios CpG, unas regiones del ADN donde un nucleótido de citosina está seguido de un nucleótido de guanina. Estas secuencias suelen estar agrupadas en islas (islas CpG) cerca de los promotores de los genes (Barter *et al.*, 2012).

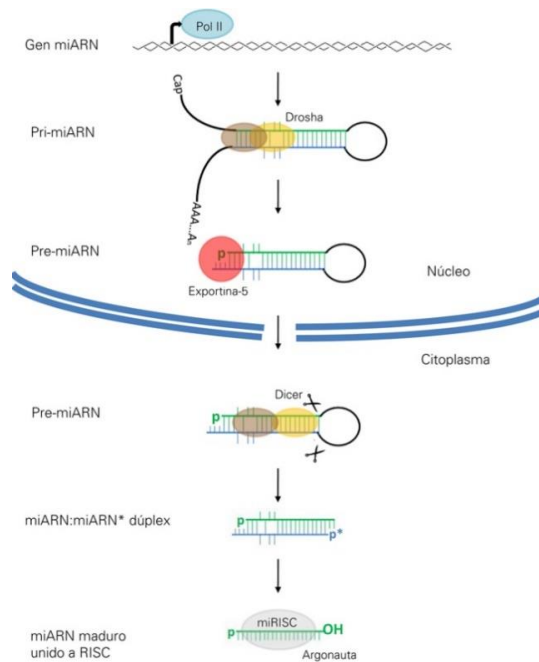
El ADN eucariota se empaqueta en nucleosomas gracias a la condensación de la cromatina. En estos, el ADN da casi dos vueltas sobre un octámero de histonas, las cuales pueden sufrir modificaciones enzimáticas postraduccionales como la acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación.



Las modificaciones de los residuos de lisina (K) y serina (S), de los extremos N-terminales de las histonas H3 y H4 provocarán efectos reguladores sobre la transcripción, activando o reprimiendo la expresión génica, mientras que las modificaciones de las histonas H2A y H2B permiten acceder a las histonas H3 y H4 para efectuar las modificaciones ya mencionadas (Zhang *et al.*, 2021).

### 1.3.1. MicroARNs.

En nuestro estudio nos centraremos concretamente en esta modificación. Los microARNs (miARNs) son moléculas pequeñas de ácido ribonucleico (ARN) no codificante de 19 a 25 nucleótidos, que regulan negativamente la expresión génica postranscripcional al unirse por complementariedad de bases en la región no traducida o UTR (*Untranslated region*) del ARNm del gen diana, conduciendo a una represión de la traducción del ARNm (**Figura 3**). Actúan como factores clave en la regulación de la diferenciación celular, la progresión del ciclo celular o la apoptosis (Nugent, 2015).



**Figura 3.** Biogénesis de los miARNs. Fuente: Suárez *et al.*, 2011.

La expresión de miARNs *in vivo* está regulada por diferentes mecanismos como pueden ser la metilación del ADN, la desacetilación de histonas, la alteración de copias del ADN o mutaciones genéticas que afectan a las proteínas implicadas en la maduración de estos miARNs. Las alteraciones de los niveles de expresión de miARNs pueden desembocar en diversas patologías, entre ellas, procesos inflamatorios como la OA (Nugent, 2015).

Jones y colaboradores identificaron miARNs en tejido óseo y cartilaginoso humano con OA. Para ello compararon la expresión de miRNAs en el cartílago y hueso de pacientes con OA con la expresión en muestras de personas sin dolor

articular previo. Tras analizar el perfil de expresión de 157 miRNAs humanos, el estudio identificó 17 miRNAs en el cartílago y 30 en el hueso que se mostraban sobre-expresados en el tejido enfermo en comparación con el tejido normal (Jones *et al.*, 2009).

Otros estudios han demostrado que miR-9 y miR-98 se encontraron aumentados tanto en el cartílago como el hueso de los pacientes con OA en comparación con muestras sanas. Estudios posteriores sugirieron la participación de miR-9 y miR-98 en la vía inflamatoria a través de la inhibición de la producción de factores de necrosis como TNF- $\alpha$  mediada por la IL-1 $\beta$ . Además, cabe destacar que, la sobreexpresión de miR-9 redujo la liberación basal e inducida de la proteína MMP-13 por la IL-1 $\beta$  (Jones *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que la modulación de los miARNs en la articulación reduce la OA en modelos animales y, por lo tanto, son cruciales para el desarrollo de los condrocitos y en la homeostasis del cartílago. La supresión de miARNs específicos, como por ejemplo miR-140 provoca la degradación prematura del cartílago articular y una mayor susceptibilidad a la OA. De este modo, su translación a los humanos parece una estrategia terapéutica clave en el futuro (Le *et al.*, 2016).

### **1.3.2. MicroRNA 140 (miR-140) en la OA.**

Los estudios sobre miARNs llevados a cabo en el cartílago han conducido a que el microARN más estudiado en este tejido sea el microARN-140 (miR-140), que originalmente se identificó como un patrón restringido en el cartílago del pez cebra en desarrollo (Barter *et al.*, 2012). Esto se confirmó después en el ratón (Le *et al.*, 2016).

El miR-140 está especialmente expresado en los tejidos cartilagosos en desarrollo (Nakamura *et al.*, 2012). Se ha descubierto que muestra una expresión diferencial en los condrocitos del cartílago articular humano y, que, su expresión está reducida en el tejido con OA (Nugent, 2015). La eliminación de miR-140 en los condrocitos da lugar a cambios osteoartíticos relacionados con la pérdida de proteoglicanos y fibrilación del cartílago articular. Por el contrario, se ha observado que la transfección de miR-140 en los condrocitos produce una baja expresión de ADAMTS inducida por la IL-1 $\beta$  y no se induce OA (Nugent, 2015).

Otras funciones del miR-140 incluyen la regulación, mediante la inhibición post-transcripcional, de la proteína-5 de unión al factor de crecimiento implicado en la OA en el cartílago (Nugent, 2015).

### **1.4. El pez cebra como modelo animal para el estudio de la OA.**

Los modelos animales parecen ser una buena herramienta para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas (Lorenz & Grassel, 2014). Para desarrollar modelos de OA se han utilizado tanto animales pequeños como

grandes en función del tipo de experimento, la duración, los costes de cría, la facilidad de manejo y las mediciones de los resultados (Kuyinu *et al.*, 2016).

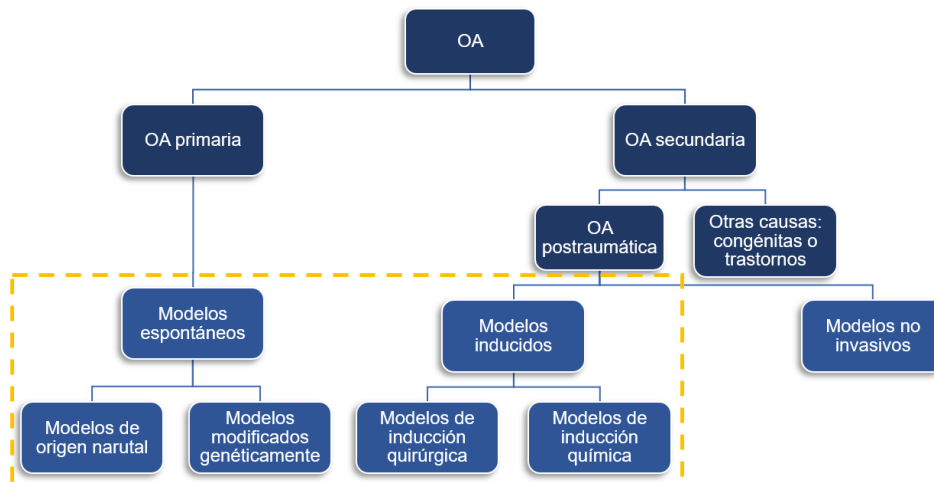
Como podemos ver en la **Figura 4**, los modelos de OA *in vivo* se centran tanto en los modelos espontáneos como en los inducidos en función de si derivan de la OA primaria o de la OA secundaria respectivamente (Kuyinu *et al.*, 2016):

Los **modelos espontáneos** recogen a los modelos de origen natural y los modelos generados mediante modificación genética, utilizados para examinar los posibles genes de susceptibilidad a la enfermedad identificados en estudios humanos (Butterfield *et al.*, 2021). Un inconveniente de estos modelos es que se caracterizan por una progresión lenta ya que requieren mucho tiempo para que se desarrolle la OA, haciendo que la experimentación se dificulte (Kuyinu *et al.*, 2016).

Dentro de la OA postraumática están los **modelos no invasivos** y los **modelos inducidos o invasivos**. Los primeros consisten en producir una agresión externa mediante un impacto mecánico que, sin causar daños en la piel del animal, desencadena cambios osteoartrotríticos. Por otro lado, los modelos inducidos o invasivos se utilizan para estudiar el efecto farmacológico de diferentes tratamientos en la enfermedad (Kuyinu *et al.*, 2016).

Estos últimos, a su vez, se dividen en modelos de inducción quirúrgica, donde la iniciación o aceleración de la degeneración articular es mediante cirugía, en él se incluyen: la meniscectomía, la transección del ligamento cruzado anterior y la osteotomía (Teeple *et al.*, 2013) y, en los modelos de inducción química, los cuales actúan estimulando inflamación intraarticular, el daño directo de la MEC o la toxicidad de los condrocitos mediante la inyección intraarticular de sustancias proinflamatorias o condrotóxicas. Son menos invasivos que los anteriores y, además, son exitosos a corto plazo debido a la facilidad de la inducción y su reproducibilidad (Kuyinu *et al.*, 2016).

Los modelos animales más utilizados en mamíferos para el estudio de la OA son los quirúrgicos, pero el pez cebra presenta una elevada capacidad de regeneración por lo que no parece lo más adecuado aplicar dichos modelos.



**Figura 4.** Esquema de clasificación de los modelos de OA animales para el estudio de la OA humana. Resaltada en amarillo se encuentra la clasificación original de los modelos de OA *in vivo*. Fuente: Elaboración propia adaptada de Kuyinu *et al.*, 2016.

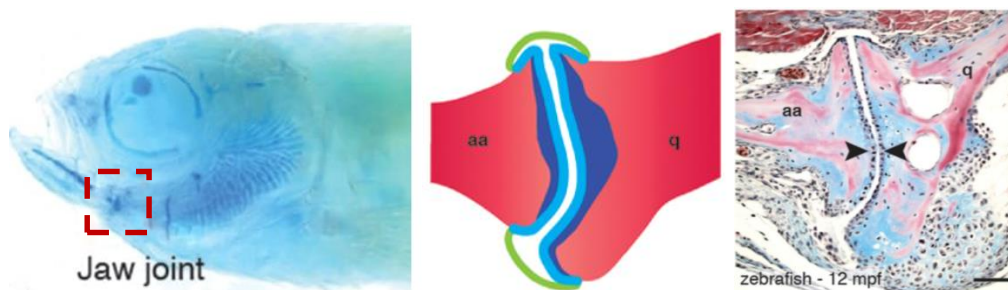
En la mayoría de los estudios de OA se han utilizado modelos animales mamíferos (ratón, rata, conejillo de indias, conejo, perro, oveja, cabra y caballo). En este proyecto se propone como alternativa el pez cebra (*Danio rerio*) como sistema modelo de vertebrados genéticamente manejable. El pez cebra es un pequeño pez teleosteo dulceacuícola que pertenece a la familia *Cyprinidae* cuya distribución se focaliza en el sur de Asia, en India y Bangladesh. El interés en utilizar este modelo animal se debe, entre otras características, a que, por su pequeño tamaño, se puede mantener un alto número de individuos en poco espacio, su desarrollo es rápido, la fecundación es externa y la fecundidad es alta. Además, la claridad óptica de los embriones permite realizar un seguimiento directo del desarrollo y del funcionamiento de órganos internos, lo hace que sea una opción especialmente interesante para estudios de microscopía de alta resolución (Lieschke & Currie, 2007). Todas estas características (**Tabla I**) hacen del pez cebra un modelo único para mantener mutantes. En la actualidad, existen numerosos recursos sobre el pez cebra como mapas genéticos o la secuenciación de su genoma, así como gran cantidad de información complementaria (ej. líneas mutantes, transgénicos, etc.) recogida en la base de datos ZFIN (<http://zfin.org/>) (Rocha & Ruiz, 2001).

El pez cebra es un modelo animal pequeño. Estos modelos son más rápidos, baratos y fáciles de implementar que los modelos animales grandes, aunque estos últimos parecen tener una mayor eficacia en los estudios debido a las similitudes anatómicas, histológicas y fisiológicas con los humanos (Kuyinu *et al.*, 2016).

**Tabla I.** Características del pez cebra como modelo para investigaciones en biología molecular de peces. Fuente: adaptado de Rocha & Ruiz, 2001.

| Conceptos                 | Valores                              |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Mantenimiento             | Bajo coste                           |
| Espacio                   | Pequeño: 30 animales/20L             |
| Maduración sexual         | A los 4 meses después de la eclosión |
| Reproducción              | Controlable por alimentación y luz   |
| Descendencia              | 200-400 huevos/hembra/2 semanas      |
| Desarrollo embrionario    | Documentado a nivel genético         |
| Tiempo desarrollo embrión | 3-4 días                             |
| Características embriones | Transparentes                        |
| Alimentación              | Seco y vivo                          |
| Stock de mutantes         | Actualmente miles                    |

Por todo lo visto anteriormente, el pez cebra es un modelo eficaz en diferentes campos de estudio. Sin embargo, hasta el momento apenas se ha empleado en estudios de enfermedades articulares, ya que se pensaba que carecían de articulaciones sinoviales lubricadas similares a las de humanos. Sin embargo, un estudio realizado por Askary y colaboradores demostró que la mandíbula y las aletas del pez cebra presentan importantes similitudes anatómicas e histológicas con las articulaciones sinoviales de humanos, lo que abriría las puertas para el estudio de enfermedades articulares sinoviales como la artrosis con el pez cebra (Askary *et al.*, 2016) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Morfología de la articulación sinovial mandibular en el pez cebra. Imagen (a): localización de la articulación sinovial mandibular; imagen (b): en color rojo se señala el hueso, en azul el cartílago, azul claro cartílago articular y en verde la membrana sinovial; imagen (c) imagen histológica donde se señalan condrocitos articulares recubriendo la cavidad. Fuente: Askary *et al.*, 2016.

## 1.5. Referencias bibliográficas.

- Askary, A., Smeeton, J., Paul, S., Schindler, S., Braasch, I., Ellis, N. A., Postlethwait, J., Miller, C. T., & Gage Crump, J. (2016). Ancient origin of lubricated joints in bony vertebrates. *Elife*, 5, e164115. <https://doi.org/10.7554/eLife.16415.001>
- Barter, M. J., Bui, C., & Young, D. A. (2012). Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(5), 339–349. doi:10.1016/J.JOCA.2011.12.012
- Butterfield, N. C., Curry, K. F., Steinberg, J., Dewhurst, H., Komla-Ebri, D., Mannan, N. S., Adoum, A. T., Leitch, V. D., Logan, J. G., Waung, J. A., Ghirardello, E., Southam, L., Youlten, S. E., Wilkinson, J. M., McAninch, E. A., Vancollie, V. E., Kussy, F., White, J. K., Lelliott, C. J., ... Bassett, J. H. D. (2021). Accelerating functional gene discovery in osteoarthritis. *Nature Communications*, 12, 1–18. doi:10.1038/s41467-020-20761-5
- Felson, D. T., Lawrence, R. C., Dieppe, P. A., Hirsch, R., Helmick, C. G., Jordan, J. M., Kington, R. S., Lane, N. E., Nevitt, M. C., Zhang, Y., Sowers, M., McAlindon, T., Spector, T. D., Poole, A. R., Yanovski, S. Z., Ateshian, G., Sharma, L., Buckwalter, J. A., Brandt, K. D., & Fries, J. F. (2000). Osteoarthritis: New insights - Part 1: The disease and its risk factors. *Annals of Internal Medicine*, 133(8), 635–646. doi:10.7326/0003-4819-133-8-200010170-00016
- Goldring, M. B., & Otero, M. (2011). Inflammation in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 23(5), 471–418. doi:10.1097/BOR.0b013e328349c2b1
- Jones, S. W., Watkins, G., le Good, N., Roberts, S., Murphy, C. L., Brockbank, S. M. V., Needham, M. R. C., Read, S. J., & Newham, P. (2009). The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(4), 464–472. doi:10.1016/J.JOCA.2008.09.012
- Kuyinu, E. L., Narayanan, G., Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2016). Animal models of osteoarthritis: Classification, update, and measurement of outcomes. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 11(19), 1–27. doi:10.1186/s13018-016-0346-5
- Le, Linh T. T.; Swingler, Tracey E.; Crowe, Natalie; Vincent, Tonia L.; Barter, Matthew J.; Donell, Simon T.; Delany, Anne M.; Dalmay, Tamas; Young, David A.; Clark, Ian M. (2016). The microRNA-29 family in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Journal of Molecular Medicine*, 94(5), 583–596. doi:10.1007/s00109-015-1374-z

- Lieschke, Graham J.; Currie, Peter D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews*, 8(5), 353–367. doi:10.1038/nrg2091
- Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R., & Goldring, M. B. (2012). Osteoarthritis A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis & Rheumatism*, 64(6), 1697–1707. doi:10.1002/art.34453
- Lorenz, J., & Grässel, S. (2014). Experimental osteoarthritis models in mice. *Mouse Genetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1194, 401–419. doi:10.1007/978-1-4939-1215-5\_23
- Mansfield, J. C., Winlove, C. P., Brasselet, S., Mandalia, V., & Toms, A. (2019). Collagen reorganization in cartilage under strain probed by polarization sensitive second harmonic generation microscopy. *J. R. Soc. Interface* 16(150), 1–14. doi:10.1098/rsif.2018.0611
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), 562–573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002
- Nakamura, Y., He, X., Kato, H., Wakitani, S., Kobayashi, T., Watanabe, S., Iida, A., Tahara, H., Warman, M. L., Watanapokasin, R. (2012). Sox9 Is Upstream of MicroRNA-140 in Cartilage. *Appl Biochem Biotechnol*, 166(1), 64–71. doi:10.1007/s12010-011-9404-y
- Nugent, M. (2015). MicroRNAs: exploring new horizons in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(4), 573–580. doi:10.1016/J.JOCA.2015.10.018
- Pearle, A. D., Warren, R. F., & Rodeo, S. A. (2005). Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clinics in Sports Medicine*, 24(1), 1–12. doi:10.1016/J.CSM.2004.08.007
- Rocha, A., & Ruiz, S. (2001). Biología molecular de los peces: Interés y aplicaciones. *Revista AquaTIC*, 15.
- Sacitharan, P. K. (2019). Ageing and Osteoarthritis. *Subcellular Biochemistry*, 91(6), 123–159. doi:10.1007/978-981-13-3681-2\_6
- Shen, J., Abu-Amer, Y., O’Keefe, R. J., & McAlinden, A. (2017). Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connective Tissue Research*, 58(1), 49–63. doi:10.1080/03008207.2016.1208655
- Sophia Fox, A. J., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health*, 1(6), 461–468. doi:10.1177/1941738109350438

- Suárez-Gómez M, Alexandre-Durán E, Ruiz-Rubio M. (2011). MicroARN en el trastorno bipolar: posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. *Revista de Neurología*, 53 (02), 91–98. doi:10.33588/rn.5302.2010661
- Teeple, Erin; Jay, Gregory D.; Elsaid, Khaled A.; Fleming, Braden C. (2013). Animal Models of Osteoarthritis: Challenges of Model Selection and Analysis. *The AAPS Journal*, 15(2), 438–446. doi:10.1208/s12248-013-9454-x
- Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, Fang Y, Fang D. (2021) Overview of Histone Modification. Histone Mutations and Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1283, 1-16. doi: 10.1007/978-981-15-8104-5\_1

## **2. CONTENIDO DEL PROYECTO: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.**

Debido a la importancia de la OA a nivel mundial este proyecto de investigación se centra en el uso del pez cebra como modelo animal para el estudio del efecto del miR-140 sobre la articulación sinovial de la mandíbula del pez cebra. Esta enfermedad ha sido estudiada en diferentes especies, sobre todo en mamíferos, pero en el presente proyecto se llevará a cabo el estudio de la OA en el pez cebra con el fin comprobar si este es un buen modelo para el estudio de la OA.

- 1) Silenciamiento de miR-140 mediante microinyección del inhibidor anti-miR-140 en embriones.
- 2) Estudio de la expresión de miR-140 en individuos a los 3, 7 y 14 días después de la fecundación y también con el envejecimiento, a los 2 y 6 meses, 1 y 2 años mediante PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) a nivel de expresión génica.
- 3) Estudio de cambios en la expresión de las proteínas relacionadas con el proceso artrósico, MMP-13, agregano y colágeno tipo II, mediante Western Blot tras el silenciamiento de miR-140.
- 4) Estudio de los cambios histológicos inducidos en la articulación sinovial de la mandíbula tras el silenciamiento de miR-140 mediante el análisis del Score OARSI (*Osteoarthritis Research Society International*).
- 5) Comparación de los resultados con modelos de OA en mamíferos para determinar en qué grado el pez cebra es un modelo adecuado.



### **3. CONTENIDO DEL PROYECTO: INTERÉS PARA EL AVANCE DE LOS CONOCIMIENTOS Y DE LA SOCIEDAD.**

La OA es una enfermedad de gran impacto en la sociedad al ser considerada una de las principales formas de dolor y discapacidad. De este modo, todo estudio relacionado con ella ayudará a encontrar posibles dianas terapéuticas.

Esta enfermedad ha sido ampliamente estudiada en mamíferos, pero en este proyecto se propone el pez cebra como modelo animal para el estudio de la OA debido a las ventajas que lo acompañan, además de la similitud de sus articulaciones sinoviales con las humanas. Así se podría comprobar si el pez cebra puede desarrollar OA, promoviendo su uso en estudios de la enfermedad, permitiendo así ampliar el conocimiento de su sistema esquelético y la composición del cartílago articular. Además, podría abrir las puertas a diferentes líneas de investigación como por ejemplo fármacos para el tratamiento de la enfermedad.

### **4. CONTENIDO DEL PROYECTO: PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN DE LOS RESULTADOS.**

La diseminación de los resultados de este proyecto será de extraordinario atractivo para los diferentes grupos de investigación que se dedican tanto al estudio de la OA como al estudio del desarrollo esquelético del pez cebra.

Los resultados serán expuestos en conferencias y congresos además de ser publicadas en revistas según su impacto y ranking en el *Journal Citation Reports* (JCR). Otra vía sería mediante actividades de divulgación científica como el Día de la Ciencia en la Calle o charlas divulgativas en la universidad.

### **5. VIABILIDAD DEL PROYECTO: METODOLOGÍA.**

La metodología descrita a continuación tiene como finalidad evaluar el efecto del silenciamiento del miR-140 sobre la degeneración de la articulación sinovial de la mandíbula del pez cebra.

#### **Tarea 1. Importación, cría y mantenimiento del pez cebra.**

El primer paso para llevar a cabo nuestro estudio será la importación de embriones desde el Centro Europeo de Recursos para el pez cebra (European Zebrafish Resource Center - EZRC). Emplearemos embriones de fenotipo silvestre (WT, *wild type*).

Los embriones se mantendrán en un sistema de acuarios con recirculación de agua para su cría en condiciones naturales. En cuanto a la luz, esta seguirá un ciclo de luz - oscuridad de 10 horas de oscuridad y 14 horas de

luz, condiciones óptimas para el buen desarrollo de los procesos fisiológicos (Aleström *et al.*, 2020). Respecto a la temperatura, aunque el pez cebra es una especie tropical, tolera ambientes templados, de modo que la temperatura recomendada para su mantenimiento en el laboratorio se sitúa en  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Aleström *et al.*, 2020) y un pH entre 6.5 y 8. La calidad del agua será revisada para mantener los parámetros correctos de nitratos, nitritos y amonio (Miller *et al.*, 2019).

En relación a la dieta, el pez cebra es un organismo generalista, consumiendo un amplio rango de crustáceos tanto plantónicos como bentónicos, así como de larvas y gusanos (Lawrence, 2007). Por lo tanto, serán alimentados con comida seca en escamas y con larvas del crustáceo *Artemia* spp. dos veces al día (Miller *et al.*, 2019).

## **Tarea 2. Microinyección y silenciamiento de miR-140 para la inducción de la OA.**

### **- Silenciamiento.**

Para llevar a cabo el silenciamiento de miR-140 nos basamos en los estudios realizados por Carbonare y colaboradores donde se estudia la modulación de la expresión del miR-204 durante la condrogénesis (Carbonare *et al.*, 2022).

Como se ha descrito anteriormente, el miR-140 se encuentra reducido en el cartílago artrósico (Nugent, 2015). De este modo, en este proyecto de investigación vamos a silenciar el miR-140 en el pez cebra para ver si se induce una OA comparable a la que se produce en la articulación sinovial humana.

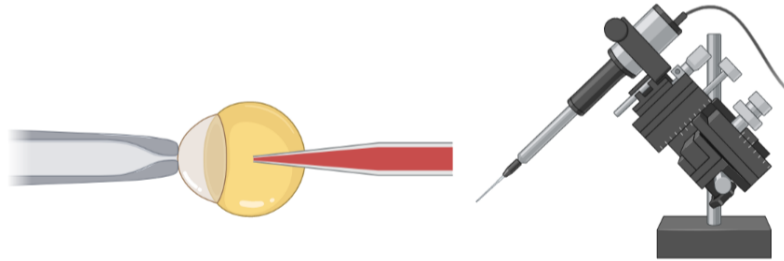
El silenciamiento del miR-140 se llevará a cabo con un inhibidor, el anti-miR-140 (Cat#: AM17000; Ambition by Thermo Fisher Scientific). Por otro lado, el grupo control será tratado con el inhibidor, control negativo anti-miR (Cat#: AM17010; Ambition by Thermo Fisher Scientific).

### **- Microinyección.**

La microinyección con anti-miR-140 *in vivo* será realizada en los embriones del pez cebra. Tendremos dos grupos control, uno tratado con el control negativo anti-miR en disolución y otro grupo control solo con la solución. Todos los tratamientos contendrán un reactivo colorante que nos servirá como una marca visual para la inyección de la solución en el embrión.

La metodología de la microinyección se realizará siguiendo el protocolo de Yuan & Sun, 2009. Para llevar a cabo la microinyección, las micropipetas de borosilicato se llenarán con la solución que contiene el anti-miR-140. El volumen de inyección será calibrado usando el micrómetro. Los embriones son depositados en las placas de la cámara de microinyección, las cuales se caracterizan por poseer una serie de canales en forma de cuña que servirán

como sujeción de los embriones durante la inyección. Una vez realizada la microinyección, gracias al aparato microinyector (Figura 6), los embriones serán incubados a 28.5°C y se observará su desarrollo. Del mismo modo se actuará para el grupo de peces control tratados con la solución que incluye el control negativo anti-miR y para el grupo de peces control que únicamente contiene el buffer.



**Figura 6.** En esta imagen se muestra el proceso de microinyección a la izquierda y a la derecha el aparato microinyector. Fuente: elaboración propia creado con BioRender.com.

### **Tarea 3. PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR).**

Los niveles de expresión del miR-140 serán cuantificados mediante PCR cuantitativa con transcriptasa inversa durante la embriogénesis del pez cebra a los 3, 7 y 14 días después de la fecundación y también con el envejecimiento, a los 2 y 6 meses, 1 y 2 años. De este modo, nos ayudará a comprobar si el nivel de miR-140 sigue estando reducido con el paso del tiempo.

Este proceso consiste en la amplificación de la secuencia específica del miR-140 presente en una mezcla heterogénea del material genético del tejido del animal y su consiguiente identificación mediante una PCR en tiempo real.

Se usarán las sondas Taqman y el gen U6 como gen de referencia. Además, los cambios en la expresión relativa del gen diana y de los miARN serán cuantificados usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **Tarea 4. Extracción de proteínas y Western Blot.**

Se estudiará la expresión de proteínas relacionadas con el proceso artrósico como, por ejemplo, MMP-13, agregano y colágeno tipo II. Se recogerán los lisados de las proteínas, las muestras se separarán mediante electroforesis y, posteriormente, se transferirán a una membrana de nitrocelulosa, la cual será incubada primero con sus respectivos anticuerpos primarios para la detección de las proteínas de interés: anticuerpo policlonal de conejo anti-MMP-13 (Cat#:PA5-16566, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), anticuerpo policlonal de conejo anti-agregano (Cat#: PA5-32650, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) y anticuerpo policlonal de cabra anti-Colágeno tipo II (SC7763, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, RRID: AB\_2229686). Posteriormente se realizará una segunda

incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes: anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo Alexa Fluor 555 (Cat#: A32732, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo Alexa Fluor 647 (Cat#: A32733, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) y anticuerpo policlonal de mono anti-cabra Alexa Fluor 488 (Cat#: A32814, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) respectivamente. El resultado se obtendrá con señales quimioluminiscentes con Uvitec Imager y un análisis densitométrico con el software ImageQuant (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) (Carbonare *et al.*, 2022).

### **Tarea 5. Análisis histológico de la articulación de la mandíbula**

Para llevar a cabo los estudios histológicos nos basaremos en el estudio de Askary *et al.*, 2006. En este estudio se detectaron lo que serían los indicios de una cavidad parcial a los 14 días después de la fertilización (dpf) y una cavidad prominente a los 28 dpf. La cavidad de la articulación sinovial de la mandíbula aparece prácticamente desarrollada a los 12 meses después de la fertilización (mdf) (Askary *et al.*, 2016). Para la obtención de las secciones histológicas seguiremos los siguientes pasos:

#### **– Eutanasia.**

Cumpliendo la directiva europea (2010/63/UE) y la legislación española (Real Decreto 53/2013) vigente en referencia a la protección y bienestar animal en investigación establece que los peces deberán ser eutanasiados antes de fijarlos. De este modo, los animales serán eutanasiados con sobre dosis de anestesia con 2,6-diisopropilfenol, 97 % (Cat#: L06841.36, Thermo Fisher Scientific) y deberá ser confirmada con la decapitación.

#### **– Fijación y descalcificación.**

Los peces cebra adultos se fijarán con paraformaldehído (PFA) al 4% a 4°C durante 7 días. Posteriormente se seccionará la estructura deseada, en nuestro caso la cabeza, que es donde se sitúa la articulación mandibular. Para el proceso histológico en este caso al estar tratando con tejidos mineralizados se sucederá un proceso de descalcificación en una solución de EDTA al 20% a temperatura ambiente durante 10 días (Askary *et al.*, 2016).

#### **– Inclusión.**

En el siguiente paso se deshidratarán las muestras con una serie de lavados con etanol (30, 50, 70, 95 y 100%) durante 20 minutos cada uno. A continuación, se tratarán con Hemo-De (50, 75 y 100%) (Cat#: NC0174259, Thermo Fisher Scientific) en lavados de 15 minutos. Una vez realizado este proceso, las muestras se incubarán en una solución 1:1 Hemo-De-parafina a 65°C durante 1 hora seguido de una incubación nocturna a 65°C con parafina líquida al 100%. Al día siguiente, las muestras incluidas serán sumergidas en parafina fundida y se dejará solidificar a temperatura ambiente. Por último, se

realizarán los cortes de 5  $\mu\text{m}$  con la ayuda de un microtomo, obteniendo así las secciones histológicas (Askary *et al.*, 2016).

– **Tinciones.**

Las tinciones son un paso esencial para la observación de las características morfológicas del tejido animal a microscopio óptico, ya que, la mayor parte son incoloros. Cada tinte será específico para una estructura determinada, aumentando así el contraste y facilitando la identificación de las mismas. A continuación, serán descritas las diferentes tinciones que se llevarán a cabo en el estudio, de nuevo nos basaremos en Askary *et al.*, 2006 para los protocolos:

**a) Hematoxilina y eosina.**

La hematoxilina es un colorante básico cargado positivamente (catiónico) que teñirá de violeta azulado los ribosomas, la cromatina dentro del núcleo y otras estructuras, mientras que la eosina es un colorante ácido cargado negativamente (aniónico) que teñirá de rosa anaranjado el citoplasma, la pared celular, el colágeno y el tejido conjuntivo (Chan, 2014).

- Desparafinar las secciones de 5  $\mu\text{m}$  con xileno y rehidratación con unas series de etanol y agua destilada.
- Tinción con hematoxilina (VWR) durante 2 minutos y lavado con ácido acético.
- Sumergir 2 minutos en solución *Blueing Reagent* (VWR) seguido de dos lavados de 30 segundos en agua y dos lavados de 30 segundos en etanol al 95%.
- Tinción con eosina (VWR) durante 30 segundos, seguidos de un lavado con etanol al 95% durante 1 minuto y dos lavados con etanol al 100% durante 1 minuto.
- Lavado durante 2 minutos en Hemo-De (Cat#: NC0174259, Thermo Fisher Scientific).
- Montaje de las muestras con Cytoseal (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI).

**b) Tricrómica.**

Consiste en una solución de un solo paso en la que se tiñe el tejido conectivo para demostrar diferencialmente el colágeno y las fibras musculares.

- Desparafinar las secciones de 5  $\mu\text{m}$  con xileno y rehidratación con etanol y agua destilada.
- Tinción con hematoxilina de hierro Weigert (Newcomer Supply) durante 10 minutos.
- Lavado con agua corriente durante 10 minutos y enjuague con agua destilada.

- Tinción Tricrómica durante 20 minutos con *Trichrome, Gomori One-Step, Aniline Blue Stain* (Newcomer Supply, Middleton, WI).
- Diferenciar en ácido acético 0,5% por 2 minutos y enjuague con agua destilada.
- Deshidratar las muestras con alcohol etílico al 95% y 100% y aclarado con xileno.
- Cubrir con un medio de montaje compatible.
- Lavado y montaje como se explica anteriormente.

### c) Safranina-O

Este colorante es una guía básica para la identificación de procesos degenerativos como la OA, ya que la Safranina O se une a los grupos carboxilo y a los grupos sulfato, ambos con carga negativa, de los glicosaminoglicanos (GAGs), los cuales abundan en la MEC del cartílago articular (Aguirre Sánchez, 2012).

- Desparafinar las secciones de 5  $\mu\text{m}$  con xileno y rehidratación con agua destilada.
- Tinción con hematoxilina de hierro de Weigert (Newcomer Supply) durante 5 minutos y posterior lavado con agua destilada 5 veces.
- Pasar las secciones a una solución etanol al 70% durante 2 minutos, seguido de 3 lavados en agua destilada.
- Tinción con Fast Green (FCF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 0.02% durante 1 minuto y enjuague durante 30 segundos en ácido acético al 1%.
- Tinción con SafraninO (Newcomer Supply) al 1% durante 30 minutos, seguida de tres lavados de etanol al 95% durante 1 minuto.
- Lavados 2 x 1 minuto en etanol al 100% y 2 x 2 minutos en Hemo-De (Cat#: NC0174259, Thermo Fisher Scientific).
- Montaje de las muestras usando Cytoseal (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI).

### – Inmunofluorescencia.

Mediante la unión antígeno-anticuerpo, detectaremos la presencia de las proteínas implicadas en el proceso artrósico, en concreto, agregano y colágeno tipo II. Los anticuerpos comerciales que se emplearán se obtendrán de diferentes proveedores. Se seguirá el protocolo según Askary *et al.*, 2006:

- Desparafinar las secciones de 5  $\mu\text{m}$  con xileno y rehidratación con una serie de baños de etanol y tampón fosfato salino (PBS) 0.1M.
- Recuperación de los antígenos con tampón citrato sódico pH 6 en un vaporizador durante 35 minutos.
- Bloqueo de las secciones mediante la incubación en un suero de un animal diferente a los que generaron los anticuerpos, en este caso

suero de burro al 2% disuelto en tampón fosfato salino con tween (PBST) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- Incubación de las secciones con anticuerpos primarios anti-Colágeno tipo II (policlonal de cabra, SC7763, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, RRID: AB\_2229686) y agrecano (conejo anti-ACAN) (Cat#: 13880-1-AP, Proteintech, Rosemont, IL) a 4°C durante la noche.
- Incubación con los anticuerpos secundarios (anticuerpo secundario de mono anti-cabra Alexa Fluor 488 (Cat#: A32814, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) y anticuerpo de cabra anti-conejo Alexa Fluor 555 (Cat#: A32732, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)).
- Tinción nuclear de Hoechst 33342 (Cat#: 10150888, Thermo Fisher Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Montaje de los portaobjetos con Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL) para visualización al microscopio.

#### – **Procesamiento de las imágenes.**

Las imágenes de fluorescencia de las secciones se realizarán con un microscopio Zeiss LSM5 confocal. Por otro lado, en el estudio histológico, las muestras tratadas con las diferentes tinciones serán fotografiadas con un microscopio Leica D8 2500 (Askary *et al.*, 2016).

#### – **Evaluación histológica, Score OARSI.**

El sistema *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) será utilizado para la evaluación histopatológica del cartílago en la OA. Este se caracteriza por asignar una serie de grados, que se corresponden con la progresión biológica del proceso osteoartrotico con la profundidad del cartílago, con el subsecuente cálculo de una **puntuación** de OA que sería la evaluación del **grado** y el **estado** de la OA. Este último se define como la extensión horizontal de la afectación de la enfermedad en el cartílago que se encuentre dentro de un mismo compartimento celular, independientemente del grado subyacente (Pritzker *et al.*, 2006).

Los **grados** de OA según la metodología para la evaluación del grado histopatológico del cartílago son (Pritzker *et al.*, 2006) (**Tabla II**):

- **Grado 0:** se corresponde con el cartílago articular hialino no afectado por la OA. La superficie del cartílago es lisa, la matriz y los condrocitos están organizados en tres zonas perfectamente orientadas y bien ordenadas.

- **Grado 1:** se caracteriza por la retención de la capa superficial del cartílago, no obstante, puede haber ciertas grietas microscópicas en esta zona debido a una abrasión denominada fibrilación superficial. Además, también puede incluir la inflamación del cartílago pudiendo conducir a la hipertrofia. En este grado también puede observarse una proliferación de condrocitos en la zona superficial.

- **Grado 2:** viene determinado por discontinuidad de la superficie del cartílago. La abrasión debida a las fuerzas de cizallamiento provoca la pérdida parcial de la matriz superficial y, como consecuencia, los condrocitos de la zona media pueden perder su orientación, así como expandirse.

- **Grado 3:** en él se observa la extensión de las grietas de la matriz hacia la zona media formando fisuras verticales, pudiendo expandirse y ramificarse en ángulos hacia la zona profunda.

- **Grado 4:** se caracteriza por la erosión del cartílago. Pueden distinguirse dos procesos distintos: la delaminación, que implica la pérdida de un fragmento de la zona superficial provocada por las fuerzas de cizallamiento; y la excavación, que representa la formación de una cavidad relacionado con la pérdida de la matriz. En este grado también se puede observar la formación de quistes en la zona media.

- **Grado 5:** sucede la erosión completa del cartílago hialino al nivel de cartílago mineralizado y/o óseo.

- **Grado 6:** se observa una deformación, un cambio de contorno de la superficie articular debido a fracturas en la placa articular, así como al aumento de la actividad metabólica de la placa ósea articular y a la activación del tejido conectivo situado entre el cartílago y el hueso.

**Tabla II.** Evaluación del grado histopatológico de la OA en cartílago con la profundidad. Fuente: adaptado de Pritzker *et al.*, 2006.

| <b>Grado</b>   | <b>Reacción tisular</b>   |
|----------------|---|
| <b>Grado 0</b> | Matriz: arquitectura normal.<br>Condrocitos: intactos, correcta orientación.<br>Corresponde con el cartílago sano.    |
| <b>Grado 1</b> | Matriz: zona superficial intacta y/o abrasión superficial provocando grietas.<br>Condrocitos: proliferación y muerte. |
| <b>Grado 2</b> | Discontinuidad de la superficie del cartílago.<br>Condrocitos: pérdida de orientación o expansión.                    |
| <b>Grado 3</b> | Fisuras verticales.<br>Condrocitos: muerte, hipertrofia.  |
| <b>Grado 4</b> | Matriz: pérdida. Erosión del cartílago por delaminación o excavación.<br>Formación de quistes en la zona media.       |
| <b>Grado 5</b> | Erosión completa del cartílago.   |
| <b>Grado 6</b> | Deformación de la superficie articular.   |



Son cuatro las etapas o **estados** de la progresión de la enfermedad en función de la extensión articular de la superficie articular afectada por la OA, independientemente del grado de OA subyacente (**Tabla III**):

**Tabla III.** Evaluación histopatológica horizontal del cartílago con la OA. Fuente: Pritzker *et al.*, 2006.

| <b>Estados</b>  | <b>% de afectación (superficie, área, volumen)</b> |
|-----------------|--|
| <b>Estado 0</b> | No se observa actividad de la OA.                  |
| <b>Estado 1</b> | <10%   |
| <b>Estado 2</b> | 10-25%   |
| <b>Estado 3</b> | 25%-50%  |
| <b>Estado 4</b> | >50%   |

En cuanto a la **puntuación**, este parámetro va a ser la evaluación combinada basada tanto en la gravedad (grado) como en la extensión (estado) de la OA y, se calcula mediante una simple fórmula donde se multiplica el grado por el estado (**Tabla IV**). De modo que, este método, efectúa una puntuación con un rango de 0 a 24 (Pritzker *et al.*, 2006).

**Tabla IV.** Puntuación de la OA. Fuente: Pritzker *et al.*, 2006.

| <b>Grado</b> | <b>Estado</b> |           |           |           |
|--------------|---------------|-----------|-----------|-----------|
|              | <b>S1</b>     | <b>S2</b> | <b>S3</b> | <b>S4</b> |
| <b>G1</b>    | 1             | 2         | 3         | 4         |
| <b>G2</b>    | 2             | 4         | 6         | 8         |
| <b>G3</b>    | 3             | 6         | 9         | 12        |
| <b>G4</b>    | 4             | 8         | 12        | 16        |
| <b>G5</b>    | 5             | 10        | 15        | 20        |
| <b>G6</b>    | 6             | 12        | 18        | 24        |

### **Tarea 6. Análisis estadístico.**

Los resultados se evaluarán mediante un análisis estadístico realizado con el programa estadístico informático SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). El análisis constará de una prueba t de Student donde las diferencias se consideran significativas con  $P < 0.05$ .

## 6. VIABILIDAD DEL PROYECTO: PLAN DE TRABAJO.

**Tabla V.** Tabla que muestra el cronograma y reparto de tareas detallado para los tres años de duración del proyecto.

| <b>Años</b>  | <b>Primero</b> |     |     |       | <b>Segundo</b> |       |       |       | <b>Tercero</b> |       |       |       |
|--|----------------|-----|-----|-------|----------------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|
| <b>Meses</b>                                       | 0-3            | 4-6 | 7-9 | 10-12 | 13-15          | 16-18 | 19-21 | 22-24 | 25-27          | 28-30 | 31-33 | 34-36 |
| <b>Tareas</b>                                      |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |
| <b>Obtención de embriones</b>                      |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |
| <b>Cría y mantenimiento del pez cebra</b>          |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |
| <b>Microinyección y silenciamiento del miR-140</b> |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |
| <b>Extracción de ácidos nucleicos</b>              |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |
| <b>Extracción de proteínas</b>                     |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |
| <b>Tinciones histológicas</b>                      |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |
| <b>Inmunofluorescencia</b>                         |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |
| <b>Procesamiento de las imágenes</b>               |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |
| <b>Evaluación histológica</b>                      |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |
| <b>Análisis estadístico de los resultados</b>      |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |
| <b>Publicación y difusión de los resultados</b>    |                |     |     |       |                |       |       |       |                |       |       |       |

## 7. ESTIMACIÓN PRESUPUESTARIA: DESTINO DE LA AYUDA SOLICITADA.

Tabla VI. Estimación presupuestaria.

| Concepto  |  | Años          |               |               |
|---|--|---------------|---------------|---------------|
|   |  | Primero       | Segundo       | Tercero       |
| <b>Personal contratado *</b><br>Contrato predoctoral  |  | 22.000        | 22.000        | 22.000        |
| <b>Equipamiento científico-técnico</b><br>Micropipetas, cubetas de tinción,<br>microinyector, etc.                        |  | 7.000         | 7.000         | -             |
| <b>Material bibliográfico</b><br>Acceso a revistas y libros   |  | 1.000         | 1.000         | 1.000         |
| <b>Material fungible</b>  | Dieta de los peces y mantenimiento de los acuarios | 500           | 500           | -             |
|   | Tampones, pipetas, colorantes, placas Petri...     | 650           | 650           | 650           |
|   | Anti-miR-140                                       | 900           | -             | -             |
|   | Anti-miR control negativo                          | 900           | -             | -             |
| <b>Importación de los peces</b>   |  | 1.000         | -             | -             |
| <b>Ayudas para la realización de estadias de investigación (máximo 10% de la cantidad solicitada)</b>                     |  | 2.000         | 2.000         | 3.000         |
| <b>Ayudas de coste por desplazamiento</b>   |  | -             | 1.000         | 1.000         |
| <b>Otros gastos</b><br>Divulgación científica y pago por publicación en revistas  |  | -             | -             | 5.000         |
| <b>Costes indirectos o gastos generales que reglamentariamente exige la universidad al grupo solicitante (máximo 20%)</b> |  | 6.000         | 6.000         | 7.500         |
| <b>TOTAL</b>  |  | <b>41.950</b> | <b>40.150</b> | <b>40.150</b> |

\* Cuantía anual establecida en base a la Calculadora de contratos de investigación v1.2 que proporciona la Universidad de A Coruña.

## 8. IMPLICACIONES ÉTICAS Y/O DE BIOSEGURIDAD.

El presente proyecto se llevará a cabo cumpliendo con la directiva europea (2010/63/UE) y la legislación española (Real Decreto 53/2013) vigente

en referencia a la protección y bienestar animal en investigación. Siguiendo el principio de las 3R: reemplazo, reducción y refinamiento, por el cual se establece que se les otorgarán todos los cuidados necesarios, además de que se reducirá el número de animales utilizados, así como que no se les causará innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero.

Siguiendo con los principios éticos y las responsabilidades de los investigadores, este proyecto será llevado a cabo siguiendo todos los permisos y titulaciones en lo relativo al trabajo con animales en el laboratorio.

## **9. CONCLUSIONES O HECHOS QUE SE PRETENDEN ALCANZAR.**

En mamíferos, los modelos más empleados para el estudio de la OA son los quirúrgicos, sin embargo, el pez cebra tiene una gran capacidad de regeneración de modo que no parece ser el método más adecuado para el estudio de esta patología. Este organismo es un buen modelo para el estudio de muchas otras enfermedades y, posee muchas ventajas que lo hacen un modelo muy atractivo. En este proyecto se pretende desarrollar OA en el pez cebra reduciendo la expresión del miR-140.

En base a todo eso, los hitos que se pretenden alcanzar son los siguientes:

1. Caracterización del grado de afectación de OA de la articulación sinovial de la mandíbula del pez cebra tras el silenciamiento del miR-140.
2. Comparación de similitudes y diferencias entre la OA inducida en el pez cebra y los modelos de OA en mamíferos.
3. Fomentar el uso del pez cebra como modelo animal para el estudio de enfermedades articulares.

## **10. CONCLUSIONS OR MILESTONES TO BE ACHIVED.**

In mammals, the most commonly used models for the study of OA are surgical models, however, the zebrafish has a great capacity for regeneration so it does not seem to be the most suitable method for the study of this pathology. This organism is a good model for the study of many other diseases and has many advantages that make it a very attractive model. In this project, we aim to develop OA in zebrafish by reducing the expression of miR-140.

Based on this, the milestones to be achieved are:

1. Characterisation of the degree of OA involvement of the zebrafish jaw synovial joint following miR-140 silencing.
2. Comparison of similarities and differences between OA induced in zebrafish and mammalian OA models.

3. To promote the use of zebrafish as an animal model for the study of joint diseases.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, S. H. I. (2012). Colorante safranina O. *Investigación en Discapacidad*, 1(2), 83-85.
- Aleström, P., D'Angelo, L., Midtlyng, P. J., Schorderet, D. F., Schulte-Merker, S., Sohm, F., & Warner, S. (2020). Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Laboratory Animals*, 54(3), 213–224. doi:10.1177/0023677219869037
- Askary, A., Smeeton, J., Paul, S., Schindler, S., Braasch, I., Ellis, N. A., Postlethwait, J., Miller, C. T., & Gage Crump, J. (2016). Ancient origin of lubricated joints in bony vertebrates. *Elife*, 5, e164115. doi:10.7554/eLife.16415.001
- Carbonare, L. D., Bertacco, J., Minoia, A., Cominacini, M., Bhandary, L., Elia, R., Gambaro, G., Mottes, M., & Valenti, M. T. (2022). Modulation of miR-204 Expression during Chondrogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 1–11. doi:10.3390/ijms23042130
- Chan, J. K. C. (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International Journal of Surgical Pathology* 22(1), 12–32. doi:10.1177/1066896913517939
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1–4), 1–20. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.077
- Miller Id, M., Sabrautzki, S., Beyerlein Id, A., & Brielmeier, M. (2019). Combining fish and environmental PCR for diagnostics of diseased laboratory zebrafish in recirculating systems. *PLOS ONE*, 14(9), 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0222360
- Nugent, M. (2015). MicroRNAs: exploring new horizons in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(4), 573–580. doi:10.1016/J.JOCA.2015.10.018
- Pritzker, K. P. H., Gay, S., Jimenez, S. A., Ostergaard, K., Pelletier, J. P., Revell, K., Salter, D., & van den Berg, W. B. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(1), 13–29. doi:10.1016/j.joca.2005.07.014
- Yuan, S., & Sun, Z. (2009). Microinjection of mRNA and morpholino antisense oligonucleotides in zebrafish embryos. *Journal of Visualized Experiments*, 27, e1113. doi:10.3791/1113