



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

ALBA
PENSADO LÓPEZ

Tesis doctoral

Desarrollo y caracterización
de una línea mutante de pez
cebra para *auts2a*, gen
candidato a trastornos del
espectro autista

Lugo, 2022



TESIS DE DOCTORADO

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE
UNA LÍNEA MUTANTE DE PEZ CEBRA
PARA *AUTS2A*, GEN CANDIDATO A
TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA**

Alba Pensado López

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR



LUGO

2022

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **ALBA PENSADO LÓPEZ**

Título da tese: **Desarrollo y caracterización de una línea mutante de pez cebra para auts2a, gen candidato a trastornos del espectro autista**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Lugo, **24 de mayo de 2022.**

Firma electrónica

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

**Desarrollo y caracterización de una línea mutante de pez cebra para
auts2a, gen candidato a trastornos del espectro autista**

D^a. LAURA ELENA SÁNCHEZ PIÑÓN

D^a. CATARINA ALLEGUE TOSCANO

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D^a. ALBA PENSADO LÓPEZ, bajo nuestra dirección/tutorización, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directoras de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación de la doctoranda fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En LUGO 25 de Mayo de 2022

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Yo, Alba Pensado López, con DNI 44849551-B, declaro que la presente tesis doctoral no presenta conflicto de interés alguno.

EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Yo, Alba Pensado López, con DNI 44849551-B, declaro que esta tesis fue realizada al amparo del proyecto de investigación denominado 'El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente' (Exp. 01/20/LU-003), aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Santiago de Compostela (MR110250) (Anexo II), de acuerdo con la normativa actual de bienestar animal y conforme a los protocolos estándar (Real Decreto 53/2013, Directiva 2010-63-UE). Los procedimientos se llevaron a cabo en el animalario del Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, en la Facultad de Veterinaria, Lugo (AE-LU-003), con código REGA de autorización ES270280346401. Todos los procedimientos fueron realizados por Alba Pensado López, capacitada para las funciones A, B y C de experimentación animal con peces, anfibios y roedores (Anexo III).

FINANCIACIÓN

El trabajo de la presente tesis se desarrolló con el apoyo de la Consellería de Educación, Universidade e Formación Profesional (ED431C-2018/28) y el Instituto Carlos III-Fondos FEDER (PI19/00809, 2020-2022). Alba Pensado López fue financiada por las Ayudas de Apoyo a la Etapa Predoctoral de la Xunta de Galicia (ED481A-2018/095).

Pesa menos un lápiz que una pala...

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Como siempre dice mi padre, ahora jubilado, todos los días son Viernes...No se refiere con ello a que llegue ese ansiado día en que vamos juntitos al bar a tomar las cañitas, sino que se refiere a que yo, con suerte y a diferencia de otros muchos, vuelvo a casa no por Navidad, sino los Viernes. Es bonito, por supuesto, pero a la vez refleja lo rápido que pasa el tiempo, lo rápido que pasa la vida...ya llegó de nuevo el Viernes!!! Pues con la tesis es más o menos lo mismo; te levantas, vas al laboratorio, te rompes la cabeza a base de pensar, peleas con los protocolos y en mi caso, con mis peixes, regresas a casa, duermes (o no), y vuelta a empezar, y sin darte cuenta pasan casi 5 años. Parece, además, que pasa el tiempo y no avanzas, que todo es cuesta arriba y realmente, parece que uno cada día sabe menos, pero justamente, un par de personas muy queridas me dijeron recientemente que es ese momento, en que te da la sensación de que involucionas, cuando realmente eres bueno en lo tuyo, porque adquiriste la capacidad de autocrítica, de verlo todo en perspectiva, de analizar, y es por supuesto, cuando surgen en ti las ganas de mejorar.

Una de esas personas fue precisamente Cata, a la que agradezco haber demostrado confianza absoluta en mí al nunca presionarme y mostrarse siempre radiante al contarle cualquiera de mis muy pequeños avances, y desde luego, por haberme acogido para comenzar esta experiencia.

Por supuesto, a Laura, mi querida Laura, no puedo más que darle el mayor de los agradecimientos por apostar por mí desde el primer momento. ¿Sabéis esas personas con las que uno habla cuando parece que no ve la luz al final del túnel, pero luego parece que le quitaron 10 toneladas de encima? Para mí, esa persona es Laura. Siempre ve el lado bueno de las cosas, te lo transmite, te da ánimos y sobretodo, esperanza. Gracias.

Quiero mencionar con especial cariño a Ana y Álvaro, mis compañeros, pero sobretodo mis amigos, ya que sin ellos nada de lo que recoge esta tesis hubiera sido posible. Ana me recibió, me enseñó todo y sin dudarlo, me acogió como una más, siempre dispuesta a echarme una mano para todo. Eres la mejor y la más buena, Ana. Mi personita preferida, Álvaro, siempre juntos, lo sabes. Y por supuesto, no me olvido de mi tarado favorito, Coppel, que siempre consigue provocarme esos ataques de risa (aunque también de ira), que uno siempre necesita. También a mi queridísimo Pablo, que siempre está ahí para apaciguarme y darme el abrazo que normalmente no quiero, pero necesito. A mi otro también muy apreciado Adri Millán, que aunque a veces nos retroalimentemos con nuestra negatividad, siempre está para darme buenos consejos y recordarme que tengo que apreciarme a mí misma.

A Lucía, Peque, Susana y Porte, agradeceros con todo mi corazón haberme enseñado a hacer muchas cosas bien, pero sobretodo, a reñirme cuando hacía algo mal, ya que eso siempre me enseñó a mejorar. Quiero mencionar a Cris también, que aunque llegó un poquitín más tarde, siempre está dispuesta a ayudarme.

A Mónica y Sonia, que son las mejores de mundo mundial y me ayudaron siempre. Recuerdo con mucho cariño, además, lo que pensó de mí Mónica la primera vez que me vio, pero eso queda entre nosotras, ella sabe de lo que hablo.

Casi me dejo en el tintero a muchos compañeros y amigos, Chiclana, Óscar, Iago, Andrés, Martín, y a Vanesita, nuestra amiga/médico/consejera/investigadora/vale-para-todo y mi especial fuente de autoestima, que siempre espera lo mejor de mí y me lo hace saber.

A mis pupilas preferidas Sara y Maider, con especial mención a Sara, con la que empecé esta aventura, sin apenas saber nada, pero con la cual aprendí infinidad de cosas y me ayudó tremendamente. Me siento orgullosa de ti Sara, de haber visto cómo evolucionas día a día, cómo sacas adelante tu trabajo (sola) y de lo buena investigadora que eres.

No podría estar más agradecida a mis padres y mi hermana, que únicamente con sus frases *`ti vales eso e moito mais´* o, *`pero qué orgullosa estoy de ti, piojo´*, hacen claros los días más oscuros. Elisa, mi madre, la mejor persona y mamá del mundo, mi símbolo de coraje, entereza y fuerza, Braulio, mi padre, mi gran apoyo, inspirador de constancia, templanza y seriedad y, Andrea, mi hermana, mi persona favorita, mi referente y mi guía.

A Fernando, mi corazón. Siempre estuviste, estás y estarás, para todo. Como le dije a alguien un día...él se merecía el mundo, pero me escogió a mí.

A mis más mejores amigas del mundo, Adriana, Belén, Jenni, Laura y María por confiar siempre en mí y por darme siempre momentos inolvidables. A mis chilenitas Nati y Jeza, y a Jose y Nico, aunque a veces os preocupéis más de mis peixes que de mí, y a mis muy queridísimos Iván y Carmen. Vosotros sois mi otra familia y todos los fines de semana me dais el empujón que necesito para afrontar un nuevo lunes. Gracias.

Finalmente, y no por ello menos importante, agradecer a mi muy también querido Pauli, por muchas cosas, pero sobre todo por algo que me dijo, que nunca olvidaré y que me hizo sentir muy apreciada: *`Alba, tú eres como una mujer orquesta, vales para todo´*.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	35
RESUMEN	41
RESUMO	47
SUMMARY	53
INTRODUCCIÓN	59
1. TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA: DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA	61
1.1. Diagnóstico y tratamiento de TEA	62
1.2. Etiología y patología de los TEA	64
1.2.1. Componente ambiental.....	65
1.2.2. Componente genético.....	65
1.3. Herramientas de edición genómica para el estudio de factores potencialmente causales de TEA	67
1.3.1. Funcionamiento general de las ZFNs y TALENs	68
1.4. Sistemas CRISPR/CAS	69
1.4.1. Contexto histórico	69
1.4.2. Funcionamiento general de los sistemas CRISPR/Cas en procariotas.....	70
1.4.3. Modificación de los sistemas CRISPR/Cas9 para su aplicación en investigación	71
1.4.4. Aplicación del sistema CRISPR/Cas9 para el estudio de TEA.....	72
2. EL PEZ CEBRA	73
2.1. Taxonomía y distribución	73
2.2. Descripción del pez cebra	74
2.3. El pez cebra en investigación biomédica	76
2.4. Aplicación del pez cebra para el estudio de trastornos del neurodesarrollo	77
2.4.1. Modelos genéticos de pez cebra para el estudio de TEA.....	78

2.4.1.1.	Morfolinos	79
2.4.1.2.	TILLING, TALENs, ZFNs y CRISPR	81
2.4.2.	Caracterización de los modelos genéticos de pez cebra	83
3.	AUTS2, GEN CANDIDATO DE SUSCEPTIBILIDAD A AUTISMO 2.....	84
3.1.	Descripción y función en el neurodesarrollo.....	85
3.1.1.	Función citoplasmática	85
3.1.2.	Función nuclear	85
3.2.	<i>auts2a</i>, gen ortólogo en pez cebra.....	86
3.3.	Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> para el estudio de la implicación de <i>AUTS2</i> en el neurodesarrollo.....	86
	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	89
	MATERIAL Y MÉTODOS	93
1.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	95
1.1.	Mantenimiento del pez cebra.....	95
1.2.	Obtención de huevos de pez cebra	95
2.	GENERACIÓN DE UNA LÍNEA MUTANTE PARA EL GEN <i>AUTS2A</i> MEDIANTE CRISPR/CAS9.....	96
2.1.	Selección de <i>AUTS2</i>, validación de su ortólogo en pez cebra	96
2.2.	Diseño y síntesis de los ARNsg	96
2.2.1.	PCR.....	97
2.2.2.	Electroforesis en gel de agarosa	98
2.2.3.	Purificación de la reacción de PCR	98
2.2.4.	Transcripción <i>in vitro</i> y purificación	98
2.3.	Inyección de los ARNsg en el estadio de una célula del embrión de pez cebra.....	98
2.4.	Genotipado de los embriones de la generación F0	99
2.4.1.	Extracción de ADN.....	99
2.4.2.	PCR, electroforesis en gel de agarosa, purificación y cuantificación.....	99
2.4.3.	Clonación bacteriana	99
2.4.3.1.	Reacción de ligación	100
2.4.3.2.	Transformación bacteriana	100
2.4.3.3.	PCR de colonias y electroforesis en gel de agarosa	100
2.4.4.	Secuenciación Sanger o dideoxi	101

2.4.4.1.	Purificación de los productos de PCR	101
2.4.4.2.	Reacción de secuenciación	101
2.4.4.3.	Purificación de la reacción de secuenciación.....	101
2.4.4.3.	Secuenciación	101
2.5.	Obtención y genotipado de embriones de la generación F1	102
2.6.	Genotipado de los adultos de la generación F1	103
2.6.1.	Análisis de heterodúplex mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.....	103
2.6.1.1.	Extracción de ADN, PCR y gel de agarosa	103
2.6.1.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	104
2.6.2.	Clonación bacteriana y secuenciación	104
2.7.	Obtención y análisis de embriones de la generación F2	104
2.7.1.	Toma de imágenes de los embriones de la generación F2 a las 48 hpf.....	104
2.7.2.	Extracción de ADN y PCR	105
2.7.3.	Comprobación de la amplificación en gel de agarosa.....	105
2.7.4.	Análisis de fragmentos	105
2.7.5.	Mezcla de ADN de homocigotos problema con ADN de homocigotos WT.....	106
2.8.	Genotipado de los adultos de la generación F2 y obtención de la F3	106
3.	VALIDACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL <i>KNOCK-OUT</i> DE <i>AUTS2A</i>.....	108
3.1.	Cuantificación de la expresión de <i>auts2a</i> por qPCR.....	108
3.1.1.	Extracción de ARN	108
3.1.2.	Tratamiento con DNasa y purificación del ARN	108
3.1.3.	Retrotranscripción del ARN a ADN complementario	109
3.1.4.	Diseño y validación de cebadores de qPCR.....	109
3.1.4.1.	Reacción de qPCR	109
3.1.4.2.	Rectas de calibrado	110
3.2.	Hibridación <i>in situ</i> para el gen <i>auts2a</i>.....	110
3.2.1.	Síntesis y purificación de la ribosonda antisentido de ARN	110
3.2.2.	Transcripción <i>in vitro</i> y purificación de la ribosonda antisentido.....	111
3.2.3.	HIS.....	111
3.3.	Western Blot.....	112
3.3.1.	Extracción y cuantificación de proteínas.....	112

3.3.2.	Electroforesis	112
3.3.3.	Transferencia, lavado y bloqueo de la membrana.....	112
3.3.4.	Incubación con anticuerpos y revelado	113
4.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES DE <i>AUTS2A</i>.....	113
4.1.	Caracterización fenotípica de los embriones	113
4.1.1.	Análisis morfológico	113
4.1.2.	Tinción de cartílago	114
4.1.3.	Determinación de apoptosis.....	114
4.1.3.1.	Naranja de acridina.....	114
4.1.3.2.	Análisis de la expresión de <i>p53</i>	114
4.1.4.	Hibridación <i>in situ</i> de <i>pax2a</i> , <i>emx1</i> y <i>aldoca</i>	115
4.2.	Caracterización fenotípica de los adultos.....	115
4.2.1.	Longitud y peso de los adultos.....	115
5.	ANÁLISIS DE LOCOMOCIÓN DE LOS EMBRIONES MUTANTES DE <i>AUTS2A</i>.....	116
6.	ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LOS MUTANTES DE <i>AUTS2A</i>.....	116
6.1.	Selección de genes de interés	116
6.1.1.	Genes reguladores y regulados por <i>AUTS2</i>	116
6.1.2.	Genes implicados en enfermedades del neurodesarrollo	117
6.1.3.	Genes implicados en el PCR1	117
6.1.4.	Genes implicados en el NSMD	118
6.1.5.	Genes marcadores de tipos celulares cerebelares	118
6.1.6.	Genes marcadores específicos de sinapsis glutamatérgicas y gabaérgicas	118
6.1.7.	Genes marcadores de neuroglía: astrocitos, glía y oligodendrocitos	119
6.1.8.	Genes marcadores de pluripotencia	119
6.1.9.	Genes implicados en la diferenciación neuronal.....	119
6.1.10.	Gen marcador de activación neuronal.....	120
6.2.	Diseño de cebadores de qPCR	120
6.3.	Validación de los cebadores de qPCR	121
6.4.	Reacción de qPCR para determinar la expresión diferencial entre WT y mutantes	121

RESULTADOS	123
1. GENERACIÓN DE UNA LÍNEA MUTANTE PARA EL GEN <i>AUTS2A</i> MEDIANTE CRISPR/CAS9	125
1.1. Ortólogo de <i>AUTS2</i> en pez cebra.....	125
1.2. Diseño, síntesis e inyección de los ARNsg	125
1.3. Genotipado de los embriones de la generación F0	126
1.4. Genotipado de los embriones de la generación F1	128
1.5. Genotipado de los adultos de la F1	130
1.5.1. Análisis de heterodúplex en gel de poliacrilamida	130
1.5.2. Clonación bacteriana.....	130
1.6. Obtención y genotipado de la F2	131
1.6.1. Establecimiento de cruces	131
1.6.2. Genotipado de los embriones de la F2	131
1.6.2.1. Cribado de los individuos heterocigotos en gel de agarosa	131
1.6.2.2. Análisis de fragmentos.....	131
1.6.2.3. Mezcla de ADN de homocigotos problema con ADN de homocigotos WT	133
2. VALIDACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL <i>KNOCK-OUT</i> DE <i>AUTS2A</i>.....	133
2.1. Cuantificación de la expresión de <i>AUTS2A</i> por qPCR.....	133
2.2. Hibridación <i>in situ</i> para el gen <i>auts2a</i>	135
2.3. Western Blot	137
3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES DE <i>AUTS2A</i>	137
3.1. Caracterización fenotípica de los embriones	137
3.1.1. Análisis morfológico	137
3.1.2. Tinción de cartílago.....	140
3.1.3. Determinación de apoptosis	141
3.1.3.1. Naranja de acridina	141
3.1.3.2. Análisis de la expresión de <i>p53</i>	141
3.1.4. Hibridación <i>in situ</i> de <i>pax2a</i> , <i>emx1</i> y <i>aldoca</i>	142
3.2. Caracterización fenotípica de los individuos adultos.....	143
3.2.1. Longitud y peso de los adultos.....	143
4. ANÁLISIS DE LOCOMOCIÓN DE LOS EMBRIONES MUTANTES DE <i>AUTS2A</i>	144

5. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LOS MUTANTES DE <i>AUTS2A</i>.....	145
5.1. Validación de los cebadores de qPCR	145
5.2. Expresión diferencial entre individuos WT y mutantes	146
5.2.1. Genes reguladores y regulados por <i>AUTS2</i>	146
5.2.2. Genes implicados en enfermedades del neurodesarrollo.....	147
5.2.3. Genes implicados en el PRC1.....	148
5.2.4. Genes implicados en el NSMD.....	149
5.2.5. Genes marcadores de tipos celulares cerebelares	149
5.2.6. Genes marcadores específicos de sinapsis glutamatérgicas y gabaérgicas	150
5.2.7. Genes marcadores de neuroglia: astrocitos, microglía y oligodendrocitos	150
5.2.8. Genes marcadores de pluripotencia y de diferenciación neuronal	151
5.2.9. Gen marcador de activación neuronal	151
DISCUSIÓN	153
CONCLUSIONES.....	163
CONCLUSIONS	167
ANEXO I.....	171
ANEXO II.....	175
ANEXO III.....	181
REFERENCIAS	185

ÍNDICE DE TABLAS Y ECUACIONES

Tabla 1. Criterios diagnósticos de TEA según el DSM-5	62
Tabla 2. Terapias psicosociales para el tratamiento de pacientes con TEA	63
Tabla 3. Terapias farmacológicas y de medicina natural de pacientes con TEA	63
Tabla 4. Ejemplos de líneas transgénicas disponibles con marcaje para células del sistema nervioso.....	78
Tabla 5. Estudios con MOs en pez cebra para la caracterización fenotípica de genes candidatos de TEA.....	80
Tabla 6. Estudios en pez cebra para la caracterización fenotípica de genes candidatos de TEA mediante ZFNs, TALENs, ENU y CRISPR/Cas9	82
Tabla 7. Secuencias en dirección 5'→ 3' de los cebadores utilizados y tamaño de amplicón.....	109
Tabla 8. Secuencias en dirección 5'→ 3' de los cebadores utilizados y tamaño de amplicón.....	115
Tabla 9. Secuencias en dirección 5'→ 3' de los cebadores utilizados y tamaño de amplicón.....	120
Tabla 10. Datos relativos a las rectas de calibrado de los cebadores de qPCR.....	145
Ecuación 1. Fórmula empleada para el cálculo de la cantidad de inserto necesario	100
Ecuación 2. Fórmulas empleadas para el cálculo de la eficiencia de las parejas de cebadores. a) Fórmula de regresión lineal, siendo m la pendiente de la línea, x la variable independiente y b la ordenada al origen ; b) fórmula de cálculo de la eficiencia; c) fórmula de cálculo del porcentaje de eficiencia.	110

ÍNDICE DE FIGURAS *

Figura 1. Número de genes según su clasificación como sindrómicos o no sindrómicos y su correspondiente puntuación según la base de datos de SFARI (SP=Sin puntuación). Datos de Febrero del 2022.	66
Figura 2. Número de genes de cada cromosoma humano, clasificados según la puntuación en la base de datos SFARI (SP=Sin puntuación). Datos de Febrero del 2022.....	66
Figura 3. Esquema del funcionamiento de los mecanismos celulares de reparación del ADN tras producirse cortes de doble hebra. (a) NHEJ; (b) HDR.....	67
Figura 4. Esquema del funcionamiento básico de los sistemas de edición genómica: (a) ZFNs; (b) TALENs.....	68
Figura 5. Esquema de los principales componentes del sistema CRISPR; proteínas Cas, secuencia <i>leader</i> y <i>array</i> CRISPR (repetición-espaciador).....	69
Figura 6. Esquema del funcionamiento básico del sistema CRISPR/Cas9. (a) Fase de adquisición o adaptación; (b) Fase de biogénesis de ARNcr; (c) Fase de interferencia.	70
Figura 7. Estructura básica de los componentes del sistema CRISPR/Cas9.	71
Figura 8. Fotografías de un macho y una hembra de pez cebra, donde se pueden observar características diferenciales con respecto al sexo.	74
Figura 9. Ciclo de vida del pez cebra desde el período cigótico hasta la edad adulta.	75
Figura 10. Representación de la estructura básica del ADN (a) con el anillo desoxirribosa y el enlace fosfodiéster y de los MOs (b) con el anillo morfolino y el enlace de grupos fosfordiamidato.	79
Figura 11. Representación esquemática de la localización cromosómica y composición exónica de <i>AUTS2</i>	85

Figura 12. Análisis del exón 9 de pez zebra. a) Secuencia nucleotídica del exón 9 de la isoforma principal de pez cebra (ENSDARE00001012383; 27,195,284 - 27,195,046; b) Comparación de la secuencia aminoacídica resultante de la transcripción entre humano y pez cebra.	97
Figura 13. Ejemplo de análisis de heterodúplex mediante gel de poliacrilamida para embriones de la F0: marcador de peso molecular de 100 pb; una única banda para los controles (carriles 2-5); heterodúplex para los individuos inyectados (carriles 6-9).	102
Figura 14. Ejemplo de análisis de heterodúplex mediante gel de poliacrilamida para adultos de la F0. El asterisco (*) marca individuos con presencia de heterodúplex. Marcador de peso molecular de 100 pb.	103
Figura 15. Representación esquemática de los procedimientos para: a) Inyección y genotipado de embriones y adultos de la F0; b) Genotipado de embriones y adultos de la F1; c) Genotipado de embriones y adultos de la F2 y obtención de la F3.	107
Figura 16. Representación de la secuencia del ARNsg. a) Complementariedad entre la secuencia diana del genoma y la secuencia del ARNsg; b) Composición del ARNsg a amplificar.	125
Figura 17. Gel de agarosa para ARNsg amplificado y purificado. Marcador de peso molecular de 100 pb.	126
Figura 18. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas embriones WT y mutantes de la F0. En mayúscula se muestra la secuencia exónica y en minúscula la intrónica. Se marcan en gris los cebadores, en verde la región complementaria al ARNsg, en azul las inserciones y en rojo tachado las deleciones. a) Secuencia nucleotídica WT del exón 9; b) Secuencia con delección de 311 pb e inserción de 9 pb; c) Secuencia con delección de 307 pb; d) Secuencia con delección de 293 pb e inserción de 2 pb; e) Secuencia con delección de 1 pb e inserción de 1 pb; f) Secuencia aminoacídica completa de individuo WT. En amarillo la secuencia correspondiente al exón 9; g) Secuencia aminoacídica interrumpida debido a las mutaciones reflejadas en los apartados b,c y d.	126

Figura 19. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de mutantes de la F1. En mayúscula se muestra la secuencia exónica y en minúscula la intrónica. Se marcan en gris los cebadores, en verde la región complementaria al ARNsg, en azul las inserciones y en rojo tachado las deleciones. a) Secuencia con deleción de 3 pb; b) Secuencia con deleción de 5 pb; c) Secuencia con deleción de 6 pb; d) Secuencia con deleción de 7 pb; e) Secuencia con inserción de 33 pb y un cambio de base; f) Secuencia aminoacídica interrumpida debido a las mutaciones reflejadas en los apartados b y d. En amarillo la secuencia correspondiente al exón 9; g) Secuencia aminoacídica interrumpida debido a la mutación reflejada en el apartado e.128

Figura 20. Ejemplo de análisis de heterodúplex mediante gel de poliacrilamida para 9 de los adultos de la F1. El asterisco (*) marca individuos con presencia de heterodúplex. Marcador de peso molecular de 100 pb.130

Figura 21. Gel de agarosa para el cribado de individuos heterocigotos de la generación F2. Los asteriscos muestran los individuos en los que el genotipo no se puede distinguir. C+, control positivo; C-, control negativo. Marcador de peso molecular de 100 pb.....131

Figura 22. Electroferogramas generados por el *software* del análisis de fragmentos para el genotipado: a) Individuo con dos alelos WT; b) Individuo con un alelo WT y un alelo mutante (heterocigoto); c) Individuo con dos alelos mutantes (homocigoto mutante).....132

Figura 23. Geles de agarosa para la distinción de individuos homocigotos mutantes o WT. a) Ejemplo de la validez de la metodología; b) Genotipado de 4 individuos problema. C+/, control WT; C+/-, control heterocigoto; C-/-, control homocigoto. Marcador de peso molecular de 100 pb.....133

Figura 24. Comprobación de la amplificación de los cebadores en gel de agarosa. a) Análisis para *auts2a*; b) Análisis para *actb2* y *eef1a1*. C-, control negativo. Marcador de peso molecular de 100 pb.134

Figura 25. Validación del *knock-out* mediante la evaluación de la expresión de *auts2a* en individuos heterocigotos y homocigotos con respecto a individuos WT,

- utilizando como normalizadores los genes *actb2* y *eef1a1*. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$)..... 134
- Figura 26.** Rectas de calibrado de los cebadores. a) y b), rectas para *actb2* y *auts2a*, respectivamente, obtenidas enfrentando los valores de las Cts con el logaritmo de la cantidad de ARN en las muestras; c), ecuación de regresión lineal, valor R^2 , eficiencia y % de eficiencia para los cebadores. 135
- Figura 27.** Comprobación de la amplificación de los cebadores en gel de agarosa. a) Análisis para los cebadores de *auts2a* sin y con secuencia de reconocimiento de T7; b) Análisis del producto de transcripción o sonda; c) Análisis de la sonda tras la purificación. Marcador de peso molecular de 100 pb. 135
- Figura 28.** Validación del *knock-out* mediante HIS para el gen *auts2a*. a y a') Embrión WT de 24 hpf; b y b') Embrión homocigoto mutante de 24 hpf; c y c') Embrión WT de 48 hpf; d y d') Embrión homocigoto mutante de 48 hpf. Las flechas indican las regiones anatómicas en que se expresa *auts2a*. Ca, cerebro anterior; Cm, cerebro medio; Cp, cerebro posterior; Tr, tronco; Rt, retina. 136
- Figura 29.** Validación del *knock-out* mediante *Western Blot*. Expresión de la proteína normalizadora Actb2 y Auts2a en individuos WT y homocigotos mutantes. Se observa banda para Actb2 en todos los individuos, mientras que solo se observa en los individuos WT para Auts2a. 137
- Figura 30.** Análisis morfológico de los embriones y fotografías de un individuo WT y un homocigoto mutante. a, diámetro de la cabeza; b, diámetro del ojo; c, longitud total del cuerpo; d, longitud de la aleta caudal. Escala a 500 μm 138
- Figura 31.** Análisis fenotípico de embriones WT y homocigotos para el diámetro de la cabeza y diámetro del ojo, longitud del cuerpo con y sin aleta, y longitud de la aleta. Se muestran las gráficas y los valores de la media, desviación típica y valor de p para todas las medidas. DC, diámetro de la cabeza; DO, diámetro del ojo; LC, longitud del cuerpo; LS/A, longitud del cuerpo sin aleta. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$)..... 138
- Figura 32.** Análisis fenotípico de embriones WT y homocigotos para la ratio cabeza/cuerpo y ojo/ cabeza. Se muestran las gráficas y los valores de la media,

desviación típica y valor de p para todas las medidas. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).140

Figura 33. Análisis de las estructuras cartilagosas y dimensión de la cabeza de embriones de 5 dpf mediante azul alcian. ch, ángulo ceratohial; pc, palatocadrado; L, longitud de la cabeza; d, diámetro de la cabeza. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).140

Figura 34. Evaluación de la apoptosis en embriones WT y homocigotos mutantes de 24 hpf mediante tinción con naranja de acridina. a) Individuo WT, campo claro; b) Individuo WT, fluorescencia; c) Individuo WT, imágenes superpuestas; d) Individuo homocigoto, campo claro; b) Individuo homocigoto, fluorescencia; c) Individuo homocigoto, imágenes superpuestas.141

Figura 35. Análisis de *p53*. a) Gel de agarosa para *p53*. Marcador de peso molecular de 100 pb; b) recta de calibrado para *p53*; c) Comparación de la expresión de *p53* en individuos WT y homocigotos mutantes. C-, control negativo. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).142

Figura 36. Comprobación de la amplificación de los cebadores en gel de agarosa. a-c) Análisis para los cebadores de *pax2a*, *emx1* y *aldoca*, respectivamente, sin y con secuencia de reconocimiento de T7; d-f) Análisis de las sondas de *pax2a*, *emx1* y *aldoca* tras la purificación. Marcador de peso molecular de 100 pb.142

Figura 37. HIS para el gen *aldoca*. a y a') Embrión WT de 120 hpf; b y b') Embrión homocigoto mutante de 120 hpf. Las flechas indican las regiones anatómicas en que se expresa *aldoca*. Cp, cerebro posterior; Cb, cerebelo; Rt, retina.143

Figura 38. Comparación entre la longitud y el peso de los individuos adultos WT y homocigotos mutantes. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$). ..143

Figura 39. Análisis de la locomoción de larvas mutantes de 7 dpf. a) Distancia recorrida expresada en pixeles/minuto para cada uno de los 6 períodos intermitentes de luz-oscuridad en individuos WT y homocigotos. b) Computo total de la distancia recorrida expresada en pixeles/minuto en luz y oscuridad en individuos WT y homocigotos. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).144

Figura 40. Comprobación de la amplificación de los cebadores en gel de agarosa. a) *vglut2.2*, *isl1*, *nes*, *rac1b*, *elavl3*, *fosab*, *neurod1*, *rybpa*; b) *fat2*, *ptfla*, *gad1a*,

<i>grid2</i> ; c) <i>sema5a</i> , <i>mecp2</i> , <i>gfap</i> , <i>dcaf7</i> , <i>emx1</i> , <i>upf1</i> , <i>zmat3</i> , <i>sox2</i> , <i>satb2</i> , <i>ck2b</i> , <i>olig2</i> ; d) <i>smg1</i> , <i>pcgf5b</i> , <i>c-myc</i> , <i>rereb</i> , <i>tbr1b</i> , <i>gtf2ird1</i>	145
Figura 41. Expresión relativa de los genes <i>tbr1b</i> , <i>satb2</i> y <i>rac1b</i> en individuos homocigotos mutantes de <i>auts2a</i> . El asterisco (*) indica significación estadística (p<0,05).....	147
Figura 42. Expresión relativa de los genes <i>gtf2ird1</i> , <i>mecp2</i> , <i>sema5a</i> y <i>zmat3</i> en individuos homocigotos mutantes de <i>auts2a</i> . El asterisco (*) indica significación estadística (p<0,05).	148
Figura 43. Expresión relativa de los genes <i>ck2b</i> , <i>dcaf7</i> , <i>pcgf5b</i> y <i>rybpa</i> en individuos homocigotos mutantes de <i>auts2a</i> . El asterisco (*) indica significación estadística (p<0,05).....	148
Figura 44. Expresión relativa de los genes <i>upf1</i> y <i>smg1</i> en individuos homocigotos mutantes de <i>auts2a</i> . El asterisco (*) indica significación estadística (p<0,05).....	149
Figura 45. Expresión relativa de los genes <i>ptf1a</i> , <i>fat2</i> y <i>rereb</i> en individuos homocigotos mutantes de <i>auts2a</i> . El asterisco (*) indica significación estadística (p<0,05).....	149
Figura 46. Expresión relativa de los genes <i>gad1a</i> , <i>grid2</i> y <i>vglut2.2</i> en individuos homocigotos mutantes de <i>auts2a</i> . El asterisco (*) indica significación estadística (p<0,05).....	150
Figura 47. Expresión relativa de los genes <i>emx1</i> , <i>gfap</i> , <i>nes</i> y <i>olig2</i> en individuos homocigotos mutantes de <i>auts2a</i> . El asterisco (*) indica significación estadística (p<0,05).....	151
Figura 48. Expresión relativa de los genes <i>sox2</i> , <i>c-myc</i> , <i>elavl3</i> , <i>isll</i> y <i>neurod1</i> en individuos homocigotos mutantes de <i>auts2a</i> . El asterisco (*) indica significación estadística (p<0,05).	151
Figura 49. Expresión relativa del gen <i>fosab</i> en individuos homocigotos mutantes de <i>auts2a</i> . El asterisco (*) indica significación estadística (p<0,05).....	152



* Todas las figuras que se incluyen en la presente tesis doctoral fueron elaboradas por Alba Pensado López.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micras
µS	Microsiemens
6-FAM	6- Carboxifluoresceína
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
<i>aldoca</i>	<i>aldolase C, fructose-bisphosphate, a</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNcr	ARN de CRISPR
ARNm	ARN mensajero
ARNsg	Guía Simple de ARN
ARNtracr	ARN de CRISPR Transactivador
ASD	<i>Autism Spectrum Disorders</i>
BSA	Albúmina de Suero Bovino
<i>ck2b</i>	<i>Casein kinase 2, beta polypeptide</i>
cm	Centrímetros
<i>c-Myc</i>	<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
CNVs	<i>Copy Number Variations</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
<i>dcaf7</i>	<i>Ddb1 and cul4 associated factor 7</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxirribonucleótidos Tri-Fosfato
dpf	Días Post-Fertilización
DSBs	<i>Double Strand Breaks</i>
DSM-5	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
<i>elavl3</i>	<i>ELAV like neuron-specific RNA binding protein 3</i>
<i>emx1.</i>	<i>Empty spiracles homeobox 1</i>
ENU	<i>N-ethyl-N-nitrosourea</i>
EtOH	Etanol
<i>fat2</i>	<i>FAT atypical cadherin 2</i>
<i>fosab</i>	<i>V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog Ab</i>
g	Gramos
GABA	Ácido Gamma-Aminobutírico

<i>gad1a</i>	<i>Glutamate decarboxylase 1a</i>
<i>gfap</i>	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
<i>grid2</i>	<i>Glutamate receptor, ionotropic, delta 2</i>
<i>gtf2ird1</i>	<i>General Transcription Factor II-I Repeat Domain-Containing Protein 1</i>
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HCL	Cloruro de hidrógeno
HDR	<i>Homology-Directed Repair</i>
hiPSCs	<i>Human Induced Pluripotent Stem Cells</i>
HIS	<i>Hibridación In Situ</i>
hpf	Horas Post-Fertilización
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
INDELS	Inserciones y/o Deleciones
<i>isl1</i>	<i>ISL LIM homeobox 1</i>
KD	<i>Knock-Down</i>
KI	<i>Knock-In</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
KOH	Hidróxido de potasio
kPA	kilo Pascales
lncRNA	<i>Long Non-Coding RNAs</i>
mecp2	Methyl CpG Binding Protein 2)
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
MHB	<i>Midbrain-Hindbrain Boundary</i>
ml	Mililitros
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>nes</i>	<i>Nestin</i>
<i>neurod1</i>	<i>Neuronal differentiation 1</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
nl	Nanolitros
nm	Nanómetros
NSMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
<i>olig2</i>	<i>Oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>
ON	<i>Overnight</i>
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
<i>pax2a</i>	<i>Paired box 2a</i>
pb	Pares de bases
<i>pcgf5b</i>	<i>Polycomb Group Ring Finger 5b</i>

PCGFs	<i>Polycomb Group RING Fingers</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFA	Para-formaldehido
PRC1	<i>Polycomb repressive complex type 1</i>
PSCs	<i>Premature Stop Codons</i>
<i>ptf1a</i>	<i>Pancreas associated transcription factor 1a</i>
PTU	Feniltiourea
qPCR	<i>quantitative- Polimerase Chain Reaction</i>
<i>rac1b</i>	<i>Rac family small GTPase 1b</i>
<i>rereb</i>	<i>Arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats b</i>
RNasas	Nucleasas de ARN
rpm	Revoluciones por minuto
<i>rybpa</i>	<i>RING1 and YY1 binding protein a</i>
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
<i>satb2</i>	(Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 2, SATB Homeobox 2)
<i>sema5a</i>	<i>Semaphorin 5A</i>
SFARI	<i>Simons Foundation Autism Research Initiative</i>
<i>smg1</i>	<i>SMG1 nonsense mediated mRNA decay associated PI3K related kinase</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
<i>sox2</i>	<i>SRY-box transcription factor 2</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TALENs	<i>Transcription Activator–Like Effector Nucleases</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
<i>tbr1b</i>	<i>T-box brain transcription factor 1b</i>
TEA	Trastornos del Espectro Autista
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
<i>upf1</i>	<i>UPF1 RNA helicase and ATPase</i>
V	Voltios
<i>vglut2.2</i>	<i>Solute carrier family 17 member 6a</i>
ZFNs	<i>Zinc-Finger Nucleases</i>

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA: DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

Los trastornos del espectro autista (TEA o ASD por sus siglas en inglés, *Autism Spectrum Disorders*) hacen referencia a un conjunto de enfermedades complejas del neurodesarrollo. Las manifestaciones clínicas asociadas a estos trastornos fueron descritas por primera vez en 1943 por el psiquiatra Leo Kanner tras observar a 11 niños que mostraban incapacidad innata para la comunicación social, adherencia a la monotonía y resistencia al cambio, así como patrones repetitivos de comportamiento¹. En la actualidad, se caracterizan de acuerdo con la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5 por sus siglas en inglés, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth edition*)², por el deterioro persistente en las habilidades comunicativas (verbales y no verbales), ocupacionales y en la reciprocidad socioemocional, aunque no cursa necesariamente con déficit intelectual (criterio A). Asimismo, es característica la presencia de comportamientos e intereses restrictivos y repetitivos y la insistencia en la monotonía, siendo excesiva la inflexibilidad para cambios mínimos de rutina (criterio B). Además, las características especificadas en los criterios A y B están presentes desde la infancia temprana, y limitan o impiden el funcionamiento cotidiano normal (criterios C y D). En este sentido, los primeros síntomas se dan en períodos tempranos del desarrollo, aunque el desorden puede no manifestarse completamente hasta que las demandas sociales o intelectuales exceden las capacidades limitadas. Los individuos pueden además, presentar manifestaciones físicas como epilepsia, problemas cardiovasculares e intestinales, hipotonía, disfunción inmunitaria o insomnio. A pesar de que los síntomas pueden ir acompañados de discapacidad intelectual (DI), para el diagnóstico de TEA es necesario que las alteraciones no se expliquen mejor por un trastorno de discapacidad intelectual o por retraso global del desarrollo (criterio E). Los criterios diagnósticos mencionados se recogen en la Tabla 1.

La sintomatología se presenta con grados de intensidad y severidad variable de forma que, atendiendo a las deficiencias en la comunicación social y los comportamientos restringidos y repetitivos, se establecen tres niveles de gravedad: grado 1 (necesita ayuda), grado 2 (necesita ayuda notable) y grado 3 (necesita ayuda muy notable). El DSM-5 recoge, dentro de la clasificación de TEA, los siguientes trastornos del neurodesarrollo: autismo de primera infancia, autismo infantil, autismo de Kanner, autismo de alto funcionamiento, autismo atípico, trastorno generalizado del desarrollo no especificado, trastorno desintegrativo de la infancia y trastorno de Asperger².

Tabla 1. Criterios diagnósticos de TEA según el DSM-5

Criterio A	Déficits persistentes comunicativos y de interacción social en múltiples contextos A.1. Deficiencias en la reciprocidad socioemocional A.2. Deficiencias en la comunicación no verbal para la interacción social A.3. Deficiencias en el desarrollo, mantenimiento y comprensión de las relaciones sociales
Criterio B	Comportamientos e intereses restrictivos y repetitivos B.1. Movimientos, utilización de objetos o habla estereotipados o repetitivos B.2. Inflexibilidad de rutinas e insistencia en la monotonía o patrones ritualizados de conducta verbal y no verbal B.3. Intereses fijos y restringidos B.4. Hiper- o hipo-reactividad a estímulos sensoriales
Criterio C	Síntomas presentes en infancia temprana
Criterio D	Limitación del funcionamiento cotidiano normal
Criterio E	Los síntomas no se explican mejor por DI o retraso global del desarrollo

A nivel mundial, se estima una prevalencia de aproximadamente 1,5%, siendo cuatro veces más común en el sexo masculino que en el femenino (ratio 4:1)³, aunque las niñas tienen más probabilidades de presentar discapacidad intelectual acompañante². No obstante, las cifras varían ampliamente entre áreas geográficas y dependiendo del año del estudio y bases de datos consultadas⁴. En relación a la posible asociación entre poblaciones humanas y estatus socioeconómico con el mayor riesgo de padecer TEA, los estudios no han arrojado resultados concluyentes, aunque sí se ha observado que diversos factores culturales o socioeconómicos afectan a la edad del diagnóstico^{5,6}. Asimismo, a pesar de que en los últimos años se ha observado una tendencia al aumento en la incidencia y prevalencia, es posible que se deba a una mejora notable en las herramientas y criterios diagnósticos⁷.

1.1. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TEA

Actualmente el diagnóstico de TEA se basa fundamentalmente en criterios los clínicos estándar previamente mencionados y reflejados en la Tabla 1, con los que se evalúan los síntomas y gravedad en cada caso. El diagnóstico se realiza generalmente a una edad temprana, fundamentalmente en base a observaciones de las destrezas básicas del niño y entrevistas con él y con los cuidadores y test de simulación de juegos a fin de observar cómo aprende, habla, se comporta o se mueve. Para una evaluación más minuciosa, se pueden incluir también pruebas neurológicas y otras pruebas médicas físicas para recabar información sobre el peso, la altura, el perímetro craneal o la existencia de rasgos dismórficos, así como pruebas de audición y/o visión⁸. Asimismo, es fundamental que se tenga en cuenta la posibilidad de que los pacientes presenten trastornos comórbidos, como discapacidad intelectual, depresión, ansiedad, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, esquizofrenia, trastorno bipolar o trastorno obsesivo compulsivo, ya que estos trastornos neuropsiquiátricos comórbidos pueden enmascarar el TEA⁹. En muchos casos, fundamentalmente de TEA sindrómicos, las características clínicas pueden hacer sospechar de una mutación concreta conocida, por lo que el diagnóstico se podría confirmar mediante

pruebas genéticas. En caso de no confirmarse y como ocurre con los TEA no sindrómicos, se aplican técnicas de cariotipado, *microarrays* cromosómicos, cribado del X frágil, cribado de *PTEN* y *MECP2*, secuenciación de paneles de genes o secuenciación de genoma o exoma completo^{8,10,11}. En cualquier caso, el diagnóstico precoz es fundamental ya que se relaciona directamente con un tratamiento temprano y por ende, mejor pronóstico a nivel cognitivo y comportamental¹².

En cuanto al tratamiento para TEA, éste se basa fundamentalmente en tratar de mejorar los síntomas y así reducir el impacto que tienen en las actividades cotidianas de las personas afectadas. A tal fin, los pacientes reciben frecuentemente una combinación de enfoques terapéuticos, incluida la terapia conductual y medicación. En la actualidad las estrategias terapéuticas disponibles se clasifican en tres grupos: terapias psicosociales, terapias farmacológicas y medicina natural. Las Tablas 2 y 3 recogen algunos ejemplos de dichas terapias.

Tabla 2. Terapias psicosociales para el tratamiento de pacientes con TEA

Estrategia Terapéutica	Procedimiento	Mejoras	Referencias
Análisis de Conducta Aplicado	Modificación de habilidades sociales y comunicativas mediante el refuerzo positivo	Efectos positivos en el funcionamiento intelectual, el desarrollo del lenguaje y las habilidades para la vida diaria	13
Tratamiento de Respuesta Pivotante	Motivar el desarrollo de tareas por iniciativa propia, en un entorno familiar	Efectos positivos en las habilidades comunicativas y en la conducta disruptiva	14,15
Intervención parental temprana	Entrenamiento parental para fomentar diversas habilidades en el entorno doméstico	Efectos positivos en habilidades físicas, comunicativas, sociales y de razonamiento	16

Tabla 3. Terapias farmacológicas y de medicina natural de pacientes con TEA

Tipo de Tratamiento	Fármaco / Sustancia	Mejoras	Efectos adversos	Referencias
Antipsicótico Atípico	Risperidona	Disminución de la irritabilidad y mejora de los comportamientos restringidos y repetitivos	Síntomas extrapiramidales, aumento de peso y somnolencia	17,18
Antipsicótico Atípico	Aripiprazol	Disminución de la irritabilidad, hiperactividad y comportamientos estereotipados	Riesgo de fracturas óseas, síntomas extrapiramidales, aumento de peso y somnolencia	19,20
Antipsicótico Atípico	Olanzapina	Disminución de la irritabilidad, hiperactividad y comportamientos estereotipados	Aumento de peso	21

Antipsicótico Atípico	Ziprasidona	Disminución de la irritabilidad	Alteraciones cardíacas	22
Antipsicótico Atípico	Paliperidona	Disminución de la irritabilidad	Síntomas extrapiramidales leves y aumento de peso	23
Antipsicótico Típico	Haloperidol	Disminución de la hiperactividad y comportamientos estereotipados	Somnolencia, reacciones distónicas agudas e irritabilidad	24
Antidepresivo	Venlafaxina	Mejora de los comportamientos repetitivos, comunicación	Poliuria, náuseas, irritabilidad	25
Antidepresivo	Clomipramina	Disminución de la irritabilidad y mejora de los comportamientos estereotipados	Somnolencia, enuresis, estreñimiento	26
Antiepiléptico	Sodium Divalproex	Disminución de la agresividad e irritabilidad	Somnolencia	27
Estimulante/ Agonista alfa-2	Metilfenidato	Disminución de la hiperactividad	Insomnio e irritabilidad	28
Estimulante/ Agonista alfa-2	Atomoxetina	Disminución de la hiperactividad, impulsividad y mejora de la atención	Leve disminución del apetito y fatiga	29
Agonista alfa-2	Clonidina	Disminución de la hiperactividad, impulsividad, mejora en la calidad del sueño	Disminución en la actividad general e hipertensión	30
Agonista alfa-2	Guanfacina	Disminución de la hiperactividad, impulsividad y distracción	Somnolencia, enuresis, dolor de cabeza y estreñimiento	31
Compuesto Natural	Sulforafano	Reducción de comportamientos estereotipados y mejora en habilidades sociales	No descritos	32
Compuesto Natural	Melatonina	Mejora en la calidad y duración del sueño	No descritos	33

1.2. ETIOLOGÍA Y PATOLOGÍA DE LOS TEA

Las manifestaciones observadas en afectados de TEA tienen su origen en anomalías en la anatomía y conectividad de diversas partes del cerebro como el lóbulo frontal, córtex temporal superior, parietal y órbita-frontal, amígdala, área de Broca o núcleo caudado³⁴, así como en anomalías en la migración neuronal³⁵. Estas anomalías se deben, a su vez, a la disfunción de una amplia gama de genes, así como a la influencia de factores ambientales, pues aunque la base genética de estos trastornos es clara, la considerable variabilidad

fenotípica y genotípica que se observa en los afectados por TEA, apoya la idea de una etiología multifactorial. De esta forma, los TEA se clasifican de manera general en dos categorías atendiendo al conocimiento o no del origen del trastorno: los TEA sindrómicos incluyen casos con una etiología bien caracterizada, mientras que en los casos de TEA no sindrómico ésta es menos definida, interviniendo múltiples factores en el desarrollo del trastorno. En términos generales, se conoce que estos trastornos pueden estar relacionados con factores de riesgo prenatales, perinatales y posnatales, tanto genéticos como ambientales³⁶.

1.2.1. Componente ambiental

En relación a la contribución ambiental, que se estima en un 17%³⁷, se han determinado como factores de riesgo, entre otros, la avanzada edad de los padres, complicaciones durante el parto, el sangrado, infección o administración de fármacos durante el embarazo (p.ej., valproato o antidepresivos), diabetes, hipertensión, exposición a químicos (p.ej., organofosfatos)^{38,39} o déficits nutritivos de la embarazada⁴⁰. Asimismo, se ha encontrado que ciertas disfunciones del sistema inmunitario pueden alterar los patrones normales de desarrollo cerebral, incrementando el riesgo a padecer autismo⁴¹.

1.2.2. Componente genético

La relevancia de los factores genéticos en el riesgo de padecer TEA se conoce desde hace más de 50 años debido principalmente, a los estudios llevados a cabo en gemelos y en familias, y se estima que la heredabilidad global media un 83%³⁷. Los primeros estudios de gemelos arrojaron una concordancia de alrededor del 90% en gemelos monocigóticos, en comparación con una concordancia del 30% en gemelos dicigóticos^{42,43}. A pesar de la clara heredabilidad de este tipo de trastornos, éstos son genéticamente muy heterogéneos, ya que dichos genes pueden estar afectados por variantes genéticas comunes o variantes genéticas raras, ya sean reordenaciones cromosómicas, polimorfismos de un único nucleótido (SNPs, del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*), inserciones y deleciones intrónicas o exónicas, así como variaciones del número de copias (CNVs, del inglés *Copy Number Variations*), tanto heredadas como *de novo*⁴⁴⁻⁴⁷. Además, aunque los genes de susceptibilidad conocidos son, en su mayoría, codificadores de proteínas, debido a la elevada expresión en cerebro de ARNs largos no codificantes (lncRNAs, del inglés *Long Non-Coding RNAs*) se ha comenzado a estudiar la implicación de los mismos en la aparición de TEA⁴⁸. No obstante, se han identificado múltiples genes de susceptibilidad mediante análisis genéticos como los estudios de asociación de genoma completo (GWAS, del inglés *Genome-Wide Association Studies*), que han permitido asociar múltiples variantes genéticas comunes, principalmente SNPs, con la enfermedad⁴⁹, o la secuenciación completa de exomas y genomas, con las que se han indentificado múltiples CNVs tanto heredadas como *de novo*⁵⁰ así como también inserciones y deleciones intrónicas o exónicas.

La base de datos SFARI (*Simons Foundation Autism Research Initiative*)⁵¹ recoge uno de los listados más completos de genes de susceptibilidad a TEA, con aproximadamente 1000 genes identificados, clasificados en sindrómicos y no sindrómicos, según si están implicados

en síndromes en los que una subpoblación significativa desarrolla síntomas de autismo o no, respectivamente. A su vez, éstos se clasifican por puntuaciones del 1 al 3 dependiendo de la cantidad de la información que respalda la implicación del gen en el desarrollo de TEA (Figura 1):

- Puntuación 1: genes claramente implicados en TEA, generalmente por la presencia de al menos tres mutaciones *de novo* descritas en la literatura
- Puntuación 2: candidatos firmes de susceptibilidad a TEA, generalmente por la presencia de al menos dos mutaciones *de novo* descritas
- Puntuación 3: genes con asociación significativa con TEA, con presencia de una única mutación *de novo* descrita

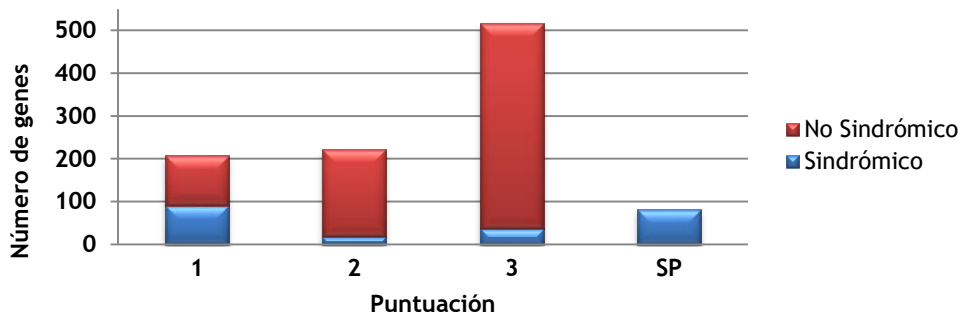


Figura 1. Número de genes según su clasificación como sindrómicos o no sindrómicos y su correspondiente puntuación según la base de datos de SFARI (SP=Sin puntuación). Datos de Febrero del 2022.

Tal y como se muestra en la Figura 2, éstos genes no se distribuyen de manera uniforme en el genoma y de hecho, la proporción hombre-mujer de 4:1 anteriormente mencionada podría explicarse por la alta abundancia de genes con puntuación de 1 en el cromosoma X^{51,52}.

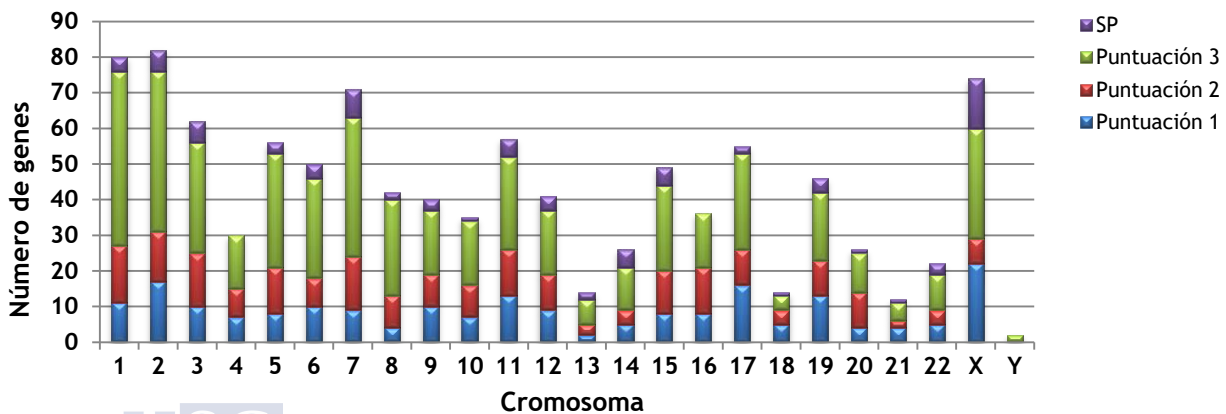


Figura 2. Número de genes de cada cromosoma humano, clasificados según la puntuación en la base de datos SFARI (SP=Sin puntuación). Datos de Febrero del 2022.

1.3. HERRAMIENTAS DE EDICIÓN GENÓMICA PARA EL ESTUDIO DE FACTORES POTENCIALMENTE CAUSALES DE TEA

Debido a la etiología multifactorial y la heterogeneidad en las alteraciones genéticas de los TEA, descifrar el impacto individual de cada factor de riesgo ha sido una tarea ardua para los investigadores y aún hoy en día continúa siendo un desafío. No obstante, en los últimos años los estudios de asociación, la mejora en los métodos de secuenciación y a nivel experimental, los avances en los sistemas de edición genómica, han permitido delimitar un número importante de genes candidatos y establecer relaciones fenotipo-genotipo.

En la actualidad se usan principalmente tres sistemas de edición genómica: nucleasas de dedos de zinc (ZFNs, del inglés *Zinc-Finger Nucleases*); nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALENs, del inglés *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*); y repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR/Cas, del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)⁵³. Estos sistemas se basan fundamentalmente en el uso de nucleasas con la consecuente generación de roturas de doble hebra (DSBs, del inglés *Double Strand Breaks*) en el ADN que, a su vez, desencadenan los mecanismos celulares de reparación del ADN, que en las células eucariotas son principalmente dos: reparación por unión de extremos (NHEJ, del inglés *Non-Homologous End Joining*) (Figura 3a) y la reparación dirigida por homología (HDR, del inglés *Homology-Directed Repair*)⁵⁴ (Figura 3b).

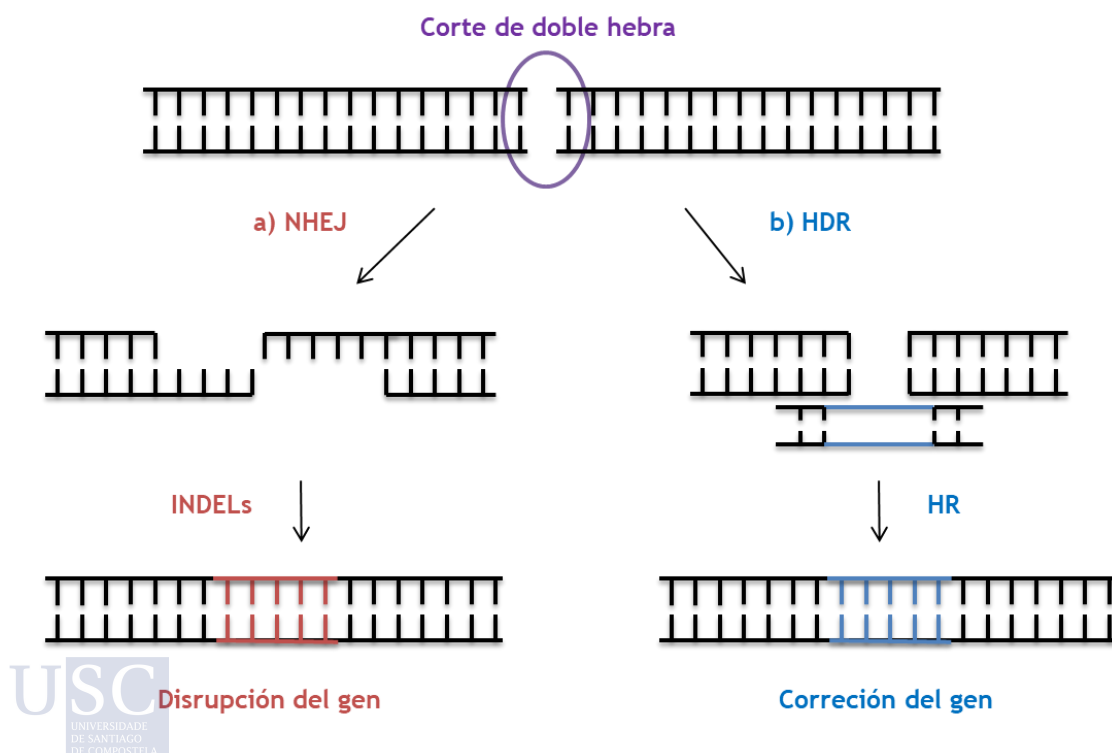


Figura 3. Esquema del funcionamiento de los mecanismos celulares de reparación del ADN tras producirse cortes de doble hebra. (a) NHEJ; (b) HDR.

El primero de los mecanismos conlleva una reparación más rápida aunque más propensa a errores, ya que únicamente se produce la unión de los extremos de las cadenas. Así, habitualmente se generan inserciones y/o deleciones (INDELS) que alteran el marco de lectura del gen y generan proteínas disfuncionales. La vía de HDR es mucho más precisa, ya que repara la rotura mediante la introducción de un ADN donante homólogo.

1.3.1. Funcionamiento general de las ZFNs y TALENs

El funcionamiento de las ZFNs se basa en la utilización de dos nucleasas, cada una de ellas compuesta por dos dominios: el dominio de unión al ADN (dedos de zinc) y el dominio de escisión del ADN⁵⁵. El dominio de unión al ADN está compuesto por módulos de proteínas, cada uno de los cuales es capaz de reconocer un triplete de nucleótidos específico. El dominio de escisión de ADN, que no presenta homología con la secuencia de ADN, se deriva de la endonucleasa FokI. Así, el sistema se une a la región deseada del genoma, guiado por el dominio de dedos de zinc, y el dominio de escisión genera DSBs (Figura 4a). Las TALENs surgieron en 2010 como alternativa a las ZFNs⁵⁶, ya que aunque éstas se han mostrado eficientes en múltiples estudios con modelos celulares y animales^{57,58}, su diseño y utilización resulta dificultosa. El funcionamiento de las TALENs, no difiere significativamente con respecto a las ZFNs. En ese caso, existe igualmente un dominio de escisión del ADN derivado de la endonucleasa FokI y un dominio de unión al ADN, formado por subunidades TALEs, que a diferencia de los dedos de zinc, presentan complementariedad con pares de bases individuales. De forma semejante a las ZFNs, el dominio de unión al ADN guía al sistema al lugar específico del genoma, y el dominio de escisión genera DSBs (Figura 4b). Al igual que las ZFNs, las TALENs han sido ampliamente aplicadas para la generación de modelos celulares y animales^{59,60}. Sin embargo, aunque el diseño y síntesis de estos sistemas se simplifica por el modo de reconocimiento del dominio de unión al ADN, su desarrollo continúa siendo relativamente dificultoso. Así, el sistema de edición genómica mayoritariamente utilizado en la actualidad, se basa en la tecnología CRISPR/Cas.

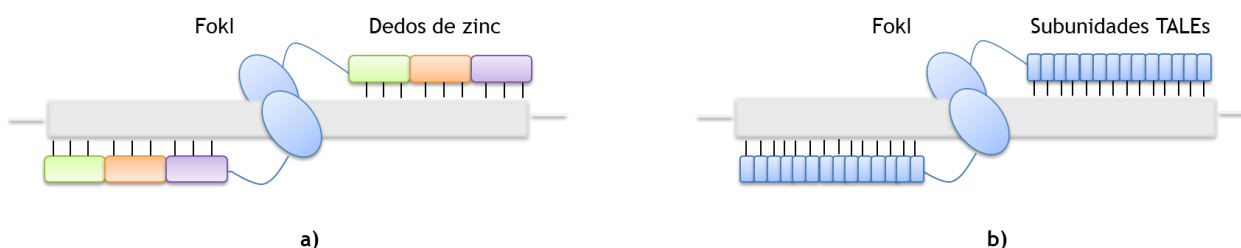


Figura 4. Esquema del funcionamiento básico de los sistemas de edición genómica: (a) ZFNs; (b) TALENs.

1.4. SISTEMAS CRISPR/CAS

1.4.1. Contexto histórico

Los sistemas CRISPR fueron observados por primera vez en la arquea *Haloferax mediterranei* por Francis Mojica en 1993 mientras estudiaba los mecanismos de regulación de dichos microorganismos para adaptarse a ambientes extremadamente salinos⁶¹, y descubiertos en múltiples bacterias y otras arqueas en años sucesivos. En un principio, Mojica trataba de obtener la secuencia genómica de las arqueas, cuando encontró en el genoma un patrón característico de secuencias que se repetían a lo largo del genoma, de entre 20-50 pares de bases (secuencias palindrómicas), separadas entre sí por fragmentos (espaciadores), cuya secuencia no se correspondía con el genoma bacteriano o de arqueas. Finalmente, Mojica y Christine Pourcel, en trabajos independientes⁶²⁻⁶⁴ determinaron que dichos espaciadores se correspondían con genomas de bacteriófagos, profagos y plásmidos. Se encontró además que las secuencias repetitivas y los espaciadores (*array* repetición-espaciador) siempre iban precedidos por una secuencia de varios cientos de pares de bases (secuencia *leader*). Esta observación indujo a pensar que estas secuencias foráneas podrían tener una función biológica de relevancia, confiriendo a bacterias y arqueas inmunidad específica frente al genoma exógeno. En paralelo, se habían descubierto varios genes implicados en la reparación del ADN y que dichos genes se encontraban en regiones adyacentes a los sistemas CRISPR actuando en conjunto, de forma que los denominaron genes asociados a CRISPR (*CRISPR-associated genes*) y por ende, proteínas endonucleasas Cas⁶⁵. Un esquema simplificado de los componentes del sistema se muestra en la Figura 5.

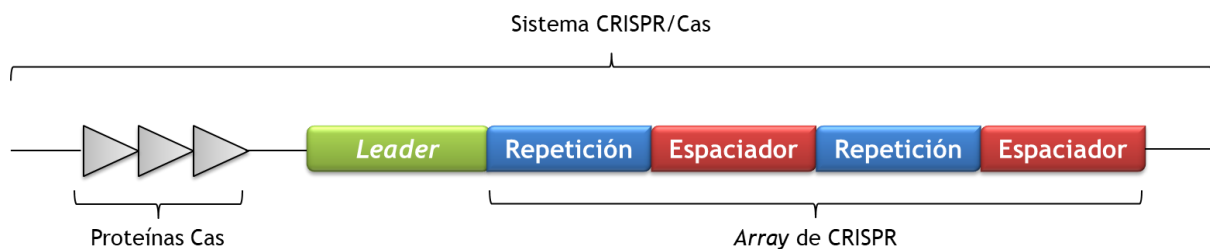


Figura 5. Esquema de los principales componentes del sistema CRISPR; proteínas Cas, secuencia *leader* y *array* CRISPR (repetición-espaciador).

Mediante estudios de genómica comparativa, Makarova *et al.*, propusieron que la función de defensa de los sistemas CRISPR/Cas en procariotas es análoga a la función de los ARN de interferencia en eucariotas⁶⁶. La confirmación de que los sistemas CRISPR/Cas intervienen como mecanismos de inmunidad adquirida en procariotas se confirmó experimentalmente en 2007 en la bacteria *Streptococcus thermophilus*⁶⁷. Asimismo se identificaron pequeñas secuencias de entre 2 y 5 nucleótidos adyacentes a los espaciadores del genoma exógeno denominados motivos adyacentes al protoespaciador (PAM, del inglés *Protospacer Adjacent Motif*), que son precisamente los que determinan qué porción del genoma vírico y en qué posición será introducido en el genoma de los huéspedes⁶⁸.

En la actualidad los sistemas CRISPR/Cas se clasifican en dos clases (I y II) en base a los complejos de proteínas Cas que intervienen, siendo complejos multiproteicos en la clase I y una única proteína efectora en la clase II. Estas clases a su vez, se dividen en tipo I, III y IV (clase I) y tipo II, V y VI (clase II) atendiendo a qué nucleasas principales intervienen, siendo la Cas3 en el tipo I, la Cas10 en el tipo III, no caracterizada en el tipo IV, la Cas9 en el tipo II, la Cas12 en el tipo V y la Cas13 en el tipo VI^{69,70}.

1.4.2. Funcionamiento general de los sistemas CRISPR/Cas en procariontas

El funcionamiento básico no difiere significativamente entre los distintos sistemas CRISPR, de forma que se explicará, de forma general, el mecanismo de defensa que desarrollan las bacterias a través del sistema CRISPR/Cas9 (clase II, tipo II), ya que éste es el mejor caracterizado y el más extendido en sus aplicaciones (Figura 6).

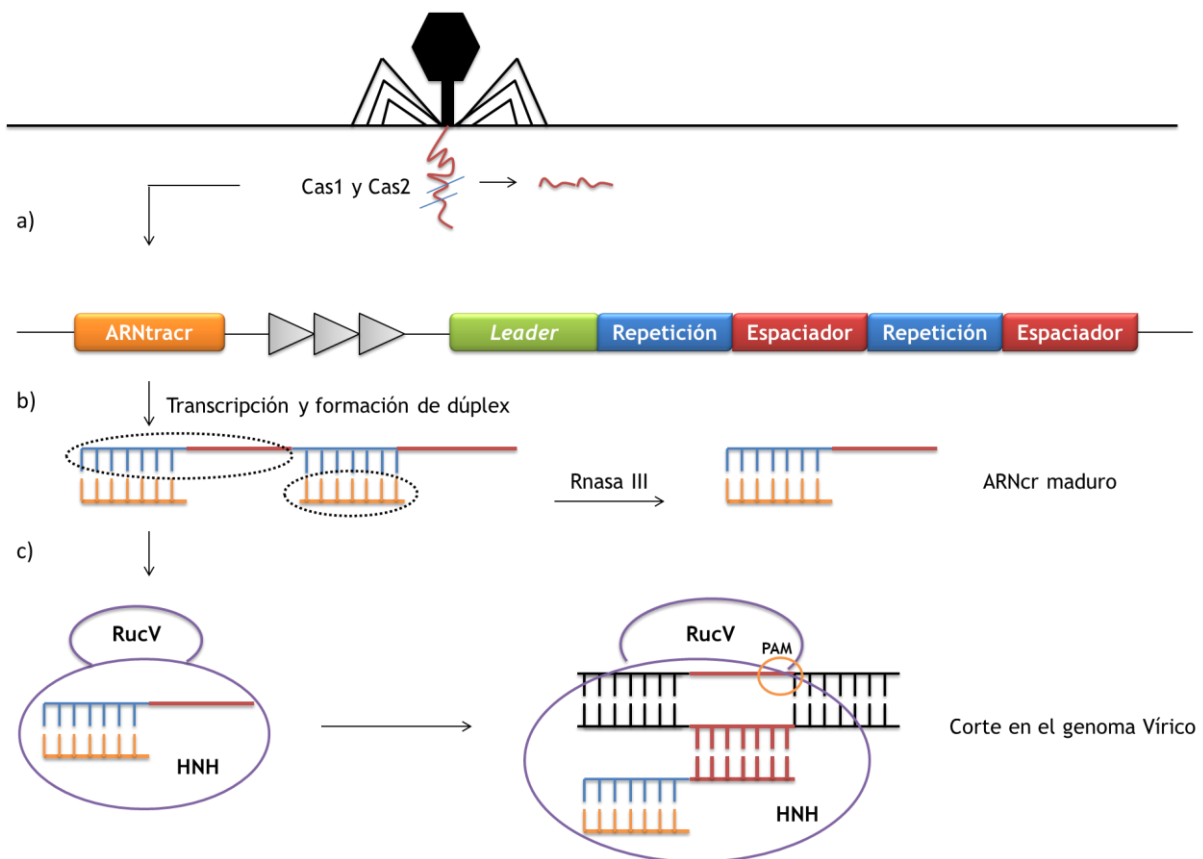


Figura 6. Esquema del funcionamiento básico del sistema CRISPR/Cas9. (a) Fase de adquisición o adaptación; (b) Fase de biogénesis de ARNcr; (c) Fase de interferencia.

Cuando una bacteria es infectada por un bacteriófago ésta reconoce la presencia de un genoma exógeno y mediante las proteínas Cas1 y Cas2, que reconocen una secuencia PAM específica del protoespaciador, éste es procesado e integrado entre repeticiones del locus CRISPR como un nuevo espaciador, lo que se conoce como fase de adquisición o adaptación

(Figura 6a). El funcionamiento conjunto de proteínas Cas1 y Cas2 es esencial en la fase de adaptación y ambas son ubicuas en todos los sistemas CRISPR/Cas y no tienen capacidad de actuar de forma individual⁶⁶. Ante una nueva reinfección, mediante el promotor de la secuencia *leader*, la bacteria es capaz de transcribir el *array* repetición-espaciador, dando lugar a los pre-ARN de CRISPR (pre-ARNcr), que son complementarios al *array* repetición-espaciador y por tanto complementarios a las secuencias espaciadoras del ADN exógeno. Asimismo, se transcriben otros ARNs pequeños no codificantes denominados ARN de CRISPR transactivador (ARNtracr), que se encuentran aguas arriba del locus CRISPR y que son complementarios a las regiones repetitivas. Así, se forma un dúplex pre-ARNcr:ARNtracr, que será procesado por una endoribonucleasa (RNAsa III), dando finalmente lugar al dúplex ARNcr:ARNtracr, cada uno de ellos únicamente correspondiente y complementario a un espaciador del *array*. Esta fase se denomina fase de biogénesis de ARNcr (Figura 6b). A continuación, durante la fase de interferencia los dúplex son reconocidos por la Cas9, por lo que se une a los mismos formando un complejo ribonucleoproteína y éste se activa. La Cas9 contiene dos dominios, el RuvC y el HNH, que guiarán al complejo a la región complementaria en el virus, a donde se unirán y generarán un corte de doble cadena, fragmentando el genoma vírico (Figura 6c)⁷¹.

1.4.3. Modificación de los sistemas CRISPR/Cas9 para su aplicación en investigación

La aplicación de los sistemas CRISPR/Cas9 en investigación supone un avance importante frente a las ZFNs y a las TALENs, ya que se trata de un sistema coste-efectivo de edición, con un diseño más sencillo que únicamente requiere el uso de dos componentes principales: a) la nucleasa Cas9; b) la guía simple de ARN (ARNsg) que se sintetiza de forma que contenga el ARNtracr, que presenta una región que permite la unión a la Cas9, y el ARNcr, que contiene la secuencia complementaria a la región específica del genoma a editar^{72,73}. De esta forma, el complejo ARNg-Cas9, se dirige específicamente a la región de interés, y se generan DSBs (Figura 7).

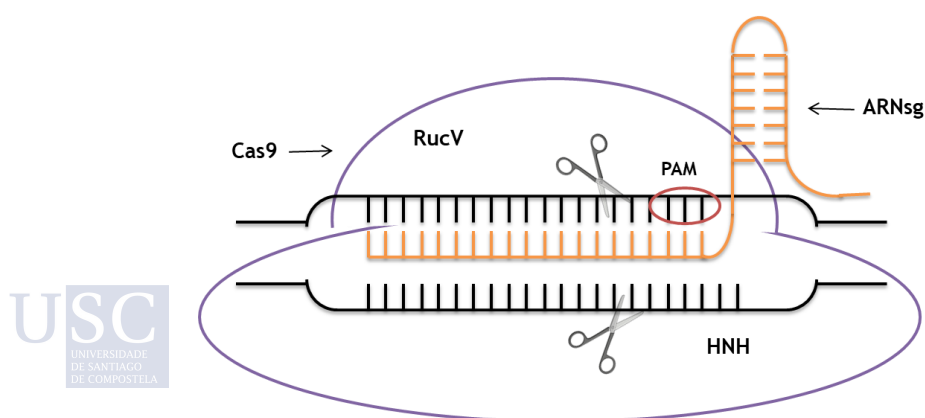


Figura 7. Estructura básica de los componentes del sistema CRISPR/Cas9.

Tras la generación de los DSBs por parte de la endonucleasa, se desencadenarán los mecanismos celulares de reparación de forma que si el interés del investigador es provocar la disrupción del gen (KO, del inglés *knock-out*), no será necesario introducir elementos adicionales en el sistema, y se generarán INDELS (Figura 3a). Por el contrario, si la intención es corregir una secuencia determinada del gen o insertar secuencias de interés (KI, del inglés *knock-in*), será necesario aportar una secuencia ADN donante determinado para que ésta sea introducida en la posición deseada (Figura 3b).

Así, la edición del genoma mediante la aplicación del sistema CRISPR/Cas se ha realizado satisfactoriamente en multitud de organismos modelo, como nematodos (*Caenorhabditis elegans*)⁷⁴, la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*)⁷⁵, el pez cebra (*Danio rerio*)⁷⁶ o ratón (*Mus musculus*) y rata (*Rattus norvegicus*)⁷⁷. Asimismo, se han desarrollado estudios en multitud de líneas celulares, tanto somáticas como embrionarias⁷⁸.

1.4.4. Aplicación del sistema CRISPR/Cas9 para el estudio de TEA

Los modelos celulares son una herramienta fundamental para estudiar multitud de enfermedades con base genética. No obstante, las alteraciones que se producen en los TEA como consecuencia de mutaciones genéticas afectan fundamentalmente a células del sistema nervioso central asociadas a funciones cognitivas superiores, y estos tipos celulares presentan una tasa de proliferación muy baja, por lo que su cultivo y mantenimiento a largo plazo no es posible. Sin embargo, la identificación de los mecanismos que permiten reprogramar células somáticas adultas por parte de Takahashi y Yamanaka supuso una revolución en la investigación⁷⁹. Este descubrimiento ha permitido desarrollar protocolos para transformar líneas celulares diferenciadas en células madre pluripotenciales inducidas humanas (hiPSCs, del inglés *human induced pluripotent stem cells*) mediante la expresión de los llamados factores de Yamanaka (Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc). Así, las hiPSC pueden reprogramarse y diferenciarse en tipos celulares específicos del sistema nervioso y así generar modelos *in vitro* derivados directamente de cada paciente y estudiar la causa particular del trastorno⁸⁰. Los modelos celulares obtenidos de pacientes para estudiar la fisiopatología de los TEA presentan grandes ventajas con respecto a otros modelos celulares, ya que preservan el bagaje genético individual. Además, la obtención de estos tipos celulares y la aplicación de los sistemas CRISPR/Cas permite estudiar las alteraciones en la morfología neuronal, transmisión sináptica, migración celular o capacidad de diferenciación⁸¹. De esta forma, puede establecerse una relación genotipo-fenotipo, así como desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Siguiendo esta metodología se han descubierto alteraciones en la actividad sináptica, longitud y complejidad de las dendritas, formación de neuritas, migración neuronal, en la adhesión y diferenciación neuronal, en la ruta de señalización del calcio e incluso hiperactivación de la ruta de mTOR y la alteración en la expresión de genes asociados a la morfogénesis neuronal, a través del uso de iPSCs derivadas de neuronas corticales y disrupción del gen *SHANK2*⁸², de neuronas dopaminérgicas y disrupción del gen *RELN*⁸³, de neuronas glutamatérgicas y disrupción de los genes *AFF2*, *ASTN2*, *ATRX*, *KCNQ2* y *SCN2A*⁸⁴ o de organoides neuronales y disrupción del gen *CHD8*⁸⁵, entre otras.

A pesar de la valiosa información que se desprende de los estudios con modelos *in vitro*, es innegable que los cultivos celulares no pueden recapitular por completo la complejidad que se representa en la patología los TEA. Por ello, los modelos animales son una herramienta fundamental para una mayor comprensión de estos trastornos.

La ventaja principal del uso de modelos animales para la investigación de TEA es la posibilidad de modular la actividad de determinados genes candidatos mediante los sistemas de edición genómica, y así comprobar *in vivo* la implicación de los mismos en la enfermedad.

En el ámbito de la investigación en neurociencias, los modelos animales más comúnmente utilizados son los roedores, principalmente el ratón. Esto se basa fundamentalmente en el profundo conocimiento del genoma del mismo así como su homología con el ser humano pues aproximadamente un 99% de los genes de ratón tienen un homólogo en el genoma humano⁸⁶. Además, pueden desarrollar patrones comportamentales, sociales, comunicativos o de aprendizaje análogos a los humanos⁸⁷. En la actualidad existen unos 200 modelos de ratón recogidos en la base de datos de SFARI⁵¹ generados mediante distintos sistemas de edición genómica. Algunos de estos estudios llevados a cabo utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 para comprobar la implicación de diversos genes en la patología de los TEA, han mostrado un incremento en la mortalidad y disminución de la fertilidad, desarrollo anormal del cerebro y el corazón, formación anormal de la corteza cerebral, disminución en la proliferación de precursores neuronales, disminución en la mielinización, así como disminución cognitiva y alteraciones en los patrones de aprendizaje y en la interacciones sociales, y aparición de comportamientos repetitivos⁸⁸⁻⁹². Asimismo, con esta misma metodología se han generado modelos de rata para el estudio de TEA, revelando alteraciones neuronales en general y de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas en particular, cambios en la materia blanca, así como dificultades motoras y en los procesos de aprendizaje y memoria⁹³⁻⁹⁵.

A pesar de la evidente idoneidad de los roedores como modelos de TEA y la valiosa información que ofrecen, existen algunos inconvenientes notables que han llevado a los investigadores a optar por modelos más manejables, como el pez cebra, cuya descripción general y ventajas sobre otros modelos, así como su utilidad para el estudio de los factores genéticos causales de TEA se discuten en el siguiente apartado.

2. EL PEZ CEBRA

2.1. TAXONOMÍA Y DISTRIBUCIÓN

El pez cebra pertenece al reino *Animalia*, filo *Chordata*, clase *Actinopterygii*, interclase *Teleostei*, orden *Cypriniformes*, familia *Cyprinidae*, género *Danio* y especie *Danio rerio*. La primera descripción del pez cebra la hizo Hamilton en 1822, bajo el nombre de *Cyprinus rerio*, dentro de la división *Cyprinus* y género *Danio*⁹⁶, en el río Kosi, un afluente del Ganges. Con posterioridad, Weber y Beaufort propusieron subdividir esta clasificación en el género *Brachydanio* y el género *Danio*, atendiendo a ciertas características corporales⁹⁷, de ahí las diversas referencias de pez cebra como *Brachydanio rerio*. Tras observar las múltiples características superpuestas los géneros *Brachydanio* y *Danio* se unificaron^{98,99}. En la

actualidad, la base de datos de taxonomía del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) recoge un total de 26 especies pertenecientes al género *Danio*¹⁰⁰, que se distinguen entre sí por ciertas diferencias en la pigmentación, tamaño, morfología y comportamiento.

El pez cebra es natural del sudeste asiático, con amplia distribución geográfica, desde la zona norte de Myanmar, Bangladesh, Nepal, Pakistán y sudeste y noreste de India, principalmente en las cuencas de los ríos Ganges y Brahmaputra. Habita principalmente en aguas tranquilas y poco profundas cerca de arroyos y zanjas, donde soportan un amplio rango de temperaturas (12–39°C), niveles de pH (5.9–9.8) y conductividad (10-2000 μS)¹⁰¹.

2.2. DESCRIPCIÓN DEL PEZ CEBRA

Los peces de la especie *D. rerio* son peces delgados y fusiformes, de pequeño tamaño (3-5 cm en la edad adulta), caracterizados principalmente por poseer de 5-9 bandas de color azulado que se extienden desde la zona del opérculo hasta la aleta caudal, entre matices de color dorado y plateado. Las células que determinan la coloración característica del pez cebra son los melanóforos (azul oscuro), xantóforos (dorado) e iridóforos (plateado)¹⁰². Asimismo, carece de línea media completa. Los ojos, situados a ambos lados de la cabeza, son de tamaño moderado, color plateado y pupila circular. La mandíbula inferior sobresale en relación a la superior, lo que es indicativo del modo de alimentación (partículas en suspensión). Como se muestra en la Figura 8, presentan un relativo dimorfismo sexual, pues las hembras suelen tener un mayor tamaño y mayor curvatura en la zona ventral, así como una coloración más oscura, mientras que los machos tienen un tamaño ligeramente menor, son más aplanados ventralmente y su coloración es más brillante. Asimismo, en la cloaca de las hembras, situada entre las aletas pélvicas y la aleta anal, se encuentra una pequeña papila genital blanquecina, estructura que no resulta visible en machos.

a) Hembra adulta



b) Macho adulto



Figura 8. Fotografías de un macho y una hembra de pez cebra, donde se pueden observar características diferenciales con respecto al sexo.

En relación a su dieta, los peces cebra son omnívoros y se alimentan principalmente de insectos y zooplancton, aunque también se han encontrado restos de fitoplancton y distintos tipos de material vegetal, así como huevos de invertebrados, crustáceos y detritus en su intestino¹⁰³.

El ciclo vital del pez cebra es muy corto, pues alcanzan la madurez sexual en torno a los 3 meses. Son animales ovíparos, de fecundación externa, con preferencia por la reproducción en

períodos estivales. El apareamiento comienza cuando la hembra libera feromonas al agua, fundamentalmente tras un estímulo lumínico, de forma que el macho se acerca y comienza a tocar con su aleta caudal la zona ventral del cuerpo de la hembra. Este movimiento estimula la ovoposición, lo que a su vez hace que el macho expulse esperma al agua y se produzca la fertilización de los huevos¹⁰¹. El desarrollo embrionario consta de siete períodos básicos conocidos como cigótico, escisión o clivaje, blástula, gástrula, segmentación, faríngrula y eclosión¹⁰⁴ (Figura 9). Así, los huevos fertilizados sufrirán la primera división en torno a la primera media hora, en lo que se conoce como período cigótico. Durante el período escisión o clivaje que va desde las 0,75 a las 2 horas post-fertilización (hpf) se producen sucesivas divisiones hasta alcanzar las 64 células, tras lo que comienza el período de blástula, que se extiende hasta las 5 hpf. En el período de gástrula (5-10 hpf) se produce la formación de las tres capas germinales, a lo que le siguen los períodos de segmentación (10-24 hpf) y faríngrula (24-48 hpf) en los que se produce el desarrollo de la mayor parte de los órganos. Finalmente los embriones eclosionan (salen del corión) en torno a las 48-72 hpf¹⁰⁴. Los embriones comenzarán a nadar a medida que desarrollan la vejiga natatoria y disminuye el volumen del vitelo, que les sirve de aporte alimenticio, hasta su completa reabsorción a los 5-7 días post-fertilización (dpf) aproximadamente, momento en el cual comienzan a alimentarse de material exógeno. Tanto los huevos como los embriones son transparentes, lo que facilita su utilización en investigación, como se discutirá en apartados posteriores.

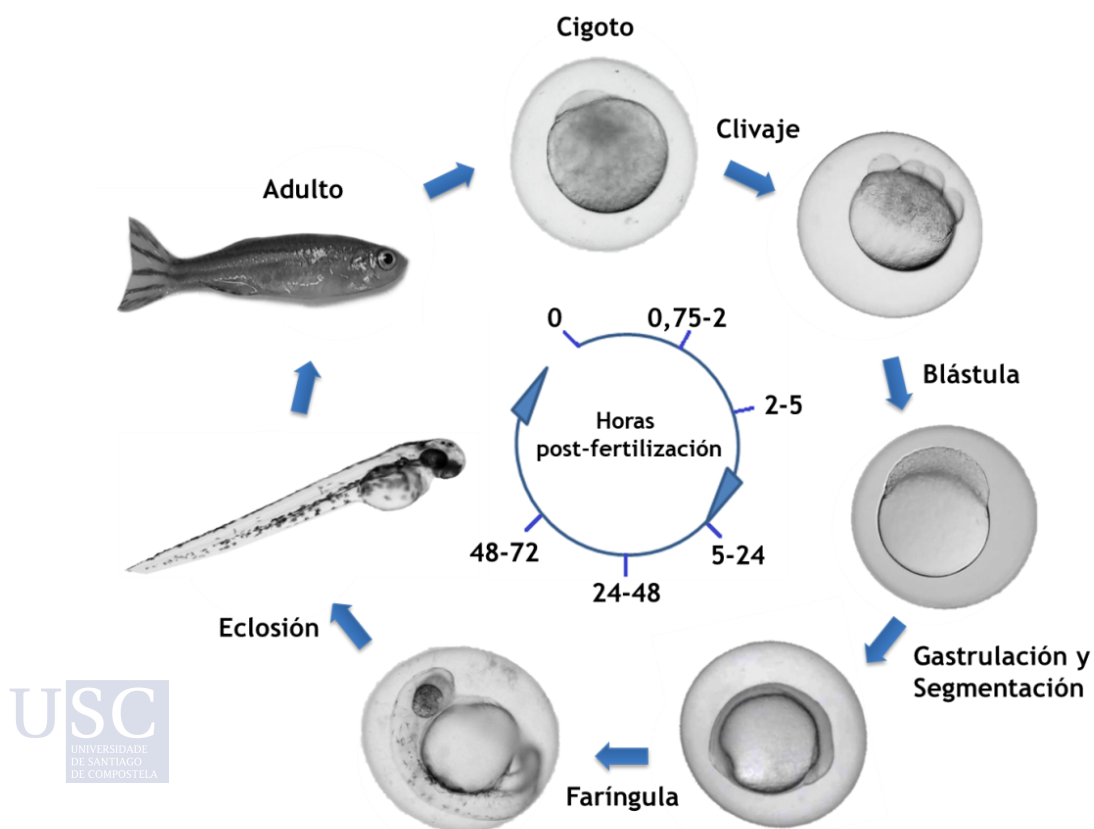


Figura 9. Ciclo de vida del pez cebra desde el período cigótico hasta la edad adulta.

2.3. EL PEZ CEBRA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

La introducción del pez cebra como modelo animal se remonta a principios de la década de los 70, sirviendo inicialmente como plataforma para comprender procesos de la biología del desarrollo y la genética de animales vertebrados¹⁰⁵. Desde entonces, multitud de investigadores han adoptado al pez cebra como modelo animal para numerosos estudios relacionados con patologías humanas, desde enfermedades con base genética o procesos regenerativos hasta estudios de toxicidad, biodistribución y efectividad de fármacos a gran escala. El éxito de este animal para la investigación se debe a sus particulares características biológicas, entre las que destacan las siguientes:

- **Mantenimiento.** Su pequeño tamaño permite que sean fácilmente manejables, y que se pueda mantener un gran número de individuos en estado óptimo sin suponer grandes costes. Asimismo, los costes de alimentación y mantenimiento en sí del animalario, son notablemente inferiores en comparación con los de roedores.
- **Ciclo de vida y reproducción.** Como se menciona anteriormente, los peces cebra tienen un ciclo de vida corto, desarrollando sus órganos principales en unas 48 horas y alcanzando la madurez sexual a los 3 meses de vida, aproximadamente¹⁰⁴. Asimismo, en condiciones de laboratorio, cada pareja de individuos adultos puede llegar a tener una descendencia de entre 100-300 embriones cada semana, lo que a su vez permite una continuidad en los experimentos y posibilita realizar estudios a gran escala.
- **Fecundación externa y transparencia.** La forma de fecundación de los individuos hace posible que las puestas puedan planearse de manera que éstas sean sincrónicas, lo que es fundamental para experimentos de edición genómica, por ejemplo. Además, la transparencia de los embriones permite una fácil manipulación y realización de múltiples estudios sin necesidad del uso de técnicas invasivas. Cabe destacar la importancia de la transparencia en estudios de desarrollo y especialmente de neurodesarrollo, en que se han conseguido ver procesos neuronales incluso a nivel celular¹⁰⁶.
- **Sistema inmunitario.** Aunque los componentes celulares básicos de la inmunidad innata del pez cebra están presentes desde estadios tempranos del desarrollo, el sistema inmunitario adaptativo no está activo hasta entre 2-3 semanas tras la fertilización, y la inmunocompetencia completa no se alcanza hasta las 4-6 semanas¹⁰⁷. Esta característica es especialmente relevante para el trasplante de células tumorales en embriones, pues dicha se puede realizar sin necesidad de inmunosuprimir al animal.
- **Regeneración.** Estos animales tienen una extraordinaria capacidad de regeneración de múltiples tejidos, incluyendo médula espinal, cerebro y cerebelo, corazón, aleta caudal, riñón o hígado, lo que ha servido para descubrir mecanismos esenciales detrás de este proceso¹⁰⁸.
- **Genoma.** En 2013 se publicó el primer genoma de referencia de alta calidad de pez cebra, lo que reveló que más de un 70% de los genes humanos tienen un ortólogo en pez cebra y que además, el 80% de los mismos son genes relacionados con enfermedades humanas¹⁰⁹.

Todo ello ha permitido el avance del conocimiento en múltiples áreas de estudio, tanto para el estudio de procesos biológicos como patológicos, y en ellas, la neurobiología y los trastornos del neurodesarrollo.

2.4. APLICACIÓN DEL PEZ CEBRA PARA EL ESTUDIO DE TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO

Los estudios comparativos muestran que los procesos de neurodesarrollo entre distintas especies con respecto al humano, incluyendo al pez cebra, están altamente conservados. No obstante, la temporalidad de los eventos, así como la complejidad y organización de las estructuras difiere en niveles variables, sobre todo en lo que se refiere a los procesos de morfogénesis y neurogénesis^{110,111}. Es interesante mencionar que la formación del cerebro del pez cebra se completa a los 3 dpf¹⁰⁴, en comparación con los 21 días de un ratón, y las ocho semanas en humanos¹¹². Asimismo, a pesar de que los mecanismos de formación de las diferentes estructuras difieren con respecto a los mamíferos, las regiones cerebrales más importantes y las principales subdivisiones, así como los tipos de células, diferenciación, conectividad, vías de señalización y los patrones de expresión génica están muy conservados^{113,114}. Además, hay regiones neuroanatómicas estructural y funcionalmente equivalentes, como el palio lateral, dorsal y medial del pez cebra, que comparten características con el hipocampo humano, la neocorteza y la amígdala, respectivamente¹¹³. Un ejemplo interesante de la conservación entre estructuras cerebrales, que justifica asimismo el uso del pez cebra en estudios de neurobiología, ocurre con el desarrollo del cerebelo. En pez cebra el desarrollo del mismo comienza a las 22 hpf aproximadamente y sus capas son detectables a los 5 dpf, pero tanto en pez cebra como en mamíferos se requiere la expresión de un mismo gen (*engrailed1/2*), que dará lugar a células progenitoras, que bajo el influjo de la expresión de los mismos factores de transcripción *atoh1* y *ptfla*, especificará el tipo celular en células granulares (glutamatérgicas) o de Purkinje (GABAérgicas), respectivamente y determinará también su migración formando una estructura trilaminar junto con otras neuronas cerebelares, cada una de las cuales tiene funciones similares en pez cebra y mamíferos¹¹⁵⁻¹¹⁷. Las células de Purkinje son primordiales para la función y conectividad neural del cerebelo, pues reciben información, la procesan y envían a los núcleos del cerebelo, conectando con el cerebro y la médula espinal y regulando funciones sensoriales, motoras, cognitivas, emocionales y del lenguaje¹¹⁸. De hecho, una de las observaciones más aparentes en individuos con TEA es la disminución significativa en el tamaño y número de estas células^{119,120}.

De esta forma, por las características biológicas especiales del pez cebra, así como por su homología genómica y estructural con el humano, específicamente, a nivel cerebral, se han desarrollado multitud de modelos genéticos que han permitido relacionar defectos genéticos con anomalías fenotípicas y de comportamiento, concordantes a su vez con lo que se observa en pacientes acuciados de trastornos del neurodesarrollo, y más específicamente, TEA.

2.4.1. Modelos genéticos de pez cebra para el estudio de TEA

Una de las principales ventajas del uso del pez cebra como modelo de enfermedades humanas es la relativa facilidad para llevar a cabo experimentos de manipulación genética. Así, se puede conseguir la desregulación o sobreexpresión de genes de forma transitoria, a través del uso de morfolinós (MOs) o la edición genómica permanente generando KOs o KIs a través de los ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas o lesiones locales e inducidas dirigidas en genomas (TILLING, del inglés *Targeted Induced Local Lesions in Genomes*). Asimismo, se pueden desarrollar de forma relativamente sencilla líneas transgénicas que expresen fluorescencia en determinadas células del sistema nervioso, pudiendo así realizar una mejor caracterización de los modelos de neuropatologías, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Ejemplos de líneas transgénicas disponibles con marcaje para células del sistema nervioso

Línea transgénica	Células fluorescentes	Referencia
<i>ath5</i> :GFP	Células ganglionares de la retina	121
<i>dat</i> :EGFP	Neuronas dopaminérgicas	122
<i>elavl3</i> :lynTagRFP	Neuronas post-mitóticas	123
<i>En-1</i> :GFP	Interneuronas ascendentes	124
<i>flk1</i> :GFP	Células endoteliales	125
<i>gad1b</i> :RFP	Neuronas GABAérgicas	126
<i>gfap</i> :GFP	Células de glía radial	127
<i>glyt2</i> :GFP	Neuronas glicerinérgicas	128
<i>isl1</i> :GFP	Neuronas motoras del cráneo	129
<i>kctd15a</i> :GFP	<i>Torus lateralis</i>	130
<i>mnx1</i> :GFP	Neuronas motoras	131
<i>neurod</i> :EGFP	Neuronas inmaduras	132
<i>neurog1</i> :GFP	Neuronas primarias	133
<i>olig2</i> :EGFP	Oligodendrocitos	134
<i>pet1</i> :GFP	Neuronas serotoninérgicas	135
<i>qrfp</i> :GFP	Núcleo preóptico del hipotálamo	136
<i>sox10</i> :GFP	Células de la cresta neural	137
<i>tbx2b</i> :EGFP	Células fotorreceptoras (conos)	138
<i>Vglut2a</i> :GFP	Neuronas glutamatérgicas	126
<i>vmat2</i> :GFP	Neuronas monoaminérgicas	139

2.4.1.1. Morfolinos

En lo referente a la genética reversa, una de las estrategias para el silenciamiento genético más utilizadas en pez cebra son los MOs, que permiten el bloqueo transitorio de determinados genes (KD, del inglés *knock-down*), cuyo uso se ha extendido desde finales de la década de los 90¹⁴⁰. Se trata de pequeños oligonucleótidos modificados y diseñados para unirse de forma específica por complementariedad a una secuencia determinada del ARN mensajero (ARNm) del gen de interés, para así desregular su función pero sin que la secuencia genómica se vea afectada. Dependiendo del diseño de la secuencia de los MOs, éstos pueden bloquear la traducción del ARNm al unirse al lugar de inicio de la traducción e impidiendo el acceso de los ribosomas, o bien unirse a los lugares de escisión de los pre-ARNm (uniones exón-intrón), generando así ARNm maduros anormales. Asimismo, se diseñan de forma que no sean sustrato de la RNasa-H y por ello los complejos no son degradados¹⁴¹. Estos oligonucleótidos, de unas 25 pares de bases (pb), se sintetizan de forma que las bases del ADN están unidas a un anillo de morfolino, en lugar de a anillos de desoxirribosa, y en los enlaces fosfodiéster los grupos fosfato se sustituyen por grupos fosfordiamidato, lo que da lugar a una estructura neutra de alta afinidad¹⁴², como se muestra en la Figura 10.

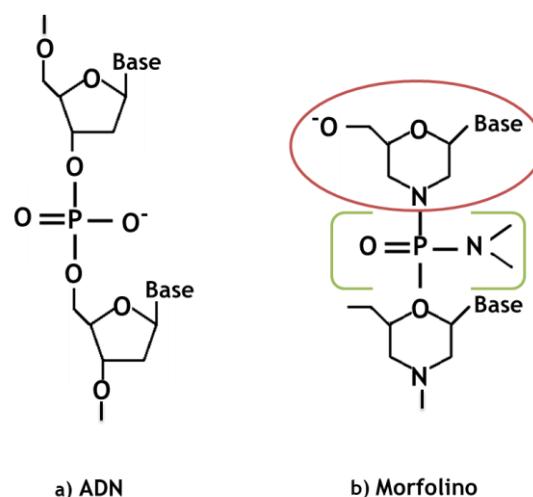


Figura 10. Representación de la estructura básica del ADN (a) con el anillo desoxirribosa y el enlace fosfodiéster y de los MOs (b) con el anillo morfolino y el enlace de grupos fosfordiamidato.

Su facilidad de aplicación y coste relativamente bajo ha hecho que los investigadores hayan utilizado los MOs para estudios de múltiples procesos biológicos y enfermedades humanas. En concreto, han servido para estudiar la implicación de numerosos genes candidatos en el desarrollo de TEA (Tabla 5). No obstante, a pesar de su uso extendido en investigación biomédica, la técnica de los MOs presenta ciertas desventajas que deben ser consideradas¹⁴³⁻¹⁴⁵. En primer lugar, su efecto transitorio hace que los efectos de bloqueo cesen al cabo de 4-5 días aproximadamente, lo que no permite estudiar la función génica a largo plazo, sino únicamente en los primeros períodos del desarrollo. Además, en muchos

casos se ven fenotipos anormales inesperados debido a uniones inespecíficas del MO y en muchos casos, por apoptosis mediada por la activación de la ruta de p53. Por ello se recomienda la utilización de MOs control, para verificar que los fenotipos observados no son producto de la manipulación de los embriones; la co-inyección de MOs específicos para p53, para verificar que los fenotipos no se deben a apoptosis; y el rescate del fenotipo mediante la inyección de ARNm, para verificar que se revierten los fenotipos y que por ende el MO es específico^{145,146}. Asimismo, es recomendable verificar los fenotipos en modelos mutantes, en los que los efectos inespecíficos se ven reducidos y es posible establecer modelos a largo plazo.

Tabla 5. Estudios con MOs en pez cebra para la caracterización fenotípica de genes candidatos de TEA

Gen de pez cebra	Características fenotípicas observadas	Referencia
<i>arid1b</i>	Longitud corporal reducida Expresión anormal de genes condrogénicos y osteogénicos	147
<i>arxa</i>	Desarrollo cerebral anormal Alteraciones neuronales	148
<i>auts2a</i>	Microcefalia Desarrollo anormal de la mandibular Alteraciones neuronales y motoras	149
<i>cacna1c</i>	Alteraciones cardiovasculares Desarrollo craneofacial anormal	150
<i>cep41</i>	Alteraciones axonales y en la migración de la cresta neural Alteraciones en el comportamiento social	151
<i>chd2</i>	Alteraciones en el desarrollo Microcefalia y curvatura anormal del cuerpo Ausencia de vejiga natatoria Dificultades motoras	152
<i>chd8</i>	Desarrollo craneofacial alterado con macrocefalia Reducción de neuronas entéricas post-mitóticas Movilidad gastrointestinal reducida	153,154
<i>ctnnd2b</i>	Longitud corporal reducida Alteraciones de la notocorda	155
<i>kcnj10</i>	Alteraciones motoras Desarrollo general anormal Incremento de la estereotipia	156
<i>kdm6a</i> y <i>kmt2d</i>	Longitud corporal reducida Desarrollo anormal de la mandíbula Alteraciones de la notocorda Alteraciones neuronales	157,158

<i>mecp2</i>	Disminución de la longitud axonal y dendrítica Disminución en las respuestas sensoriales	159
<i>met</i>	Alta mortalidad Alteraciones neuronales	160
<i>mytl1a</i> and <i>mytl1b</i>	Niveles disminuidos de oxitocina	161
<i>rlim</i> y <i>rpl10</i>	Microcefalia	162,163
<i>syngap1a/syngap1b</i> y <i>shank3a/shankb</i>	Retraso en el desarrollo y dificultades mototas Incremento en la apoptosis cerebral Desregulación de señales excitatorias e inhibitorias	164
<i>trappc6b</i>	Microcefalia Hiperexcitabilidad	165

2.4.1.2. TILLING, TALENs, ZFNs y CRISPR

Debido a las relativas limitaciones que presenta el uso de MOs, y con objeto de generar líneas mutantes estables, otra estrategia ampliamente utilizada en el pez cebra para el estudio de genes relacionados con TEA es la metodología TILLING. Ésta se basa en la exposición del animal a N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), un potente agente mutagénico, y posterior secuenciación para identificar mutaciones que provoquen una pérdida de función del gen. El ENU es un agente alquilante que, mediante la transferencia de sus grupos etilo a los átomos de oxígeno o nitrógeno de las bases del ADN, genera errores en la replicación dando lugar a mutaciones puntuales al azar en el genoma¹⁶⁶. Aunque su uso comenzó principalmente en *Arabidopsis*¹⁶⁷, pronto se aplicó a otras especies, incluida *D.rerio*¹⁶⁸, y se han desarrollado varios modelos de TEA generados mediante la mutagénesis mediada por ENU (Tabla 6). Sin embargo, los costes asociados son bastante elevados y el tiempo que requiere analizar todas las secuencias es considerable, lo que a su vez dificulta la generación de líneas mutantes estables para el gen específico de interés¹⁶⁶. Para superar estas dificultades se introdujeron con posterioridad las metodologías basadas en ZFNs y TALENs, previamente descritas, también aplicadas al estudio de TEA (Tabla 6).

En la actualidad, con las mejoras introducidas en los protocolos de CRISPR/Cas se ha incrementado significativamente la eficiencia de generación de líneas mutantes, por lo que esta técnica ha pasado a ser la opción de preferencia para muchos investigadores¹⁶⁹. Para ejemplificar la utilidad de los sistemas CRISPR en el estudio del trasfondo genético de los trastornos, en este caso, psiquiátricos, cabe mencionar el estudio a gran escala desarrollado por Thyme y colaboradores. En base a variantes asociadas a esquizofrenia detectadas en estudios de casos y controles, aplicaron la técnica de CRISPR/Cas9 a 132 genes en pez cebra, pudiendo hacer una descripción fenotípica general asociada a esquizofrenia, priorizar más de 30 genes candidatos y establecer asociaciones entre genes específicos y mecanismos biológicos determinados¹⁷⁰. Asimismo, Guissart y colaboradores mientras trabajaban con familias con grados variables de alteraciones en las funciones cognitivas, motoras y

conductuales, así como discapacidad intelectual, identificaron varias mutaciones en el receptor nuclear ROR α , esencial para el desarrollo del cerebelo. Tras generar una línea mutante mediante CRISPR/Cas9 en pez cebra, encontraron reducción de las células granulares y de Purkinje, recapitulado así las alteraciones neuroanatómicas de los pacientes¹⁷¹. Este y otros ejemplos de CRISPR/Cas9 para estudiar genes relacionados con TEA se recogen en la Tabla 6.

Tabla 6. Estudios en pez cebra para la caracterización fenotípica de genes candidatos de TEA mediante ZFNs, TALENs, ENU y CRISPR/Cas9

Gen de pez cebra	Técnica utilizada	Características fenotípicas observadas	Referencia
<i>chd8</i>	CRISPR/Cas9	Desarrollo craneofacial alterado con macrocefalia	153
<i>cntnap2a</i> y <i>cntap2b</i>	ZFNs	Desarrollo anormal Microcefalia Disminución de interneuronas Alteraciones motoras	172
<i>dyrk1a</i>	TALENs	Microcefalia Alteración en la morfología del cerebelo Respuesta alterada a estímulos sociales	173
<i>fmr1</i>	ENU y CRISPR/Cas9	Desarrollo cerebral anormal Hiperactividad Incremento de la ansiedad Comportamiento social anormal Dificultades de aprendizaje	174-176
<i>mecp2</i>	ENU	Respuesta inmune alterada Alteraciones neuronales Alteraciones motoras	177,178
<i>nbea</i>	ENU y TALENs	Disminución de la complejidad dendrítica Respuesta sensorial alterada Actividad locomotora disminuida	179
<i>nr3c2</i>	CRISPR/Cas9	Comportamiento social anormal Rutinas de sueño alteradas	50
<i>oxtr</i>	TALENs	Alteración de la señalización de oxitocina Alteraciones de la memoria para el reconocimiento social y no social	180
<i>reln</i>	TALENs	Comportamiento social anormal Alteración de la señalización de serotonina	181
<i>rerea</i> and <i>rereb</i>	ENU	Disminución en la respuesta a estímulos Dificultades visuales y auditivas	182

<i>rora</i>	CRISPR/Cas9	Alteraciones en la morfología del cerebelo y <i>tectum</i> óptico	171
<i>shank3a</i> y <i>shankb</i>	CRISPR/Cas9	Desarrollo general anormal Alteraciones neuronales Alteraciones en la función sináptica Peristaltismo intestinal reducido Socialización reducida con hipoactividad	183,184

2.4.2. Caracterización de los modelos genéticos de pez cebra

Una vez se han generado los modelos de KD, KO o KI para el gen deseado, se dispone de multitud de estrategias aplicables para una caracterización de los mismos, basadas principalmente en el análisis fenotípico, molecular y de comportamiento en combinación o no, con el uso de líneas transgénicas (Tabla 4).

En relación al análisis morfológico, se trata fundamentalmente de evaluar la presencia de anomalías en el cuerpo y la cola, cabeza, ojos, otolitos, vitelo, así como la posible presencia de edema cardíaco. Esto se puede realizar a través del uso de microscopía y la realización de medidas que permitan comparar datos entre individuos, por ejemplo, midiendo la longitud del cuerpo, el diámetro o área de la cabeza, ojos, otolitos y vitelo o la distancia entre estos diferentes elementos, e incluso también analizando regiones cerebrales concretas^{185,186}. Para la caracterización molecular de los modelos en relación a los patrones de expresión génica, una técnica ampliamente utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o qPCR (del inglés, *quantitative- Polymerase Chain Reaction*), que permite cuantificar el nivel de expresión de genes determinados y evaluar diferencias entre los individuos salvajes y los modelos. También se suele recurrir a los ensayos de hibridación *in situ* o HIS con sondas de ARN, que permiten además, localizar en qué tejidos se expresan los genes de interés en los distintos períodos de desarrollo. Algunos de los marcadores moleculares que se han evaluado y han arrojado resultados interesantes en modelos de neurodesarrollo son, por ejemplo, *sox2* (marcador de pluripotencia de células madre neurales), *vglut2.2* (marcador glutamatérgico), *th1* (marcador dopaminérgico), *neurog1* (marcador de determinación neuronal), *c-fos* (marcador de activación neuronal), *crh* (neuronas del núcleo paraventricular), *c-myc* (zona de proliferación tectal y retina), *emx1* (telencéfalo) u *otx2a* y *pax2a* (diencéfalo y límite mesencéfalo-rombencéfalo)^{185,187,188}. Asimismo, en los últimos años se ha desarrollado la técnica de secuenciación del ARN o RNA-seq (del inglés *RNA sequencing*), que permite la caracterización completa del transcriptoma y así determinar a nivel global los cambios en la expresión génica que se producen en los modelos, o incluso la implicación a nivel transcriptómico de la exposición a ciertos factores ambientales^{189,190}.

A nivel de proteínas, su ubicación física así como las diferencias en los niveles de las mismas entre individuos puede determinarse a través de técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (IHQ e IF, respectivamente), basadas en la aplicación de anticuerpos. Así, se ha utilizado, por ejemplo, anti-5-HT (neuronas serotoninérgicas)¹⁹¹, anti-GFAP (células de glía radial)¹⁸⁵, anti- α -tubulina acetilada (tractos axonales cerebrales), anti-sox10

(migración de células de la cresta neural)¹⁵¹, anti-homer1 (proteína postsináptica), anti-sinaptofisina (terminales presinápticos)¹⁸³, znp-1 (neuronas motoras)¹⁸⁷, anti-fosfohistona H3 (fase M, proliferación celular)¹⁷², anti-PCNA (proliferación celular)¹⁸⁸, anti-caspasa3 (células apoptóticas)¹⁷³ o anti-PSD95 (marcador sináptico)¹⁸⁴.

En cuanto a los estudios comportamentales, el desarrollo precoz de determinadas conductas en pez cebra permite la aplicación de multitud de test, no solo para caracterizar los comportamientos típicos observados en pacientes de TEA, sino también para otros síntomas comórbidos como ansiedad, agresividad, epilepsia o alteraciones del sueño¹⁹². Así, se pueden evaluar entre otros parámetros la interacción social, respuestas emocionales, capacidad sensorial, toma de decisiones o habilidades de aprendizaje¹⁹³.

Finalmente, la generación relativamente sencilla de modelos genéticos de pez cebra, la gran cantidad de técnicas aplicables para la validación de genes candidatos y el establecimiento de correlaciones genotipo-fenotipo, así como la disponibilidad de un número elevado de individuos, permiten testar la acción de múltiples compuestos o drogas que, en último término, pueden llevar al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y fármacos¹⁹⁴.

3. *AUTS2*, GEN CANDIDATO DE SUSCEPTIBILIDAD A AUTISMO 2

El gen *AUTS2*, comúnmente denominado como gen de susceptibilidad a autismo 2 (del inglés, *autism susceptibility candidate 2*) o también conocido como activador de la transcripción y regulador del desarrollo (del inglés, *activator of transcription and developmental regulator*) por el *HUGO Gene Nomenclature Committee* ([HGNC:14262](#)), se identificó y se caracterizó como gen candidato a autismo en el año 2002¹⁹⁵. Sultana y colaboradores, basándose en estudios de ligamiento que previamente habían relacionado el cromosoma 7q con autismo¹⁹⁶, encontraron una traslocación recíproca entre la región 7q11.2 y 20p11.2 que afectaba al gen *AUTS2* en una pareja de gemelos monocigóticos con autismo. Desde entonces se han identificado múltiples variaciones estructurales de este gen, tanto heredadas como *de novo*, desde deleciones, traslocaciones, duplicaciones o SNPs, en pacientes de autismo e incluso en otras enfermedades psiquiátricas o del neurodesarrollo, como esquizofrenia, depresión, epilepsia, discapacidad intelectual o trastorno de déficit de atención e hiperactividad^{149,197-199}. Sin embargo, los individuos que presentan alteraciones en torno a la región 3' del gen muestran un fenotipo más severo, lo que parece indicar que el extremo amino terminal de la proteína es esencial para su correcto funcionamiento²⁰⁰. Los estudios llevados a cabo para establecer relaciones fenotipo-genotipo en pacientes con mutaciones en el gen *AUTS2* han revelado que las principales características clínicas son las siguientes: retraso global del desarrollo (98%), microcefalia (65%), dificultades para la alimentación (62%), TDAH (54%), rasgos autistas (52%)²⁰¹, aunque se han descrito hasta 32 rasgos relacionados con el gen, cuya frecuencia es oscila entre del 10 - 50%²⁰⁰. Todo ello ha llevado a concluir que *AUTS2* es un gen con efectiva implicación en el desarrollo de enfermedades del neurodesarrollo, más concretamente, TEA.

3.1. DESCRIPCIÓN Y FUNCIÓN EN EL NEURODESARROLLO

El gen *AUTS2* se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, concretamente en la posición 7q11.22 (Figura 11), abarca una región de 1,2 megabases (69,598,296-70,793,506) y presenta 16 transcritos codificadores de proteínas (aunque tiene un total de 33 variantes)²⁰². La isoforma principal (NM_015570.4, ENST00000342771.10) con 7469 pb, tiene 19 exones y codifica para una proteína de 1259 aminoácidos (Figura 11). *AUTS2* se expresa principalmente en el cerebro, aunque también en riñón, colon, vesícula biliar o músculo esquelético y en menor medida en la placenta y pulmón²⁰³. A nivel celular, la proteína *AUTS2* tiene funciones tanto en el citoplasma como en el núcleo.

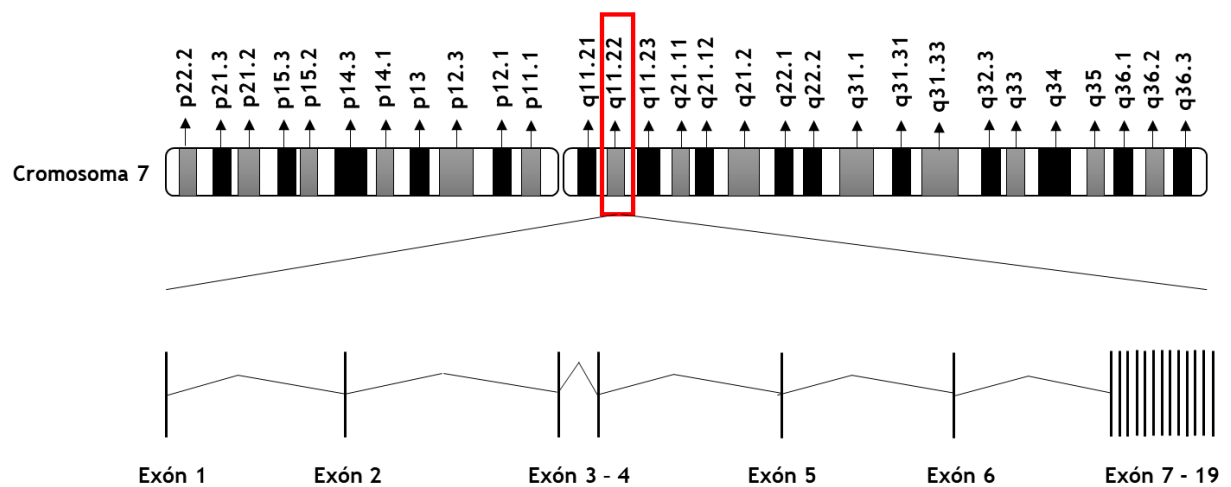


Figura 11. Representación esquemática de la localización cromosómica y composición exónica de *AUTS2*.

3.1.1. Función citoplasmática

En el citoplasma *AUTS2* está involucrada en la motilidad y morfogénesis celular mediante la reorganización del citoesqueleto y la interacción con miembros de la familia Rho, tales como Rac1 y CDC42²⁰⁴. De esta forma, *AUTS2* activa a Rac1 a través de factores intercambiadores de guanina, como P-Rex1 o el complejo Elmo2/Dock180 lo que da lugar a la formación de lamelipodios, e inhibe la formación de filopodios al suprimir la función de CDC42, promoviendo así la correcta migración neuronal y la proyección axonal^{205,206}.

3.1.2. Función nuclear

La principal función del gen *AUTS2* es la regulación de la transcripción génica de múltiples genes implicados en el desarrollo, estando muchos de ellos relacionados con la aparición de trastornos del neurodesarrollo y desarrolla sus funciones como parte del denominado PRC1 (del inglés, *Polycomb repressive complex type 1*)²⁰⁷. El PRC1 se subdivide en 6 clases dependiendo de la proteína del tipo *RING finger* que contenga (PCGFs, del inglés *Polycomb Group RING Fingers*), aunque todos ellos contienen la proteína RING1A/B y su función canónica es la represión transcripcional a través la monoubiquitinación de la lisina 19 de la histona H2A (H2AK119ub1) compactando la cromatina y así, reprimiendo la

transcripción²⁰⁸. No obstante, AUTS2 forma parte del complejo PRC1 que contiene las proteínas PCGF3 o PCGF5, RING1A/B, RYBP, CK2B y P300 cuya función, no canónica, revierte la represión transcripcional y convierte al complejo en activador de la transcripción. En este sentido, CK2 fosforila a la subunidad RING1A/B, lo que inhibe la ubiquitinación de la H2AK119ub1 y, a su vez, AUTS2 interactúa con las proteínas PCGFs del complejo, reclutando a P300, cuya actividad acetiltransferasa activa la transcripción^{209,210}. A su vez, el reclutamiento al complejo de la proteína DCAF7, también denominada WDR68, induce la transcripción al promover la actividad del complejo.

3.2. *auts2a*, GEN ORTÓGOLO EN PEZ CEBRA

Como se menciona con anterioridad, la secuenciación del genoma del pez cebra ha permitido demostrar la conservación genómica y funcional de múltiples genes implicados en enfermedades humanas¹⁰⁹. Uno de estos genes, altamente conservados tanto a nivel de secuencia como de función es AUTS2. El ortólogo en pez cebra se denomina *auts2a*, cuya función se relaciona igualmente con procesos de desarrollo y cuya homología global de secuencia con el gen humano es de aproximadamente un 63%²⁰². Este gen se localiza en el cromosoma 10 (27,182,704-27,741,793) y tiene 9 isoformas, constando al principal de 19 exones, con 4714 pb, que dan lugar a una proteína de 1278 aminoácidos ([ENSDART00000129369.3](#)). Su expresión en pez cebra se extiende al cerebro anterior, medio y posterior, así como al ojo y al tronco hasta las 24 hpf, limitándose únicamente al cerebro y ojo en etapas posteriores del desarrollo¹⁴⁹.

3.3. MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE *AUTS2* EN EL NEURODESARROLLO

La implicación de *AUTS2* en la neurogénesis, migración neuronal, regulación sináptica, desarrollo cerebral y cerebelar, así como en la aparición de comportamientos anormales ha sido investigada a través de varios estudios, tanto en modelos animales como celulares.

En relación a los modelos celulares, mediante el uso de células madre embrionarias de ratón o cultivos primarios de neuronas se demostró la función de *AUTS2* en la diferenciación neuronal a través de su participación en el PRC1^{209,211}, que su sobre-expresión promueve el crecimiento de las neuritas²⁰⁴ y que su disrupción provoca un incremento de la muerte celular en el proceso de diferenciación neuronal²¹². En el pez cebra, con el bloqueo de *auts2a* mediante MOs se observaron anomalías en el desarrollo, incluyendo microcefalia y reducción del tamaño mandibular, así como disminución generalizada de neuronas en el cerebelo, retina y *tectum* óptico, como consecuencia de un incremento de la apoptosis^{149,200}. Dichos fenotipos se pudieron revertir con la inyección del ARNm humano, mostrando la especificidad del MO y la responsabilidad de *auts2a* en la aparición de las características anormales observadas. Mediante TALENs, Jha y colaboradores pudieron establecer la relación entre la ralentización de las respuestas de escape y la excitabilidad reducida de las neuronas de Mauthner²¹³. En ratones, la pérdida de *Auts2* se ha relacionado con la disminución del tamaño y peso corporal, pérdida de la capacidad del reflejo de

enderezamiento corporal y una menor capacidad de vocalización ultrasónica²¹⁴. Hori y colaboradores demostraron que la pérdida de *Auts2* da lugar a anomalías en la formación, extensión y ramificación de las neuritas, así como en la migración y elongación de las neuronas corticales²⁰⁴. Con posterioridad encontraron un balance anormal de señales excitatorias e inhibitorias, presencia de comportamientos autistas y déficits en la interacción social y la comunicación vocal²¹⁵. El papel crucial de *AUTS2* en las funciones motoras y la comunicación social a través de la regulación del desarrollo del cerebelo, la maduración de las células de Purkinje y el desarrollo correcto de sinapsis fue evidenciado en un modelo mutante de ratón por Yamashiro y colaboradores²¹⁶.

En vista de lo anteriormente expuesto, se hace necesaria la generación de un modelo KO para *auts2a* en pez cebra que permita su validación funcional, así como la identificación de alteraciones transcriptómicas y moleculares, y el desarrollo de estudios de comportamiento. Así, además de aportar datos muy valiosos acerca de la fisiopatología asociada a mutaciones en dicho gen, con el modelo se pretende establecer a *auts2a* como potencial diana terapéutica para la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Todo ello permitiría una mejora en el consejo genético, tratamiento, y en último término, en la calidad de vida de los pacientes y sus familiares.

Parte de los contenidos de la presente Introducción se han derivado o modificado de la publicación de Pensado-López *et al.* (2020), cuyos detalles se recogen en el Anexo I (página 171).*



* Pensado-López, A., Veiga-Rúa, S., Carracedo, Á., Allegue, C. & Sánchez, L. Experimental Models to Study Autism Spectrum Disorders: hiPSCs, Rodents and Zebrafish. *Genes (Basel)* **11**(2020). DOI: [10.3390/genes11111376](https://doi.org/10.3390/genes11111376)

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La etiología multifactorial de los TEA dificulta en gran medida la comprensión de los mecanismos biológicos, celulares y moleculares que desencadenan estos trastornos. A nivel genético, y al tratarse de un conjunto de enfermedades complejas, delimitar los genes que intervienen y la función de los mismos en la aparición y desarrollo de la sintomatología asociada a la enfermedad ha supuesto una tarea compleja para los investigadores. Por ello, aquellos genes que se pueden asociar con alta probabilidad como candidatos de TEA, deben ser investigados. *AUTS2* se ha propuesto como de alto riesgo ya desde hace dos décadas, pero gran parte de la fisiopatología asociada a las disrupciones en el mismo todavía se desconoce. Tratándose de un gen cuya implicación en TEA está ampliamente demostrada, es necesario comprender en profundidad los procesos que se encuentran alterados en los individuos y que pueden explicar la sintomatología asociada, con el fin último de poder abordar dichos procesos y síntomas desde un punto de vista terapéutico. Ante esta situación, en la presente tesis se propone al pez cebra como organismo modelo para el desarrollo de una línea mutante de *auts2a* (ortólogo del gen humano) mediante el sistema CRISPR/Cas9. Las características únicas del pez cebra lo hacen idóneo para un desarrollo rápido y sencillo de líneas mutantes, la comprobación de que se recapitulan la sintomatología de los pacientes, o parte de la misma, y su caracterización a distintos niveles, todo lo cual, a su vez, ofrece información tremendamente valiosa con gran potencial para ser trasladada a la práctica clínica. Así, el objetivo general de la presente tesis doctoral es la evaluación del papel del gen *auts2a* en el desarrollo de TEA utilizando el pez cebra como modelo, con el fin de proponerlo como diana candidata para desarrollo futuro de nuevas terapias o la identificación de moléculas con potencial terapéutico. Para ello, los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

1. Desarrollo de una línea mutante de pez cebra para el gen *auts2a* mediante el sistema CRISPR/Cas9 y optimización de las estrategias de genotipado
2. Validación de la eficiencia del *knock-out*
3. Caracterización a nivel fenotípico de los embriones y adultos mutantes
4. Caracterización transcriptómica de los embriones mutantes

RESUMEN

RESUMEN

Los trastornos del espectro autista (TEA o ASD por sus siglas en inglés, *Autism Spectrum Disorders*) hacen referencia a un conjunto de enfermedades complejas del neurodesarrollo caracterizadas por el deterioro persistente en las habilidades comunicativas, ocupacionales y en la reciprocidad socioemocional. La presencia de comportamientos e intereses restrictivos y repetitivos y la insistencia en la monotonía son, asimismo, características. Los primeros síntomas se dan en períodos tempranos del desarrollo, aunque el desorden puede no manifestarse completamente hasta que las demandas sociales o intelectuales exceden las capacidades limitadas, y la sintomatología se presenta con grados de intensidad y severidad variable. Los individuos pueden además, presentar manifestaciones físicas como epilepsia, problemas cardiovasculares e intestinales, hipotonía, disfunción inmunitaria o insomnio. Las características citadas constituyen la base fundamental del diagnóstico, aunque éste puede incluir también pruebas neurológicas, pruebas médicas físicas y también pruebas genéticas. En la actualidad el tratamiento se dirige principalmente a aminorar los síntomas presentes en los individuos mediante terapias psicosociales, farmacológicas y medicina natural.

Las manifestaciones observadas tienen su origen en anormalidades en la anatomía y conectividad de diversas partes del cerebro así como en la migración neuronal, lo que a su vez se debe a una amplia gama de factores de riesgo prenatales, perinatales y posnatales, tanto genéticos como ambientales. En relación a la contribución genética, descifrar el impacto individual de cada factor de riesgo ha sido una tarea ardua para los investigadores, aunque los estudios de asociación, la mejora en la secuenciación y, a nivel experimental, los avances en los sistemas de edición genómica, han permitido delimitar un número importante de genes candidatos. Concretamente, la tecnología CRISPR/Cas9 ha sido aplicada exitosamente para generar modelos mutantes para dichos genes candidatos, permitiendo así, establecer relaciones fenotipo-genotipo y explicar la fisiopatología de la enfermedad.

En este sentido, el pez cebra (*Danio rerio*) se ha establecido en los últimos años como un modelo idóneo para el estudio de trastornos del neurodesarrollo, como TEA, debido a sus singulares características, entre las que destacan: fácil mantenimiento, ciclo de vida y reproductivo corto, fecundación externa y transparencia de los embriones y larvas y muy especialmente, la elevada homología a nivel genómico con el ser humano, pues el 70% de los genes humanos tienen un ortólogo en pez cebra siendo, el 80% de los mismos, genes relacionados con enfermedades humanas. Asimismo, los procesos básicos involucrados en el neurodesarrollo están altamente conservados entre el humano y el pez cebra, y existe una elevada homología estructural en diversas partes del cerebro. De esta forma, se han generado múltiples modelos genéticos en pez cebra para el estudio de genes candidatos, que han

permitido recapitular muchos de los signos y síntomas observados en pacientes y así desentrañar las bases biológicas, celulares y moleculares de la patología.

Siguiendo esta estrategia, el objetivo principal de esta tesis de investigación ha sido desarrollar una línea mutante de pez cebra para el gen *auts2a*, ortólogo del gen humano *AUTS2*. Este gen se identificó y se caracterizó como gen candidato a autismo en el año 2002 y desde entonces, se han descrito múltiples variaciones estructurales del mismo en pacientes de TEA, e incluso en otras enfermedades psiquiátricas o del neurodesarrollo, como esquizofrenia, depresión, epilepsia, discapacidad intelectual o trastorno de déficit de atención e hiperactividad. En el cerebro, y a nivel citoplasmático, la proteína *AUTS2* está involucrada en la motilidad y morfogénesis celular mediante la reorganización del citoesqueleto, promoviendo la correcta migración neuronal y la proyección axonal. A nivel nuclear, la principal función del gen *AUTS2* es la regulación de la transcripción génica de numerosos genes implicados en el neurodesarrollo, formando parte del complejo denominado PRC1 (del inglés, *Polycomb repressive complex type 1*), que resulta fundamental para la correcta diferenciación neuronal.

Se han desarrollado otros modelos para este gen, tanto celulares como animales, que han revelado, entre otras características, anormalidades en formación, extensión y ramificación de las neuritas o en la migración y elongación de las neuronas corticales, desregulación en el balance de señales inhibitoras/ excitadoras, disminución generalizada de neuronas en el cerebelo y también disminución del tamaño y peso corporal, microcefalia y anormalidades mandibulares. No obstante, se hace necesaria la generación de un modelo estable y a largo plazo para *auts2a* en pez cebra que permita su validación funcional, así como la identificación de alteraciones celulares y moleculares y muy especialmente, transcryptómicas, que aporten datos acerca de la fisiopatología asociada a mutaciones en dicho gen.

Un aspecto crucial en el desarrollo de líneas mutantes mediante CRISPR/Cas9 es la optimización de tiempos y costes, a lo que en esta tesis se ha dado especial relevancia, principalmente a través del desarrollo y validación de distintas estrategias para el genotipado de las distintas generaciones de individuos mutantes, incluyendo la clásica secuenciación Sanger, pero también análisis de fragmentos o análisis de heterodúplex en gel de poliacrilamida. De igual importancia es la validación de la eficiencia del *knock-out* del gen, por lo que en la presente tesis se ha hecho hincapié en dicha comprobación y se ha establecido como segundo objetivo general, en primer lugar, mediante la comprobación *in silico* de la potencial producción de codones de parada prematuros (PSC, del inglés, *Premature Stop Codons*). Asimismo, se ha realizado la comprobación tanto a nivel transcriptómico, mediante PCR cuantitativa e hibridación *in situ*, pues se esperaba la participación del *nonsense-mediated mRNA decay* (NSMD) y la eliminación del ARN mensajero, como proteómico mediante Western Blot con el fin de comprobar los efectos de la mutación en la traducción de la proteína.

Como tercer objetivo principal se ha propuesto la caracterización a nivel fenotípico de los mutantes, principalmente mediante técnicas de imagen, evaluando características morfológicas tales como el tamaño de la cabeza, de los ojos, del cuerpo e incluso de estructuras cartilaginosas de la región mandibular. Asimismo, se han evaluado procesos de

apoptosis, con especial atención en la región cefálica y anomalías en la locomoción en general, lo que podría explicarse o por disfunciones motoras o bien por una desregulación del balance excitatorio/ inhibitorio.

El cuarto objetivo principal ha sido la caracterización a nivel transcriptómico de los individuos mutantes, por lo que se seleccionaron una serie de genes cuya expresión podría estar afectada en los individuos mutantes. Dicha desregulación se puede relacionar con alteraciones en los procesos biológicos en los que dichos genes están implicados, y a su vez con parte de los signos y/o síntomas observados en pacientes. Los genes fueron seleccionados por ser reguladores o regulados por *AUTS2*, por estar implicados en enfermedades del neurodesarrollo, en el PRC1 o en NSMD, por ser marcadores específicos cerebelares, de sinapsis glutamatérgicas o gabaérgicas, de neuroglia, de pluripotencia, de diferenciación neuronal o de activación neuronal. Además de una delicada selección de los genes en base a la homología entre el gen humano y el de pez cebra, se ha prestado gran atención al funcionamiento correcto de los cebadores diseñados para maximizar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Conocidas las alteraciones y el significado biológico que la disrupción del gen provoca, se pretende, en último término, establecer a *auts2a* como potencial diana terapéutica para la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, sirviendo el pez cebra como plataforma de estudio a gran escala. Todo ello permitiría una mejora en el consejo genético y en las terapias y tratamientos, lo que redundaría, finalmente, en una mejora de la calidad de vida de los pacientes y sus familiares.

RESUMO

RESUMO

Os Trastornos do Espectro Autista (TEA ou ASD polas súas siglas en inglés, *Autism Spectrum Disorders*) fan referencia a un conxunto de enfermidades complexas do neurodesenvolvemento caracterizadas polo deterioro persistente das habilidades comunicativas, as habilidades ocupacionais e a reciprocidade socioemocional. Tamén son características a presenza de comportamentos e intereses restritivos e repetitivos e a insistencia na monotonía. Os primeiros síntomas ocorren nos primeiros períodos de desenvolvemento, aínda que o trastorno pode non manifestarse plenamente ata que as demandas sociais ou intelectuais superan as capacidades limitadas, e a sintomatoloxía se presenta con distintos graos de intensidade e gravidade. Os individuos tamén poden ter manifestacións físicas como epilepsia, problemas cardiovasculares e intestinais, hipotonía, disfunción inmunolóxica ou insomnio. As características mencionadas constitúen a base fundamental do diagnóstico, aínda que este tamén pode incluír probas neurolóxicas, probas médicas físicas e tamén probas xenéticas. Actualmente, o tratamento está dirixido principalmente a reducir os síntomas presentes nos individuos mediante terapias psicosociais, farmacolóxicas e de medicina natural.

As manifestacións observadas teñen a súa orixe en anomalías na anatomía e conectividade de varias partes do cerebro así como na migración neuronal, que á súa vez se deben a unha ampla gama de factores de risco prenatais, perinatais e posnatais, tanto xenéticos como ambientais. En relación á contribución xenética, descifrar o impacto individual de cada factor de risco foi unha tarefa ardua para os investigadores, aínda que os estudos de asociación, as melloras na secuenciación e, a nivel experimental, os avances nos sistemas de edición do xenoma, permitiron delimitar un número importante de xenes candidatos. En concreto, a tecnoloxía CRISPR/Cas9 aplicouse con éxito para xerar modelos mutantes para estes xenes candidatos, permitindo así establecer relacións fenotipo-xenotipo e explicar a fisiopatoloxía da enfermidade.

Neste sentido, o peixe cebrá (*Danio rerio*) consolidouse nos últimos anos como un modelo idóneo para o estudo de trastornos do neurodesenvolvemento, como o TEA, polas súas características únicas, entre as que destacan: fácil mantemento, ciclo vital e reprodución curta, fecundación externa e transparencia dos embrións e larvas e moi especialmente, a alta homoloxía a nivel xenómico co ser humano, xa que o 70% dos xenes humanos teñen ortólogo no peixe cebrá, sendo o 80% deles, xenes relacionados con enfermidades humanas. Así mesmo, os procesos básicos implicados no neurodesenvolvemento están moi conservados entre humanos e peixe cebrá, e hai unha alta homoloxía estrutural en varias partes do cerebro. Deste xeito, no peixe cebrá xeráronse múltiples modelos xenéticos para o estudo de xenes

candidatos, que permitiron recapitular moitos dos signos e síntomas observados nos pacientes e desentrañar así as bases biolóxicas, celulares e moleculares da patoloxía.

Seguindo esta estratexia, o obxectivo principal desta tese de investigación foi desenvolver unha liña mutante de peixe cebra para o xene *auts2a*, ortólogo ao xene humano *AUTS2*. Este xene foi identificado e caracterizado como xene candidato para o autismo no ano 2002 e dende entón, describíronse múltiples variacións estruturais do mesmo en pacientes con TEA, e mesmo noutras enfermidades psiquiátricas ou do neurodesenvolvemento, como esquizofrenia, depresión, epilepsia, discapacidade intelectual ou Trastorno de déficit de atención e hiperactividade. No cerebro, e a nivel citoplasmático, a proteína *AUTS2* está implicada na motilidade celular e na morfoxénese mediante a reorganización do citoesqueleto, promovendo a correcta migración neuronal e a proxección axonal. A nivel nuclear, a función principal do xene *AUTS2* é a regulación da transcrición xénica de numerosos xenes implicados no neurodesenvolvemento, formando parte do complexo denominado PRC1 (*Polycomb repressive complex type 1*), que é esencial para unha correcta diferenciación neuronal.

Para este xene desenvolvéronse outros modelos, tanto celulares como animais, que revelaron, entre outras características, anomalías na formación, extensión e ramificación de neuritas ou na migración e elongación das neuronas corticais, desregulación no equilibrio dos sinais inhibitorios/ excitatorio, diminución xeneralizada das neuronas no cerebelo e tamén diminución do tamaño e peso corporal, microcefalia e anomalías da mandíbula. Non obstante, é necesario xerar un modelo estable e a longo prazo para *auts2a* en peixe cebra que permita a súa validación funcional, así como a identificación de alteracións celulares e moleculares, e especialmente, transcriptómicas, que proporcionen datos sobre a fisiopatoloxía asociada ás mutacións no devandito xene.

Un aspecto crucial no desenvolvemento de liñas mutantes mediante CRISPR/Cas9 é a optimización de tempo e custos, ao que se lle deu especial relevancia nesta tese, fundamentalmente a través do desenvolvemento e validación de diferentes estratexias para o xenotipado das distintas xeracións. individuos mutantes, incluíndo a secuenciación clásica de Sanger, pero tamén a análise de fragmentos ou a análise heterodúplex en xel de poliacrilamida. De igual importancia é a validación da eficiencia do *knock-out* do xene, polo que nesta tese se fixo fincapé en dita verificación e se estableceu como segundo obxectivo principal, en primeiro lugar, a través da comprobación *in silico* da produción potencial de codóns de parada prematura (PSC, do inglés *Premature Stop Codons*). Así mesmo, realizouse a verificación tanto a nivel transcriptómico mediante PCR cuantitativa como hibridación *in situ*, xa que se esperaba a participación do *nonsense-mediated mRNA decay* (NSMD) e a eliminación do ARN mensaxeiro, como proteómica mediante Western Blot para verificar os efectos da mutación na tradución da proteína.

Como terceiro obxectivo principal, propúxose a caracterización a nivel fenotípico dos mutantes, principalmente mediante técnicas de imaxe, avaliando características morfolóxicas como o tamaño da cabeza, ollos, corpo e mesmo estruturas cartilaxinosas da rexión mandibular. Así mesmo, avaliáronse os procesos de apoptose, con especial atención á rexión

cefálica e as anomalías da locomoción en xeral, que se poden explicar ben por disfuncións motoras ou por unha desregulación do equilibrio excitador/inhibitorio.

O cuarto obxectivo principal foi a caracterización a nivel transcriptómico dos individuos mutantes, para o que se seleccionaron unha serie de xenes cuxa expresión podería verse afectada nos individuos mutantes. Dita desregulación pode estar relacionada con alteracións dos procesos biolóxicos nos que están implicados os devanditos xenes, e á súa vez con parte dos signos e/ou síntomas observados nos pacientes. Os xenes foron seleccionados por ser reguladores ou regulados por *AUTS2*, por estar implicados en enfermidades do neurodesenvolvemento, *PRC1* ou *NSMD*, por ser marcadores específicos de sinapses cerebelosas, glutamatérxicas ou gabaérxicas, neuroglía, pluripotencia, diferenciación neuronal ou activación neural. Ademais dunha coidada selección de xenes baseada na homoloxía entre o xene humano e do peixe cebrá, prestouse gran atención ao correcto funcionamento dos cebadores deseñados para maximizar a fiabilidade dos resultados obtidos.

Coñecendo as alteracións e o significado biolóxico que provoca a interrupción do xene, preténdese, en definitiva, establecer a *auts2a* como unha diana terapéutica potencial para a busca e desenvolvemento de novas estratexias terapéuticas, servindo ao peixe cebrá como plataforma de estudo a gran escala. Todo iso permitiría unha mellora no asesoramento xenético e nas terapias e tratamentos, que redundará en definitiva nunha mellora da calidade de vida dos pacientes e dos seus familiares.

SUMMARY

SUMMARY

Autism Spectrum Disorders (ASD) refer to a set of complex neurodevelopmental diseases characterized by persistent deterioration in communication skills, occupational skills and socio-emotional reciprocity. The presence of restrictive and repetitive behaviors and interests and the insistence on monotony are also characteristic. The first symptoms occur in early periods of development, although the disorder may not fully manifest until social or intellectual demands exceed limited capacities, and symptoms present with varying degrees of intensity and severity. Individuals may also have physical manifestations such as epilepsy, cardiovascular and intestinal problems, hypotonia, immune dysfunction, or insomnia. The characteristics mentioned constitute the fundamental basis of the diagnosis, although this may also include neurological tests, physical medical tests and also genetic tests. Currently, treatment is mainly aimed at reducing the symptoms present in individuals through psychosocial, pharmacological and natural medicine therapies.

The observed manifestations have their origin in abnormalities in the anatomy and connectivity of various parts of the brain as well as in neuronal migration, which are, in turn, due to a wide range of prenatal, perinatal and postnatal risk factors, both genetic and environmental. Regarding the genetic contribution, deciphering the individual impact of each risk factor has been an arduous task for researchers, although association studies, improved sequencing and, at an experimental level, advances in genome editing systems have made it possible to delimit a significant number of candidate genes. Specifically, CRISPR/Cas9 technology has been successfully applied to generate mutant models for these candidate genes, thus allowing to establish phenotype-genotype relationships and explain the pathophysiology of the disease.

In this sense, the zebrafish (*Danio rerio*) has been established in recent years as an ideal model for the study of neurodevelopmental disorders, such as ASD, due to its unique characteristics, among which are: easy maintenance, short life and reproductive cycles, external fertilization, transparency of the embryos and larvae and especially, the high homology at the genomic level with the human being, since 70% of human genes have an orthologue in zebrafish, being 80% of them , human disease- related genes. Likewise, the basic processes involved in neurodevelopment are highly conserved between humans and zebrafish, and there is a high structural homology in various parts of the brain. In this way, multiple genetic models have been generated in zebrafish for the study of candidate genes, which have made it possible to recapitulate many of the signs and symptoms observed in patients and thus, unravel the biological, cellular and molecular bases of the pathology.

Following this strategy, the main objective of this thesis has been to develop a zebrafish mutant line for the *auts2a* gene, orthologous to the human gene *AUTS2*. This gene was

identified and characterized as a candidate gene for autism in 2002 and since then, multiple structural variations have been described in ASD patients, and even in other psychiatric or neurodevelopmental diseases, such as schizophrenia, depression, epilepsy, intellectual disability or attention deficit hyperactivity disorder. In the brain, and at the cytoplasmic level, the AUTS2 protein is involved in cell motility and morphogenesis through the reorganization of the cytoskeleton, promoting correct neuronal migration and axonal projection. At the nuclear level, the main function of the *AUTS2* gene is the regulation of gene transcription of numerous genes involved in neurodevelopment, forming part of the complex called PRC1 (Polycomb repressive complex type 1), which is essential for correct neuronal differentiation.

Other models, both cellular and animal, have been developed for this gene and they have revealed, among other characteristics, abnormalities in the formation, extension and branching of neurites or in the migration and elongation of cortical neurons, imbalance of inhibitory/excitatory signals, generalized decrease of neurons in the cerebellum and also decreased body size and weight, microcephaly and jaw abnormalities. However, it is necessary to generate a stable and long-term model for *auts2a* in zebrafish that allows its functional validation, as well as the identification of cellular and molecular alterations and, especially, transcriptomic alterations, which could provide data about the pathophysiology associated with mutations in such gene.

A crucial aspect in the development of mutant lines using CRISPR/Cas9 is the optimization of time and costs, to which special relevance has been given in this thesis, mainly through the development and validation of different strategies for the genotyping of the different mutant generations, including classical Sanger sequencing, but also fragment analysis or polyacrylamide gel heteroduplex analysis. Of equal importance is the validation of the efficiency of the gene knock-out, so in this thesis emphasis has been placed on such verification and it has been proposed as a second main objective, in the first place, through *in silico* verification of the potential production of premature stop codons (PSC). Likewise, verification has been carried out both at the transcriptomic level by means of quantitative PCR and *in situ* hybridization, since the participation of nonsense-mediated mRNA decay (NSMD) and the elimination of mRNA were expected, as well as proteomic by Western Blot in order to verify the effects of the mutation in the translation of the protein.

As a third main objective, the characterization at the phenotypic level of the mutants has been proposed, mainly by means of imaging techniques, evaluating morphological characteristics such as the size of the head, eyes, body and even cartilaginous structures of the mandibular region. In addition, apoptosis processes have been evaluated, with special attention to the cephalic region and abnormalities in locomotion in general were monitored, which could be explained either by motor dysfunctions or by a deregulation of the excitatory/inhibitory balance.

The fourth main objective has been the characterization of the mutant individuals at the transcriptomic level, for which a series of genes whose expression could be affected in the mutant individuals were selected. Such deregulation can be related to alterations in the biological processes in which those genes are involved and in turn, with part of the signs and/or symptoms observed in patients. The genes were selected for being regulators or

regulated by *AUTS2*, for being involved in neurodevelopmental diseases, PRC1 or NSMD, for being specific markers for cerebellar, glutamatergic or gabaergic synapses, neuroglia, pluripotency, neuronal differentiation or neural activation. In addition to a careful selection of genes based on the homology between the human and zebrafish gene, great attention has been paid to the correct functioning of the primers designed to maximize the reliability of the results obtained.

By understanding the alterations and the biological significance that the disruption of the gene cause, it is intended, ultimately, to establish *auts2a* as a potential therapeutic target for the search and development of new therapeutic strategies, serving the zebrafish as a large-scale study platform. All this would allow an improvement in genetic counseling and in therapies and treatments, which ultimately results in an improvement in the quality of life of patients and their relatives.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El cuidado, mantenimiento y uso, así como los procedimientos descritos en pez cebra se realizaron de acuerdo con la normativa actual (Real Decreto 53/2013) y con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Santiago conforme a los protocolos estándar (Directiva 2010-63-UE). Todos ellos se llevaron a cabo en el animalario del Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, en la Facultad de Veterinaria, Lugo (EA-LU-003), con código REGA de autorización ES270280346401. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo por Alba Pensado López, capacitada para las funciones A, B y C de experimentación animal con peces, anfibios y roedores.

1.1. MANTENIMIENTO DEL PEZ CEBRA

Siguiendo las directrices establecidas, los peces de la línea salvaje tipo AB, de aquí en adelante denominados como WT (del inglés *wild type*), así como las líneas mutantes, se mantienen en el animalario en peceras de 3, 10 o 50 litros, en condiciones estables, con una temperatura de 28,5°C, pH 7 y conductividad de 600 μ S aproximadamente. Para el correcto acondicionamiento y mantenimiento de los animales, el agua del sistema adaptado al pez cebra recircula a través de un circuito de ósmosis inversa cerrado para su renovación constante. Así, el agua se incorpora a un primer filtro mecánico (guata), pasa con posterioridad a un filtro químico (carbón activo), luego a otro filtro mecánico (malla) y por último a un filtro biológico, compuesto de bolas biológicas en donde habitan bacterias nitrificantes. Finalmente, y antes de reincorporarse de nuevo al sistema de canalización, pasa por un filtro de luz ultravioleta. Se establece un ciclo de luz y oscuridad de 14 y 10 horas respectivamente. Los animales se alimentan preferentemente con pienso de distinto tamaño de grano, dependiendo de la edad de los mismos, así como de *Artemia salina*, un crustáceo de pequeño tamaño altamente nutritivo.

1.2. OBTENCIÓN DE HUEVOS DE PEZ CEBRA

Para la obtención de huevos de pez cebra para su posterior uso, los peces deben ser estimulados emulando las condiciones de la naturaleza. Para ello y de forma general, la noche anterior los peces se disponen en peceras especiales para la puesta, denominadas parideras, cuyo fondo formado por un entramado rugoso semeja los cantos rodados típicos de su hábitat natural. De esta forma, y como se describe en el apartado 2.2 de la introducción, con el estímulo lumínico de la mañana, comienza el proceso de apareamiento. En los casos en que se requirió la obtención de huevos sincrónicos, es decir, conocer exactamente el momento de

puesta y fecundación, los machos y las hembras se separaron mediante un separador físico, dentro de la misma pecera, que se retiró a primera hora de la mañana, coincidiendo con el estímulo lumínico, entrando machos y hembras en contacto e iniciando la fecundación. Una vez comenzada la puesta y pasados aproximadamente 10 minutos, para asegurar la fecundación, los huevos se recogen. Para ello se filtra en agua de la pecera a través de un colador de tamaño de poro apropiado, de forma que los huevos queden retenidos. Tras ello, se coloca el colador en orientación inversa sobre una placa de Petri y se vierte sobre el mismo agua de ósmosis inversa, lo que hace que los huevos pasen a la placa junto con el agua.

2. GENERACIÓN DE UNA LÍNEA MUTANTE PARA EL GEN *AUTS2A* MEDIANTE CRISPR/CAS9

La generación de la línea mutante mediante el sistema CRISPR/Cas9 en pez cebra se realizó en colaboración con la Dra. Ana Fernández Miñán, responsable del servicio de Genómica Funcional del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CSIC – Universidad Pablo Olavide.

2.1. SELECCIÓN DE *AUTS2*, VALIDACIÓN DE SU ORTÓLOGO EN PEZ CEBRA

El gen *AUTS2* fue seleccionado para investigar su implicación en TEA por el grupo del Dr. Ángel Carracedo Álvarez de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, tras encontrar de forma recurrente mediante análisis genómicos y exómicos, mutaciones de diversa naturaleza en individuos con perfiles sintomáticos concordantes con TEA (Comunicación personal).

Para el desarrollo de la línea mutante en pez cebra se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos; que existiese un ortólogo en humanos, con homología de al menos un 40% y que los parálogos de pez cebra tuviesen menos de un 60% de homología entre ellos. Para la determinación de la existencia de un ortólogo de *AUTS2* en pez cebra así como la existencia de parálogos se consultaron las bases de datos *ENSEMBL*²⁰² y *ZFIN*²¹⁷, mientras que para determinar la homología nucleotídica y aminoacídica de las principales isoformas se utilizaron las herramientas *Nucleotide BLAST* y *Protein BLAST*²¹⁸, respectivamente.

2.2. DISEÑO Y SÍNTESIS DE LOS ARNsg

Para el diseño de los ARNsg se utilizó la herramienta *CRISPRscan*²¹⁹. Para su selección se priorizó la puntuación que el programa les asigna basándose en la especificidad de los mismos a la región diana del genoma (que debe contener una región PAM) y en la posibilidad de uniones inespecíficas. Asimismo, se priorizaron aquellos ARNsg dirigidos a exones cuya secuencia aminoacídica presente el mayor índice de homología con los humanos, siendo en este caso el exón 9 de la principal isoforma (*ENSDART00000129369.3*) (Figura 12), pero teniendo en cuenta que deben presentar complementariedad con todas las isoformas.

a) Secuencia nucleotídica del exón 9 de <i>auts2a</i> en pez cebra					
AACAAAGACATTCTCCGGCAGGAATTAACACTCGTTTCCTGGCATCTCAGAGTGCTGATCGTGGGGCATCACTGGGTCCC CCTCCATACTTGCGGACTGAGTTCCACCAGCATCAGCACCAGCATCAGCATCAGCACCAGCACACACACCAACACACACAC CAGCACACCTTCACCCCTTCCCCACGCCATCATGCCACGCCTGCACCGCCCATGGTGCGTACCCAGCCAGAAAT					
b) Secuencia aminoacídica del exón 9 de pez cebra frente a la secuencia de humano					
Humano	1	QDILRQELNTRFLASQSADRGASLGPPPYLRTEFHQHQHQ	----	HQHTHQHTHQHTFTPF	56
Pez cebra	1	QDILRQELNTRFLASQSADRGASLGPPPYLRTEFHQHQHQ	HQHT	HQHTHQHTHQHTFTPF	60
Humano	57	PHAI	PPTAIMPTPAPPM	-----	73
Pez cebra	61	PH	-----	AIMPTPAPPMVRT	PARN 79

Figura 12. Análisis del exón 9 de pez zebra. a) Secuencia nucleotídica del exón 9 de la isoforma principal de pez cebra (ENSDARE00001012383; 27,195,284-27,195,046; b) Comparación de la secuencia aminoacídica resultante de la transcripción entre humano y pez cebra.

Una vez se seleccionó el ARNsg óptimo de 20 pb añadió a al extremo 5' del mismo la secuencia de reconocimiento para la enzima de transcripción correspondiente, en este caso, polimerasa T7, de 17 pb y al extremo 3' se añadió una secuencia de 15 pb complementaria al llamado cebador o *primer* universal¹⁶⁹, que permite amplificar el ARNsg y conferir al mismo un extremo 3' constante. La secuencia del mismo, en dirección 5' → 3' es la siguiente: AAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGC TATttctagctctaaaac.

Asimismo, una vez se estableció la región a la que se dirigiría el ARNsg, se diseñaron los cebadores directo e reverso (*forward* y *reverse*) para la secuenciación, mediante la herramienta *Primer BLAST*²¹⁸, siendo las secuencias CGGCAGGAATTAACACTCG y GCACACATGGAAATCAAATGC, respectivamente, delimitando un amplicón de 557 pb. Todos los cebadores utilizados en la presente tesis se pidieron a la casa comercial Sigma.

2.2.1. PCR

El primer paso en la síntesis de los ARNsg fue la amplificación del fragmento mediante PCR con el kit *iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase* (Bio-Rad). Para cada reacción se usaron 5 µl de tampón HF 5X, 1,25 µl de dNTPs 2 mM, 1 µl de ARNsg 10 µM, 1 µl de cebador universal 10 µM, 0,25 µl de Taq poli PROOF 2 U/µl y 16,5 µl de agua Milli-Q. Para la reacción de termociclado, se estableció una fase de desnaturalización inicial a 98°C durante 3 minutos, 30 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 98°C, hibridación de 30 segundos a 45°C y elongación de 20 segundos a 72°C, y una fase de elongación final de 5 minutos a 72°C. Todos los procesos de termociclado descritos en la presente tesis se realizaron, indistintamente, en los termocicladores *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) o *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems), a no ser que se indique lo contrario.

2.2.2. Electroforesis en gel de agarosa

La comprobación de la correcta amplificación de los ARNsg se realizó mediante análisis en gel de agarosa (iNtRON Biotechnology) al 1% en tampón Tris-Acetato-EDTA 0,5% (TAE, Invitrogen) y con tinción de *SYBR[®] Safe DNA Gel Stain 10000X* (Invitrogen). Para la preparación de las muestras se añadió azul de bromofenol 10% al producto de amplificación y para preparar el marcador de peso molecular se añadió azul de bromofenol y agua Milli-Q al estándar de tamaño *GeneRuler-100bp 1 µg/µl* (ThermoFisher). Los geles se corrieron en cubetas horizontales con TAE 0,5X a 100-120 voltios (V). Los resultados se visualizaron mediante un transiluminador y fotografiaron con una cámara conectada al programa informático *Kodak Digital Science 1D*.

2.2.3. Purificación de la reacción de PCR

Tras comprobar que la reacción de amplificación se realizó con éxito, dicha reacción se purificó con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del proveedor. Para asegurar que en la purificación no se produjo pérdida de material, el producto se comprobó de nuevo en gel de agarosa siguiendo los pasos descritos en el anterior apartado.

2.2.4. Transcripción *in vitro* y purificación

Para la transcripción del producto de PCR a ARN se utilizó el *kit MAXIscript T7 Transcription* (Invitrogen), añadiendo 3 µl de agua Milli-Q, 3 µl de producto de PCR, 1 µl de tampón de transcripción 10X, 1 µl de mezcla de enzimas 15 U/µl y 0,5 µl de cada uno de los ribonucleótidos 10 mM (rATP, rGTP, rCTP y rUTP). Las muestras se incubaron a 37°C durante toda la noche (ON, del inglés *overnight*). Tras dicha incubación se añadieron 1,5 µl de DNasa Turbo 2 U/µl para eliminar restos de ADN, y se incubó a 37°C durante 30 minutos más.

Al finalizar la incubación con la DNasa el producto de transcripción se purificó añadiendo 2 µl de EDTA 0,5 M para parar la reacción, 5 µl de cloruro de litio (LiCl) 5 M para eliminar ribonucleótidos libres y 150 µl etanol (EtOH, Sigma) 100% frío y se precipitó a -80°C durante 3 horas y 45 minutos. Tras ello, las muestras se centrifugaron 30 minutos a 13.000 revoluciones por minuto (rpm), se lavaron dos veces con 200 µl de EtOH 70% durante 20 minutos, y finalmente se resuspendieron en 15 µl de agua libre de nucleasas. Como se describe anteriormente, la verificación de que la purificación no dio lugar a la pérdida de material se realizó mediante comprobación en gel de agarosa y la cuantificación de la concentración de las muestras se realizó en el espectrofotómetro *NanoDrop-1000* (ThermoFisher).

2.3. INYECCIÓN DE LOS ARNsg EN EL ESTADÍO DE UNA CÉLULA DEL EMBRIÓN DE PEZ CEBRA

La inyección de los ARNsg se realizó en huevos de pez cebra recién fertilizados, para cuya obtención los machos y hembras se separaron la noche anterior tal y como se describe en

el apartado 1.2. La mezcla de inyección se preparó con 1 μl del ARNsg a 160 ng/ μl , 1 μl de Cas9 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 0,4 μl de rojo fenol, un colorante inocuo para los embriones, para así poder visualizar la correcta introducción en el huevo. La mezcla se cargó en agujas de microinyección de diámetro externo de 1 mm y microfilamento interno de 0.58 mm (A-M Systems), que a su vez se colocaron en un micromanipulador conectado al microinyector *Narishige IM-31*, al que se le proporciono presión mediante una bomba de nitrógeno. En cuando a los parámetros de inyección, la presión de balance se mantuvo en torno a 2,5-3 kilo Pascales (kPa), la presión de inyección a aproximadamente 30 kPa y el volumen inyectado fue de 1-3 nanolitros (nl) por cada huevo. Tras las inyecciones, los individuos (generación F0) se pasaron a placas de Petri de 90x15 mm con agua de ósmosis inversa y se mantuvieron a 28,5°C hasta su análisis a las 48 hpf. Se incubaron asimismo, individuos sin inyectar que sirvieron de control.

2.4. GENOTIPADO DE LOS EMBRIONES DE LA GENERACIÓN F0

2.4.1. Extracción de ADN

A las 48 hpf se realizó la extracción de ADN de los embriones, estableciéndose conjuntos de 10 individuos por cada 100 individuos inyectados, así como de los individuos control, mientras que el resto de individuos se mantuvieron para su cría. Para ello, tras aplicarles una sobredosis de anestésico tricaina 0,03% (Sigma), se incluyeron en 125 μl de la resina quelante *Chelex[®]-100* (Bio-Rad) al 10% y se incubaron 15 minutos a 100°C, tras lo que se añadieron 3,8 μl de Proteinasa K a 20 mg/ml (Roche) y se introdujeron sometieron a una incubación de 1 hora a 56°C y 15 minutos a 100°C. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

2.4.2. PCR, electroforesis en gel de agarosa, purificación y cuantificación

La mezcla de reacción se preparó con 8,6 μl de agua Milli-Q, 1,5 μl de tampón 10X, 1,05 μl de cloruro de magnesio (MgCl_2) 25 mM, 0,75 μl de desoxirribonucleótidos tri-fosfato (dNTPs) 2 mM, 1 μl de cada cebador, 0,1 μl de Taq polimerasa 5 U/ μl y 1 μl de ADN. Las muestras se introdujeron en el termociclador, en el que se estableció una fase de desnaturalización de 10 minutos a 95°C y una fase de amplificación de 35 ciclos, basada en un paso de desnaturalización de 45 segundos a 94°C, un paso de hibridación de cebadores de 50 segundos a 60°C y un paso de elongación de 1 minuto a 72°C. Finalmente se añadió una fase de elongación final de 10 minutos a 72°C y enfriamiento a 4°C. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso. La comprobación de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa, así como la purificación y cuantificación del producto de PCR se realizaron como se describe en el los apartados 2.2.2 y 2.2.3.

2.4.3. Clonación bacteriana

Debido a la imposibilidad de aplicar la secuenciación Sanger directamente a las muestras para conocer las potenciales mutaciones producidas debido al solapamiento de electroferogramas de alelos mutantes y salvajes, así como por la presencia de mosaicismo en

los embriones, se procedió a la clonación bacteriana. En este caso, el uso de la polimerasa Taq durante la reacción de PCR produjo extremos protuberantes de adenina en el extremo 3' del amplicón, lo que es compatible con una clonación de tipo TA.

2.4.3.1. Reacción de ligación

El primer paso consistió en ligar el producto de PCR con 50 ng del vector lineal con extremos protuberantes de timina (pCR[®] 2.1, 3900 pb) para lo que previamente se calculó la cantidad de producto de PCR necesario para mantener una relación apropiada entre el inserto y vector (Ecuación 1), resultando en una cantidad de 21,42 ng. Para las reacciones de ligación se mezclaron 2 µl de vector pCR[®] 2.1 a 25 ng/µl, 1 µl de tampón de reacción de T4 ADN ligasa 10X (NEB), 0,83 µl de T4 ADN ligasa 400.000 U/ml (NEB), 5,17 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de inserto a 21,42 ng/µl. Se incluyó un control negativo de la reacción, en el que se añadió agua en lugar del inserto y un control positivo, en el que se utilizó como inserto un ADN control proporcionado por el *kit The Original TA Cloning* (Invitrogen). Las reacciones se incubaron a 10 minutos a temperatura ambiente (RT, del inglés *Room Temperature*) y tras ello, 10 minutos a 65°C para inactivar la ligasa. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

Ecuación 1. Fórmula empleada para el cálculo de la cantidad de inserto necesario

$$\text{ng inserto} = 3 * \left[\frac{(557 \text{ bp inserto}) * (50 \text{ ng vector})}{3900 \text{ pb vector}} \right]$$

2.4.3.2. Transformación bacteriana

Para la inserción del vector con el inserto se utilizaron bacterias competentes comerciales (*Escherichia coli* NEB[®] 5-*a* competentes de alta eficiencia). Se mezclaron 25 µl de células competentes con 2 µl de producto de ligación y se incubaron en hielo durante 30 minutos, tras lo que se aplicó un choque térmico de 30 segundos a 42°C. Las muestras se pasaron a hielo durante 5 minutos y a continuación se añadieron 250 µl de medio líquido de crecimiento SOC (NEB) y se mantuvieron 1 hora 37°C con agitación constante para estimular la multiplicación bacteriana. Las muestras se centrifugaron 3 minutos a 3.000 rpm y se retiró el sobrenadante, excepto 75 µl, en los que se resuspendió el sedimento de bacterias. Las bacterias se sembraron en placas de medio LB agar con ampicilina 100 µg/ml, X-Gal 80 µg/ml e IPTG 0,3 mM y se incubaron a 37°C ON. Las bacterias transformadas son resistentes a ampicilina, pues el vector contiene un gen de resistencia, y asimismo, presentaran coloración blanca por la disrupción del gen lacZ.

2.4.3.3. PCR de colonias y electroforesis en gel de agarosa

Una vez se seleccionaron las colonias de coloración blanca, cada una de ellas se recogió de la placa con ayuda de una punta blanca de micropipeta y se diluyó en 10 µl de

agua Milli-Q. De estas diluciones se utilizó 1 µl para la reacción de PCR, que se estableció y posteriormente se analizó tal y como se describe en el apartado 2.4.2.

2.4.4. Secuenciación Sanger o dideoxi

2.4.4.1. Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron sometidos a una purificación enzimática basada en la exonucleasa I y la fosfatasa alcalina de gamba (SAP, del inglés *Shrimp Alkaline Phosphatase*). Para ello, 10 µl de los productos de amplificación se trataron con 0,03 µl de la exonucleasa I 20 U/µl (ThermoFisher), 0,3 µl de SAP 1 U/µl (Sigma) y 1,67 µl de agua Milli-Q, y se incubaron a 60°C durante 1 hora y a 85°C durante 15 minutos.

2.4.4.2. Reacción de secuenciación

Para la secuenciación de los productos purificados se utilizó el *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) y placas de 96 pocillos (4titude). Por cada reacción se utilizaron 2 µl de tampón 5X, 0,5 µl de mezcla de reacción BDT, 1 µl de cada cebador, 2 µl de producto de PCR y 4,5 µl de agua Milli-Q. Las muestras se incubaron 1 minuto a 96°C, tras lo que se sometieron a 25 ciclos de desnaturalización de 10 segundos a 96°C, hibridación de 5 segundos a 50°C y elongación de 4 minutos a 60°C.

2.4.4.3. Purificación de la reacción de secuenciación

Las reacciones de secuenciación se purificaron mediante lavados con 10 µl de agua Milli-Q, 5 µl de EDTA 125 mM y 60 µl de EtOH 100% e incubaron 15 minutos a RT en oscuridad. Tras ello se centrifugaron 30 segundos a 4.000 rpm, el sobrenadante se descartó y se centrifugó de nuevo 1 minuto a 1.300 rpm. Se añadieron 60 µl de EtOH 70%, se centrifugó 15 minutos a 1.300 rpm, se descartó de nuevo el sobrenadante y se centrifugó una última vez 1 minuto a 1.300 rpm.

2.4.4.4. Secuenciación

Para el proceso de secuenciación se añadieron 10 µl de formamida (Applied Biosystems) a cada una de las muestras y se introdujeron en el secuenciador de 96 capilares *ABI Prism 3730 GeneticAnalyzer* (Applied Biosystems). Los datos de las secuencias obtenidas se analizaron mediante el *software CodonCode Aligner*. Para determinar *in silico* las consecuencias a nivel proteico de las mutaciones encontradas se utilizó el recurso *ExpASy-Translate Tool*^{220,221}, que entre otras cosas, permite identificar la introducción de codones prematuros de parada de la traducción (PSC, del inglés, *Premature Stop Codons*). Confirmada la presencia de mutaciones en los embriones de la F0 analizados, los individuos restantes fueron criados hasta la edad adulta.

A pesar de que para la caracterización genotípica de la generación F0 de *auts2a* se desarrolló la metodología descrita, en nuestro laboratorio, y por sugerencia del Dr. Miguel González Blanco (Grupo de Reparación del ADN e Integridad Genómica, CiMUS, Santiago

de Compostela), se comprobó que la presencia de mutaciones en los embriones puede determinarse a través de la detección de heterodúplex mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Es una estrategia rápida, sencilla y de muy bajo coste en comparación con la clonación, que aunque no permite determinar el tipo de mutación a nivel de secuencia, sí confirma que se han producido cortes en el ADN. Así, es perfectamente válida para continuar con la cría de los embriones en caso de detectar heterodúplex, ya que independientemente de que se conozca o no el tipo de mutación producida a nivel de secuencia, éstas pueden no afectar a la línea germinal y por tanto no transmitirse a la descendencia y, en caso de transmitirse, no necesariamente son del mismo tipo en la generación F1. El procedimiento para los geles de poliacrilamida y detección de heterodúplex se detalla posteriormente en el apartado 2.6.1. Un ejemplo del análisis de la F0 de CRISPR/Cas9 para otro gen desarrollado en nuestro laboratorio en donde se observa una única banda para los controles y diversos heterodúplex para los embriones inyectados se muestra en la Figura 13.

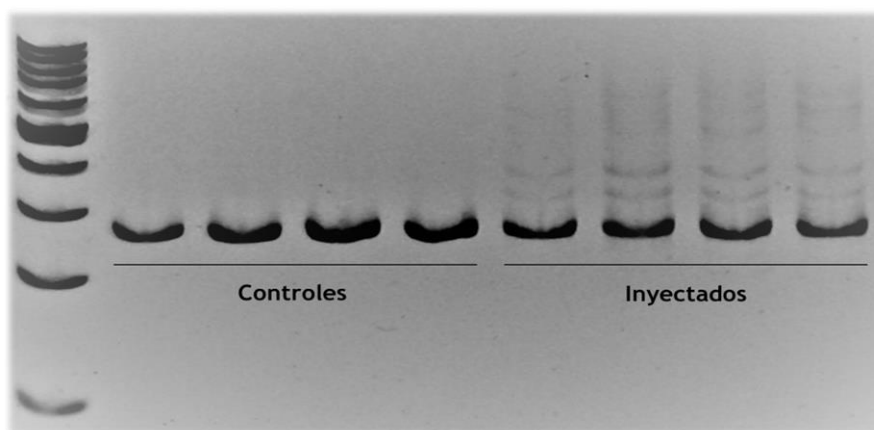


Figura 13. Ejemplo de análisis de heterodúplex mediante gel de poliacrilamida para embriones de la F0. Una única banda para los controles (carriles 2-5); heterodúplex para los individuos inyectados (carriles 6-9). Marcador de peso molecular de 100 pb.

2.5. OBTENCIÓN Y GENOTIPADO DE EMBRIONES DE LA GENERACIÓN F1

Tras haber confirmado la presencia de mutaciones en los embriones de la F0, los embriones restantes se criaron hasta la edad adulta, momento en el que se cruzó cada individuo de la F0 con un individuo WT para la obtención de la generación F1. Para el genotipado de los embriones de la F1 se hicieron conjuntos de embriones de cada una de las parejas y se siguieron los mismos pasos de extracción de ADN, PCR, comprobación en gel de agarosa, purificación, cuantificación, clonación bacteriana y secuenciación Sanger, descritos en el apartado 2.4.

De forma semejante a lo descrito anteriormente, aunque para la línea mutante CRISPR/Cas9 de *auts2a* no se realizó, en nuestro laboratorio también se determinó que un primer cribado de los adultos de la F0 se puede llevar a cabo mediante detección de

heterodúplex en gel de poliacrilamida. De esta forma pueden descartarse adultos en que la ausencia de heterodúplex indica que no portan mutación alguna en el gen, por lo que ya no se establecen cruces con WT y no se analizan los embriones de la F1, lo que supone un incremento de eficiencia a nivel de tiempo y costes. Un ejemplo del análisis de los adultos de la F0 para otro gen, en donde se observa una banda para individuos que no portan mutación y varias bandas de heterodúplex para aquellos que sí portan mutación, se muestra en la Figura 14.

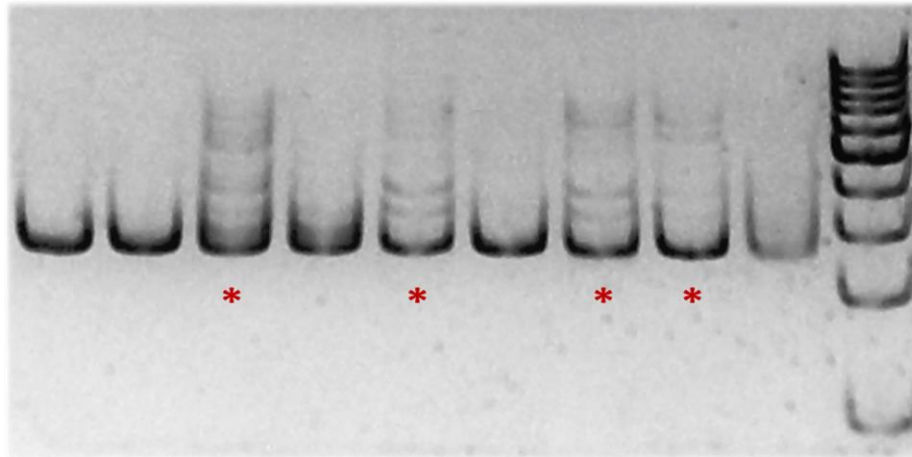


Figura 14. Ejemplo de análisis de heterodúplex mediante gel de poliacrilamida para adultos de la F0. El asterisco (*) marca individuos con presencia de heterodúplex. Marcador de peso molecular de 100 pb.

2.6. GENOTIPADO DE LOS ADULTOS DE LA GENERACIÓN F1

Confirmadas las mutaciones en los embriones de la generación F1, éstos se criaron hasta la edad adulta, momento en el que se genotiparon para determinar de forma individual si portaban o no mutación en heterocigosis en el gen *auts2a*, y en su caso, caracterizar el tipo de mutación.

2.6.1. Análisis de heterodúplex mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

Como se menciona con anterioridad, para reducir costes e incrementar la eficiencia en términos de tiempo de trabajo, un primer cribado para el genotipado de los adultos de la F1 se llevó a cabo mediante la detección de heterodúplex en gel de poliacrilamida.

2.6.1.1. Extracción de ADN, PCR y gel de agarosa

La obtención de ADN de los adultos de la F1 se realizó mediante el procedimiento de corte de aleta. Para ello, los individuos fueron anestesiados con triclaína 0,003%, tras lo que, con ayuda de unas pinzas y un bisturí, se seccionó una pequeña porción de la aleta caudal, que fue introducida en 125 µl de *Chelex*[®]-100 10% y se siguieron los pasos descritos en el apartado 2.4.1. Tras ello, se realizó la reacción de PCR y su comprobación en gel de agarosa como se describe en el apartado 2.4.2, aunque en este punto se comenzó a emplear

una nueva pareja de cebadores cuya secuencia en dirección 5'→ 3' es TGGATAGCATCCATCATCACA para el *forward*, y TCAGGTACCAGTCACCACCT para el *reverse*.

2.6.1.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se prepararon con acrilamida/bisacrilamida 29:1 30% (Bio-Rad), Tris-Borato-EDTA 5X (TBE, Invitrogen), agua destilada, persulfato de amonio 10% (Bio-Rad) 10% y tetrametiletilendiamina (TEMED, Bio-Rad). Las muestras se prepararon añadiendo 1,6 µl de azul de bromofenol a 8 µl de las mismas y los geles se corrieron en cubetas verticales con TBE 1X a 140V. Los geles se incubaron para su tinción durante 30 minutos en agitación y oscuridad en una solución de SYBR[®] *Safe DNA Gel Stain* 10000X en agua destilada. Tras ello, se realizaron dos lavados de 10 minutos en agua destilada, los resultados se visualizaron en un transiluminador y se fotografiaron.

2.6.2. Clonación bacteriana y secuenciación

Para determinar el tipo exacto de mutación una vez se realizó un primer cribado de individuos heterocigotos mediante la detección de heterodúplex, fue necesario llevar a cabo de nuevo un protocolo de clonación bacteriana y posterior secuenciación Sanger. Los pasos que se llevaron a cabo fueron los mismos que los previamente descritos en los apartados 2.4.3 y 2.4.4.

2.7. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE EMBRIONES DE LA GENERACIÓN F2

Una vez determinadas las mutaciones presentes en los adultos de la F1, se procedió a determinar el efecto de las mismas mediante el recurso *ExPASy-Translate Tool*^{220,221}, descrito anteriormente. Tras seleccionar las mutaciones de interés, se establecieron cruces entre hembras y machos de la F1 portadores del mismo tipo de mutación en heterocigosis para obtener así la generación F2, en la que según las leyes Mendelianas, se esperaba obtener una proporción del 25% de homocigotos WT, 50% de individuos heterocigotos y 25% de homocigotos mutantes. Una vez recogidas las puestas, parte de los embriones se criaron hasta la edad adulta, y con otra parte de ellos se comenzó su análisis.

2.7.1. Toma de imágenes de los embriones de la generación F2 a las 48 hpf

Para realizar una primera caracterización en busca de anomalías fenotípicas, los embriones de la F2 se anestesiaron con una dosis de triclaína, se individualizaron y se fotografiaron a las 48 hpf con la ayuda del microscopio óptico *AZ100 Multizoom* conectado a una cámara *DS-R1* (Nikon) y al programa *NIS-Elements* (versión 4.13.04), a través de una unidad de control *Nikon Digital Sight DS-U3*. Tras este paso, los embriones se sacrificaron con sobredosis de triclaína y se procedió a su corte con ayuda de un bisturí. De esta forma, la mitad superior del cuerpo se conservó en una solución estabilizadora de ARN, denominada *RNAlater* (Invitrogen), para la posterior extracción de ARN, mientras que la mitad inferior se conservó en EtOH 100%, para la posterior extracción de ADN.

2.7.2. Extracción de ADN y PCR

Para extraer el ADN de forma individual de cada una de las mitades inferiores de los embriones, se siguieron los mismos pasos que se describen en el apartado 2.4.1, con la salvedad de que en este caso se emplearon 100 μ l de *Chelex*[®]-100 10% y a continuación se añadieron 3,1 μ l de Proteinasa K 20 mg/ml. La reacción de PCR se llevó a cabo de igual forma que en el apartado 2.4.2., aunque en este punto los cebadores *forward* y *reverse* fueron sustituidos por otro par que delimitan un amplicón de 216 pb, cuyas secuencias en dirección 5'→ 3' son TCACATTCTGGCTGGGGTA y ACTCGTTTCCTGGCATCTCA, respectivamente.

2.7.3. Comprobación de la amplificación en gel de agarosa

Teniendo en cuenta que el alelo que portaba la mutación a estudiar era de un tamaño relativamente diferente al tamaño del alelo WT, se comprobó si dicha diferencia sería lo suficiente como para poder determinar individuos heterocigotos en gel de agarosa. Para ello, se prepararon los geles como se describe con anterioridad, pero añadiendo una cantidad mayor de agarosa para obtener una concentración del 2%, lo que permite discriminar con mayor eficiencia alelos de distintos tamaños. Asimismo, el voltaje al que se corrieron los geles se disminuyó hasta los 70 V. Aunque esta metodología permitió distinguir los individuos heterocigotos, la diferencia de tamaño entre el alelo mutante y el WT no era suficiente como para poder distinguir con fiabilidad entre individuos homocigotos WT e individuos homocigotos mutantes. Así, la primera solución para su distinción hubiera sido aplicar la secuenciación Sanger, pero en el laboratorio se desarrollaron dos estrategias diferentes de genotipado que supusieron un ahorro importante en tiempo y costes; el análisis de fragmentos, cuando el número de individuos es de al menos 96 y la mezcla de ADN, cuando se trata de un número reducido de individuos.

2.7.4. Análisis de fragmentos

El análisis de fragmentos permite determinar el tamaño de los productos de amplificación presentes en una muestra mediante comparación de los mismos con un estándar de tamaño, lo que requiere que ambos porten un marcaje fluorescente para poder ser detectados. Por ello, se añadió el marcaje fluorescente 6- Carboxifluoresceína (6- FAM, emisión a 522 nm) al extremo 5' del cebador, lo que permitió la adición del marcaje al producto de PCR durante la propia reacción.

Para el análisis se utilizaron placas de 96 pocillos (4titude), en cada uno de los cuales se introdujeron 0,5 μ l de producto de PCR, 8,8 μ l de formamida y 0,2 μ l del estándar de tamaño *GeneScan 500 LIZ dye* (Applied Biosystems), que contiene 16 fragmentos monocatenarios de entre 30 y 500 pb marcados con el fluoróforo LIZ (emisión a 655 nm). Las muestras fueron sometidas a un paso de desnaturalización de 3 minutos a 97°C, tras lo que se introdujeron en el secuenciador de 96 capilares *ABI Prism 3730 GeneticAnalyzer*, en donde se introduce cada muestra en un capilar con polímetro POP-7[™] (ThermoFisher) sometido a alto voltaje, lo que provoca la separación de las moléculas en función de su tamaño a la vez que un láser excita el

marcaje, emitiendo fluorescencia a distinta longitud de onda y comparando la muestra con el estándar de tamaño. El análisis de los resultados se realizó mediante el programa informático *GeneMapper*.

2.7.5. Mezcla de ADN de homocigotos problema con ADN de homocigotos WT

A menudo, el número de individuos en que no se pudo determinar mediante gel de agarosa si se trataba de homocigotos WT o mutantes no resultó suficiente como para completar una placa de 96 pocillos para su análisis de fragmentos. Así, se comprobó que con la mezcla del ADN de los individuos problema con ADN control de un individuo WT y posterior PCR y gel de agarosa se puede determinar con detalle el genotipo.

2.8. GENOTIPADO DE LOS ADULTOS DE LA GENERACIÓN F2 Y OBTENCIÓN DE LA F3

Los embriones de la F2 que se habían criado se genotiparon al llegar a la edad adulta con el fin de detectar individuos portadores de la mutación en homocigosis, y así poder obtener descendientes únicamente homocigotos en la generación F3 y evitar los pasos de genotipado. Para la caracterización genotípica de los adultos se siguió la metodología descrita en los apartados 2.7.2, 2.7.3 y 2.7.5. Los adultos homocigotos se cruzaron entre sí, de forma que parte de los individuos homocigotos de la F3 se crecieron y otra parte de los mismos se mantuvieron hasta las 48 hpf, momento en que fotografiaron y posteriormente se les practicó la eutanasia para su conservación y análisis.

En la Figura 15 se muestra un esquema de trabajo simplificado para todos los procesos de genotipado de embriones, cruces y genotipado de adultos de las distintas generaciones.

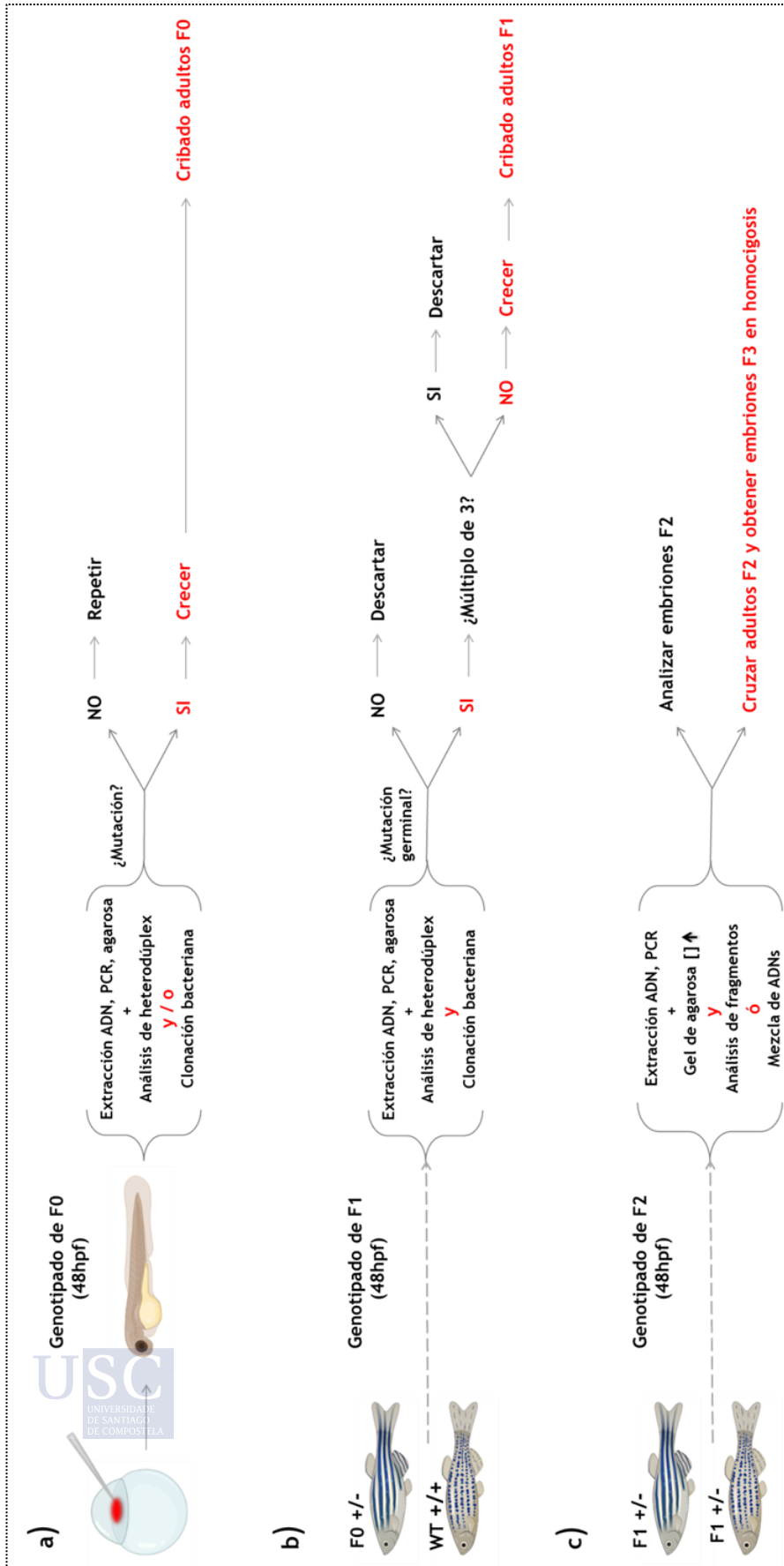


Figura 15. Representación esquemática de los procedimientos para: a) Inyección y genotipado de embriones y adultos de la F0; b) Genotipado de embriones y adultos de la F1; c) Genotipado de embriones y adultos de la F2 y obtención de la F3.

3. VALIDACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL *KNOCK-OUT* DE *AUTS2A*

A pesar de haber comprobado la potencial producción de PSC como se describe en el apartado 2.7, se llevaron a cabo tres procedimientos para determinar con seguridad la eficiencia del *knock-out* tanto a nivel transcriptómico como proteómico.

3.1. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *AUTS2A* POR QPCR

Debido a la existencia de PSCs, se espera que en las células de los individuos se ponga en marcha el denominado *nonsense-mediated mRNA decay* (NSMD), complejo responsable de la degradación de ARNm que contienen PSCs, y que por tanto se observe una disminución en los niveles de ARNm en los individuos mutantes, lo que se comprobó mediante qPCR.

3.1.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó partiendo de conjuntos de 15 cabezas procedentes de los individuos homocigotos o heterocigotos de la F2 o de 10 individuos de cuerpo entero de la F3 homocigota, así como de conjuntos de 10 individuos WT de puestas independientes, todos ellos de 48 hpf. Para ello, las cabezas o individuos previamente sacrificados se introdujeron en tubos de 1,5 ml (Axygen), se retiró el líquido sobrante, se disgregaron completamente en 500 μ l de trizol (NZYTech) y se incubaron 5 minutos a RT. Tras ello se incorporaron 100 μ l de cloroformo (Sigma) al tubo, el contenido se mezcló por inversión y se centrifugó durante 20 minutos a 13.300 rpm y 4°C. A continuación, se recuperó el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió un volumen 1:1 de isopropanol (Sigma) junto con 2 μ l de glucógeno 4 mg/ml (ThermoFisher). Para precipitar el ARN, las muestras se introdujeron a -80°C durante 1 hora tras lo que se centrifugaron a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, se lavó el *pellet* con 200 μ l de EtOH 70% y se centrifugó durante 5 minutos más, tras lo que se dejó secar el *pellet* 5 minutos a RT para posteriormente resuspenderlo en 20 μ l agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Invitrogen).

3.1.2. Tratamiento con DNasa y purificación del ARN

A cada muestra se añaden 5 μ l de tampón de DNasa 10X y 1 μ l de DNasa I 2,73 U/ μ l del *kit RNase-Free DNase Set* (Qiagen) y se incuban 10 minutos a RT, tras lo que se añade un volumen 1:1 de fenol-cloroformo (Invitrogen) y se centrifugan 10 minutos a 13.300 rpm y 4°C. Se recuperó el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadieron 3 volúmenes de EtOH 100 % y 1:10 de acetato de sodio 3 M, para a continuación precipitar el producto a -80°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 200 μ l de EtOH 70%. Se centrifugó durante 5 minutos más, se retiró el sobrenadante y se secó el *pellet* 5 minutos a RT para posteriormente resuspenderlo en 20 μ l agua DEPC. La concentración de ARN se midió en un espectrofotómetro.

3.1.3. Retrotranscripción del ARN a ADN complementario

Para la conversión del ARN extraído y purificado en ADN complementario (ADNc) se emplearon entre 1000 y 2000 ng del mismo, según la finalidad a la que se destinó el ADNc y se utilizó el *kit AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis* (Agilent). Así, se prepararon muestras de forma que contuvieran 1000-2000 ng de ARN en 12,7 μ l de agua libre de nucleasas, a los que se añadieron 3 μ l de cebadores aleatorios (0,1 μ g/ μ l) y se introdujeron en el termociclador durante 5 minutos a 65°C y 10 minutos a 18°C. Tras este paso se añadió a cada muestra 2 μ l de tampón 10X, 0,8 μ l de dNTPs 100 mM, 0,5 μ l de inhibidor de ribonucleasas *RNasa block* 40 U/ μ l y 1 μ l de transcriptasa reversa y se realizó una incubación de 10 minutos a 25°C, 1 hora a 50°C y 15 minutos a 70°C. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

3.1.4. Diseño y validación de cebadores de qPCR

Los cebadores de qPCR para *auts2a* y para el gen normalizador β -actina 2 (*actb2*) se diseñaron con ayuda del programa *Primer BLAST*²¹⁸, mientras que la pareja para el otro gen normalizador a evaluar, *eef1a1*, fue cedida por el Dr. Jose Bessa (*Vertebrate Development and Regeneration Group*, i3S, Porto). Las secuencias de los mismos, así como el tamaño de amplicón se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencias en dirección 5' \rightarrow 3' de los cebadores utilizados y tamaño de amplicón

Gen	Forward	Reverse	Tamaño de amplicón (pb)
<i>actb2</i>	ACTTCACGCCGACTCAAAC	ATCCTGAGTCAAGCGCCAAA	86
<i>eef1a1</i>	CCGCTAGCATTACCCTCC	CTTCTCAGGCTGACTGTGC	358
<i>auts2a</i>	CCCTCCATACTTGCGGACTG	TTCTGGCTGGGGTACGCA	158

Para evaluarlos, se procedió en primer lugar a realizar una reacción de PCR con cada una de las parejas tal y como se describe en el apartado 2.4.2, aunque en esta ocasión se sustituyó el ADN por 1 μ l de ADNc de WT 10 ng/ μ l y se comprobó la altura correcta de las bandas así como la ausencia de bandas inespecíficas mediante gel de agarosa.

3.1.4.1. Reacción de qPCR

A continuación, se realizó una qPCR utilizando el *kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix* (Agilent) y se establecieron 3 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas para cada una de las condiciones (WT, heterocigoto y homocigoto) y para cada pareja de cebadores. Por reacción, se añadieron 6,5 μ l de agua Milli-Q, 0,6 μ l de cada cebador 10 μ M, 0,3 μ l de *Reference Dye* 2 μ M, 10 μ l de *SYBR Green QPCR master mix* 2X y 2 μ l de ADNc a 10 ng/ μ l. Las muestras se introdujeron en el aparato *Stratagene Mx3005P* (Agilent) y se sometieron a una fase de 3 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de amplificación, compuestos por una fase de 5 segundos a 95°C y otra de 20 segundos a 60°C. Tras ello las muestras se incubaron durante 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 95°C. Los resultados obtenidos se visualizaron mediante el programa *MxPro* (versión 4.10) en el

ordenador conectado al equipo de qPCR. El análisis de los datos obtenidos para cuantificar la expresión relativa de *auts2a* en los tres grupos de individuos con respecto a los dos genes normalizadores se realizó mediante el método de doble-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) en el programa *Microsoft Excel* y el análisis estadístico para determinar la significación, establecida en $p < 0,05$ se llevó a cabo mediante la prueba T de *Student* en del programa *SPSS Statistics* (IBM). En este punto, se continuó el análisis únicamente con individuos homocigotos y se estableció el gen *actb2* como normalizador.

3.1.4.2. Rectas de calibrado

Para incrementar la fiabilidad de los resultados se procedió a realizar rectas de calibrado para los cebadores de *auts2a* y *actb2*. Para ello, se establecieron las reacciones de qPCR tal y como se describe en el apartado anterior pero usando ADNc de WT a 5 concentraciones decrecientes (diluciones 1/10), más un control con agua Milli-Q, por triplicado. Los resultados se analizaron en el programa *Microsoft Excel*, de forma que se calculó la eficiencia de los mismos así como el coeficiente de regresión lineal (R^2) a partir de la ecuación de regresión lineal. Las fórmulas utilizadas para dichos cálculos se muestran en la Ecuación 2.

Ecuación 2. Fórmulas empleadas para el cálculo de la eficiencia de las parejas de cebadores. a) Fórmula de regresión lineal, siendo m la pendiente de la línea, x la variable independiente y b la ordenada al origen ; b) fórmula de cálculo de la eficiencia; c) fórmula de cálculo del porcentaje de eficiencia.

- a) $y = mx + b$
- b) $e = 10^{(-1/m)}$
- c) $\% = (e - 1) * 100$

3.2. HIBRIDACIÓN *IN SITU* PARA EL GEN *AUTS2A*

Con el fin de determinar la localización corporal en que se expresa el gen *auts2a* así como para evaluar la disminución en los niveles de ARNm en individuos homocigotos se desarrolló la metodología de HIS.

3.2.1. Síntesis y purificación de la ribosonda antisentido de ARN

Para sintetizar la sonda antisentido de ARN para el gen *auts2a* el primer paso consistió en el diseño de cebadores mediante el programa *Primer BLAST*²¹⁸, tras lo que se añadió una secuencia promotora de la enzima polimerasa T7 de 30 pb al extremo 5' del cebador *reverse* para su posterior transcripción. La secuencia de los cebadores, que delimitan un amplicón de 426 pb (396 + 30) en dirección 5' → 3' es la que sigue:

Forward: CAGAGTGTTGGGTCCGTGA

Reverse: taagctttaatacgaactactatagggagaGGGCCATCCATTTCCACCAGA

A continuación, se realizó una reacción de PCR con la pareja de cebadores con y sin la secuencia de reconocimiento de la T7 como se describe en el apartado 3.1.4, pero con una

concentración de ADNc de 50 ng/μl y volumen final de 50 μl. La correcta amplificación y ausencia de bandas inespecíficas se comprobaron en gel de agarosa. Los productos de amplificación fueron purificados mediante el protocolo de fenol-cloroformo y EtOH, según lo descrito en el apartado 3.1.2 y su concentración se midió con el espectrofotómetro.

3.2.2. Transcripción *in vitro* y purificación de la ribosonda antisentido

Para la transcripción de los productos de PCR y su conversión en ARN se hicieron reacciones con 10 μl de tampón de transcripción 5X (Promega), 5 μl de DTT 50 mM (Promega), 5 μl de *DIG RNA Labelling Mix* (Sigma), 1 μl de *RNase Out* (Invitrogen), 2,5 μl de T7 polimerasa (Promega), 1 μg de producto de PCR y agua Milli-Q hasta alcanzar un volumen de 50 μl. Las muestras se incubaron 2 horas a 37°C, se añadió 1 μl de DNasa I y se incubaron a 37°C durante 30 minutos más. Las sondas transcritas se purificaron con el *kit Quick Spin Columns for radiolabeled RNA purification* (Roche), según las indicaciones del proveedor y se cuantificaron en el espectrofotómetro.

3.2.3. HIS

Los peces WT y homocigotos se criaron en agua de ósmosis reversa hasta que concluyó la gastrulación, momento en el que se pasaron a una solución de agua de ósmosis reversa con feniltiourea 75 μM (PTU, Sigma) para evitar la formación de pigmentos, hasta las 24 y 48 hpf, momento en el que se sacrificaron e incluyeron en para-formaldehído 4% (PFA, Sigma) y se mantuvieron a 4°C, ON. Se sometieron a 2 lavados de 5 minutos en PBT, consistente en PBS 1X (Sigma) y Tween-20 0,1% (Sigma) y se deshidrataron en series de 3 minutos de 25% metanol (MeOH, Sigma) / 75% PBT, 50% MeOH / 50% PBT y 75%MeOH / 25%PBT. Se conservaron en MeOH 100% ON a -20°C, tras lo que se hidrataron con una serie inversa a la descrita y se trataron con proteinasa K 10 μg/ml en PBT entre 4 y 20 minutos. Se realizaron dos lavados de 2 minutos en PBT, una fijación de PFA 4% de 20 minutos y otros cuatro lavados de 5 minutos en PBT con agitación. Para la pre-hibridación se sustituyó el PBT por tampón de hibridación HYB+, compuesto por formamida 50%, SSC 5X (Promega), heparina 50 μg/ml (Sigma), yeast tRNA 0,5 mg/ml (Sigma), Tween-20 0,1% y ácido cítrico 9,2 mM pH 6.0 y las muestras se incubaron durante 3 horas a 70°C. Pasado este tiempo se añadió la sonda a 1,5 nl/μl disuelta en tapón HYB+ y se incubó ON a 70°C. Al día siguiente, la sonda de hibridación se retiró y se realizaron lavados de 10 minutos a 70°C de 25% SSC 2X / 75% HYB- (formamida 65%, SSC 5X y Tween-20 0,1%), 50% SSC 2X / 75% HYB-, 75% SSC 2X / 25% HYB- y SSC 2X, seguidos de dos lavados de 30 minutos en SSC 0,05X, un lavado de 5 minutos a RT y con agitación de 50% SSC 0,05X / 50% PBT, y finalmente dos lavados en PBT. Tras ello, las muestras se incubaron 1 hora a RT con agitación en tampón de bloqueo, compuesto por PBT, suero de oveja 2% (Sigma) y albúmina de suero bovino 2 mg/ml (BSA, Sigma). A continuación, se incubaron 2 horas a RT en el anticuerpo anti-digoxigenina de oveja conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) disuelto a 1:2000 en tampón de bloqueo, y se realizaron seis lavados de 10 minutos a RT y con agitación en PBT, para luego conservar las muestras a 4°C, ON. Se realizaron con posterioridad 3 lavados de 10

minutos con el tampón NTMT, compuesto por Tris-HCl 100 mM pH 9.5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 50 mM y Tween-20 0,1% y el revelado se realizó en oscuridad con la solución *BM-Purple* (Sigma). Una vez alcanzada la señal colorimétrica deseada, las muestras se lavaron 4 veces durante 5 minutos en PBT y se conservaron finalmente en PFA 4% a RT hasta la toma de imágenes.

3.3. WESTERN BLOT

3.3.1. Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas de los embriones WT y mutantes homocigotos de 48 hpf, éstos se sacrificaron con sobredosis de triclaína e introdujeron en 3 grupos de 10 individuos en tubos de 1,5 ml. Sobre ellos se añadieron 200 µl de solución de disociación celular, compuesta por media tableta del cóctel de inhibidores de proteasas *cOmplete™ Mini* (Roche) disuelta en 2,5 ml de PBS 1X, y se disgregó el tejido suavemente. A continuación, las muestras se centrifugaron a 2.000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante, se añadieron 200 µl más de solución de disociación y se repitió el paso de centrifugado y retirado del sobrenadante. Al sedimento se añadieron 20 µl de SDS 2X- DTT 1 mM y se resuspendió. Para cuantificar las proteínas extraídas se utilizó el *kit DC Protein Assay Reagents Package* (Bio-Rad), una adaptación del método de Bradford, siguiendo las indicaciones del proveedor. Las absorbancias se midieron en el aparato *EnSpire Multimode Plate Reader* (Perkin Elmer), y las concentraciones se calcularon en base a una recta patrón de BSA, según la fórmula $Y = 0.1263x + 0.057$, siendo Y la absorbancia y x la concentración en µg/µl.

3.3.2. Electroforesis

Para realizar la electroforesis, se prepararon muestras a 30 µg, a las que se añadieron 6,7 µl del tampón de carga *4X Bolt™ LDS Sample Buffer* (Invitrogen) y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 20 µl, y se incubaron 5 minutos a 95°C. Se utilizaron los geles comerciales de poliacrilamida desnaturalizante *Bolt™ 4 to 12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gels* (Invitrogen) y como marcador de peso molecular se usó el *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo con tampón MES 1X (Invitrogen) en cubetas verticales a 167 V durante 25-30 minutos.

3.3.3. Transferencia, lavado y bloqueo de la membrana

Las proteínas separadas en la electroforesis se transfirieron a la membrana *Immuno-Blot PVDF Membranes for protein blotting* (Bio-Rad), previamente activada al sumergirla 1 minuto en MeOH y empapada en tampón de transferencia, compuesto por Tris 25 nM, glicina 192 nM y MeOH 20%. La transferencia se efectuó en el equipo *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-rad) a 15 V durante 90 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo la membrana se lavó dos veces en agitación durante 5 minutos en TBS 1X (Sigma)- Tween-20 0,1% (TTBS 1X) y se bloqueó en BSA 5% en TTBS 1X durante 90 minutos en agitación.

3.3.4. Incubación con anticuerpos y revelado

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Auts2a (GeneTex) y anti-Actb2 (Invitrogen) como normalizador, ambos de conejo y en concentraciones de 1:1000 y 1:1500 respectivamente. Para ello, la membrana se cortó en dos pedazos, cada uno de los cuales contenía la proteína esperada y estas dos porciones se incubaron ON a 4°C en agitación con el anticuerpo primario correspondiente, tras lo que se incubaron con el anticuerpo secundario *anti-rabbit IgG HRP-linked antibody* (Cell Signaling Technology) con dilución 1:2500, durante 1 hora a RT con agitación. Tras 4 lavados con TTBS 1X de 5 minutos cada uno, se añadió el sustrato comercial *ECL Prime WB detection reagent* (GE Healthcare) para la inmunodetección basada en quimioluminiscencia por exposición y revelado de la película autorradiográfica *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare).

4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES DE AUTS2A

4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS EMBRIONES

4.1.1. Análisis morfológico

Para la caracterización fenotípica de los embriones se utilizaron las fotografías tomadas a las 48 hpf de los embriones homocigotos de la generación F2, así como de individuos homocigotos de la F3. Como control se utilizaron embriones WT de 48 hpf de puestas independientes. Las medidas de los individuos se tomaron directamente en el programa *NIS-Elements* (versión 4.13.04) y fueron las siguientes:

- Diámetro de la cabeza, trazando una línea por la parte media de la región de los arcos branquiales y pasando por la parte del otolito más cercana al ojo y trazando su paralela en el extremo anterior de la cabeza.
- Diámetro del ojo, trazando una perpendicular a la línea que delimita el diámetro de la cabeza y determinando su paralela.
- Longitud total del cuerpo, mediante el trazado de una línea recta entre la región anterior de la cabeza, coincidiendo con la unión entre el cerebro anterior y medio hasta el extremo posterior del cuerpo, coincidiendo con el final de la aleta caudal.
- Longitud de la aleta caudal, por trazado de una línea recta.
- Longitud del cuerpo sin aleta caudal, resultante de la resta de la longitud de la aleta caudal a la longitud total del cuerpo.

Una vez realizadas las medidas, se calcularon los ratios cabeza/ cuerpo y ojo/cabeza y los datos fueron analizados en el *SPSS Statistics*, en donde se realizó el estadístico de Levene, para evaluar la homogeneidad de varianzas, el estadístico de Kolmogorov – Smirnov, para determinar la distribución de los caracteres, y finalmente la prueba U de Mann-Whitney para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre individuos WT y homocigotos para las diferentes medidas tomadas. La significación se estableció en $p < 0,05$.

4.1.2. Tinción de cartílago

El estudio de la morfología del cartílago de la región mandibular de los individuos se realizó mediante el protocolo de tinción con azul alcian. Para ello, los individuos WT y los homocigotos se criaron hasta la edad de 5 dpf, momento en que las estructuras cartilaginosas son fácilmente identificables. Llegado este punto, los embriones se sacrificaron y se fijaron ON en PFA 4%, tras lo que se lavaron tres veces durante 2 minutos en PBS 1X. A continuación, se incubaron ON en un preparado de *Alcian Blue* 0,1 mg/ml (Sigma) en EtOH y ácido acético glacial (Panreac) en proporción 8:2, previamente filtrado a través de un filtro para jeringuillas de 0,22 μ m (Sigma). Para eliminar la pigmentación de los individuos, se trataron con hidróxido de potasio 1% (KOH, Panreac) en peróxido de hidrógeno 0,6% (H₂O₂, Sigma) durante 2 horas, tras lo que se lavaron dos veces durante 5 minutos en PBS 1X y se incluyeron en glicerol 99% (Sigma) a través de una serie ascendente de KOH 0,5% / glicerol 99% (9:1,7:3, 5:5, 3:7, 1:9). En este punto se fotografiaron y se tomaron medidas de la longitud del palatoc cuadrado, así como del ángulo ceratohial. Asimismo, se tomaron medidas de la longitud y el diámetro de la cabeza. Tras evaluar la homogeneidad de varianzas mediante el estadístico de Levene y la distribución de caracteres mediante el estadístico de Kolmogorov – Smirnov, los datos fueron analizados en el *SPSS Statistics* mediante la prueba T de *Student* para determinar la existencia de diferencias significativas entre los individuos WT y los homocigotos. La significación se estableció en $p < 0,05$.

4.1.3. Determinación de apoptosis

4.1.3.1. Naranja de acridina

La evaluación de las diferencias en los niveles de apoptosis entre los individuos WT y los homocigotos mutantes se realizó mediante tinción con naranja de acridina. Para ello, los individuos de 24 hpf fueron incubados en oscuridad en una solución de naranja de acridina 3 μ g/ml (Sigma) durante 20 minutos. Tras ello se realizaron dos lavados de 1 minuto con PBS 1X, los embriones se anestesiaron con triclaína y se fotografiaron.

4.1.3.2. Análisis de la expresión de *p53*

Se evaluó mediante qPCR la expresión de *p53*, un importante inductor de la apoptosis, en la región cefálica de los embriones WT y homocigotos mutantes a las 48 hpf. Para ello, los individuos se sacrificaron y se cortaron con ayuda de bisturí, conservándose las cabezas en *RNA later* hasta su uso. La extracción de ARN, purificación, retrotranscripción, diseño y validación de cebadores, así como la reacción de la qPCR y su análisis se llevó a cabo tal y como se describe en los apartados 3.1.1 - 3.1.4. Las secuencias de los cebadores *forward* y *reverse* son, en dirección 5' \rightarrow 3', CCCCGGATGGAGATAACTTGG y GCACAGTTGTCCATTCAGCA, respectivamente, delimitando un amplicon de 153 pb.

4.1.4. Hibridación *in situ* de *pax2a*, *emx1* y *aldoca*

Se seleccionaron los siguientes genes para su detección y análisis mediante HIS:

- *pax2a*, *Paired box 2a*, ([ENSDARG00000028148](#), [ENSDART00000160921.2](#)). Marcador de la unión entre el cerebro medio y el cerebro posterior (MHB, del inglés, *midbrain-hindbrain boundary*).
- *emx1*, *Empty spiracles homeobox 1*, ([ENSDARG00000039569](#), [ENSDART00000057810.6](#)). Marcador de telencéfalo.
- *aldoca*, *Aldolase C, fructose-bisphosphate a*, ([ENSDARG00000057661](#), [ENSDART00000080377.7](#)) Marcador de cerebro, principalmente de la región cerebelar.

La síntesis de las sondas de ARN para estos genes se realizó de igual forma que se describe en los apartados 3.2.1 y 3.2.2. En este caso, las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Secuencias en dirección 5' → 3' de los cebadores utilizados y tamaño de amplicón

Gen	Forward	Reverse	Tamaño de amplicón (pb)
<i>pax2a</i>	ACGACTGGCTCAGTACCAAA	taagctttaatacactcactataggaga GGGGGAGATGGATTGTTTTCT	393 (363 + 30)
<i>emx1</i>	TTCTTTGGCACGCAACATCG	taagctttaatacactcactataggaga CTCCAGCTTCTGCCGCTTAT	351 (321 + 30)
<i>aldoca</i>	CCGTCTGAGTCCTTCAGTCTTG	taagctttaatacactcactataggaga GGACGCCATCATCCGAGTTC	347 (317 + 30)

El protocolo de HIS se realizó siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.2.3, aunque únicamente para la sonda de *aldoca* debido a la falta de un número suficiente de individuos homocigotos mutantes.

4.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS ADULTOS

4.2.1. Longitud y peso de los adultos

Los adultos de pez cebra WT y homocigotos mutantes de un año de edad se anestesiaron con triclaína 0,003% y la longitud total del cuerpo se midió con ayuda de una regla graduada. Asimismo, el peso de los individuos se midió en la báscula de precisión *Explorer* (Ohaus). Tras evaluar la homogeneidad de varianzas y la distribución normal, los datos fueron analizados en el *SPSS Statistics* mediante la prueba T de Student para determinar la existencia de diferencias significativas entre los individuos WT y los homocigotos. La significación se estableció en $p < 0,05$.

5. ANÁLISIS DE LOCOMOCIÓN DE LOS EMBRIONES MUTANTES DE *AUTS2A*

Para estudiar posibles diferencias en la locomoción general de los individuos, se seleccionaron 48 individuos homocigotos mutantes y 48 individuos WT de 7 dpf. Esta etapa del desarrollo fue seleccionada debido a que a edades anteriores las larvas tienden a presentar movimientos de tipo explosivo, mientras que a partir de los 6-7 dpf ya presentan un nado y deslizamiento normalizado. En etapas posteriores, coincidiendo con la reabsorción completa del corión, es necesario alimentar a los animales, por lo que su movimiento normal puede verse alterado por la búsqueda de alimento. Las larvas se analizaron en el dispositivo *Zebrabox* con el *software Zebralab* de *Viewpoint Life Sciences*, y para el rastreo automatizado de cada uno de los movimientos de cada uno de los peces se estableció un programa de análisis de 60 minutos con tres ciclos intermitentes de luz y oscuridad, cada uno de ellos con una duración de 10 minutos. Los datos obtenidos se convirtieron a formato *Microsoft Excel* y se realizó el estadístico de Levene, para evaluar la homogeneidad de varianzas, el estadístico de Kolmogorov – Smirnov, para determinar la distribución de los caracteres, y finalmente la prueba U de Mann-Whitney en el programa *SPSS Statistics*. La significación se estableció en $p < 0,05$.

6. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LOS MUTANTES DE *AUTS2A*

Con objeto de determinar posibles diferencias transcripcionales en diversos genes entre los individuos WT y los homocigotos mutantes, y así poder dar una explicación a nivel transcripcional de la fisiopatología de los TEA, se realizaron análisis por qPCR.

6.1. SELECCIÓN DE GENES DE INTERÉS

Se seleccionaron un total de 29 genes en base a su potencial relación con *AUTS2/ auts2a* y también genes marcadores de diversas estructuras cerebrales o de determinados procesos biológicos. Se comprobó en la base de datos de *ENSEMBL*²⁰² que todos los genes en humanos contarán con un ortólogo de elevada homología en pez cebra, y que todos ellos se expresaran en el momento de desarrollo a evaluar en la base de datos *ZFIN*²¹⁷, siendo en este caso, 48 hpf.

6.1.1. Genes reguladores y regulados por *AUTS2*

- *TBR1/ tbr1b*, *T-box brain transcription factor 1b*, ([ENSDARG00000004712](#), [ENSDART00000006612.7](#)). Regula transcripcionalmente al promotor de *AUTS2* durante el desarrollo. Interviene en la diferenciación neuronal, por lo que expresa ampliamente en neuronas postmitóticas, y participa en la formación de sinapsis glutamatérgicas excitatorias y en la migración neuronal²²². La homología es del 80,92%.
- *SATB2/ satb2*, *Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 2*, *SATB Homeobox 2*, ([ENSDARG000000061885](#), [ENSDART000000088876.4](#)). Regula directamente la

expresión de *TBR1* e indirectamente a *AUTS2*. Se ha establecido como marcador de neuronas excitatorias²²³. La homología es del 65,83%.

- *RAC1/rac1b, Rac family small GTPase 1b*, ([ENSDARG00000087954](#), [ENSDART00000130877.3](#)). Es regulado positivamente por *AUTS2*, y en conjunto participan en la remodelación del citoesqueleto de actina para una adecuada migración neuronal y proyección axonal²⁰⁵. La homología es del 98,44%.

6.1.2. Genes implicados en enfermedades del neurodesarrollo

- *GTF2IRD1/ gtf2ird1, General Transcription Factor II-I Repeat Domain-Containing Protein 1*, ([ENSDARG00000022203](#), [ENSDART00000148727.3](#)). Factor de transcripción implicado en el síndrome de Williams, un trastorno del neurodesarrollo con manifestaciones clínicas semejantes a las de TEA²²⁴. Se ha relacionado con la señalización serotoninérgica. La homología es del 53,05%.
- *MECP2/ mecp2, Methyl CpG Binding Protein 2*, ([ENSDARG00000014218](#), [ENSDART00000123882.4](#)). Factor de transcripción implicado en el síndrome de Rett, un trastorno del neurodesarrollo con manifestaciones clínicas semejantes a las de TEA. Se conoce que reprime transcripcionalmente la expresión de *AUTS2* y que interviene en el crecimiento normal de dendritas y axones²²⁵. La homología es del 53,41%
- *SEMA5A/ sema5a, Semaphorin 5a*, ([ENSDARG00000058821](#), [ENSDART00000164319.2](#)). Gen candidato a TEA, interviene en la formación de un número apropiado de proyecciones axonales durante el desarrollo²²⁶. La homología es del 76,53%
- *ZMAT3/ zmat3, Zinc Finger Matrin-Type 3*, ([ENSDARG00000080021](#), [ENSDART00000109833.4](#)). Implicado en enfermedades neurodegenerativas, y cuya desregulación provoca disminución en los niveles cerebrales de *AUTS2* en modelos de ratón para la enfermedad de Huntington²⁰³. La homología es del 62,63%.

6.1.3. Genes implicados en el PRC1

- *CK2B/ ck2b, Casein kinase 2, beta polypeptide*. ([ENSDARG00000077776](#), [ENSDART00000109258.4](#)). Como componente del PRC1 interactúa físicamente con *AUTS2*. Interviene en la señalización dopaminérgica y tiene un papel fundamental en la oligodendrogénesis a través de la regulación del gen *OLIG2*²²⁷. La homología es del 99,07%.
- *DCAF7/ dcaf7, ddb1 and cul4 associated factor 7*, ([ENSDARG00000054355](#), [ENSDART00000058221.7](#)). Interviene en la activación del complejo PRC1 y desarrolla un papel importante en la diferenciación neuronal²¹¹. La homología es del 97,95%.
- *PCGF5/ pcgf5b, Polycomb Group Ring Finger 5b*, ([ENSDARG00000052388](#), [ENSDART00000086211.7](#)). Como componente del PRC1 interactúa físicamente con

AUTS2. Asimismo, es fundamental para la diferenciación neuronal. La homología es del 78,02%.

- *RYBP/ rybpa, RING1 and YY1 binding protein a*, ([ENSDARG00000037773](#), [ENSDART00000055038.4](#)). Como componente del PRC1 interactúa físicamente con AUTS2. Es fundamental para la morfogénesis normal del sistema nervioso y la formación de astrocitos y oligodendrocitos²²⁸. La homología es del 69,72%.

6.1.4. Genes implicados en el NSMD

- *SMG1/ smg1, SMG1 nonsense mediated mRNA decay associated PI3K related kinase*, ([ENSDARG00000054570](#), [ENSDART00000076796.7](#))²²⁹. La homología es del 73,87%
- *UPF1/ upf, UPF1 RNA helicase and ATPase*, ([ENSDARG00000016302](#), [ENSDART00000021011.10](#))²²⁹. La homología es del 95,18%.

6.1.5. Genes marcadores de tipos celulares cerebelares

- *PTF1A/ ptf1a, Pancreas associated transcription factor 1a*, ([ENSDARG00000014479](#), [ENSDART00000021987.6](#)). Factor de transcripción necesario para la generación específica de células de Purkinje en el cerebelo, y por tanto de neuronas gabaérgicas. En su ausencia, las neuronas adoptan un fenotipo glutamatérgico²³⁰. La homología es del 69,81%.
- *FAT2/ fat2, FAT atypical cadherin 2*, ([ENSDARG00000018923](#), [ENSDART00000014149.11](#)). Se expresa casi exclusivamente en el cerebelo, principalmente en las células granulares²³¹. La homología es del 46,41%.
- *RERE/ rereb, Arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats b*, ([ENSDARG00000075670](#), [ENSDART00000111639.4](#)). Interviene en la maduración y migración de las células y Purkinje y en la proliferación de las células granulares²³². La homología es de 59,38%.

6.1.6. Genes marcadores específicos de sinapsis glutamatérgicas y gabaérgicas

- *GAD1/ gad1a, Glutamate decarboxylase 1a*, ([ENSDARG00000093411](#), [ENSDART00000025332.9](#)). Codifica para la glutamato descarboxilasa, que cataliza la conversión de glutamato en ácido gamma-aminobutírico (GABA), principal responsable de sinapsis gabaérgicas (inhibidoras), comúnmente alteradas en pacientes con TEA²³³. La homología es del 79,50%.
- *GRID2/ grid2, Glutamate receptor, ionotropic, delta 2*, ([ENSDARG00000055302](#), [ENSDART00000141634.3](#)). Se trata de un receptor ionotrópico de glutamato, por lo que interviene en sinapsis glutamatérgicas (excitadoras), comúnmente alteradas en pacientes con TEA. Se encuentra significativamente sobreexpresado en pacientes con síndrome de Down²³⁴. La homología es del 81,86%.
- *VGLUT2/ vglut2.2, Solute carrier family 17 member 6a*, ([ENSDARG00000001127](#), [ENSDART00000003494.7](#)). Codifica para un transportador vesicular glutamatérgico

por lo que interviene de forma directa en las sinapsis glutamatérgicas (excitadoras), comúnmente alteradas en pacientes con TEA²³⁵. La homología es del 85,18%.

6.1.7. Genes marcadores de neuroglía: astrocitos, microglía y oligodendrocitos

- *EMX1/ emx1, Empty spiracles homeobox 1*. (ENSDARG00000039569, ENSDART00000057810.6). El linaje de células que expresan este factor de transcripción en el cerebro anterior o telencéfalo, dan lugar a glía y también neuronas excitatorias diversas²³⁶. La homología es del 76,19%.
- *GFAP/ gfap, Glial fibrillary acidic protein*, (ENSDARG00000025301, ENSDART00000028270.7). Da lugar a los filamentos intermedios del citoesqueleto de astrocitos y glía, por lo que es un marcador específico de estos tipos celulares. Su expresión se encuentra elevada en pacientes²³⁷. La homología es del 65,54%.
- *NES/ nes, Nestin*, (ENSDARG00000088805, ENSDART00000122681.3). Codifica para una proteína de los filamentos intermedios y da lugar a líneas celulares neuronales y de glía, siendo un marcador de diferenciación neuronal²³⁸. Se ha propuesto también como marcador de angiogénesis en los pericitos, encontrándose elevado en pacientes con TEA²³⁹. La homología es del 77,19%.
- *OLIG2/ olig2, Oligodendrocyte lineage transcription factor 2*, (ENSDARG00000040946, ENSDART00000060006.5). Factor de transcripción expresado en células progenitoras de oligodendrocitos y por tanto responsable de la diferenciación de los mismos, fundamentales para la correcta integridad de las vainas de mielina y la materia blanca^{240,241}. La homología es del 72,16%.

6.1.8. Genes marcadores de pluripotencia

- *SOX2/sox2, SRY-box transcription factor 2* (ENSDARG00000070913, ENSDART00000104493.5) y *c-MYC/ c-myc, MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*, (ENSDARG00000045695, ENSDART00000111014.4). Factores de transcripción responsables de mantener la auto-renovación y pluripotencia de células madre neurales, siendo fundamental para un desarrollo neuronal normal^{242,243}. La homología es del 87,30% y 60,64% respectivamente.

6.1.9. Genes implicados en la diferenciación neuronal

- *ELAVL3/ elavl3, ELAV like neuron-specific RNA binding protein 3*, (ENSDARG00000014420, ENSDART00000013717.9). Promueve la diferenciación y maduración neuronal por lo que se considera un marcador de neuronas postmitóticas. Interviene asimismo en el mantenimiento de una estructura axonal correcta²⁴⁴. La homología es del 89,69%.
- *ISL1/ isl1, ISL LIM homeobox 1*, (ENSDARG00000004023, ENSDART00000010896.6). Factor de transcripción requerido para la diferenciación y supervivencia de distintos tipos neuronales postmitóticos. Su sobreexpresión se ha

asociado asimismo a la desregulación de las señales gabaérgicas²⁴⁵. La homología es del 97,99%.

- *NEUROD1/neurod1, Neuronal differentiation 1*, (ENSDARG00000019566, ENSDART00000011837.6). Marcador de neuronas postmitóticas ya que promueve la diferenciación de progenitores neurales, está presente en neuronas piramidales excitatorias. Asimismo, regula positivamente la expresión de *TBRI*²⁴⁶. La homología es del 77,43%.

6.1.10. Gen marcador de activación neuronal

- *FOS/fosab, V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog Ab*, (ENSDARG00000031683, ENSDART00000043298.8). Factor de transcripción descrito como marcador de activación neuronal e implicado en la plasticidad neuronal. Su expresión se asocia a procesos de aprendizaje y memoria y disminución de la ansiedad en modelos de TEA en ratón^{247,248}. La homología es del 57,59%

6.2. DISEÑO DE CEBADORES DE QPCR

El diseño de los cebadores de qPCR se realizó en el programa *PRIMER BLAST*²¹⁸, con excepción de *neurod1*, *nes*, *elavl3* e *isl1*, que fueron tomados de la literatura²³⁸. La secuencia de los mismos, en dirección 5' → 3' se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Secuencias en dirección 5' → 3' de los cebadores utilizados y tamaño de amplicón

Gen	Forward	Reverse	Tamaño de amplicón (pb)
<i>tbr1b</i>	CAAGCAGGGACGACGAATGT	CATTCGTATCCGCTTTGCCG	161
<i>satb2</i>	TGCTGGACGTTTACCACATG	AAGTTCTTTGAGGGCGTTGC	119
<i>rac1b</i>	ATGCAGGCCATCAAGTGTGTG	CCGGTTTCCCATCCACCATC	151
<i>gtf2ird1</i>	GCTAAGGTGCCGTACTION	GTCAACAATTCTGGCCTCGTT	173
<i>mecp2</i>	CTGGACACGCAAGCTGAAAC	GGCTTCCCTTCTGGGTTGAT	85
<i>sema5a</i>	TGGCAACAGCAGTGAACCTC	ACTTGAACGTGCAACAGACG	76
<i>zmat3</i>	CCATGCCAGGCCCTTACTAC	CTGGCACCCGAGTTACACAT	115
<i>ck2b</i>	GGAAGTGTCTGGATTTCTTGG	AATGGGGAAGTTGCTCGTTG	122
<i>dcaf7</i>	AACCTCCTGGGGACATCTAGT	TTTTGACGTGACCCGACACT	103
<i>pcgf5b</i>	CCCCTTCCGGAAGTTGACA	TTTACAAAAGGTGTGCAGGC	140
<i>rybpa</i>	GACTGTAGCGTCTGCACCTT	GCAGGTCTCTGTCTGTTCTG	199
<i>smg1</i>	ACGTTACCAGGGTTTTGCGA	CTCCAACTGGGCAAACATGC	140
<i>upf1</i>	CATGAGCCAGCCTTCACAGA	ACAGCGCAACATCCATCTGA	107
<i>ptf1a</i>	ACATGCCAATTCGGAACCCA	CATTTGGAGATGGGGATCTTGT	93
<i>fat2</i>	GGGATCTACCAGTGCTGCTC	TGCAGTGAACCTCCAGTG	100
<i>rereb</i>	CCAACAGGACCCTCTCAACC	GCATTTTCATGCTCGTGTGGT	146
<i>gad1a</i>	TGGAGGGCTTCAACCTGGAG	GCTGCTCCATCAGGACAAAC	231
<i>grid2</i>	GTCCCATCGAAGGAGGACGATA	AGAGTCTGGATCTGCTCTGGT	236
<i>vglut2.2</i>	CTGCGATCCTGCTCACATCA	GGGTAGGTCACACCTTCGAC	118
<i>emx1</i>	CACTTCTTTGGCAGCAACA	CCTGGGAGACATCATTACCTTG	103
<i>gfap</i>	TGGCCAACTCTAACATGCAG	ATTACGATTGGCTGCATCCG	80
<i>nes</i>	AGAAGGTCGGTCAACTCG	GGTCTGGGATGCTGGTAG	144
<i>olig2</i>	ACGAGTGAAGTGGATAGCCT	TGTCAGAGTCCATGGCGTTC	128

<i>sox2</i>	CACCAACTCCTCGGGAAACA	GGGGTTCTCCTGTGCCATTT	115
<i>c-myc</i>	TATGCTGCAAGTGACCGGAG	TCACCGGCATTTTGACACTT	141
<i>elavl3</i>	ATCACCTCACGCATCCTG	TTGTTGGCGAACTTTACG	164
<i>isl1</i>	CCCAGGAGATGAGTTTCGC	GGCTCTGCTGCCATTTGT	141
<i>neurod1</i>	CGAGCAGAGCCAGGAGAT	AGGGTGGTGCAAAGAACG	186
<i>fosab</i>	CAGCTCCACCACAGTGAAGA	GCTCCAGGTCAGTGTTAGCC	176

6.3. VALIDACIÓN DE LOS CEBADORES DE QPCR

Se realizó en primer lugar una reacción de PCR con cada una de las parejas como se describe en el apartado 3.1.4, usando 1 µl de ADNc de WT 10 ng/µl y se comprobó en gel de agarosa la altura correcta de las bandas así como la especificidad en la amplificación. A continuación, se realizaron las rectas de calibrado para todos los cebadores, para lo que se extrajo ARN de individuos WT, se realizó el tratamiento con DNasa, se purificó y se realizó la retrotranscripción tal y como se describe en los apartados 3.1.1 - 3.1.3. La reacción de qPCR para para obtención de las rectas se realizó como se describe en el apartado 3.1.4.2., aunque en este caso las diluciones decrecientes fueron de 1/2. Los resultados se analizaron en el programa *Microsoft Excel* utilizando las fórmulas de la Ecuación 2.

6.4. REACCIÓN DE QPCR PARA DETERMINAR LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE WT Y MUTANTES

La existencia de diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes de interés se realizó mediante análisis por qPCR, para lo que se establecieron 3 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas para cada grupo (WT y homocigotos mutantes) y para pareja de cebadores. Los pasos que se siguieron se describen en los apartados 3.1.1 - 3.1.3 y 3.1.4.1.

RESULTADOS

ARNsg, la Cas9 y el rojo fenol se inyectó en aproximadamente 200 embriones, mientras que un número equivalente de embriones WT sirvió como control. La mortalidad en ambos grupos fue aproximadamente la misma, lo que indicó que tanto el volumen inyectado, como el proceso de inyección en sí fueron óptimos para la correcta viabilidad de los huevos.

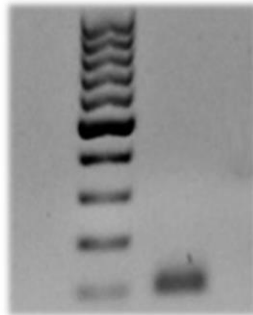


Figura 17. Gel de agarosa para ARNsg amplificado y purificado. Marcador de peso molecular de 100 pb.

1.3. GENOTIPADO DE LOS EMBRIONES DE LA GENERACIÓN F0

El análisis de las secuencias resultantes del proceso de extracción de ADN de parte de los embriones inyectados, PCR, clonación bacteriana y finalmente secuenciación, reveló la existencia de:

- Alelos portadores de una delección de 311 pb y una inserción de 9 pb, aunque a nivel exónico se trata de una delección de 53 pb.
- Alelos con una delección de 307 pb, que suponen la pérdida de 53 pb en el exón.
- Alelos con una delección de 293 pb y una inserción de 2 pb, con pérdida de 50 pb a nivel exónico.
- Alelos portadores de una delección de 1 pb y una inserción de 1 pb.

El análisis *in silico* para predecir el efecto de las mutaciones a nivel proteico indicó que para los tres primeros tipos de mutaciones se introduce un PSC en el exón 9, lo que da lugar a la pérdida de la proteína a partir de este punto. En relación al último tipo de mutación, únicamente se produce el cambio de un aminoácido, lo que no supone consecuencia negativa alguna para la proteína. La secuencia nucleotídica WT delimitada por los cebadores utilizados y las secuencias de los alelos mutantes, así como la secuencia aminoacídica completa WT y de los mutantes se muestran en la Figura 18.

a) **Secuencia nucleotídica WT del exón 9**

```

CGGCAGGAATTAAACACTCGTTTCCCTGGCATCTCAGAGTGCTGATCGTGGGGCATCACTGGGTCCCCCTCCATACTGCGGACTGAGT
TCCACCAGCATCAGCACCAGCATCAGCATCAGCACCAGCACACACCAACACACACACCAGCACACCTTCACCCCTTTCC CCCACGC
CATCATGCCACGCCTGCACCGCCCATGGTGCCTACCCAGCCAGAAATgtgaggataagtggaagacaactctaaaaaactatata
atatataaaatgataaacattgtgatgatggatgctatccactttatTTTTGACACAAAGTCAGTCAAACTGAATGGTAAGTCAAAA
atgatatttattaacataatcattatcataaacactcatttggTGAAGAAGTTTACAGTTTTTGTCTTTTCTAGTTTTGTCT
gtaggTactaaagtagtcttgtacaattaatgttaattaccgactttcatgttgagaaataaggtggatatgctgagtagttgttta
aaaatgatgcacacatggaaatcaaatgc
  
```

b) Secuencia con delección de 311 pb e inserción de 9 pb

CGGCAGGAATTAACACTCGTTTCCTGGCATCTCAGAGTGTGATCGTGGGGCATCACTGGGTCCCCCTCCATACTTGCGGACTGAG
 TTCCACCAGCATCAGACCAGCATCAGCATCAGCACCAGCACACACACCAACACACACACCAGCACACCTTACCCCTTCC **CCCAC**
GCAACATGCGGACGCG GCACCGCCCATGGTGGGTACCCAGCCAGAAATgtgaggataagtggagagaaactetaaaaaactata
 tataatataaaaaatgataaacattgtgatgatggatgetatecaactttatTTTTGACACAAAGTCAGTCAAACTGAATGGTAACTG
 eaaaatgatattttattacaatattttcattatecataaaactcattttgttgaagaagttttacagttttttgttctttttctagttt
 tgtetgttaggtaactaaagtagtettgtacaattaatgTTAATTAECGA **tttccacc**cttcatggttgagaaataaggtggat
 gcctgagtagttgtttaaaaatgatgcacacatggaaatcaaatgc

c) Secuencia con delección de 307 pb

CGGCAGGAATTAACACTCGTTTCCTGGCATCTCAGAGTGTGATCGTGGGGCATCACTGGGTCCCCCTCCATACTTGCGGACTGAG
 TTCCACCAGCATCAGACCAGCATCAGCATCAGCACCAGCACACACACCAACACACACACCAGCACACCTTACCCCTTCC **CCCAC**
GCAACATGCGGACGCG GCACCGCCCATGGTGGGTACCCAGCCAGAAATgtgaggataagtggagagaaactetaaaaaactata
 tataatataaaaaatgataaacattgtgatgatggatgetatecaactttatTTTTGACACAAAGTCAGTCAAACTGAATGGTAACTG
 eaaaatgatattttattacaatattttcattatecataaaactcattttgttgaagaagttttacagttttttgttctttttctagttt
 tgtetgttaggtaactaaagtagtettgtacaattaatgTTAATTAECGA **tttccacc**cttcatggttgagaaataaggtggatagcctgagtagt
 tgtttaaaaatgatgcacacatggaaatcaaatgc

d) Secuencia con delección de 293 pb e inserción de 2 pb

CGGCAGGAATTAACACTCGTTTCCTGGCATCTCAGAGTGTGATCGTGGGGCATCACTGGGTCCCCCTCCATACTTGCGGACTGAG
 TTCCACCAGCATCAGACCAGCATCAGCATCAGCACCAGCACACACACCAACACACACACCAGCACACCTTACCCCTTCC **CCCAC**
GCAACATGCGGACGCG GCACCGCCCATGGTGGGTACCCAGCCAGAAATgtgaggataagtggagagaaactetaaaaaactata
 tataatataaaaaatgataaacattgtgatgatggatgetatecaactttatTTTTGACACAAAGTCAGTCAAACTGAATGGTAACTG
 eaaaatgatattttattacaatattttcattatecataaaactcattttgttgaagaagttttacagttttttgttctttttctagttt
 tgtetgttaggtaactaaagtagtettgtacaatt **tc**aatgTTAATTAECGA **tttccacc**cttcatggttgagaaataaggtggatagcctgagtagt
 agttgtttaaaaatgatgcacacatggaaatcaaatgc

e) Secuencia con delección de 1 pb e inserción de 1 pb

CGGCAGGAATTAACACTCGTTTCCTGGCATCTCAGAGTGTGATCGTGGGGCATCACTGGGTCCCCCTCCATACTTGCGGACTGAG
 TTCCACCAGCATCAGACCAGCATCAGCATCAGCACCAGCACACACACCAACACACACACCAGCACACCTTACCCCTTCC **CCCAC**
GCTCAACATGCGGACGCG GCACCGCCCATGGTGGGTACCCAGCCAGAAATgtgaggataagtggagagaaactetaaaaaactat
 atataatataaaaaatgataaacattgtgatgatggatgetatecaactttatTTTTGACACAAAGTCAGTCAAACTGAATGGTAACTG
 gaaaaatgatattttattacaatattttcattatecataaaactcattttgttgaagaagttttacagttttttgttctttttctagtt
 ttgtctgtaggtaactaaagtagtcttgtacaattaatgTTAATTAECGA **tttccacc**cttcatggttgagaaataaggtggatagcctgagtagt
 ttgtttaaaaatgatgcacacatggaaatcaaatgc

f) Secuencia aminoacídica completa de individuo WT

MDGPRCSGIRKKRKSRSVNRERISNGIRNNHVRGVSFLRFSSDSEKEDGSTNPSSSRPRPRRKRKKESSAEEDIIDGFSIAGFMT
 LEALEKDMTLKPHERRQAGPLRKKKPGRVANGLSLDLHKDRLNHSNHQHSQENNPRLARHSHKSKKKKHLQKKHRPLKPGQNNC
 KDSDES SVSGESKPSIRSSSRDLTDCDES DQEDKGS DASSEKLFSTAAVKVPDFSVDTLSTNASQELRGLGIPKVSGLERSQEK
 QETSREISSATPPLVPTSHSKPPLPAPLHLQPPSSRGLPLPSRPAQIQNPCPERTLRPLSPPIALPQSQQQELSQAPPHPSQHPPE
 SPSHPKPPRTPSIYHHPSPALPAQNPQPVQHRPPSRCHQRPISAYSGSLTLNGLSSSRSTPGKPPGPSAPHLHHHQAPPTGA
 SASFPLPLSANPTASHTFPPSLPSSTLPHHTNMFASPAALPPPPPLTNTLPVPGHPAGSAYSE **QDILRQELNTRFLASQSADR**
LGPPPYLRTEFHQHQHQHQHQHQHTHTFTFPFPHAIMPTAPMPVVRTPARN FEKYPTKVDPFYRHSFLFHSYPPAVSGIPPVI
 PPTGPFGLSQGAFQPKTSNPLDVAARPGAVPHTLLQKDPRLTDFRPVLRKPKGKWCAMHVHIAWQIYHHQQKVKQQMQVDPHKLDFG
 LKPEFLSRPPGPTLFGAIHHPDLARPASLFSAGSTHPAAAPFGHPHHPSNFLTAPAPHPFSPRPPSFGGLASLSTAAFGGLGNP
 ALANSVFGHKDSFSAQQHFSGPHEPWNLHRTPPSFPTPPWLPKGESERSASVSSHERERERDRERERDLDRDSSVNNKDKERE
 PVEKRQHNSQPLPVNPLTLLGHTRPSEPSRNHISSEPRDKDKPKDREDREREHSDWKSNTDEHKLKENHSDKDPVPIHDGRV
 SEDK PANRITASPYMRPGMMDRVNGGLTRDILEKKAETIYEKKNSEVKVKEERKEEQDGPTERSPEQRSTPQAPPPPPAALHPSS
 MPVPMGAMMHPINSISLERTRMVAFPMGISPIPGAERFPYPAFHWDPMRDYRGLDIHRRDPLARELLLRNDPLHRLAAPRLYE
 ERSYRDREPHDFNRDHPGLTLEQRREQERAHLEERERLHLLREDEYQGRLHPMHHPVLDGHLPHPLMAPGLPSMHYPRVSPSSAV
 AAAAQNGLNKTPPTASLSAPPPLIPTLGARSSSPRRTTPLGPDIRDPPSHTHKDIAR

g) Secuencia aminoacídica interrumpida debido a las mutaciones reflejadas en los apartados b, c y d

MDGPRCSGIRKKRKSRSVNRERISNGIRNNHVRGVSFLRFSSDSEKEDGSTNPSSSRPRPRRKRKKESSAEEDIIDGFSIAGFM
 TLEALEKDMTLKPHERRQAGPLRKKKPGRVANGLSLDLHKDRLNHSNHQHSQENNPRLARHSHKSKKKKHLQKKHRPLKPGQN
 NCKDSDES SVSGESKPSIRSSSRDLTDCDES DQEDKGS DASSEKLFSTAAVKVPDFSVDTLSTNASQELRGLGIPKVSGLERSQ
 EKSQETSREISSATPPLVPTSHSKPPLPAPLHLQPPSSRGLPLPSRPAQIQNPCPERTLRPLSPPIALPQSQQQELSQAPPHPSQ
 HPPE SPSHPKPPRTPSIYHHPSPALPAQNPQPVQHRPPSRCHQRPISAYSGSLTLNGLSSSRSTPGKPPGPSAPHLHHHQ



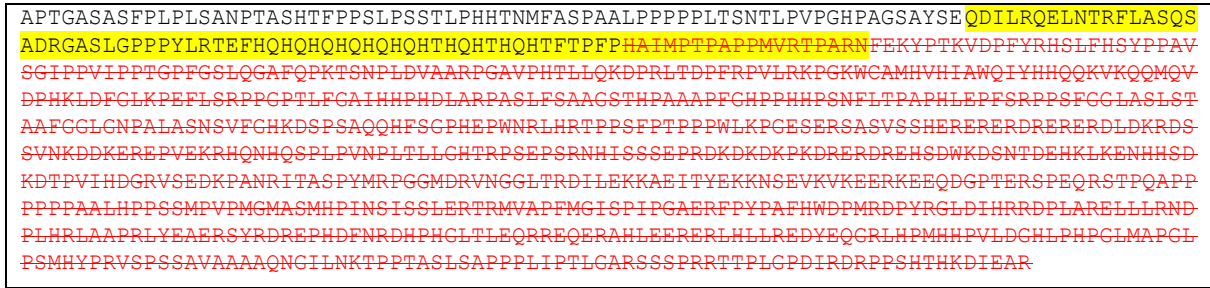
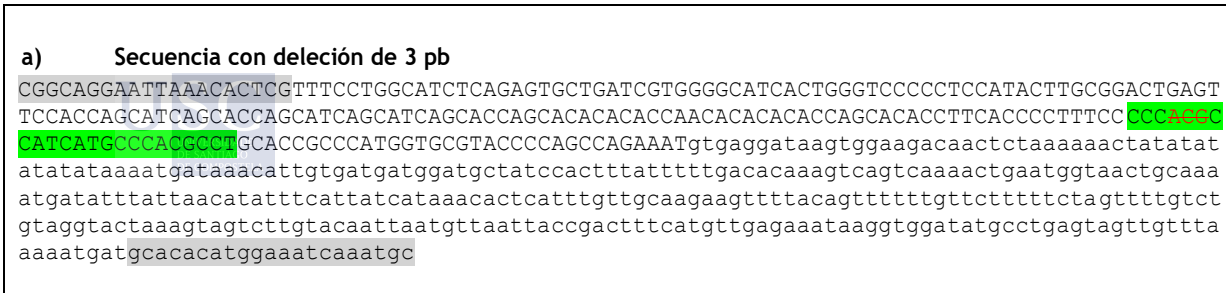


Figura 18. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas embriones WT y mutantes de la F0. En mayúscula se muestra la secuencia exónica y en minúscula la intrónica. Se marcan en gris los cebadores, en verde la región complementaria al ARNsg, en azul las inserciones y en rojo tachado las deleciones. a) Secuencia nucleotídica WT del exón 9; b) Secuencia con deleción de 311 pb e inserción de 9 pb; c) Secuencia con deleción de 307 pb; d) Secuencia con deleción de 293 pb e inserción de 2 pb; e) Secuencia con deleción de 1 pb e inserción de 1 pb; f) Secuencia aminoacídica completa de individuo WT. En amarillo la secuencia correspondiente al exón 9; g) Secuencia aminoacídica interrumpida debido a las mutaciones reflejadas en los apartados b,c y d.

1.4. GENOTIPADO DE LOS EMBRIONES DE LA GENERACIÓN F1

Los embriones inyectados de la F0 se crecieron hasta la edad adulta, momento en el que se cruzaron con individuos WT con el fin de obtener la generación F1, en que los embriones se genotiparon para determinar si las mutaciones habían afectado a la línea germinal y de ser así, conocer la naturaleza de las mismas. El análisis de las secuencias resultantes del proceso de genotipado reveló alelos portadores de una deleción de 3 pb, deleción de 5 pb, deleción de 6 pb, deleción de 7 pb y alelos con una inserción de 33 pb y un cambio de base, todas ellas afectando a la región exónica. Debido a la codificación por tripletes de los aminoácidos, las deleciones de 3 y 6 pares de bases únicamente dieron lugar a la eliminación de uno y dos aminoácidos respectivamente, sin afectar a la pauta de lectura. En cuanto a las mutaciones de 5 y 7 pares de bases, ambas dieron lugar a un PSC en el exón 9, provocando la pérdida de la proteína a partir de ese punto. En relación a la mutación consistente en 33 pb de inserción y un cambio de base, ésta provocó la introducción de 11 nuevos aminoácidos, sin afectar al resto de la proteína. La secuencia de los alelos mutantes delimitada por los cebadores utilizados, así como el resultado de los análisis *in silico* de los efectos a nivel de proteína se muestran en la Figura 19. Se observó asimismo y como era de esperar, que no todos los peces adultos portaban mutación, o de portarla, ésta no afectaba a la línea germinal, pues en algunos grupos de embriones de la F1 procedentes de la misma pareja no se encontró mutación alguna.



b) Secuencia con delección de 5 pb

CGGCAGGAATTAACACTCGTTTCCTGGCATCTCAGAGTGTGATCGTGGGGCATCACTGGGTCCCCCTCCATACTTGCGGACTGAG
 TTCCACCAGCATCAGCACCAGCATCAGCATCAGCACCAGCACACACACCAACACACACACCAGCACACCTTCACCCCTTTCC **CCGAC**
CCATCATGCCACGCCTGCACCGCCCATGGTGGTACCCAGCCAGAAATgtgaggataagtggagacaactctaaaaactata
 tataatataaaaatgataaacattgtgatgatggatgctatccactttatTTTTGACACAAAGTCAGTCAAACCTGAATGGTAACTG
 caaaatgatatttattaacatatttcattatcataaacactcatttgttgcaagaagttttacagttttttgttctttttctagttt
 tgtctgtaggtactaaagtagtcttgtacaattaatgtaattaccgactttcatgttgagaaaataagtggtatgacctgagtagt
 tgtttaaaaatgatgcacacatggaaatcaaatgc

c) Secuencia con delección de 6 pb

CGGCAGGAATTAACACTCGTTTCCTGGCATCTCAGAGTGTGATCGTGGGGCATCACTGGGTCCCCCTCCATACTTGCGGACTGAG
 TTCCACCAGCATCAGCACCAGCATCAGCATCAGCACCAGCACACACACCAACACACACACCAGCACACCTTCACCCCTTTCC **CCGAC**
GGCAGCATGCCACGCCTGCACCGCCCATGGTGGTACCCAGCCAGAAATgtgaggataagtggagacaactctaaaaactata
 tataatataaaaatgataaacattgtgatgatggatgctatccactttatTTTTGACACAAAGTCAGTCAAACCTGAATGGTAACTG
 caaaatgatatttattaacatatttcattatcataaacactcatttgttgcaagaagttttacagttttttgttctttttctagttt
 tgtctgtaggtactaaagtagtcttgtacaattaatgtaattaccgactttcatgttgagaaaataagtggtatgacctgagtagt
 tgtttaaaaatgatgcacacatggaaatcaaatgc

d) Secuencia con delección de 7 pb

CGGCAGGAATTAACACTCGTTTCCTGGCATCTCAGAGTGTGATCGTGGGGCATCACTGGGTCCCCCTCCATACTTGCGGACTGAG
 TTCCACCAGCATCAGCACCAGCATCAGCATCAGCACCAGCACACACACCAACACACACACCAGCACACCTTCACCCCTTTCC **CCGAC**
CCATCATGCCACGCCTGCACCGCCCATGGTGGTACCCAGCCAGAAATgtgaggataagtggagacaactctaaaaactata
 tataatataaaaatgataaacattgtgatgatggatgctatccactttatTTTTGACACAAAGTCAGTCAAACCTGAATGGTAACTG
 caaaatgatatttattaacatatttcattatcataaacactcatttgttgcaagaagttttacagttttttgttctttttctagttt
 tgtctgtaggtactaaagtagtcttgtacaattaatgtaattaccgactttcatgttgagaaaataagtggtatgacctgagtagt
 tgtttaaaaatgatgcacacatggaaatcaaatgc

e) Secuencia con inserción de 33 bp y 1 cambio de base

CGGCAGGAATTAACACTCGTTTCCTGGCATCTCAGAGTGTGATCGTGGGGCATCACTGGGTCCCCCTCCATACTTGCGGACTGAG
 TTCCACCAGCATCAGCACCAGCATCAGCATCAGCACCAGCACACACACCAACACACACACCAGCACACCTTCACCCCTTTCC **CCGAC**
GAGTGTTTAATTCCTGCCGAGAATGTCCTTGTTC **(A)** **CCATCATGCCACGCCT**GCACCGCCCATGGTGGTACCCAG
 CCAGAAATgtgaggataagtggagacaactctaaaaactataatataatataaaaatgataaacattgtgatgatggatgctatcc
 actttatTTTTGACACAAAGTCAGTCAAACCTGAATGGTAACTGCAAAATGATATTTATTAACATATTTCATTATCATAAACACTCA
 TTTGTTGCAAGAAGTTTACAGTTTGTCTTTTCTAGTTTGTCTGTAGGTACTAAAGTAGTCTTGTACAATTAATGTTAAAT
 accgactttcatgttgagaaaataagtggtatgacctgagtagttgtttaaaaatgatgcacacatggaaatcaaatgc

f) Secuencia aminoacídica interrumpida debido a las mutaciones reflejadas en los apartados b y d

MDGPRCSGIRKKRKSRSVRNRERISNGIRNNHVRGSLVRFSSDSEKEDGSTNPSSSRPRPRRKRKKESSAEEDIIDGFSIAGFMT
 LEALEKDMTLKPHERRQNQAGPLRKKKPGRVANGLSLDLHKDRLNHSNHQHSQDQENNPRLARHSSKKKKKHLQKHKRPLKPGQNNC
 KDSDSESVSGESKPSIRSSSRDLTDCDESDQEDKGS DASSEKLFSTAAVKVPDFSVDTLSTNASQELRGLGIPKVSGLERSQEK
 QETSREISSATPLVPTSHSKPPLPAPLHLQPPSSRGLPLPSRPAQIQNCPERTLRPLSPPIALPQSQGOELSQAPPHPSQHPPE
 SPSHPKPPRTPSYHHPPSPALPAQNPQPVQHRPPSRCHQRPI SAYSGSLTLNGLSSRSSTPGKPPGSPAPHLHHQPAPTGA
 SASFPLPLSANPTASHTFPPSLPSSSTLPHHTNMFASPAALPPPPLTSNTLPVPGHPAGSAYSE **QDILRQELNTRFLASQSADR**
LGPPPYLRTEFHQHQHQHQHQHQHTHQTFTFPFHAIMPTAPPMVTRTPARN **FEKYPTKVDFPYRHSLSFHSYPPAVSGIPPVI**
PPTGPFGLQAGAFQPKTSNPLDVAARPGAVPHLLQKDPRLTDFPRPVLKPKGKWCAMHVIWQIYHHQKVKQMQVDPHKLDFG
LKPEFLSRPPGPTLFCATIHHPDLARPASLFSAGSTHPAAAPFCHPPHPSNFLTTPAPHLEPFSRPPSFGGLASLSTAAFGGLGNP
ALASNSVFGHKDPSAQHFSGPHEPWNRLHRTPPSFPTPPWLPKGESERSASVSSHERERERDRERERDLDKRDSVNVKDDKERE
PVEKRHQNHQSPLVNPPLTLGHTRPSEPSRNHISSEPRDKDKDKPKDRERDREHSDWKSNTDEHKLKENHHSKDKTPVIHDCRV
SEDKPANRITASPYMRPGCMDRVNGCLTRDILEKKAETIYEKKNSEVVKKEERKEEQDCPTERSPEQRSTPQAPPPPPAALHPPSS
MPVPMGMSMHPINSISLERTRMVAFPMGISPIPCAERFPYAFHWDPMRDPYRGLDIHRRDPLARELLLRNDPLHRLAAPRLYEA
ERSYRDRPHDFNRDHPHGLTLEQRREQERABLEERERLHLLREDEYEQRLHPMHHPVLDGHLPHPLMAPGLPSMHYPRVSPSSAV
AAAQNGILNKTPPTASLSAPPPPLITPLGARSSSRRTTPLGPDIRDPRPSHTHKDIEAR

g) Secuencia aminoacídica interrumpida debido a la mutación reflejada en el apartado e

MDGPRCSGIRKKRKSRSVRNRERISNGIRNNHVRGSLVRFSSDSEKEDGSTNPSSSRPRPRRKRKKESSAEEDIIDGFSIAGFMT
 LEALEKDMTLKPHERRQNQAGPLRKKKPGRVANGLSLDLHKDRLNHSNHQHSQDQENNPRLARHSSKKKKKHLQKHKRPLKPGQNNC
 KDSDSESVSGESKPSIRSSSRDLTDCDESDQEDKGS DASSEKLFSTAAVKVPDFSVDTLSTNASQELRGLGIPKVSGLERSQEK
 QETSREISSATPLVPTSHSKPPLPAPLHLQPPSSRGLPLPSRPAQIQNCPERTLRPLSPPIALPQSQGOELSQAPPHPSQHPPE
 SPSHPKPPRTPSYHHPPSPALPAQNPQPVQHRPPSRCHQRPI SAYSGSLTLNGLSSRSSTPGKPPGSPAPHLHHQPAPTGA
 SASFPLPLSANPTASHTFPPSLPSSSTLPHHTNMFASPAALPPPPLTSNTLPVPGHPAGSAYSE **QDILRQELNTRFLASQSADR**
LGAS

```

LGPPPYLRTEFHQHQHQHQHQHQHQHQHQHQHTHQHTHQHTFTFPFHACLIPAGECLVLIMPTPAPPMVRTPARNFEKYPTKVDPPFYRHSLFHS
YPPAVSGIIPVIPPPTGPFGLQGAQFQPKTSNPLDVAARPGAVPHLLQKDPRLTDPFRPVLKPKGKWCAMHVHIAWQIYHHQQKVKQ
QMQVDPHKLDFGLKPEFLSRPPGPTLFGAIHHPDLARPASLFSAAGSTHPAAAPFGHPPHPSNFLTAPAPHPFSRPPSFGGLAS
LSTAAFGLGNPALASNSVFGHKDSPAQQHFSGPHEPWNRLHRTPPSFPTPPWPKGESERSASVSSHERERERDRERERDLDR
DSSVNKDDKEREPEVEKRQHQHQSPQVPLVNPVPLTLLGHTRPSEPSRNHISSEPRDKDKDKPKDRERDREHSDWKSNTDEHKLKENHHS
DKDTPVIHDGRVSEDKPANRITASPYMRPGGMDRVNGLTRDILEKKAETIYEKKNSEVKVKEERKEEQDGPTERSPEQRSTPQAPP
PPPPAALHPPSSMPVPMGMASHPINSISSLERTRMVAFPMGISPIPGAERFPYPAFWDPMRDPYRGLDIHRRDPLARELLLRNDP
LHRLAAPRLYEASRYRDREPHDFNRDHPHGLTLEQRREQERAHLEERERLHLLREDEYQGRLLHPMHHPVLDGHLPHPGLMAPGLPS
MHYPRVSPSSAVAAAQNGILNKTPPTASLSAPPPLIPTLGARSSSPRRTTFLGPDIRDPPSHTHKDIEAR

```

Figura 19. Secuencias nucleotídicas y aminoácidas de mutantes de la F1. En mayúscula se muestra la secuencia exónica y en minúscula la intrónica. Se marcan en gris los cebadores, en verde la región complementaria al ARNsg, en azul las inserciones y en rojo tachado las deleciones. a) Secuencia con deleción de 3 pb; b) Secuencia con deleción de 5 pb; c) Secuencia con deleción de 6 pb; d) Secuencia con deleción de 7 pb; e) Secuencia con inserción de 33 pb y un cambio de base; f) Secuencia aminoácida interrumpida debido a las mutaciones reflejadas en los apartados b y d. En amarillo la secuencia correspondiente al exón 9; g) Secuencia aminoácida interrumpida debido a la mutación reflejada en el apartado e.

1.5. GENOTIPADO DE LOS ADULTOS DE LA F1

1.5.1. Análisis de heterodúplex en gel de poliacrilamida

Los embriones de la F1 se crecieron y en la edad adulta, tras la extracción de ADN de aleta, PCR y electroforesis en gel de agarosa, se realizó el análisis de heterodúplex (Figura 20), lo que permitió reducir el número de muestras para analizar posteriormente. Así, de un total de 35 individuos de la generación F1, en 21 de ellos se encontraron heterodúplex. Los restantes 14 fueron descartados.

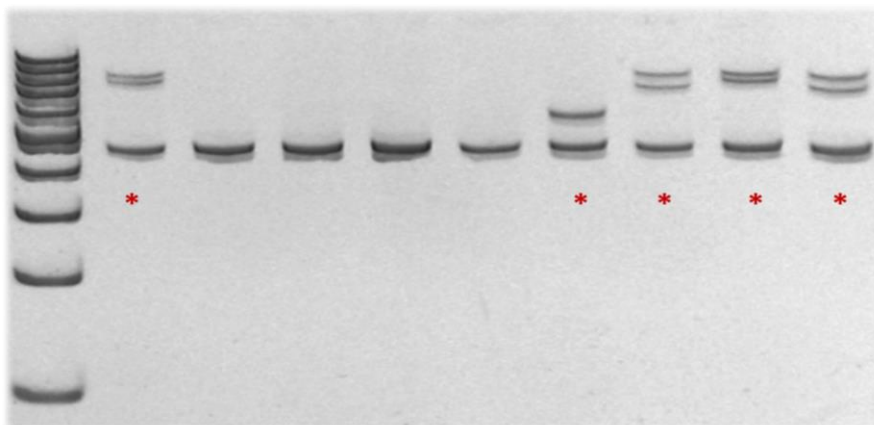


Figura 20. Ejemplo de análisis de heterodúplex mediante gel de poliacrilamida para 9 de los adultos de la F1. El asterisco (*) marca individuos con presencia de heterodúplex. Marcador de peso molecular de 100 pb.

1.5.2. Clonación bacteriana

Se realizó la clonación bacteriana para los 21 individuos adultos y así determinar el tipo exacto de mutación y así establecer cruces dirigidos. Los genotipos que se encontraron fueron los siguientes:

- 3 individuos heterocigotos para la deleción de 3 pb
- 7 individuos heterocigotos para la deleción de 5 pb

- 2 individuos heterocigotos para la delección de 6 pb
- 3 individuos heterocigotos para la delección de 7 pb
- 6 individuos heterocigotos para la inserción de 33 pb y un cambio de base

1.6. OBTENCIÓN Y GENOTIPADO DE LA F2

1.6.1. Establecimiento de cruces

En vista de los genotipos de los adultos y de las consecuencias previstas para cada una de las mutaciones se decidió descartar a los individuos portadores de las mutaciones por delección de 3 y 6 pb. Asimismo, los 3 individuos portadores de la mutación por delección de 7 pares de bases resultaron ser hembras, por lo que el establecimiento de cruces entre individuos resultó imposible. Los 6 individuos portadores de la mutación por inserción de 33 pb y un cambio de base se mantuvieron en el sistema con vistas a realizar exámenes de expresión proteica en un futuro, ya que la inserción no garantizaba la expresión de un ARNm o proteína aberrantes. Por ello, se establecieron cruces entre hembras y machos F1 portadores de la mutación por delección de 5 pb.

1.6.2. Genotipado de los embriones de la F2

1.6.2.1. Cribado de los individuos heterocigotos en gel de agarosa

La diferencia de 5 pb entre el alelo WT y el alelo mutante resultó ser suficiente como distinguir ambos alelos en un gel de agarosa concentrado, corrido a bajo voltaje. Así, de las puestas obtenidas, aproximadamente el 50% de los individuos pudieron ser genotipados mediante esta metodología. Un ejemplo de gel de agarosa para 14 embriones de la F2 se muestra en la Figura 21.

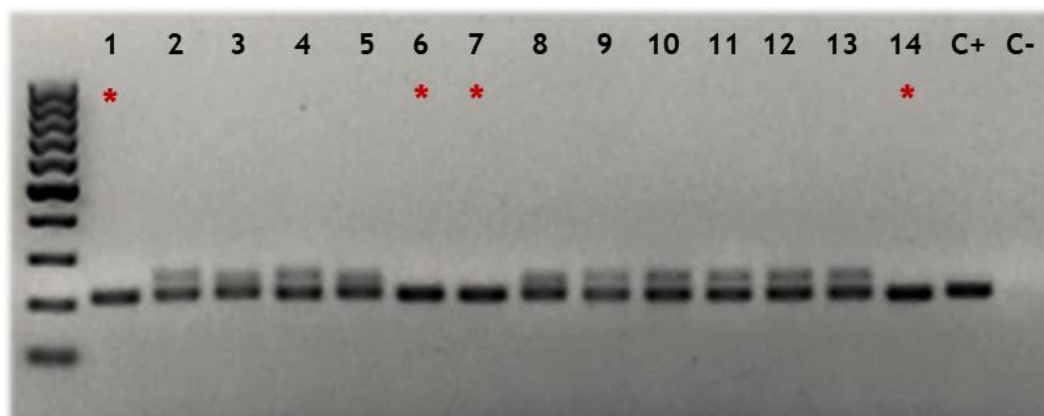


Figura 21. Gel de agarosa para el cribado de individuos heterocigotos de la generación F2. Los asteriscos muestran los individuos en los que el genotipo no se puede distinguir. C+, control positivo; C-, control negativo. Marcador de peso molecular de 100 pb.

1.6.2.2. Análisis de fragmentos

En las ocasiones en que el número de individuos a analizar alcanzó un número cercano a 96, el genotipado se pudo realizar mediante análisis de fragmentos. Se comprobó la

exactitud con la que el programa calcula el tamaño de los fragmentos tanto WT como mutantes. De esta forma, los individuos WT presentaron un único pico a 216 pb en el electroferograma, indicando que ambos alelos eran de igual tamaño; los individuos heterocigotos presentaron un pico a 211 pb y otro a 216, lo que se corresponde con la diferencia de 5 pb entre el alelo WT y el mutante; y los mutantes homocigotos presentaron únicamente un pico a 211 pb, indicando un tamaño equivalente en ambos alelos y correspondiéndose con la delección de 5 pb.

Así, esta metodología no solo permitió un genotipado rápido de individuos con mutaciones previamente caracterizadas, sino también desarrollar una nueva estrategia para el genotipado de parte de embriones o adultos de la F1 sin necesidad de clonación bacteriana. Esto es, en individuos en que el análisis por fragmentos reveló un alelo mutante con una diferencia lo suficientemente grande con respecto al alelo WT como para físicamente dichos alelos mediante gel de agarosa, éstos se pudieron recortar, purificar y enviar directamente a secuenciar. Un ejemplo de los resultados en forma de electroferograma que ofrece el *software* para el análisis de fragmentos se muestra en la Figura 22.

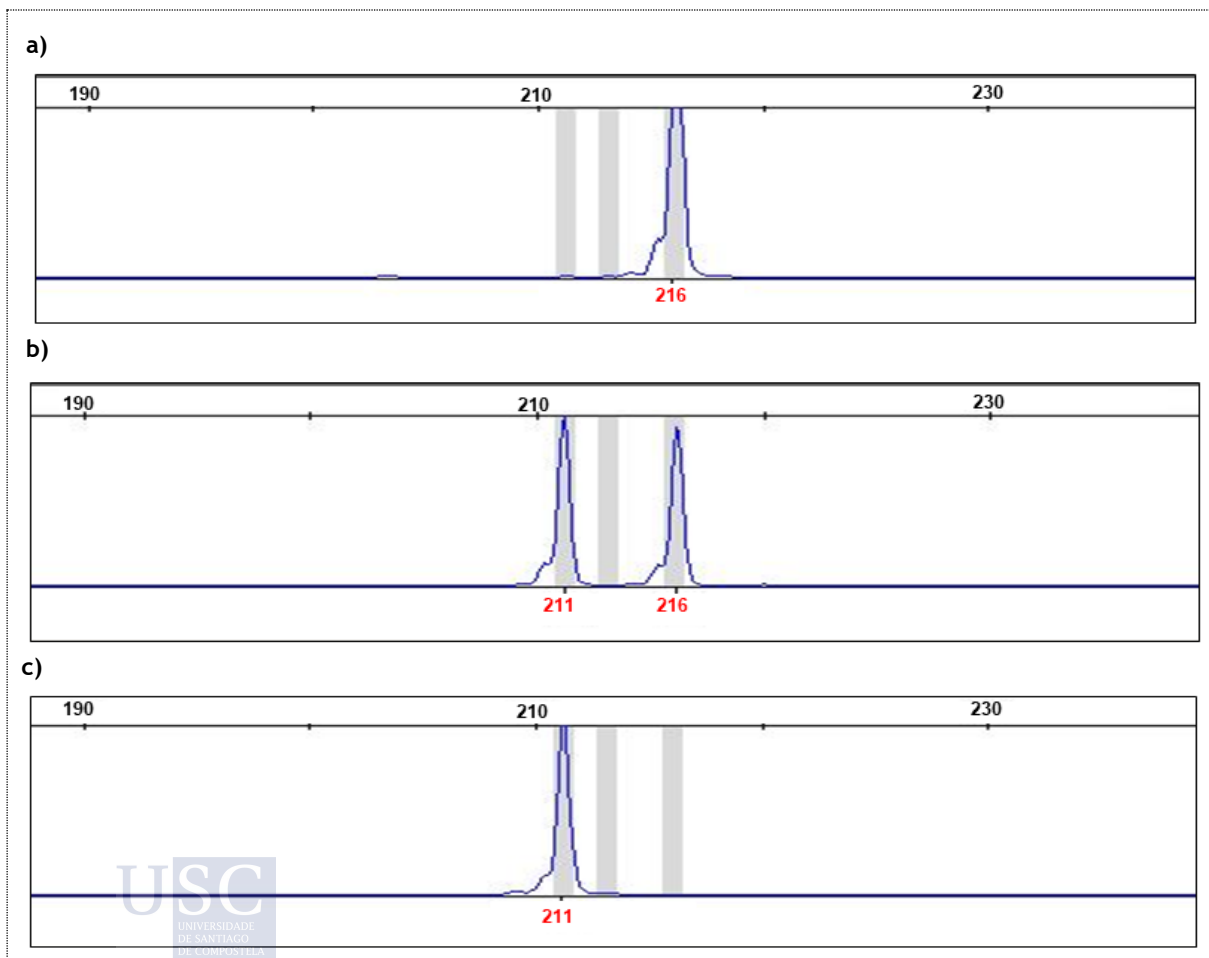


Figura 22. Electroferogramas generados por el *software* del análisis de fragmentos para el genotipado: a) Individuo con dos alelos WT; b) Individuo con un alelo WT y un alelo mutante (heterocigoto); c) Individuo con dos alelos mutantes (homocigoto mutante).

1.6.2.3. Mezcla de ADN de homocigotos problema con ADN de homocigotos WT

Para aquellos individuos homocigotos WT o mutantes en que la detección del genotipo no fue posible mediante gel de agarosa y el número no era suficiente para realizar análisis de fragmentos se desarrolló esta estrategia, sencilla y rápida. En la Figura 23a se muestra la validez de la metodología, de forma que para los individuos homocigotos para la mutación se observan dos bandas en el gel, cuando inicialmente se observa una única banda, mientras que para los individuos WT se continúa observando únicamente una banda y para los individuos heterocigotos se conservan ambas bandas. En la Figura 23b, se muestra el resultado de la mezcla de ADN WT con el ADN problema de los 4 individuos pendientes de genotipado descritos en el apartado 1.6.2.1.

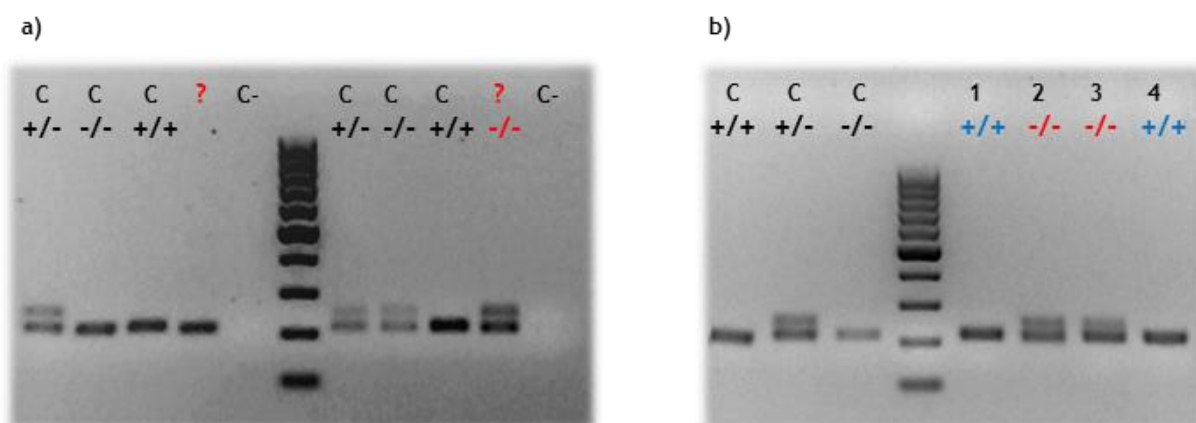


Figura 23. Geles de agarosa para la distinción de individuos homocigotos mutantes o WT. a) Ejemplo de la validez de la metodología; b) Genotipado de 4 individuos problema. C+/, control WT; C+/-, control heterocigoto; C-/-, control homocigoto. Marcador de peso molecular de 100 pb

2. VALIDACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL *KNOCK-OUT* DE *AUTS2A*

2.1. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *AUTS2A* POR QPCR

Como se muestra en la Figura 24, la comprobación en gel de agarosa de los cebadores de *auts2a*, *actb2* y *eef1a1* muestra una correcta amplificación, pues se observa una única banda a la altura esperada y ausencia de banda en los controles negativos.

Los análisis de qPCR para *auts2a* en los individuos homocigotos revelaron una disminución significativa en los niveles de expresión de dicho gen cuando se relativizan a la expresión de ambos genes normalizadores, aproximadamente en la misma medida, como se muestra en la Figura 25. En relación a los heterocigotos, se encontró un aumento significativo de la expresión de *auts2a*, lo que probablemente se debe a un mecanismo de adaptación transcripcional del alelo WT mediada por la degradación el ARNm derivado del alelo mutante. Por este motivo, el estudio de los mutantes para *auts2a* se continuó únicamente con los individuos homocigotos. Estos resultados apuntan a la potencial degradación del ARNm mutante por el NSMD y por ende, a la reducción en los niveles de proteína Aut2a.

En relación con el gen normalizador, se decidió continuar los análisis con *actb2* debido principalmente a que es el más comúnmente utilizado en estudios con pez cebra.

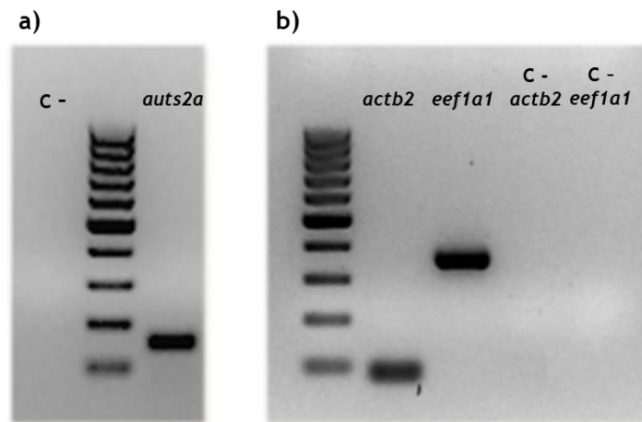


Figura 24. Comprobación de la amplificación de los cebadores en gel de agarosa. a) Análisis para *auts2a*; b) Análisis para *actb2* y *eef1a1*. C-, control negativo. Marcador de peso molecular de 100 pb.

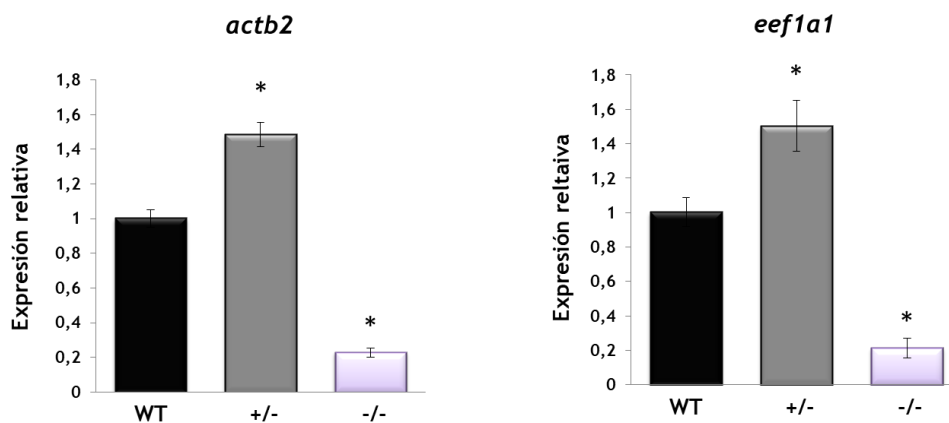


Figura 25. Validación del *knock-out* mediante la evaluación de la expresión de *auts2a* en individuos heterocigotos y homocigotos con respecto a individuos WT, utilizando como normalizadores los genes *actb2* y *eef1a1*. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

Para incrementar la fiabilidad de los cebadores de *actb2* y *auts2a* a la hora de validar el *knock-out* se desarrollaron las rectas de calibrado. El rango de valores aceptados en relación coeficiente de regresión lineal (R^2) se estableció entre 0,98 y 1 y el porcentaje de eficiencia entre el 90% ($m = -3,58$) y 110% ($m = -3,1$), siendo ideal un valor del 100% ($m = -3,2$), ya que valores por debajo del 90% suelen indicar principalmente un mal diseño de los cebadores y valores por encima de 110% apuntan a inhibición de la polimerasa o errores de pipeteo. En la Figura 26 se pueden observar las rectas de calibrado generadas al contrastar los valores de las Cts obtenidas y el logaritmo en base 10 de la cantidad de ARN de las muestras. Asimismo, se refleja la ecuación de regresión lineal para ambos cebadores, así como el R^2 , siendo 0,9907 para *actb2* y 0,9957 para *auts2a*, por lo que ambos valores entran dentro del rango establecido.

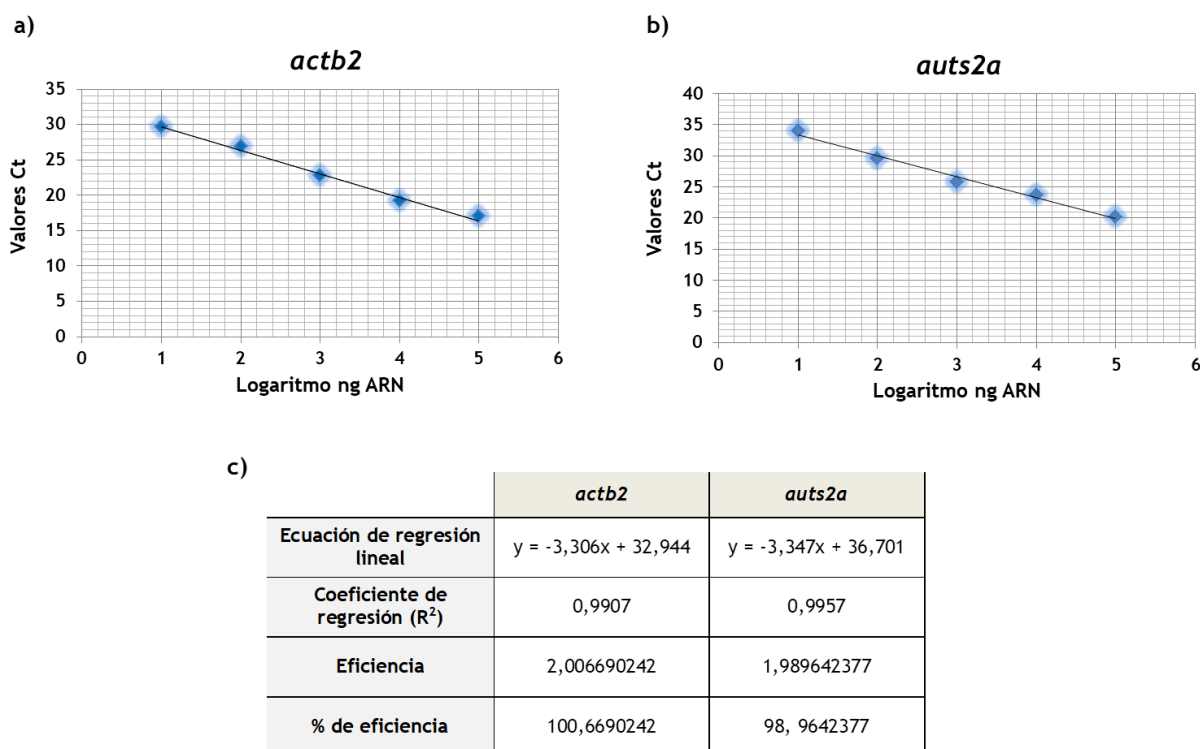


Figura 26. Rectas de calibrado de los cebadores. a) y b), rectas para *actb2* y *auts2a*, respectivamente, obtenidas enfrentando los valores de las Cts con el logaritmo de la cantidad de ARN en las muestras; c), ecuación de regresión lineal, valor R^2 , eficiencia y % de eficiencia para los cebadores.

2.2. HIBRIDACIÓN *IN SITU* PARA EL GEN *AUTS2A*

La amplificación con los cebadores para la HIS de *auts2a* sin y con la secuencia de reconocimiento de la enzima T7 comprobada mediante gel de agarosa mostró una única banda a las alturas esperadas (Figura 27a). Asimismo, la banda esperada se obtuvo tras transcribir el producto de amplificación o sonda (Figura 27b) y tras su purificación (Figura 27c).

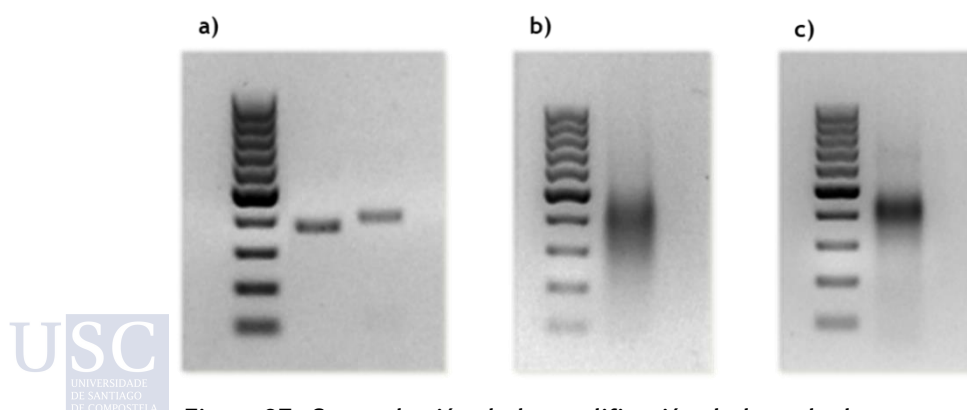


Figura 27. Comprobación de la amplificación de los cebadores en gel de agarosa. a) Análisis para los cebadores de *auts2a* sin y con secuencia de reconocimiento de T7; b) Análisis del producto de transcripción o sonda; c) Análisis de la sonda tras la purificación. Marcador de peso molecular de 100 pb.

La HIS para determinar las regiones anatómicas en donde se expresa el gen *auts2a* reveló que a las 24 hpf, la expresión se encuentra en el cerebro, abarcando el cerebro anterior, medio y posterior, así como en el tronco y en el ojo, aunque más ligeramente (Figura 28a y a'). A las 48 hpf la expresión se restringe al cerebro, principalmente al anterior y posterior, y también parece aumentar en la retina (Figura 28c y c'). En los individuos homocigotos para *auts2a* a las 24 hpf se observa una disminución drástica de la expresión tanto en el ojo, como en el tronco y el cerebro, aunque dicha disminución no es tan acuciada en la región correspondiente al cerebro anterior (Figura 28b y b'), mientras que a las 48 hpf se observa una reducción significativa de la expresión en todas las regiones anatómicas (Figura 28d y d'). Estos resultados proporcionan una reconfirmación de los resultados transcricptómicos obtenidos mediante qPCR.

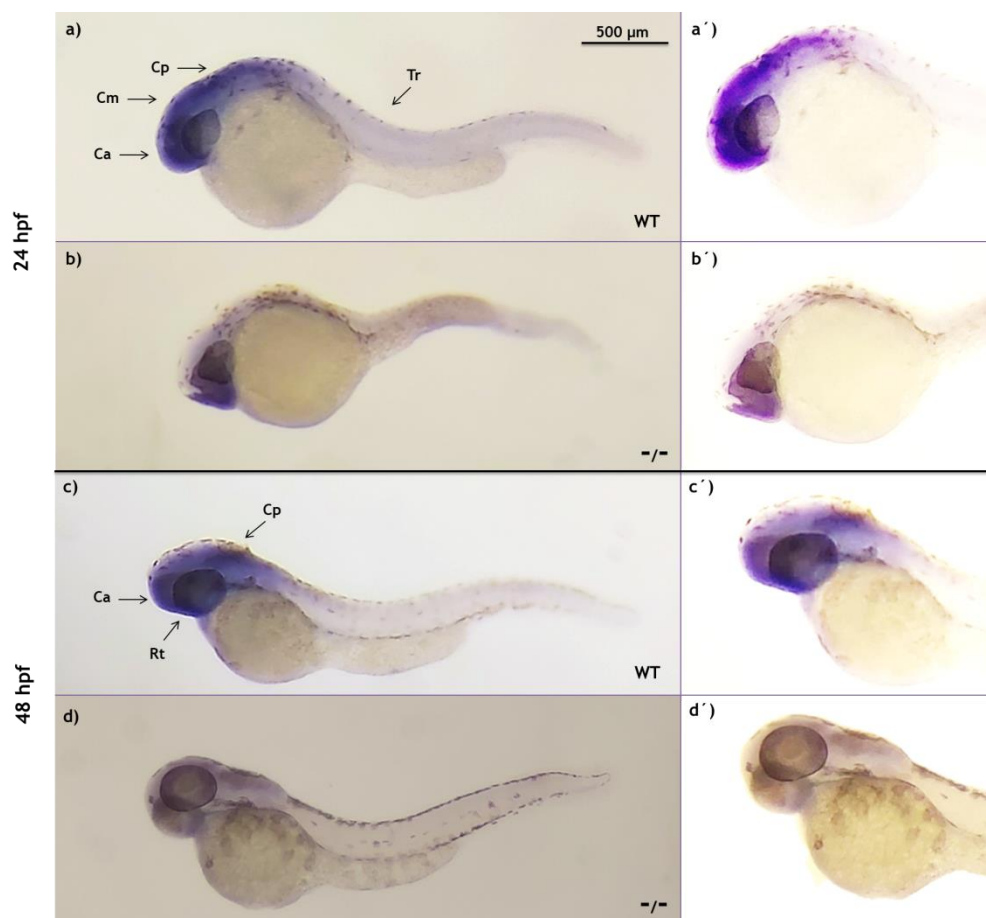


Figura 28. Validación del *knock-out* mediante HIS para el gen *auts2a*. a y a') Embrión WT de 24 hpf; b y b') Embrión homocigoto mutante de 24 hpf; c y c') Embrión WT de 48 hpf; d y d') Embrión homocigoto mutante de 48 hpf. Las flechas indican las regiones anatómicas en que se expresa *auts2a*. Ca, cerebro anterior; Cm, cerebro medio; Cp, cerebro posterior; Tr, tronco; Rt, retina.

2.3. WESTERN BLOT

Como se muestra en la Figura 29, en el análisis proteico a través de *Western Blot* se encontró señal positiva (banda) en los 3 individuos WT y los 3 individuos homocigotos para la proteína normalizadora Actb2. Por el contrario y como era de esperar, al analizar *Auts2a* se observa banda de proteína en los 3 individuos mientras que ésta está ausente en los individuos homocigotos mutantes. Este resultado termina por validar la eficiencia del *knock-out* de *auts2a* en el pez cebra, ya que confirma que la mutación afecta, en última instancia, a la producción de la proteína.

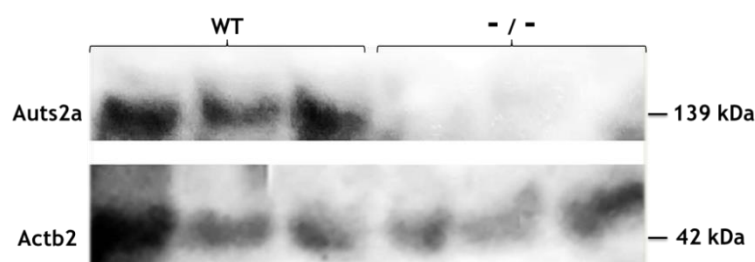


Figura 29. Validación del *knock-out* mediante *Western Blot*. Expresión de la proteína normalizadora Actb2 y *Auts2a* en individuos WT y homocigotos mutantes. Se observa banda para Actb2 en todos los individuos, mientras que solo se observa en los individuos WT para *Auts2a*.

3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES DE *AUTS2A*

3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS EMBRIONES

3.1.1. Análisis morfológico

Los embriones homocigotos mutantes así como los WT fueron fotografiados a las 48 hpf, tras lo que se tomaron medidas del diámetro de la cabeza, diámetro del ojo, longitud total del cuerpo y longitud de la aleta caudal, tal y como se muestra en la Figura 30. En la Figura 30 se pueden observar también fotografías de un embrión WT y de un embrión homocigoto con rasgos fenotípicos característicos de los individuos portadores de la mutación.

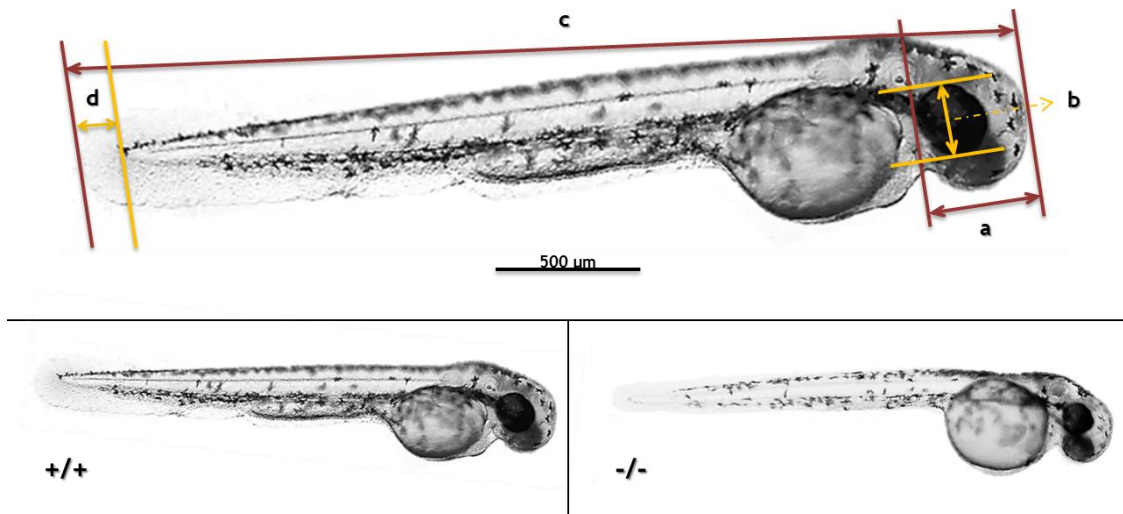
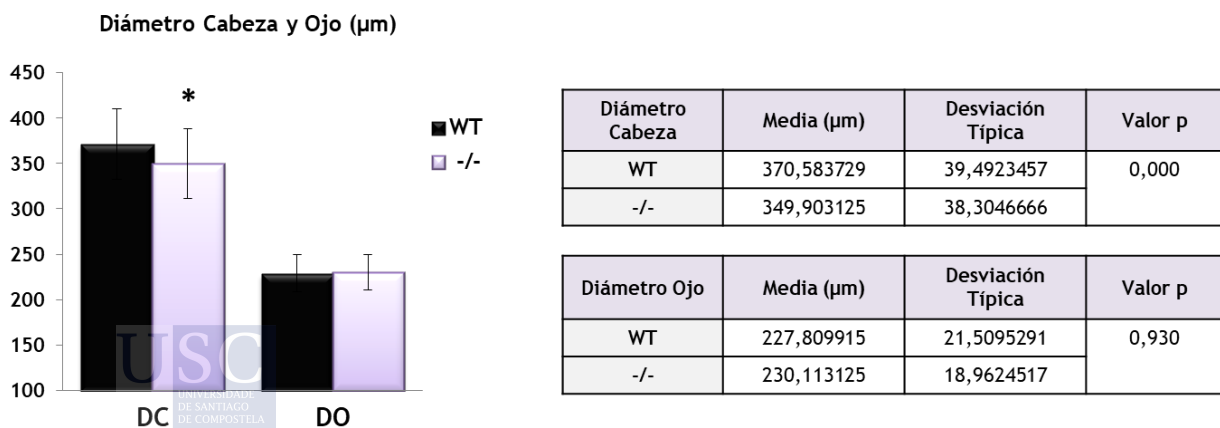


Figura 30. Análisis morfológico de los embriones y fotografías de un individuo WT y un homocigoto mutante. a, diámetro de la cabeza; b, diámetro del ojo; c, longitud total del cuerpo; d, longitud de la aleta caudal. Escala a 500 µm.

El análisis estadístico realizado en base a los datos obtenidos tras las mediciones reveló que existen diferencias estadísticamente significativas en relación al diámetro de la cabeza, indicando microcefalia, y a la longitud del cuerpo, tanto con aleta aleta caudal como sin aleta, entre los individuos WT y los homocigotos mutantes, siendo menor el valor en ambos casos para estos últimos individuos. Para la longitud de la aleta caudal no existen diferencias significativas, lo que indica que la diferencia en la longitud del cuerpo se debe al propio cuerpo, y no a una diferencia de tamaño de la aleta. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en relación al diámetro del ojo. Las gráficas en que se ilustran los resultados de las mediciones, así como los datos relativos a la media, desviación estándar y valor de p para los parámetros se muestran en la Figura 31.



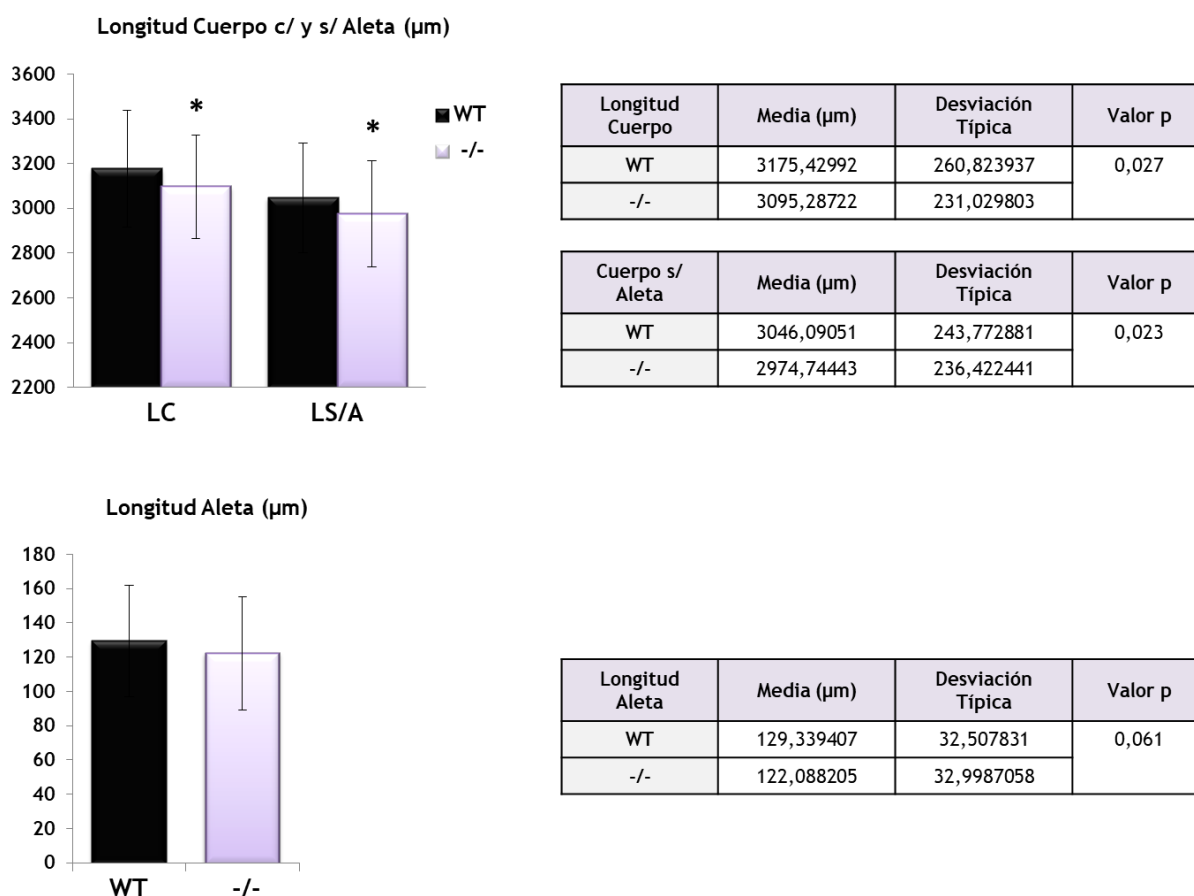


Figura 31. Análisis fenotípico de embriones WT y homocigotos para el diámetro de la cabeza y diámetro del ojo, longitud del cuerpo con y sin aleta, y longitud de la aleta. Se muestran las gráficas y los valores de la media, desviación típica y valor de p para todas las medidas. DC, diámetro de la cabeza; DO, diámetro del ojo; LC, longitud del cuerpo; LS/A, longitud del cuerpo sin aleta. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

En cuanto a la ratio cabeza/ cuerpo se encontraron diferencias significativas, siendo el valor para los homocigotos menor que para los individuos WT. Esto indica que en los WT la cabeza es más grande que en los homocigotos con respecto a la longitud del cuerpo. Para la ratio ojo/ cabeza los resultados se invierten, de forma que los valores para los homocigotos mutantes son significativamente mayores que para los WT, lo que indica que, o el ojo de los de los homocigotos es más grande con respecto a la cabeza que el de los WT, o bien que la cabeza de los homocigotos es más pequeña con respecto al ojo que la cabeza de los WT. Al no encontrarse diferencias significativas en el diámetro del ojo entre los homocigotos y los WT, y teniendo en cuenta la ratio anterior, asumimos que el diámetro de la cabeza es menor en los homocigotos que en los WT. Estos resultados apuntan a la disminución del tamaño de la cabeza de los mutantes, es decir, a microcefalia, un rasgo comúnmente observado en individuos afectados por TEA. Las gráficas en que se ilustran los resultados de las mediciones, así como los datos relativos a la media, desviación estándar y valor de p para los parámetros se muestran en la Figura 32.

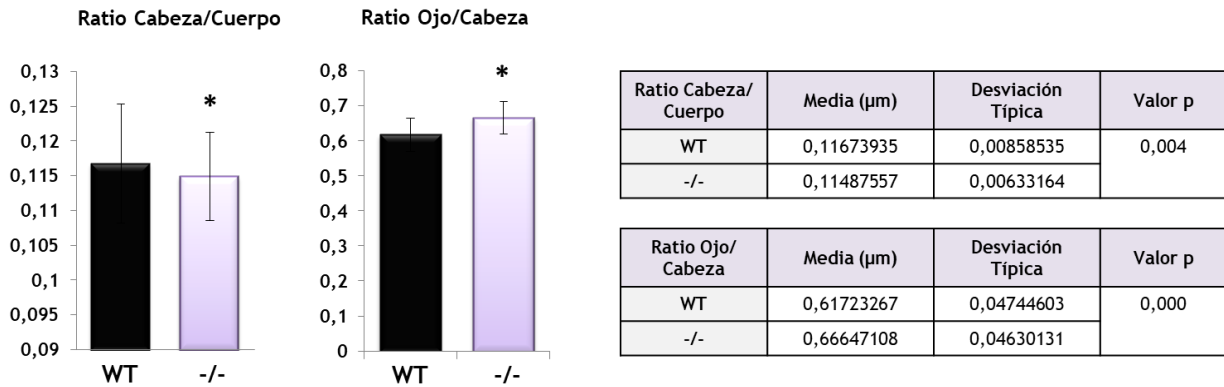


Figura 32. Análisis fenotípico de embriones WT y homocigotos para la ratio cabeza/ cuerpo y ojo/ cabeza. Se muestran las gráficas y los valores de la media, desviación típica y valor de p para todas las medidas. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

3.1.2. Tinción de cartílago

La caracterización morfológica de la región mandibular de los embriones de 5 dpf mediante la tinción con azul alcian sugiere anomalías en la misma, ya que el análisis de las medidas tomadas de la longitud del palatocadrado, así como del ángulo ceratohial reveló diferencias significativas en el tamaño de ambas estructuras anatómicas (Figura 33).

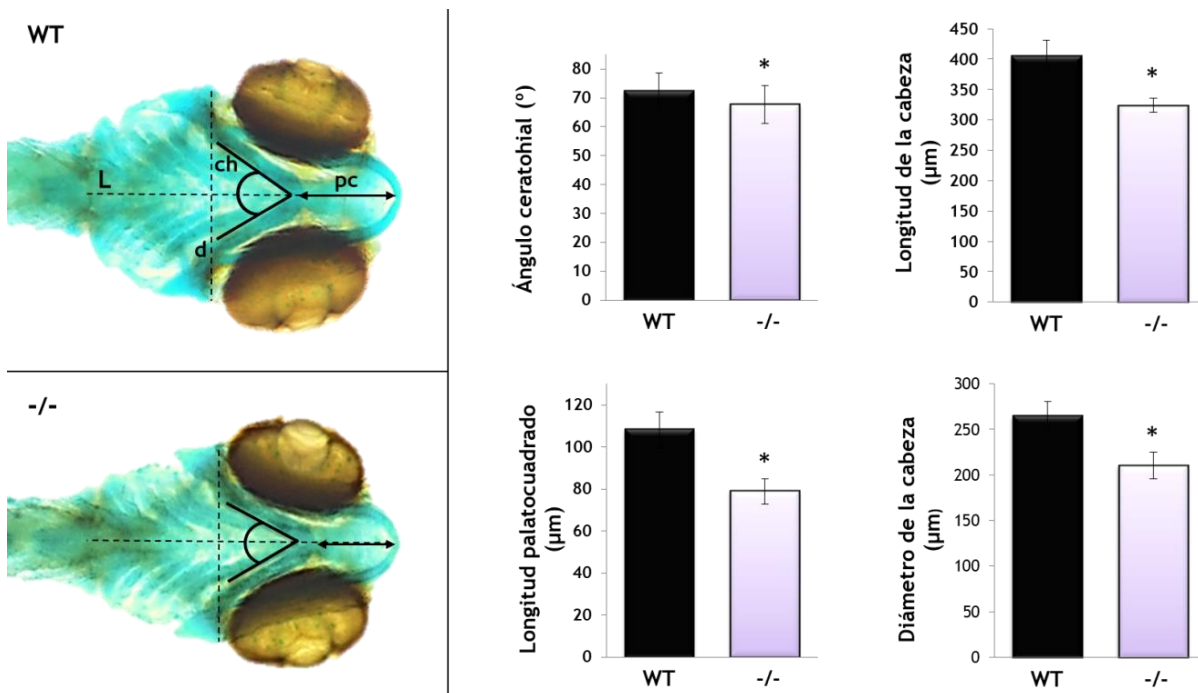


Figura 33. Análisis de las estructuras cartilaginosas y dimensión de la cabeza de embriones de 5 dpf mediante azul alcian. ch, ángulo ceratohial; pc, palatocadrado; L, longitud de la cabeza; d, diámetro de la cabeza. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

Estos resultados apuntan a una reducción del tamaño de las estructuras mandibulares, es decir, micrognatia, que al igual que la retrognatia y la boca estrecha, son rasgos comunes de

pacientes de TEA. Asimismo, se utilizaron las imágenes de la región cefálica de los embriones para tomar medidas de la longitud y diámetro de la cabeza. El análisis estadístico mostró que los individuos homocigotos presentan una disminución significativa en las medidas de ambos parámetros, lo que de nuevo indica microcefalia (Figura 33).

3.1.3. Determinación de apoptosis

3.1.3.1. Naranja de acridina

Para determinar si las anomalías morfológicas observadas en la región cefálica de los embriones se deben a un incremento en la apoptosis, se realizó una tinción con naranja de acridina. A pesar de haber relativa variabilidad en los resultados obtenidos, se observa una clara tendencia al incremento de la apoptosis en la región del cerebro anterior o telencéfalo, como se puede observar en la Figura 34. En ambos grupos de individuos se encuentran poblaciones equivalentes de células apoptóticas en la región posterior del cuerpo.

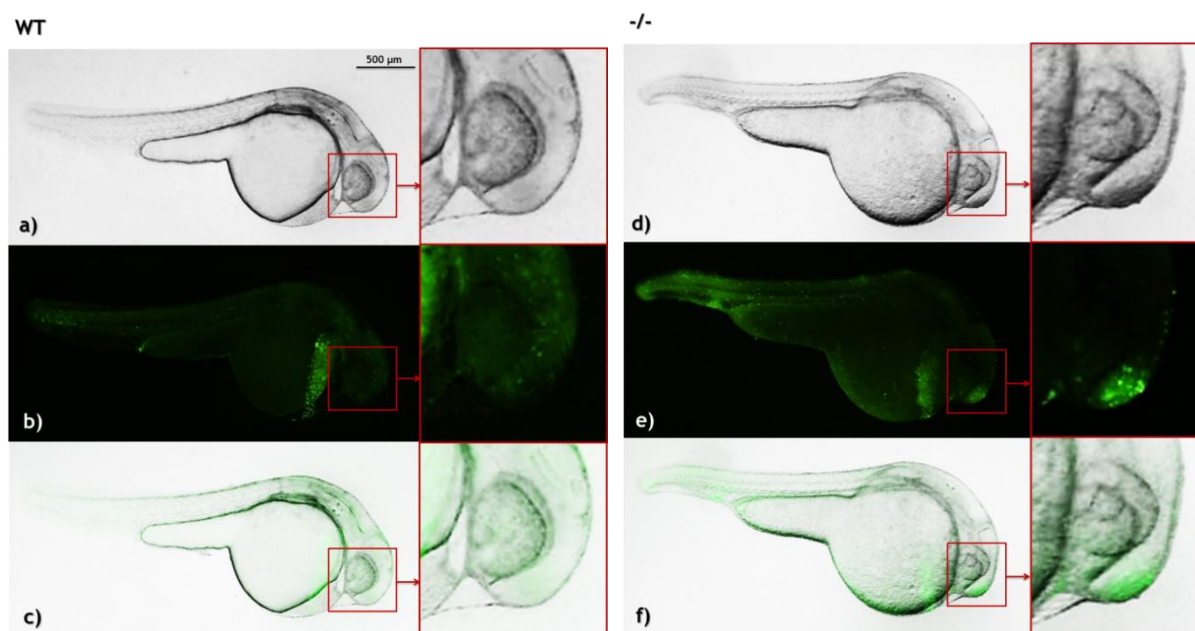


Figura 34. Evaluación de la apoptosis en embriones WT y homocigotos mutantes de 24 hpf mediante tinción con naranja de acridina. a) Individuo WT, campo claro; b) Individuo WT, fluorescencia; c) Individuo WT, imágenes superpuestas; d) Individuo homocigoto, campo claro; b) Individuo homocigoto, fluorescencia; c) Individuo homocigoto, imágenes superpuestas.

3.1.3.2. Análisis de la expresión de *p53*

Como se muestra en la Figura 35a, la comprobación en gel de agarosa muestra una correcta amplificación, pues se observa una única banda a la altura esperada. En relación a la curva de calibrado (Figura 35b), la ecuación de regresión lineal ($y = -3,3286x + 30,784$) da lugar a unos valores para R^2 y eficiencia dentro del rango de valores aceptados, siendo 0,9993 y 99,723%, respectivamente. El análisis de los datos obtenidos en la qPCR evidencian un incremento significativo de la expresión de *p53* en la región cefálica de los individuos

homocigotos mutantes (Figura 35c), lo que se corresponde con lo observado con la tinción de naranja de acridina.

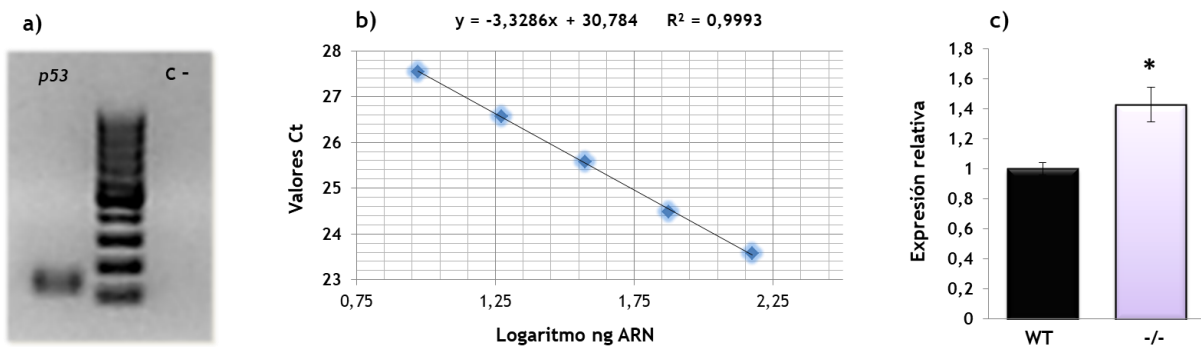


Figura 35. Análisis de *p53*. a) Gel de agarosa para *p53*. Marcador de peso molecular de 100 pb; b) recta de calibrado para *p53*; c) Comparación de la expresión de *p53* en individuos WT y homocigotos mutantes. C-, control negativo. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

3.1.4. Hibridación *in situ* de *pax2a*, *emx1* y *aldoca*

La amplificación con los cebadores para la HIS de *pax2a*, *emx1* y *aldoca* sin y con la secuencia de reconocimiento de la enzima T7 comprobada mediante gel de agarosa mostró una única banda a las alturas esperadas (Figura 36a- c). Asimismo, la banda esperada se obtuvo tras la transcripción y purificación de las sondas (Figura 36d- f).

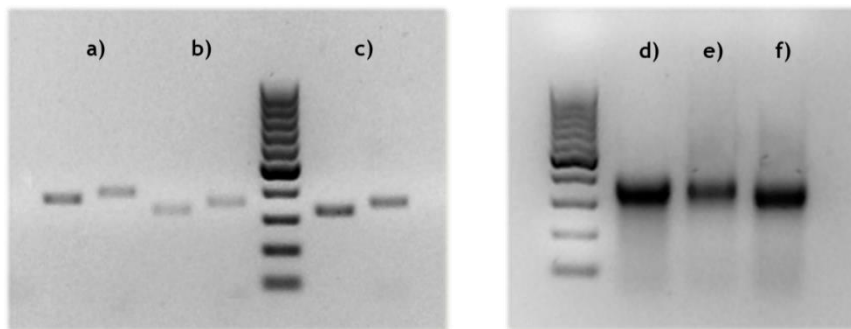


Figura 36. Comprobación de la amplificación de los cebadores en gel de agarosa. a-c) Análisis para los cebadores de *pax2a*, *emx1* y *aldoca*, respectivamente, sin y con secuencia de reconocimiento de T7; d-f) Análisis de las sondas de *pax2a*, *emx1* y *aldoca* tras la purificación. Marcador de peso molecular de 100 pb.

La falta de individuos homocigotos mutantes impidió llevar a cabo los análisis de HIS para todas las sondas transcritas, así que se priorizó la sonda para el gen *aldoca*. Así, y tal y como se muestra en la Figura 37a y a', se encontró que a las 120 hpf el gen se expresa en los individuos WT principalmente en la retina y en el cerebro posterior, en la región que se corresponde al cerebelo, aunque la expresión se extiende, aunque más ligeramente, hacia el cerebro medio y anterior. Por el contrario, en los individuos homocigotos mutantes la expresión se pierde prácticamente en las regiones cerebrales, y disminuye significativamente en la retina (Figura 37b y b'). Siendo *aldoca* un gen que se expresa de forma preferente en las

neuronas del cerebelo, estos resultados indican una reducción en el número de células neuronales del cerebelo en los individuos homocigotos.

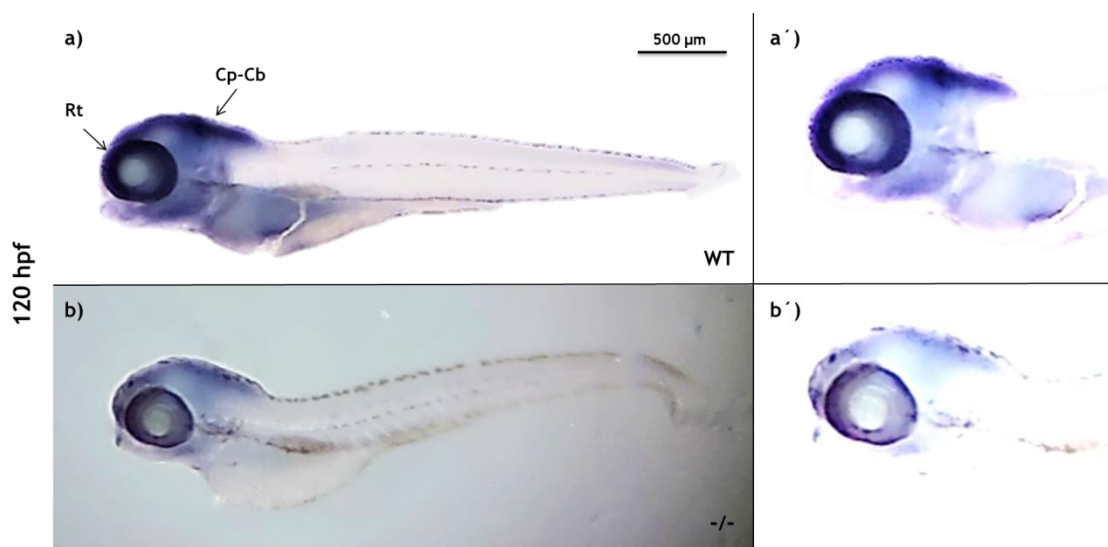


Figura 37. HIS para el gen *aldoca*. a y a´) Embrión WT de 120 hpf; b y b´) Embrión homocigoto mutante de 120 hpf. Las flechas indican las regiones anatómicas en que se expresa *aldoca*. Cp, cerebro posterior; Cb, cerebelo; Rt, retina.

3.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS INDIVIDUOS ADULTOS

3.2.1. Longitud y peso de los adultos

El análisis estadístico realizado en base a los datos obtenidos tras las medidas de la longitud del cuerpo y el peso de los adultos WT y homocigotos mutantes reveló que existen diferencias estadísticamente significativas en relación a ambos parámetros, siendo menor el valor para los homocigotos (Figura 38). Estos resultados pueden asociarse a la observación de una menor ingesta de comida por parte de los adultos homocigotos mutantes, en comparación con los WT, lo que a su vez puede relacionarse con los trastornos gastrointestinales –malestar o dismotilidad intestinal– típicamente comórbidos de los individuos afectados por TEA.

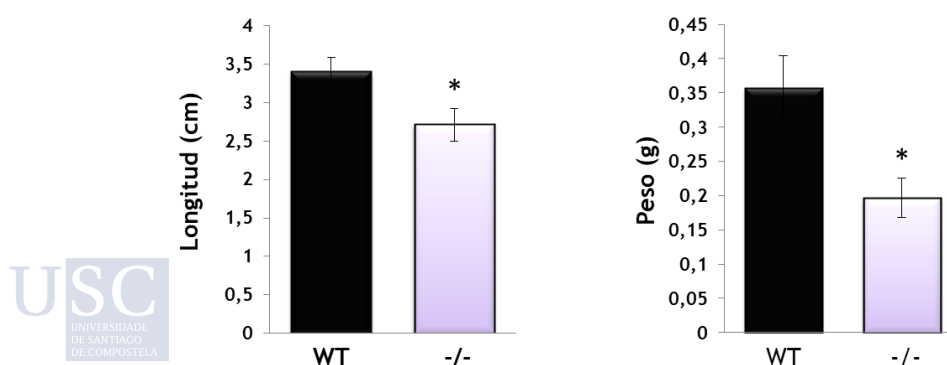


Figura 38. Comparación entre la longitud y el peso de los individuos adultos WT y homocigotos mutantes. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

4. ANÁLISIS DE LOCOMOCIÓN DE LOS EMBRIONES MUTANTES DE *AUTS2A*

El rastreo automatizado de los movimientos de los peces permitió determinar la distancia recorrida de cada pez medida en píxeles por minuto. Los análisis revelaron que tanto en condiciones de luz como de oscuridad, la distancia recorrida de los individuos homocigotos es significativamente menor que en los individuos WT (Figura 39a). Asimismo, se observó que en ambos casos, la locomoción es mayor en condiciones de oscuridad (Figura 39b), lo que probablemente se debe a un incremento en la ansiedad por el cambio de estímulo. Estos resultados muestran que, en términos generales, los homocigotos mutantes presentan una locomoción disminuida.

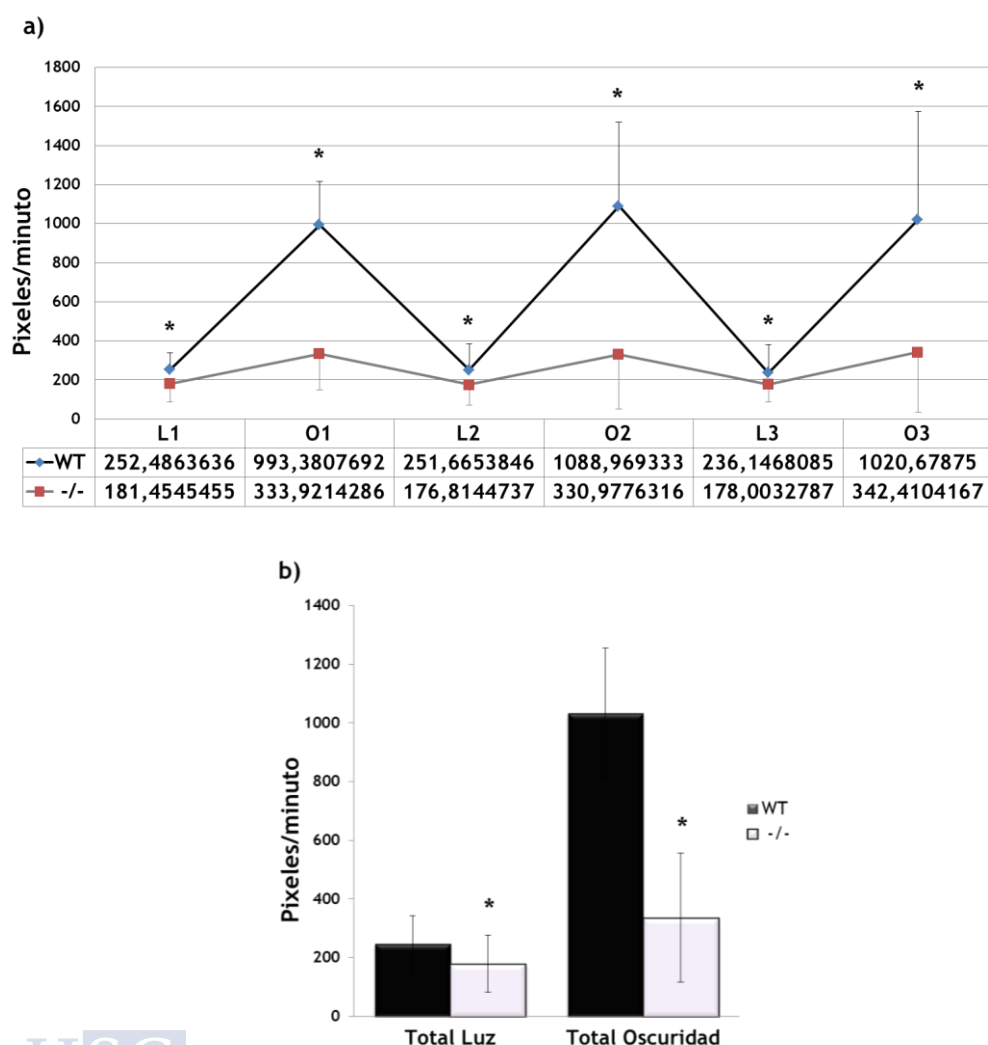


Figura 39. Análisis de la locomoción de larvas mutantes de 7 dpf. a) Distancia recorrida expresada en píxeles/minuto para cada uno de los 6 períodos intermitentes de luz-oscuridad en individuos WT y homocigotos. b) Computo total de la distancia recorrida expresada en píxeles/minuto en luz y oscuridad en individuos WT y homocigotos. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

5. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LOS MUTANTES DE *AUTS2A*

5.1. VALIDACIÓN DE LOS CEBADORES DE QPCR

La comprobación de la amplificación mediante gel de agarosa para los cebadores de qPCR reveló una especificidad correcta de todos ellos al presentarse, como se muestra en la Figura 40, una única banda a la altura esperada.

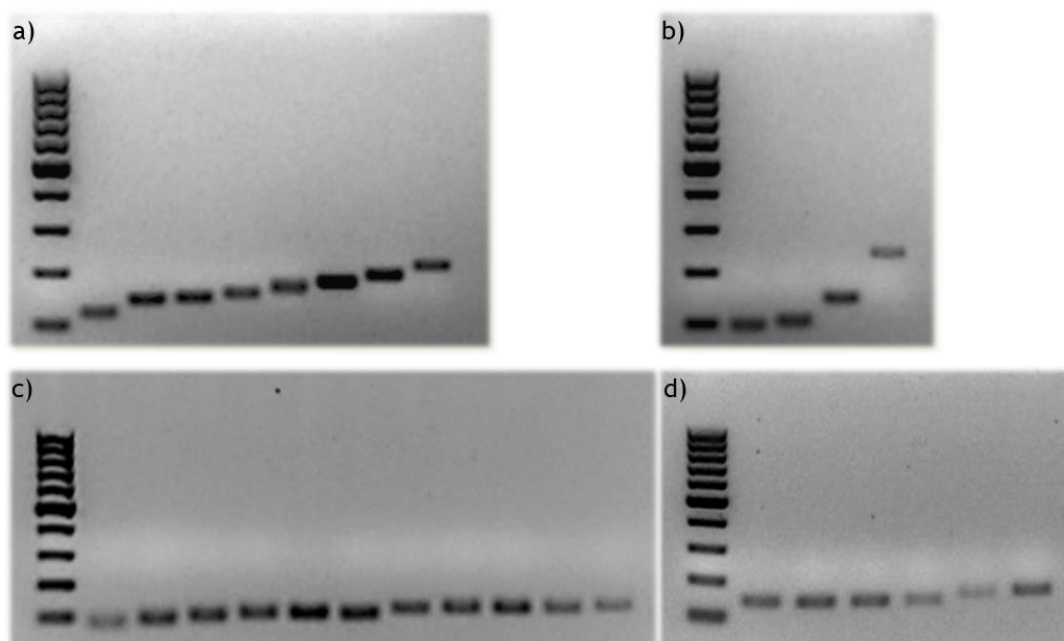


Figura 40. Comprobación de la amplificación de los cebadores en gel de agarosa. a) *vglut2.2*, *isl1*, *nes*, *rac1b*, *elavl3*, *fosab*, *neurod1*, *rybp1*; b) *fat2*, *ptf1a*, *gad1a*, *grid2*; c) *sema5a*, *mecp2*, *gfap*, *dcaf7*, *emx1*, *upf1*, *zmat3*, *sox2*, *satb2*, *ck2b*, *olig2*; d) *smg1*, *pcgf5b*, *c-myc*, *rereb*, *tbr1b*, *gtf2ird1*.

En relación con las rectas de calibrado, en la Tabla 10 se muestran los datos relativos a las mismas— ecuación de regresión lineal, R^2 , eficiencia y % de eficiencia— para cada una de las parejas de cebadores a analizar.

Tabla 10. Datos relativos a las rectas de calibrado de los cebadores de qPCR

	Ecuación de regresión lineal	Coefficiente de regresión (R^2)	Eficiencia	% de eficiencia
<i>tbr1b</i>	$y = -3,2876x + 29,866$	0,9987	2,014527764	101,4527764
<i>satb2</i>	$y = -3,2339x + 29,51$	0,9990	2,038093747	103,8093747
<i>rac1b</i>	$y = -3,2837x + 28,816$	0,9991	2,016204218	101,6204218
<i>gtf2ird1</i>	$y = -3,2976x + 29,387$	0,9998	2,010253603	101,0253603
<i>mecp2</i>	$y = -3,3203x + 30,885$	0,9717	2,000679879	100,0679879
<i>sema5a</i>	$y = -3,2704x + 29,854$	0,9996	2,021962022	102,1962022

<i>zmat3</i>	$y = -3,2931x + 34,211$	0,9999	2,01217264	101,217264
<i>ck2b</i>	$y = -3,3452x + 27,824$	0,9932	1,990379035	99,03790353
<i>dcaf7</i>	$y = -3,2605x + 28,46$	0,9990	2,026289184	102,6289184
<i>pcgf5b</i>	$y = -3,2505x + 30,616$	0,9911	2,030696301	103,0696301
<i>rybpa</i>	$y = -3,2621x + 28,894$	0,9958	2,025587437	102,5587437
<i>smg1</i>	$y = -3,297x + 29,79$	0,9985	2,010509066	101,0509066
<i>upf1</i>	$y = -3,4316x + 30,069$	0,9772	1,956181985	95,61819855
<i>ptf1a</i>	$y = -3,3153x + 32,699$	0,9945	2,002773462	100,2773462
<i>fat2</i>	$y = -3,3136x + 29,988$	0,9967	1,999719679	99,97196795
<i>rereb</i>	$y = -3,2671x + 29,552$	0,9958	2,023400469	102,3400469
<i>gad1a</i>	$y = -3,2306x + 27,333$	0,9954	2,039576613	103,9576613
<i>grid2</i>	$y = -3,2704x + 33,657$	0,9968	2,021962022	102,1962022
<i>vglut2.2</i>	$y = -3,2522x + 31,325$	0,9961	2,029944502	102,9944502
<i>emx1</i>	$y = -3,2854x + 31,144$	0,9998	2,015472795	101,5472795
<i>gfap</i>	$y = -3,2688x + 28,911$	0,9997	2,02265896	102,2658960
<i>nes</i>	$y = -3,3103x + 30,051$	0,9970	2,004875571	100,4875571
<i>olig2</i>	$y = -3,3269x + 31,665$	0,9993	1,998054024	99,80540238
<i>sox2</i>	$y = -3,2937x + 28,887$	0,9996	2,011916359	101,1916359
<i>c-myc</i>	$y = -3,3635x + 27,202$	0,9986	1,982938981	98,29389814
<i>elavl3</i>	$y = -3,2306x + 26,24$	0,9976	2,039576613	103,9576613
<i>isl1</i>	$y = -3,3319x + 29,133$	0,9978	1,995855318	99,58553177
<i>neurod1</i>	$y = -3,2954x + 26,306$	0,9996	2,011148273	101,1148273
<i>fosab</i>	$y = -3,3518x + 33,829$	0,9707	1,987683153	98,76831528

5.2. EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE INDIVIDUOS WT Y MUTANTES

5.2.1. Genes reguladores y regulados por *AUTS2*

El análisis de la expresión de *tbr1b* reveló un incremento significativo de la misma en los individuos homocigotos mutantes, en comparación con los individuos WT (Figura 41), lo que concuerda con su función de activador transcripcional de *auts2a* y, sorprendentemente, sugiere que en los mutantes puede haber una aceleración en el proceso de diferenciación durante el desarrollo embrionario, así como una formación de sinapsis glutamatérgicas inapropiadas, comúnmente alteradas en pacientes de TEA. En relación a *satb2* no se encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos grupos de

individuos (Figura 41). Al tratarse de un regulador positivo de *tbr1b*, y estando éste último tan sobreexpresado en los mutantes, los resultados parecen coherentes.

En cuanto a *rac1b*, su expresión se encuentra significativamente reducida en los individuos mutantes (Figura 41), observación en consonancia con lo esperado, pues *Auts2a* actúa como regulador positivo de dicho gen. Este resultado, además de reafirmar la eficacia del *knock-out*, sugiere que en los mutantes no se está produciendo una remodelación correcta del citoesqueleto y por ende, una migración neuronal y proyección axonal normal.

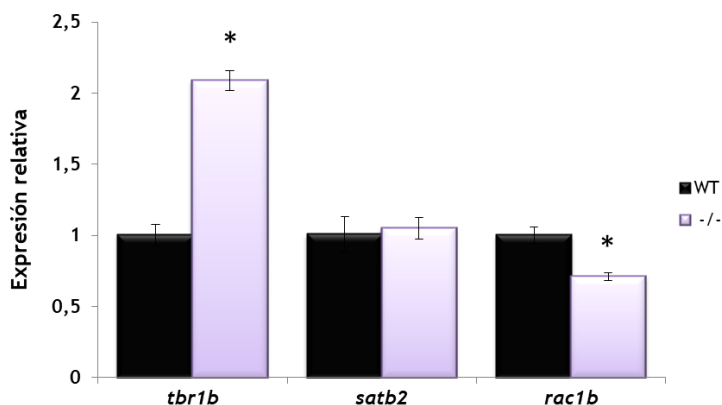


Figura 41. Expresión relativa de los genes *tbr1b*, *satb2* y *rac1b* en individuos homocigotos mutantes de *auts2a*. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

5.2.2. Genes implicados en enfermedades del neurodesarrollo

El análisis de la expresión de diversos genes relacionados con enfermedades del neurodesarrollo reveló, en primer lugar, que la expresión del *mecp2* se encuentra significativamente reducida en los individuos mutantes (Figura 42). Este resultado es coherente con su papel de represor transcripcional de *auts2a* y con la observación recurrente de niveles disminuidos de MECP2 en individuos con TEA que se relaciona, a su vez, con anomalías en el desarrollo de dendritas, axones y aumento de células gliales, pudiendo dicho aumento dar lugar a procesos de excitotoxicidad, posteriormente descritos.

En cuanto a *sema5a*, la expresión se encuentra significativamente aumentada en los homocigotos (Figura 42) y se conoce que su desregulación provoca anomalías en la cantidad de las proyecciones axonales. Que la expresión de *zmat3* se encuentre elevada en los individuos mutantes (Figura 42) reafirma la hipótesis de que dicho gen interviene en la regulación de la expresión de *auts2a*.

Finalmente, con respecto a *gtf2ird1* los resultados obtenidos deberán ser estudiados en profundidad. En los análisis se encuentra un aumento significativo en la expresión del mismo (Figura 42), aunque en un principio se esperaría lo contrario, ya que mutaciones en dicho gen provocan un aumento significativo de los niveles de serotonina y sus metabolitos en sangre, característico en pacientes de TEA, que a su vez dan lugar a signos y síntomas típicos relacionados con la agresividad, ansiedad, miedo y sociabilidad²⁴⁹.

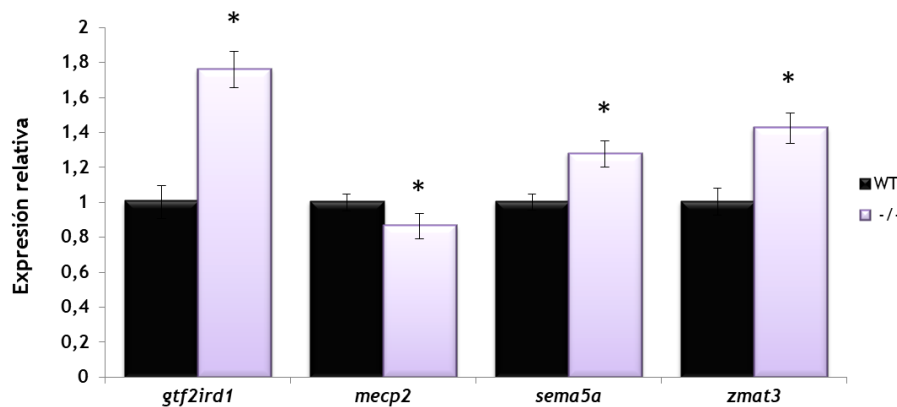


Figura 42. Expresión relativa de los genes *gtf2ird1*, *mecp2*, *sema5a* y *zmat3* en individuos homocigotos mutantes de *auts2a*. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

5.2.3. Genes implicados en el PRC1

En términos generales, se encontró que todos los componentes del PRC1 analizados presentan desregulación de su expresión en homocigotos mutantes (Figura 43). En conjunto, se sabe que el complejo PRC1-AUTS2 tiene una función crítica en la diferenciación neuronal correcta, por lo que no es de extrañar que la alteración en la expresión de sus componentes de lugar a una diferenciación anormal, pudiendo explicar parte de la fisiopatología de los TEA. En primer lugar, se encuentra una elevación significativa del gen *dcaf7* (Figura 43), lo que sugiere una diferenciación neuronal anormal, probablemente prematura, de forma semejante a lo que indican otros genes analizados en otros apartados.

La expresión de *ck2b* y *rybpa*, que tienen un rol fundamental en la diferenciación de oligodendrocitos, se encuentra elevada en los mutantes de *auts2a* (Figura 43), resultado que se corresponde con el incremento de dichas células en pacientes de TEA. Finalmente, la expresión de *pcgf5b* se encuentra significativamente disminuida en los individuos homocigotos mutantes (Figura 43), lo que deberá ser investigado, pues su patrón de expresión es opuesto a lo esperado y a lo observado para el resto de componentes del PRC1.

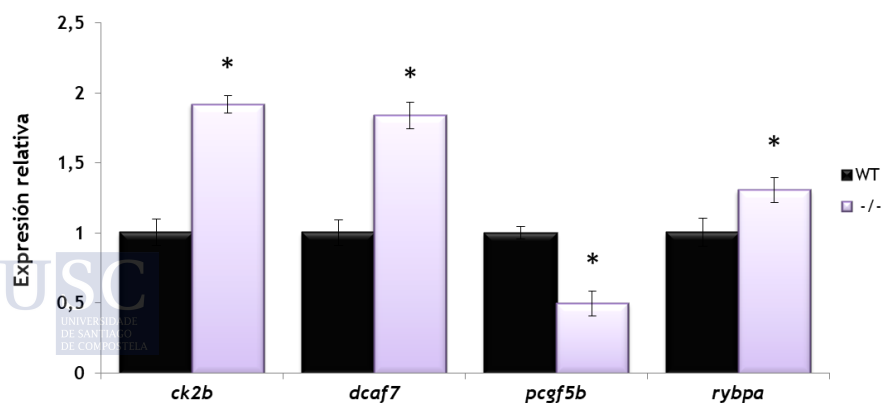


Figura 43. Expresión relativa de los genes *ck2b*, *dcaf7*, *pcgf5b* y *rybpa* en individuos homocigotos mutantes de *auts2a*. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

5.2.4. Genes implicados en el NSMD

Los resultados del análisis para *upf1* y *smg1*, dos componentes fundamentales del complejo NSMD, muestran un aumento significativo de su expresión en los individuos mutantes (Figura 44), confirmando así la intervención del NSMD y reafirmando la validez de los resultados observados por qPCR, en que la expresión de *auts2a* se encontraba muy significativamente reducida en los individuos homocigotos.

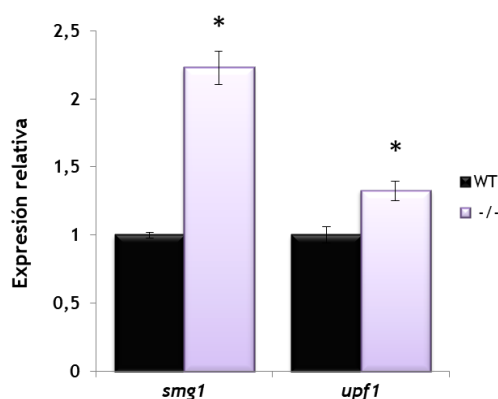


Figura 44. Expresión relativa de los genes *upf1* y *smg1* en individuos homocigotos mutantes de *auts2a*. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

5.2.5. Genes marcadores de tipos celulares cerebelares

Como se muestra en la Figura 45, el estudio de *ptf1a*, *fat2* y *rereb*, marcadores de células de Purkinje, células granulares y de diferenciación y maduración de las mismas, respectivamente, reveló una reducción significativa en los niveles de expresión de dichos genes. Estos resultados concuerdan, por un lado, con lo observado en la HIS para el gen *aldoca*, y por otro lado, con las observaciones en individuos con TEA, en los que es característica la disminución significativa en el tamaño y número de las células del cerebelo, principalmente células de Purkinje y células granulares¹¹⁹.

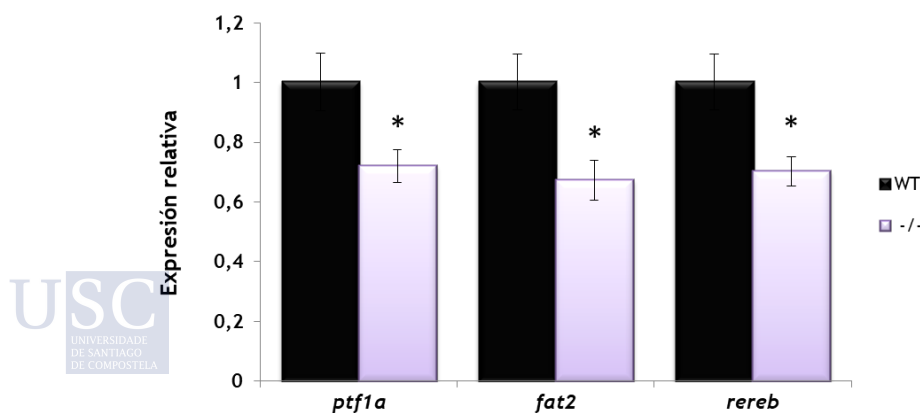


Figura 45. Expresión relativa de los genes *ptf1a*, *fat2* y *rereb* en individuos homocigotos mutantes de *auts2a*. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

5.2.6. Genes marcadores específicos de sinapsis glutamatérgicas y gabaérgicas

La expresión de *gad1a*, principal responsable de la síntesis de GABA, se encuentra significativamente disminuida en los individuos mutantes, mientras que *grid2* y *vglut2.2*, un receptor y un transportador de glutamato, respectivamente, presentan niveles anormalmente elevados en los homocigotos (Figura 46). Estos resultados, que muestran de forma general anomalías en la expresión de genes marcadores de señales glutamatérgicas y gabaérgicas concuerdan con la elevada frecuencia en que se encuentra una desregulación en la señalización excitatoria/ inhibitoria en pacientes de TEA. Muestran, asimismo, una correspondencia con lo observado en el córtex prefrontal y cerebelo de pacientes, en que se encuentran significativamente reducidos los marcadores de neuronas gabaérgicas^{233,237}.

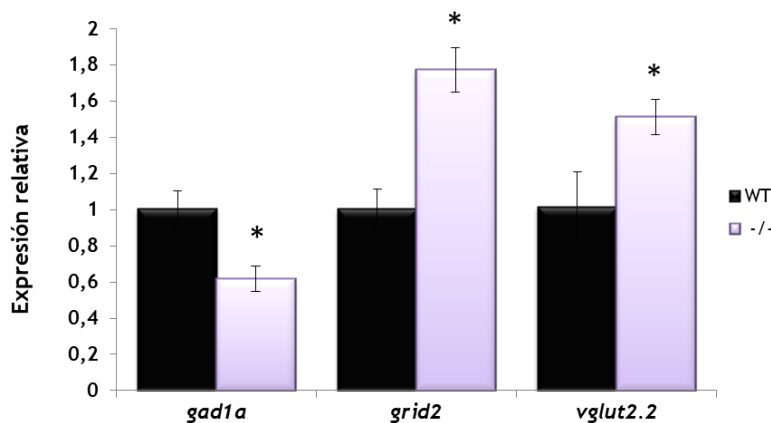


Figura 46. Expresión relativa de los genes *gad1a*, *grid2* y *vglut2.2* en individuos homocigotos mutantes de *auts2a*. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

5.2.7. Genes marcadores de neuroglia: astrocitos, microglía y oligodendrocitos

En los embriones mutantes para *auts2a* se encontró una elevación significativa de *gfap*, *nes* y *olig2* (Figura 47), marcadores de astrocitos, glía y oligodendrocitos, respectivamente, siendo estos resultados coherentes con los niveles típicamente elevados en individuos afectados por trastornos del neurodesarrollo, entre ellos TEA.

Asimismo, el incremento de *nes*, considerado un marcador de angiogénesis en pericitos, podría indicar una angiogénesis sostenida a lo largo del tiempo y consecuentes reorganizaciones constantes de la vasculatura, impidiendo la formación de conexiones más largas y complejas, necesarias para el lenguaje y la comunicación social. Finalmente, aunque *emx1* se encuentra ligeramente elevado en mutantes con respecto a los individuos WT, no se alcanza la significación.

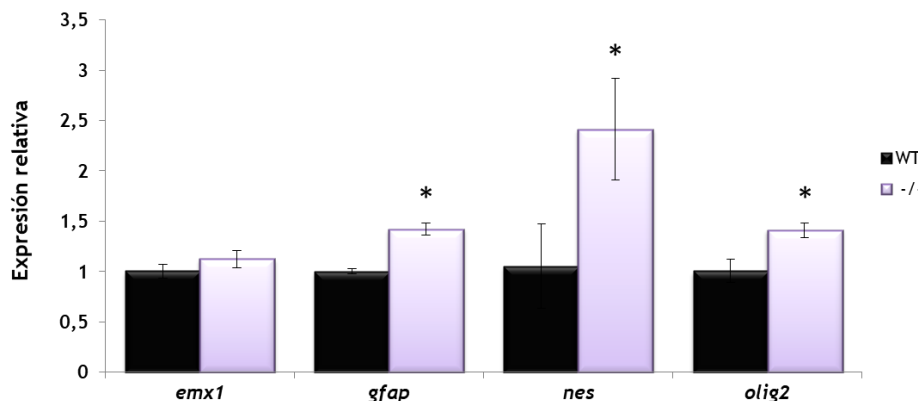


Figura 47. Expresión relativa de los genes *emx1*, *gfap*, *nes* y *olig2* en individuos homocigotos mutantes de *auts2a*. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

5.2.8. Genes marcadores de pluripotencia y de diferenciación neuronal

El análisis en conjunto de ambos grupos de genes sugiere un punto de vista interesante en cuando a la neurogénesis y diferenciación de las neuronas en los individuos mutantes, ya que la expresión de los genes responsables de mantener la pluripotencia de las células madre neuronales se encuentra significativamente reducida, mientras que la de los marcadores de diferenciación neuronal se encuentra significativamente elevada (Figura 48). Esto parece indicar que la neurogénesis en los embriones se produce, probablemente normal, pero desmesuradamente rápido, de forma que en un breve período de tiempo las neuronas se originan y diferencian, para luego mantenerse en el tiempo, debido a la disminución de la actividad y probable falta de auto-renovación de las células madre pluripotentes y progenitores neurales. Esta observación concuerda con lo expuesto para el gen *tbr1* y también para los genes implicados en el PRC1, que en ambos casos, son indicativos de un incremento de neuronas postmitóticas y por tanto de diferenciación neuronal acelerada.

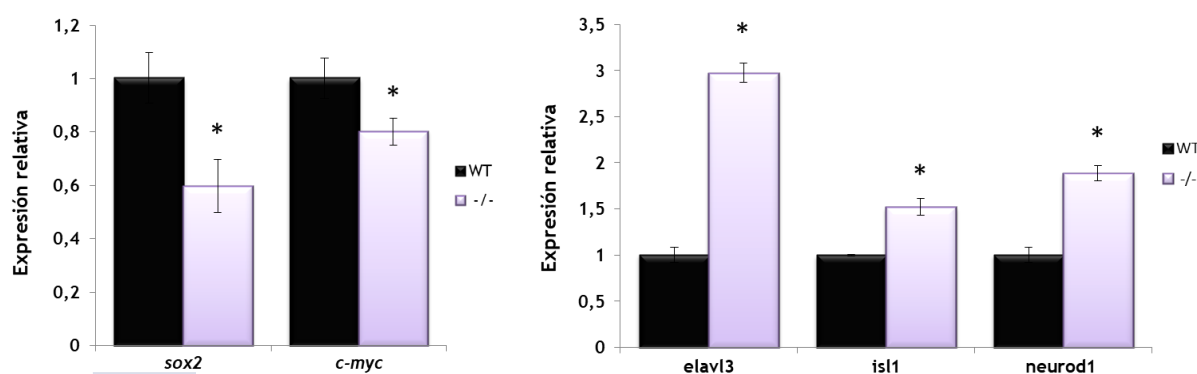


Figura 48. Expresión relativa de los genes *sox2*, *c-myc*, *elavl3*, *isl1* y *neurod1* en individuos homocigotos mutantes de *auts2a*. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

5.2.9. Gen marcador de activación neuronal

fosab o *c-fos* es un marcador de activación neuronal por lo que sus niveles pueden indicar de forma general la actividad neuronal reciente de los individuos analizados y es,

asimismo, fundamental para el desarrollo normal de los progenitores neurales. Su expresión se encuentra significativamente reducida en los mutantes de *auts2a* (Figura 49), lo que sugiere una disfunción de los progenitores neurales y posterior diferenciación, de igual forma a lo expuesto en el apartado anterior, y también una disminución en la actividad neuronal normal, parámetro observado en individuos con TEA.

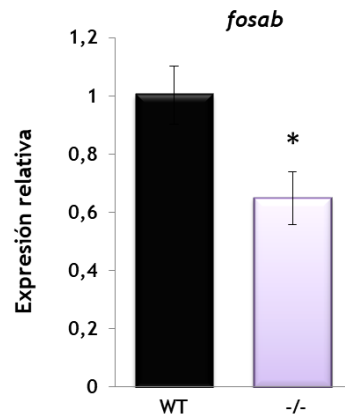


Figura 49. Expresión relativa del gen *fosab* en individuos homocigotos mutantes de *auts2a*. El asterisco (*) indica significación estadística ($p < 0,05$).

Las consecuencias de la variación en la expresión de los genes analizados se recogen de forma más extensa en la discusión.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Desarrollo de una línea mutante de pez cebra para el gen *auts2a* mediante el sistema CRISPR/Cas9 y optimización de las estrategias de genotipado

En la presente tesis doctoral se ha desarrollado de forma satisfactoria una línea mutante de pez cebra para el gen *auts2a*, ortólogo del gen humano candidato a TEA, *AUTS2*. Debido a la creciente aplicación de los sistemas CRISPR/Cas9 para la generación de modelos mutantes en pez cebra con el fin de determinar la implicación de determinados genes en enfermedades humanas, la optimización de tiempos y costes se convierte en un aspecto fundamental. Así, en este trabajo se ha hecho hincapié en el proceso de genotipado y se ha demostrado que, además de las imprescindibles estrategias de clonación y secuenciación Sanger, el análisis de heterodúplex en gel de poliacrilamida, el análisis de fragmentos y las reacciones de PCR con mezcla de ADN permiten una determinación inequívoca del genotipo de los individuos, reduciendo la complejidad, el tiempo y los costes asociados al procedimiento.

En primer lugar, el análisis de heterodúplex permite determinar la presencia o ausencia de mutaciones en los embriones y adultos de la F0 (Figuras 13 y 14), eliminando la necesidad de realizar clonación y secuenciación, pues en este punto, el tipo de mutaciones encontradas pueden no afectar a la línea germinal y por ende, no transmitirse y además, no son necesariamente las mismas que se encontrarán en la siguiente generación. Es asimismo aplicable al cribado de embriones y adultos heterocigotos de las generaciones F1 en adelante (Figura 20), cuando el tipo de mutación se ha descrito previamente por clonación y secuenciación.

En segundo lugar, el análisis de fragmentos permite un genotipado sencillo y rápido tanto de embriones como de adultos de la generación F1 en adelante para un tipo de mutación conocida por clonación y secuenciación (Figura 22). No obstante, también puede ser de gran utilidad y evitar el proceso de clonación para embriones y adultos heterocigotos de la F1, cuando dicho análisis revela una mutación de un tamaño lo relativamente grande como para que los alelos se separen lo suficiente en gel de agarosa. En este caso, las bandas pueden ser recortadas, purificadas y secuenciadas, dando información sobre el tipo de mutación sin necesidad de clonación.

En tercer lugar, la mezcla de ADNs se ha demostrado de gran utilidad para situaciones en que el número de individuos de genotipo desconocido (WT, heterocigotos y homocigotos) para un tipo de mutación conocida, es relativamente bajo, y el alelo mutante puede distinguirse relativamente bien en gel de agarosa en heterocigosis, pero no en homocigosis (Figura 21). En este caso, se identificarán fácilmente los individuos heterocigotos con una primera reacción de PCR y análisis en gel de agarosa, y posteriormente, con una segunda

reacción de PCR en que se mezcla el ADN de los individuos de genotipo aún desconocido (WT y homocigotos) con ADN de individuos WT permitirá determinar el genotipo de los mismos. En este sentido, para los individuos WT se observará una única banda, mientras que para los individuos homocigotos se observará una banda correspondiente al alelo mutante, y otra banda correspondiente al alelo WT (Figura 23). Asimismo, esta metodología resulta tremendamente útil para otras situaciones que ocurren con relativa frecuencia al trabajar con pez cebra. Un ejemplo muy representativo es cuando un investigador establece un cruce entre uno o varios individuos homocigotos y uno o varios individuos WT con la seguridad de que posteriormente conseguirá distinguirlos, pero de hecho, no lo consigue. En este caso, si los alelos WT y homocigotos no pueden distinguirse en gel de agarosa, se puede evitar la secuenciación Sanger mediante una reacción de PCR con mezcla de ADNs. Otra situación en que esta metodología es de gran ayuda es, por ejemplo, si por algún motivo el manipulador mezcla peces de distinto genotipo en una misma pecera.

2. Validación de la eficiencia del *knock-out*

Además de la optimización del proceso de generación de la línea mutante y del genotipado de la misma, la validación de la eficiencia del *knock-out* de dicha línea ha sido un objetivo fundamental de esta tesis de investigación. En este sentido, una primera comprobación *in silico*^{220,221} permitió conocer la potencial introducción de PSCs por parte de las mutaciones generadas en la generación F1 a nivel de proteína. Para evaluar dichas consecuencias a nivel de transcripción, se realizó el análisis de la expresión génica de *auts2a* mediante qPCR, usando dos parejas de cebadores de genes normalizadores previamente validados (Figura 24). Se encontró una reducción significativa de la expresión de *auts2a* en los individuos homocigotos (Figura 25), lo que sugería la participación del NSMD mediada por la presencia de PSCs. Dicha hipotética participación se comprobó con posterioridad mediante el análisis de la expresión de dos de los genes fundamentales en dicho complejo, *upf1* y *smg1*, lo que reveló un aumento estadísticamente significativo en la expresión de los mismos (Figura 44). No obstante, es importante resaltar que la reducción en los niveles de ARNm en individuos homocigotos no se observa para todos los modelos, sino que depende de los mecanismos de degradación del mismo que se activen en la célula, que a su vez dependen del tipo de mutación que se ha generado. Esto implica que se deben desarrollar otras metodologías para comprobar el efecto de las mutaciones.

En relación a los heterocigotos, se encontró un aumento significativo de la expresión de *auts2a* (Figura 25), lo que probablemente se debe a un mecanismo de adaptación transcripcional del alelo WT mediada por la degradación del ARNm derivado del alelo mutante²⁵⁰: En pez cebra la compensación genética mediada por la adaptación transcripcional explica por qué en ciertos modelos mutantes de enfermedades el fenotipo observado es equivalente al fenotipo WT, ya que se produce la activación en la expresión de genes parálogos en mutantes homocigotos e incluso la sobreexpresión del alelo WT en mutantes heterocigotos, como en este caso.

Como complemento a los resultados observados mediante qPCR, se realizó HIS para determinar en qué regiones corporales se expresa *auts2a* y si en los individuos mutantes la reducción de la expresión era observable. Como se había descrito con anterioridad¹⁴⁹, a las 24 hpf, la expresión se encuentra en el cerebro, así como en el tronco y en el ojo (Figura 28a y a'), restringiéndose al cerebro, principalmente al anterior y posterior, y aumentando en la retina (Figura 28c y c') a las 48 hpf. En individuos homocigotos se observa una disminución drástica de la expresión en el ojo, en el tronco y el cerebro a las 24 hpf (Figura 28b y b'), mientras que a las 48 hpf se observa una reducción significativa en todas las regiones anatómicas (Figura 28d y d'). Cabe destacar que la HIS no es en sí una técnica cuantitativa, por lo que los resultados obtenidos deben ser evaluados con cautela, y al igual que se menciona con anterioridad, no en todos los casos la intensidad de la coloración correspondiente a la expresión del ARNm se ve necesariamente reducida. Asimismo, es fundamental realizar un diseño y síntesis óptimos de la sonda antisentido y comprobar su especificidad realizando una HIS paralela con la sonda sentido, en que no debe apreciarse señal alguna.

Finalmente, con el objetivo de determinar el efecto de las mutaciones a nivel de proteína se realizó Western Blot. En ese caso, aunque el resultado no fue tan nítido como se esperaba, se observa ausencia de proteína en los individuos homocigotos para *auts2a* (Figura 29). Esta técnica de análisis de proteínas resulta, en muchos casos, dificultosa para el análisis en pez cebra, pues no existen anticuerpos comerciales disponibles para muchos de los genes de interés, por lo que se debe recurrir a anticuerpos equivalentes de ratón, que en muchos casos, o no se unen de forma específica a la proteína de interés, o directamente la unión es inexistente. Este hecho resalta la importancia de desarrollar otras estrategias de validación del knock-out, como las descritas con anterioridad.

3. Caracterización a nivel fenotípica de los embriones y adultos mutantes

La caracterización fenotípica de los embriones homocigotos mutantes reveló que, aunque el fenotipo general es normal, sí existe una disminución generalizada del tamaño de la cabeza y de la longitud del cuerpo, aunque no así de los ojos. En relación al tamaño de la cabeza, un estudio realizado por Beunders et al., mostró una reducción del mismo mediante el bloqueo de *auts2a* con MOs de bloqueo del *splicing*²⁰⁰. No obstante, aunque Oksenberg et al., mostraron asimismo disminución del tamaño de la cabeza mediante MOs de bloqueo de la traducción, no obtuvieron los mismos resultados con los MOs de bloqueo del *splicing*¹⁴⁹. De forma equivalente, el primer grupo no encontró diferencias estadísticamente significativas en el tamaño del cuerpo, mientras que el segundo grupo sí observó reducción del tamaño del cuerpo, así como de los ojos. Estas discrepancias en los fenotipos estudiados aun cuando en ambos casos se usan MOs, recuerda la importancia de realizar un diseño minucioso de los mismos y especialmente, la necesidad de desarrollar modelos mutantes estables, por ejemplo, mediante CRISPR/Cas9 para poder caracterizar de forma fiable los fenotipos. Por otra parte, en esta tesis, y a diferencia de los trabajos citados, no se ha realizado una valoración meramente subjetiva de presencia o ausencia de microcefalia, sino que se han medido de

forma precisa los diámetros de la cabeza de cada uno de los embriones a las 48 hpf y se ha completado el análisis mediante el cálculo de las ratios de la misma con respecto al tamaño del ojo y el tamaño del cuerpo (Figuras 30 y 31), verificando asimismo la disminución del diámetro y longitud de la cabeza a los 5 dpf (Figura 33). Estos resultados indican microcefalia en los individuos homocigotos mutantes de *auts2a*, rasgo comúnmente observado en individuos afectados por TEA. Este término resulta en muchos casos equivalente al término microencefalia, es decir, disminución del tamaño del cerebro, que a su vez se suele asociar de forma general a procesos anormales de proliferación y apoptosis de las neuronas del cerebro²⁵¹. No obstante, el tipo o tipos neuronales en que la proliferación se encuentra disminuida o la apoptosis aumentada, y que son tan representativos como para generar microcefalia/microencefalia, deben ser estudiados.

En este sentido, un resultado de este trabajo que apoya la hipótesis del incremento de la apoptosis de determinados tipos neuronales como causa de la microcefalia, es el incremento de la señal obtenida mediante naranja de acridina en los individuos homocigotos mutantes de *auts2a*, principalmente en la región del cerebro anterior o telencéfalo (Figura 34), lo que también se había observado previamente en los análisis de los morfantes¹⁴⁹. Es indicativo, asimismo, el incremento significativo observado en la expresión de *p53* (Figura 35), potente inductor de la apoptosis. Todo ello es consistente con la existencia de anomalías en el desarrollo y función del telencéfalo observadas en pacientes de diversas enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas²⁵².

Por otro lado, la microcefalia puede ser debida, en parte, a la reducción generalizada del tamaño del cerebelo y la disminución de tipos celulares cerebelares, como se ha observado en modelos mutantes de ratón para *Auts2*²¹⁶, y al igual que se ha comprobado en el presente trabajo, y lo que, a su vez, se ha observado de forma recurrente en pacientes de TEA¹¹⁹. En primer lugar, la HIS realizada para *aldoca*, marcador de neuronas cerebelares, mostró una disminución muy significativa del marcaje en los individuos homocigotos mutantes en comparación con los individuos WT, lo que indica una potencial disminución de neuronas cerebelares (Figura 37). En segundo lugar, el hecho de que la expresión de genes marcadores de células de Purkinje y granuales (*ptf2a* y *fat2*), características del cerebelo, así como de un gen responsable de su maduración, migración y proliferación (*rereb*), se encuentre disminuida (Figura 45) indica, de nuevo, una pérdida de dichos tipos neuronales cerebelares. Todo ello sugiere que *auts2a* es responsable de la maduración y proliferación de las neuronas cerebelares, probablemente a través de su participación como activador de la ruta no canónica del complejo PRC1, y también de la migración de las mismas a través de su función en la remodelación del citoesqueleto. Asimismo, el hecho de que las células de Purkinje sean neuronas de tipo gabaérgico, es decir, inhibitorias, apoya la hipótesis de una desregulación en el balance excitatorio/ inhibitorio, que se discute en mayor profundidad en un apartado posterior. Finalmente, la pérdida de elementos cerebelares, fundamentales en la integración de señales sensitivas y motoras, podría explicar las anomalías que típicamente se observan en las funciones cognitivas superiores, incluyendo la capacidad de comunicación e interacción social, y funciones de aprendizaje y control motor de los pacientes de TEA²¹⁶.

Los resultados obtenidos mediante tinción con azul alcian sugieren anomalías en la región mandibular a los 5 dpf en los individuos mutantes, pues la longitud del palatocadrado, así como del ángulo ceratohial resultó, en ambos casos, significativamente menor (Figura 33) en comparación con los WT. Estos resultados sugieren micrognatia, que al igual que la retrognatia y la boca estrecha, son rasgos comunes de pacientes de TEA, lo que podría indicar que *AUTS2* tiene un papel fundamental en la formación y desarrollo de estructuras cartilaginosas y óseas. No obstante, no se ha encontrado información en la literatura que pueda relacionar a la proteína con los citados procesos.

Finalmente, al analizar los resultados del análisis de locomoción para individuos de 7 dpf se encontró que, en términos generales, los homocigotos mutantes presentan una locomoción disminuida, lo que a su vez puede relacionarse, o bien con disfunciones motoras, como se discute con anterioridad, o bien con una desregulación del balance excitatorio/ inhibitorio, estando ambas características presentes en un número elevado de pacientes de TEA. Deberá profundizarse en las bases biológicas y moleculares de la disminución en la locomoción de los mutantes, así como llevar a cabo distintos estudios de comportamiento de forma exhaustiva.

En relación a los adultos, una limitación importante del presente trabajo ha sido la escasez de individuos, así como la reducida fertilidad de los mismos, por lo que debido a la imposibilidad de sacrificarlos para su posterior análisis, el número de estudios realizados ha sido muy reducido. No obstante, se realizó un análisis estadístico en base a los datos obtenidos tras medir de la longitud del cuerpo y el peso de los adultos WT y homocigotos mutantes, que únicamente requirió anestesia, que reveló una reducción significativa para ambos parámetros (Figura 38). Estos resultados pueden asociarse a la observación de una menor ingesta de comida por parte de los adultos homocigotos mutantes, en comparación con los WT, lo que a su vez puede relacionarse con los trastornos gastrointestinales –malestar o dismotilidad intestinal– típicamente comórbidos de los individuos afectados por TEA. Con el fin de comprobar la existencia de problemas en la motilidad intestinal en un futuro próximo, se ha comenzado a optimizar el *software* de *Zebralab* de *Viewpoint Life Sciences* para así poder cuantificar la misma, en términos de contracciones intestinales por minuto tras la ingesta de comida en embriones de 5 dpf.

4. Caracterización transcriptómica de los embriones mutantes

Siendo *auts2a* un componente fundamental para la activación de la ruta no canónica del PRC1, complejo regulador de la transcripción de múltiples genes implicados en el neurodesarrollo, en esta tesis se ha prestado especial atención a las modificaciones a nivel transcripcional que la mutación puede provocar. Con el análisis de estas modificaciones, se ha pretendido comprender, en parte, la fisiopatología de la enfermedad, es decir, relacionar los datos a nivel transcriptómico con procesos biológicos, y a su vez, con síntomas y signos observados en pacientes. Una limitación de este estudio ha sido la imposibilidad de realizar la secuenciación completa del ARN, que será llevada a cabo en un futuro. No obstante, se ha seleccionado un número considerable de genes cuya expresión podría, potencialmente, estar alterada en los individuos mutantes, y cuyo análisis ha permitido, por un lado, validar que el

modelo de pez cebra recapitula lo observado en pacientes, y por otro lado ha mostrado alteraciones previamente desconocidas.

Un primer conjunto de genes evaluados, *tbr1b* y *satb2*, reguladores de *auts2a*, muestran una significativa elevación en sus niveles de expresión (Figura 41). En relación a *tbr1b*, este resultado puede explicarse desde dos puntos de vista; siendo la proteína Tbr1b un regulador positivo del gen *auts2a*, es probable que, a su vez la proteína Aut2a module la expresión del gen *tbr1b* por un mecanismo de retroalimentación negativa, por lo que en ausencia de Aut2a, el gen *tbr1b* se expresa de forma continuada. Por otro lado, *tbr1b* juega un papel fundamental en la diferenciación neuronal, siendo un marcador de neuronas postmitóticas, lo que sugiere que en los mutantes para *auts2a* puede haber una aceleración en el proceso de diferenciación durante el desarrollo embrionario²²². Asimismo, participa activamente en la formación de sinapsis glutamatérgicas, comúnmente alteradas en pacientes de TEA. En relación a *satb2* no se encuentran diferencias estadísticamente, aunque siendo regulador positivo de *tbr1b*, y estando éste último tan sobreexpresado en los mutantes, los resultados parecen coherentes. La disminución en los niveles de *rac1b* (Figura 41), gen regulado positivamente por *auts2a*, reafirma la eficacia del *knock-out*, y sugiere asimismo una remodelación del citoesqueleto, migración neuronal y proyección axonal anormales²⁰⁵, lo que se corresponde con lo descrito anteriormente para la migración incorrecta de neuronas cerebrales, y que a su vez, podría asociarse a algún signo o síntoma observado en pacientes. Las consecuencias fisiopatológicas derivadas de la reducción de la expresión de *rac1b* como consecuencia de la pérdida de *auts2a* deberán ser estudiadas en este modelo.

Un segundo conjunto de genes seleccionados para analizar se relacionan con enfermedades del neurodesarrollo. Para el gen *mecp2* se ha encontrado una reducción significativa en la expresión del mismo (Figura 42). Se conoce que la proteína para este gen reprime transcripcionalmente a *auts2a*²²⁵, por lo de forma opuesta a lo argumentado para *tbr1b*, puede estar produciéndose un fenómeno de retroalimentación, positiva en este caso. Por otro lado, se han encontrado de forma recurrente niveles reducidos de MECP2 en el córtex frontal de individuos con TEA, lo que a su vez se relaciona con un desarrollo anormal de dendritas y axones^{253,254}. Además, en modelos mutantes de *mecp2* se encuentra una elevación anormal de células gliales que, como se expone con posterioridad, puede dar lugar a excitotoxicidad y anomalías en la ramificación dendrítica. En cuanto al gen *sema5a*, mientras que el funcionamiento normal de este gen candidato a TEA da lugar a la formación de un número normal de proyecciones axonales, su desregulación provoca anomalías en la cantidad de las mismas²²⁶. El aumento significativo de su expresión en este modelo mutante (Figura 42) concuerda con lo observado en otros modelos de TEA en pez cebra, en donde se encuentra un incremento de dichas proyecciones. El hecho de que *zmat3* se encuentre sobreexpresado en mutantes homocigotos (Figura 42) reafirma la hipótesis de que dicho gen interviene en la regulación de la expresión de *auts2a*, como había sido sugerido por Sedaghat y colaboradores²⁵⁵, y este resultado sugiere que dicha regulación es transcripcionalmente positiva a través de un mecanismo semejante al descrito para *tbr1b*. Finalmente, con respecto a *gtf2ird1* y como se expone en el apartado de resultados, los resultados obtenidos deberán ser estudiados en profundidad, puesto que los análisis muestran un aumento muy significativo

en la expresión del mismo (Figura 42), a pesar de que mutaciones en dicho gen intervienen en la modulación de síntomas relacionados con agresividad, ansiedad, miedo o sociabilidad a través del aumento de niveles de serotonina y sus metabolitos en sangre²⁴⁹.

A continuación se seleccionaron genes que intervienen en el PRC1 debido al papel que la ruta no canónica juega en diferenciación neuronal. Se ha demostrado que una deficiencia de DCAF7 da lugar a infraexpresión de múltiples responsables de la diferenciación normal²¹¹, por lo que la elevación significativa en la expresión de este gen en el modelo mutante para *auts2a* (Figura 43), sugiere una diferenciación neuronal anormal, probablemente prematura, de forma semejante a lo expuesto para *tbr1b* y otros genes analizados, discutidos en siguientes apartados. Que la expresión de *ck2b* y *rybpa*, cuya función es fundamental para la diferenciación de oligodendrocitos, se encuentre elevada en los mutantes de *auts2a* (Figura 43), se corresponde con el incremento de dichas células en pacientes de TEA. La oligodendrogénesis mediada por *ck2b* se basa en la activación de transcripción del gen *olig2*, cuyo análisis se presenta en con posterioridad²²⁷. Se ha sugerido que *ck2b* participa en la señalización dopaminérgica, a menudo afectada en pacientes, por lo que su papel en dicha señalización deberá ser estudiado. Los resultados para *rybpa* concuerdan con la observación previa de que la pérdida de *Rybp* en células madre embrionarias de ratón disminuye su potencial de diferenciación, formando menos oligodendrocitos y astrocitos²²⁸.

Los resultados obtenidos al analizar genes marcadores de señales glutamatérgicas (*grid2* y *vglut2.2*) y gabaérgicas (*gad1a*) muestran, de forma general, anormalidades en su expresión (Figura 46), lo que concuerda con la elevada frecuencia en que se encuentra una desregulación en la señalización excitatoria/ inhibitoria en pacientes de TEA. El incremento en la expresión de marcadores glutamatérgicos se relaciona de nuevo con la elevación de la expresión de *tbr1b*, que interviene de forma positiva en la formación de sinapsis glutamatérgicas, y la reducción de los niveles del marcador de neuronas gabaérgicas concuerda con lo observado en el córtex prefrontal y cerebelo de pacientes, en que se encuentran significativamente reducidos los marcadores de dicho tipo neuronal^{233,237}. La implicación del incremento de las señales glutamatérgicas y la disminución de las gabaérgicas a nivel de comportamiento deberá ser explorada en este modelo.

En relación a *gfap*, marcador de astrocitos y glía, y *nes*, que interviene en la formación de estos tipos celulares, la sobreexpresión observada (Figura 47) es coherente con la fisiopatología de los pacientes, ya que estos tipos celulares tienen la capacidad de liberar citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , del inglés, *Tumor Necrosis Factor alpha*) y también reclutar leucocitos periféricos, provocando una situación de neuroinflamación crónica que, a su vez, puede explicar las disfunciones cognitivas y de comportamiento típicas de los TEA²⁵⁶. Además, los astrocitos y microglía intervienen en la liberación de glutamato, cuyo aumento desmesurado puede dar lugar a excitotoxicidad, provocando anormalidades dendríticas y sinápticas, de igual a lo que se ha propuesto anteriormente para la disminución de *mecp2*. Asimismo, *nes* se considera marcador de angiogénesis en pericitos y su incremento daría lugar a una angiogénesis persistente²³⁹, lo que se relacionaría con reorganizaciones constantes de la vasculatura, generando conexiones cerebrales más locales, cortas y menos complejas e impidiendo la formación de conexiones

más largas y complejas, necesarias para el lenguaje y la comunicación social. A su vez, se ha sugerido que la hipoconectividad observada en los cerebros de pacientes puede ser relacionada con la reducción en el tamaño de ciertas regiones cerebrales²⁵⁷, lo que conduciría, de nuevo, a microcefalia.

El gen *olig2* sirve como marcador de oligodendrocitos pues se expresa ampliamente en progenitores de este tipo de neuroglía. Los oligodendrocitos son los encargados de la mielinización de los axones, y por ende, de la estructuración de la materia blanca. En los mutantes para *auts2a*, la expresión de este gen se encuentra significativamente aumentada (Figura 47), al igual que se ha observado tanto en pacientes como en otros modelos para trastornos del neurodesarrollo, lo que a su vez se relaciona con una mielinización y organización anormales de la materia blanca y por ende, anomalías en la conectividad neuronal²⁵⁸.

Los resultados del análisis de los genes marcadores de pluripotencia y diferenciación neural han supuesto toda una novedad en este proyecto. Como se explica en el apartado de resultados y se muestra en la Figura 48, la expresión de los genes responsables de mantener la pluripotencia de las células madre neuronales se encuentra significativamente reducida, mientras que la de los marcadores de diferenciación neuronal se encuentra significativamente elevada. Todo ello sugiere una aceleración en el proceso de diferenciación y generación de neuronas postmitóticas, a la vez que una disminución de la actividad y auto-renovación de las células madre pluripotentes y progenitores neurales. Concordando, todo ello, con la elevación en la expresión otros genes que intervienen en la diferenciación neuronal, como *tbr1b* y los genes implicados en el PRC1, que en ambos casos, son indicativos de un incremento de neuronas postmitóticas.

Aunque un estudio reciente ha demostrado que la sobreexpresión de *AUTS2* da lugar al incremento de los marcadores de pluripotencia y una diferenciación neuronal retrasada en células madre embrionarias de ratón²¹², hasta donde sabemos este es el primer estudio en un modelo animal para *auts2a* en que se corrobora un proceso desmesuradamente acelerado de diferenciación neuronal y disminución de la actividad de progenitores neuronales. Así, estos resultados abren una línea de investigación novedosa en este modelo mutante para *auts2a* de pez cebra, para comprender *in vivo* el mecanismo por el que ocurre este fenómeno de aceleración en la diferenciación de neuronas, poder relacionarlo con la fisiología de la enfermedad y, quizás, desarrollar estrategias terapéuticas.

Finalmente, la disminución de los niveles de *fosab* (Figura 49), marcador de activación neuronal y fundamental para el desarrollo normal de los progenitores neurales, se corresponde con lo descrito en el párrafo anterior, y es indicativo de también una disminución en la actividad neuronal normal, parámetro observado en individuos con TEA. Asimismo, puede relacionarse con características sintomatológicas de pacientes, ya que los niveles de dicho gen se han relacionado con la disminución de la ansiedad y el aumento de conductas sociales en modelos de TEA en ratón, así como en una mejora de los procesos del aprendizaje y memoria²⁴⁸. El mecanismo molecular mediante el cual *c-fos* desarrolla sus funciones ha sido muy escasamente evaluado, por lo que se deberá profundizar en su estudio.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La generación de la línea mutante de pez cebra para el gen *auts2a*, ortólogo de *AUTS2*, gen humano candidato a TEA, se ha llevado a cabo satisfactoriamente, pues la eficiencia del *knock-out* del gen se ha demostrado tanto a nivel transcriptómico, mediante análisis de la expresión génica de *auts2a* por qPCR e HIS, como a nivel proteómico, mediante Western Blot. Asimismo, se ha verificado que la disminución de los niveles de ARNm se debe a la intervención del NSMD mediada por la presencia de PSCs.
2. El planteamiento y desarrollo de nuevas estrategias para la optimización del proceso de genotipado de embriones y adultos de las distintas generaciones, principalmente, análisis de heterodúplex en gel de poliacrilamida, análisis de fragmentos y mezcla de ADNs problema, ha mostrado una importante reducción en términos de tiempo y costes, manteniendo la fiabilidad de los resultados. Dichas metodologías, además de demostrar utilidad en el genotipado estándar, son aplicables a diversas situaciones con las que un manipulador de líneas mutantes de pez cebra puede encontrarse.
3. El análisis de las características fenotípicas de los embriones mutantes revela la presencia de microcefalia y micrognatia, rasgos típicamente presentes en pacientes de TEA y otras enfermedades del neurodesarrollo, así como la disminución del tamaño del cuerpo. La microcefalia observada puede asociarse con varios resultados obtenidos en este trabajo. Por un lado, el incremento de la apoptosis en la región del telencéfalo y la disminución generalizada de neuronas cerebelares, y por otro, la potencial hipoconectividad derivada de una angiogénesis persistente en el cerebro.
4. El número de movimientos por unidad de tiempo, que refleja la locomoción general, se encuentra significativamente reducido en individuos homocigotos mutantes, lo que indica una disfuncionalidad a nivel motor y/o una desregulación del balance excitatorio/inhibitorio.
5. La reducida longitud del cuerpo y el peso de los adultos homocigotos mutantes en comparación con los WT, sugiere una menor ingesta de comida, pudiendo relacionarse con los trastornos gastrointestinales típicamente comórbidos de los individuos afectados por TEA.
6. La reducción en la expresión de *rac1b*, que verifica la eficiencia del *knock-out*, y de *mecp2*, así como el aumento en la expresión de *sema5a*, indican una remodelación

anormal del citoesqueleto de actina y desregulación en la migración neuronal, proyección axonal y ramificación dendrítica.

7. El incremento de la expresión de *grid2* y *vglut2.2* y disminución de *gad1a* se corresponde con un balance alterado de las señales excitatorias e inhibitorias, típico de pacientes de TEA.
8. La expresión incrementada de los marcadores específicos de neuroglía (*gfap*, *nes* y *olig2*) se corresponden con el incremento de oligodendrocitos, astrocitos y glía en pacientes, y pueden explicar las disfunciones cognitivas y de comportamiento observados, siendo consecuencia de un proceso de neuroinflamación crónica y/o excitotoxicidad, así como de anomalías en la mielinización de los axones.
9. En conjunto, el análisis de los genes marcadores de pluripotencia y diferenciación neural apuntan a una aceleración en el proceso de diferenciación y generación de neuronas postmitóticas, a la vez que una disminución de la actividad y auto-renovación de las células madre pluripotentes y progenitores neurales.
10. La disminución de los niveles de *fosab* indica el desarrollo normal de los progenitores neurales, así como una disminución en la actividad neuronal normal, parámetro observado en individuos con TEA.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. The generation of the zebrafish mutant line for the gene *auts2a*, orthologous to AUTS2, a human ASD candidate-gene, has been successfully carried out, since the efficiency of gene knock-out has been demonstrated both at the transcriptomic level, through analysis of *auts2a* gene expression by qPCR and ISH, as well as at the proteomic level, by Western Blot. Likewise, it has been verified that the decrease in mRNA levels is due to the intervention of the NSMD mediated by the presence of PSCs.
2. The approach and development of new strategies for the optimization of the genotyping process of embryos and adults of the different generations, mainly, heteroduplex analysis in polyacrylamide gel, fragment analysis and mixture of problem DNAs, has shown a significant reduction in terms of time and costs, maintaining the reliability of the results. These methodologies, in addition to demonstrating utility for the standard genotyping, are applicable to various situations that a handler of mutant lines of zebrafish may encounter.
3. The analysis of the phenotypic characteristics of the mutant embryos reveals the presence of microcephaly and micrognathia, features typically present in patients with ASD and other neurodevelopmental diseases, as well as decreased body size. The microcephaly observed can be associated with several results obtained in this work. On the one hand, the increase in apoptosis in the telencephalon region and the generalized decrease in cerebellar neurons, and on the other, the potential hypoconnectivity derived from persistent angiogenesis in the brain.
4. The number of movements per unit of time, which reflects general locomotion, is significantly reduced in homozygous mutant individuals, indicating dysfunction at the motor level and/or dysregulation of the excitatory/inhibitory balance.
5. The reduced body length and weight of homozygous mutant adults compared to WT suggests a lower food intake, which may be related to gastrointestinal disorders, typically comorbid in individuals affected by ASD.
6. The reduction in the expression of *rac1b*, which verifies the efficiency of the knock-out, and in *mecp2*, as well as the increase in the expression of *sema5a*, indicate an

abnormal remodeling of the actin cytoskeleton and dysregulation in neuronal migration, axonal projection and dendritic branching.

7. The increased expression of *grid2* and *vglut2.2* and decreased expression of *gad1a* corresponds to an altered balance of excitatory and inhibitory signals, typical of ASD patients.
8. The increased expression of neuroglia-specific markers (*gfap*, *nes* and *olig2*) corresponds to the increase in oligodendrocytes, astrocytes and glia in patients, and may explain the cognitive and behavioral dysfunctions observed, being the consequence of a neuroinflammation process chronic and/or excitotoxicity, as well as abnormalities in the myelination of axons.
9. As a whole, the analysis of the marker genes for pluripotency and neural differentiation point to an acceleration in the process of differentiation and generation of postmitotic neurons, as well as a decrease in the activity and self-renewal of pluripotent stem cells and neural progenitors.
10. The decrease in *fosab* levels indicates the normal development of neural progenitors, as well as a decrease in normal neuronal activity, a parameter observed in individuals with ASD.

ANEXO I

ANEXO I

RELACIÓN DE LAS PUBLICACIONES INCLUIDAS EN LA TESIS

Título: Experimental Models to Study Autism Spectrum Disorders: hiPSCs, Rodents and Zebrafish¹

Autores: Alba Pensado-López^{1,2}, Sara Veiga-Rúa^{1,2}, Ángel Carracedo^{2,3}, Catarina Allegue² y Laura Sánchez¹

Filiaciones:

¹ Departamento de Zoología Genética y Antropología Física, Universidade de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002 Lugo, España.

² Grupo de Medicina Genómica, Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS), Universidade de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, España.

³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), CIMUS, Universidade de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, España.

Contribución de Alba Pensado López y Sara Veiga Rúa, coautora no doctora, a la publicación:

1. Introduction

- 1.1. Definition and Epidemiology of Autism Spectrum Disorders
- 1.2. Etiology of Autism Spectrum Disorders
- 1.3. Diagnostic of Autism Spectrum Disorders
- 1.4. Treatment of Autism Spectrum Disorders

La información para el desarrollo de este punto y las Tablas 1 y 2 y las Figuras 1 y 2 fue recabada por Alba Pensado López junto con la coautora no doctora, Sara Veiga Rúa, que se encargó asimismo de la elaboración de dichas Tablas y Figuras.

2. Genome Editing Systems, a Promising Tool for Modeling Human Disorders- Fundamentals of Genomic Editing

Este punto, junto con la Figura 3, fue redactado íntegramente por Sara Veiga Rúa y revisado por Alba Pensado López.

3. In Vitro Models of ASD: The Stem Cell Revolution

Este punto, junto con la Tabla 3, fue redactado íntegramente por Sara Veiga Rúa.

4. Animal Models in ASD Research

- 4.1. Rodents and the Modelling of Human Disorders
 - 4.1.1. Mus Musculus in ASD Research
 - 4.1.2. Rattus norvegicus in ASD Research
- 4.2. Zebrafish and the Modeling of Human Disorder
 - 4.2.1. Zebrafish and Mammals: Conservation throughout Evolution
 - 4.2.2. Gene Targeting in Zebrafish
 - 4.2.3. Characterization of Zebrafish Models
 - 4.2.4. Limitations of Zebrafish to Model Human Disorder

La información para el desarrollo de este punto fue recabada por Alba Pensado López junto con Sara Veiga Rúa, que se encargó de la redacción de los puntos 4, 4.1, 4.1.1 y 4.1.2 y la Tabla 4 y 6 y Figura 4, mientras que Alba Pensado López se encargó de los puntos 4.2, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4, así como de la elaboración de las Tablas 5, 7 y 8.

5. Future Challenges

- 5.1. *In Vitro* Modelling
- 5.2. *In Vivo* Modelling

Ambos apartados fueron redactados por Sara Veiga y revisados por Alba Pensado López.

Fecha de Publicación: 20/10/2020

DOI: [10.3390/genes11111376](https://doi.org/10.3390/genes11111376)

ISSN: 2073-4425

Factor de impacto: 4,096

Quartil: Q2

Autorización de la revista para el uso de la publicación: Se trata de un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia *Creative Commons CC BY*, que permite el uso y reproducción de partes del artículo sin permiso específico, siempre que éste sea citado.



1. Pensado-López, A., Veiga-Rúa, S., Carracedo, Á., Allegue, C. & Sánchez, L. Experimental Models to Study Autism Spectrum Disorders: hiPSCs, Rodents and Zebrafish. *Genes (Basel)* **11**(2020).

ANEXO II

Informe del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Lugo

El CEEA de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Lugo, tras evaluar el Proyecto titulado “El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente” del que es Investigadora responsable D^a. Ana Quelle Regaldie, acordó con fecha 30 de enero de 2020 emitir

INFORME FAVORABLE

para la realización de dicho Proyecto, así como los procedimientos que incluye, en las instalaciones del establecimiento usuario Animalario de la Facultad de Veterinaria, con número de registro ES270280346401 (AE-LU-003), y siempre que, en cumplimiento del RD 53/2013, se obtenga la correspondiente autorización administrativa (en concreto, en relación con el artículo 27.2 y el apartado 1.b de la cláusula de salvaguardia enunciada en la disposición adicional segunda).



En Lugo, a 30 de enero de 2020



Fdo.: La presidenta

Sonia Vázquez Rodríguez

*Supervisora das instalacións de experimentación,
cría e subministro de animais de laboratorio da
Universidade de Santiago de Compostela*

<p>Responsable administrativo:</p> 	<p>Nombre: Montserrat Valcárcel Armesto Cargo: Vicerreitora de Coordinación do Campus de Lugo</p>	<p>VºBº Firma y sello</p> 
--	---	---

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 01/20/LU-003

Interesado: **Ana Quelle Regaldie**

Procedemento: RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Data de inicio: 1 de marzo de 2020

Forma de inicio: solicitude da interesada

ANTECEDENTES

A interesada, como responsable do proxecto “**El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente**” presentou con data 12 de febreiro de 2020 solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto : El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente

Nome do centro usuario: Animalario da Facultade de veterinaria(AE-LU-003).

Persoa responsable do proxecto: Ana Quelle Regaldie

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo) Animalario da Facultade de veterinaria(AE-LU-003).

Clasificación do proxecto : Tipo III.

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

Artigo 88 da Lei 39/2015, do 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE núm. 236, do 2 de outubro) establece que a resolución que poña fin ao procedemento decidirá todas as cuestións formuladas polos interesados e aquelas outras derivadas del.

Esta xefatura territorial é competente para ditar resolución de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009, do 30 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural. O Servizo Provincial de Gandería de Lugo revisou a documentación presentada coa solicitude e visto o informe favorable da avaliación do proxecto, de data 30 de xaneiro de 2020 emitido polo órgano habilitado, e o Comité de Ética da Universidade de Santiago de Compostela, esta xefatura territorial resolve AUTORIZAR o proxecto solicitado.



A autorización deste proxecto terá unha duración de 5 ANOS e unha vez que transcorran deberán renovala.

A autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandería.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural da Xunta de Galicia no prazo dun mes contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme cos artigos 121 e 122 da Lei 39/2015, do 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas.

Documento asinado electronicamente á marxe

Asinado por: IGLESIAS FONTAL, MARIA OLGA
Cargo: Xefa Territorial
Data e hora: 06/03/2020 13:49:44



CVE: ZMMUqWGH15
Verificación: <https://sede.xunta.gal/cve>



ANEXO III

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Kanner, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous child* **2**, 217-250 (1943).
2. Association, A.P. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales DSM-5. *Madrid: Paramericana* (2014).
3. Lyall, K. *et al.* The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annual review of public health* **38**, 81-102 (2017).
4. Chiarotti, F. & Venerosi, A. Epidemiology of Autism Spectrum Disorders: A Review of Worldwide Prevalence Estimates Since 2014. *Brain sciences* **10**, 274 (2020).
5. Durkin, M.S. & Yeargin-Allsopp, M. Socioeconomic Status and Pediatric Neurologic Disorders: Current Evidence. *Seminars in pediatric neurology* **27**, 16-25 (2018).
6. Schmengler, H., Cohen, D., Tordjman, S. & Melchior, M. Autism Spectrum and Other Neurodevelopmental Disorders in Children of Immigrants: A Brief Review of Current Evidence and Implications for Clinical Practice. *Frontiers in psychiatry* **12**, 566368 (2021).
7. Zwaigenbaum, L. & Penner, M. Autism spectrum disorder: advances in diagnosis and evaluation. *Bmj* **361**, k1674 (2018).
8. Fernandez, B.A. & Scherer, S.W. Syndromic autism spectrum disorders: moving from a clinically defined to a molecularly defined approach. *Dialogues in clinical neurosciences* **19**, 353-371 (2017).
9. Sharma, S.R., Gonda, X. & Tarazi, F.I. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacology & therapeutics* **190**, 91-104 (2018).
10. Waggoner, D. *et al.* Yield of additional genetic testing after chromosomal microarray for diagnosis of neurodevelopmental disability and congenital anomalies: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* **20**, 1105-1113 (2018).
11. Genovese, A. & Butler, M.G. Clinical Assessment, Genetics, and Treatment Approaches in Autism Spectrum Disorder (ASD). *International journal of molecular sciences* **21**, 4726 (2020).
12. Vivanti, G. & Dissanayake, C. Outcome for Children Receiving the Early Start Denver Model Before and After 48 Months. *Journal of autism and developmental disorders* **46**, 2441-9 (2016).
13. Yu, Q., Li, E., Li, L. & Liang, W. Efficacy of Interventions Based on Applied Behavior Analysis for Autism Spectrum Disorder: A Meta-Analysis. *Psychiatry investigation* **17**, 432-443 (2020).

14. Gengoux, G.W. *et al.* A Pivotal Response Treatment Package for Children With Autism Spectrum Disorder: An RCT. *Pediatrics* **144**, e20190178 (2019).
15. Schwartzman, J.M. *et al.* Language Improvement Following Pivotal Response Treatment for Children With Developmental Disorders. *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities* **126**, 45-57 (2021).
16. Conrad, C.E. *et al.* Parent-Mediated Interventions for Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in psychiatry* **12**, 773604 (2021).
17. Kloosterboer, S.M. *et al.* Risperidone plasma concentrations are associated with side effects and effectiveness in children and adolescents with autism spectrum disorder. *British Journal of Clinical Pharmacology* **87**, 1069-1081 (2021).
18. McDougle, C.J. *et al.* Risperidone for the core symptom domains of autism: results from the study by the autism network of the research units on pediatric psychopharmacology. *American Journal of Psychiatry* **162**, 1142-8 (2005).
19. Houghton, R., van den Bergh, J., Law, K., Liu, Y. & de Vries, F. Risperidone versus aripiprazole fracture risk in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Autism research* **14**, 1800-1814 (2021).
20. Coustals, N., Ménard, M.L. & Cohen, D. Aripiprazole in Children and Adolescents. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* **31**, 4-32 (2021).
21. Fido, A. & Al-Saad, S. Olanzapine in the treatment of behavioral problems associated with autism: an open-label trial in Kuwait. *Medical Principles and Practice* **17**, 415-8 (2008).
22. McLennan, J.D. Deprescribing in a Youth with an Intellectual Disability, Autism, Behavioural Problems, and Medication-Related Obesity: A Case Study. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry = Journal de l'Académie canadienne de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent* **28**, 141-146 (2019).
23. Stigler, K.A., Mullett, J.E., Erickson, C.A., Posey, D.J. & McDougle, C.J. Paliperidone for irritability in adolescents and young adults with autistic disorder. *Psychopharmacology (Berl)* **223**, 237-45 (2012).
24. DeFilippis, M. & Wagner, K.D. Treatment of Autism Spectrum Disorder in Children and Adolescents. *Psychopharmacology bulletin* **46**, 18-41 (2016).
25. Hollander, E., Kaplan, A., Cartwright, C. & Reichman, D. Venlafaxine in children, adolescents, and young adults with autism spectrum disorders: an open retrospective clinical report. *Journal of child neurology* **15**, 132-5 (2000).
26. Gordon, C.T., State, R.C., Nelson, J.E., Hamburger, S.D. & Rapoport, J.L. A Double-blind Comparison of Clomipramine, Desipramine, and Placebo in the Treatment of Autistic Disorder. *Archives of General Psychiatry* **50**, 441-447 (1993).
27. Hollander, E. *et al.* Divalproex Sodium vs Placebo for the Treatment of Irritability in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorders. *Neuropsychopharmacology* **35**, 990-998 (2010).
28. Kim, S.-J. *et al.* Dose-Response Effects of Long-Acting Liquid Methylphenidate in Children with Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) and Autism

- Spectrum Disorder (ASD): A Pilot Study. *Journal of Autism and Developmental Disorders* **47**, 2307-2313 (2017).
29. Patra, S., Nebhinani, N., Viswanathan, A. & Kirubakaran, R. Atomoxetine for attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents with autism: A systematic review and meta-analysis. *Autism research* **12**, 542-552 (2019).
 30. Ming, X., Gordon, E., Kang, N. & Wagner, G.C. Use of clonidine in children with autism spectrum disorders. *Brain and Development* **30**, 454-460 (2008).
 31. Scahill, L. *et al.* Extended-Release Guanfacine for Hyperactivity in Children With Autism Spectrum Disorder. *American Journal of Psychiatry* **172**, 1197-1206 (2015).
 32. Singh, K. *et al.* Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 15550 (2014).
 33. Gringras, P., Nir, T., Breddy, J., Frydman-Marom, A. & Findling, R.L. Efficacy and Safety of Pediatric Prolonged-Release Melatonin for Insomnia in Children With Autism Spectrum Disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* **56**, 948-957.e4 (2017).
 34. Amaral, D.G., Schumann, C.M. & Nordahl, C.W. Neuroanatomy of autism. *Trends in neurosciences* **31**, 137-45 (2008).
 35. Pan, Y.H., Wu, N. & Yuan, X.B. Toward a Better Understanding of Neuronal Migration Deficits in Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in cell and developmental biology* **7**, 205 (2019).
 36. Wang, C., Geng, H., Liu, W. & Zhang, G. Prenatal, perinatal, and postnatal factors associated with autism: A meta-analysis. *Medicine* **96**, e6696-e6696 (2017).
 37. Sandin, S. *et al.* The Heritability of Autism Spectrum Disorder. *Jama* **318**, 1182-1184 (2017).
 38. Hisle-Gorman, E. *et al.* Prenatal, perinatal, and neonatal risk factors of autism spectrum disorder. *Pediatric Research* **84**, 190-198 (2018).
 39. Boukhris, T., Sheehy, O., Mottron, L. & Bérard, A. Antidepressant Use During Pregnancy and the Risk of Autism Spectrum Disorder in Children. *JAMA pediatrics* **170**, 117-24 (2016).
 40. Schmidt, R.J. *et al.* Prenatal vitamins, one-carbon metabolism gene variants, and risk for autism. *Epidemiology* **22**, 476-85 (2011).
 41. Chaste, P. & Leboyer, M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues in clinical neuroscience* **14**, 281-292 (2012).
 42. Geschwind, D.H. Genetics of autism spectrum disorders. *Trends in cognitive sciences* **15**, 409-416 (2011).
 43. Rosenberg, R.E. *et al.* Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* **163**, 907-14 (2009).
 44. Alonso-Gonzalez, A., Rodriguez-Fontenla, C. & Carracedo, A. De novo Mutations (DNMs) in Autism Spectrum Disorder (ASD): Pathway and Network Analysis. *Frontiers in Genetics* **9**(2018).

45. Stefansson, H. *et al.* CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. *Nature* **505**, 361-6 (2014).
46. Yingjun, X. *et al.* Copy number variations independently induce autism spectrum disorder. *Bioscience reports* **37**(2017).
47. Devlin, B. & Scherer, S.W. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Current opinion in genetics & development* **22**, 229-37 (2012).
48. Gudenas, B.L., Srivastava, A.K. & Wang, L. Integrative genomic analyses for identification and prioritization of long non-coding RNAs associated with autism. *PLoS One* **12**, e0178532 (2017).
49. Grove, J. *et al.* Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. *Nature genetics* **51**, 431-444 (2019).
50. Ruzzo, E.K. *et al.* Inherited and De Novo Genetic Risk for Autism Impacts Shared Networks. *Cell* **178**, 850-866.e26 (2019).
51. Abrahams, B.S. *et al.* SFARI Gene 2.0: a community-driven knowledgebase for the autism spectrum disorders (ASDs). *Molecular autism* **4**, 36-36 (2013).
52. Folstein, S.E. & Rosen-Sheidley, B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nature Reviews Genetics* **2**, 943-55 (2001).
53. Doudna, J.A. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* **578**, 229-236 (2020).
54. Scully, R., Panday, A., Elango, R. & Willis, N.A. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature reviews. Molecular cell biology* **20**, 698-714 (2019).
55. Kim, Y.G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 1156-1160 (1996).
56. Christian, M. *et al.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761 (2010).
57. Verheyen, A. *et al.* Genetically Engineered iPSC-Derived FTDP-17 MAPT Neurons Display Mutation-Specific Neurodegenerative and Neurodevelopmental Phenotypes. *Stem cell reports* **11**, 363-379 (2018).
58. Chen, Y.-G. *et al.* UBASH3A deficiency accelerates type 1 diabetes development and enhances salivary gland inflammation in NOD mice. *Scientific reports* **10**, 12019-12019 (2020).
59. Zhou, M. *et al.* Generation of a human iPSC line GIBHi002-A-2 with a dual-reporter for NKX2-5 using TALENs. *Stem Cell Research* **50**, 102120 (2020).
60. Huang, P., Xiao, A., Tong, X., Lin, S. & Zhang, B. Targeted Mutagenesis in Zebrafish by TALENs. *Methods in Molecular Biology* **1338**, 191-206 (2016).
61. Mojica, F.J., Juez, G. & Rodríguez-Valera, F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology* **9**, 613-21 (1993).

62. Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Soria, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution* **60**, 174-82 (2005).
63. Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. & Juez, G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology* **36**, 244-6 (2000).
64. Pourcel, C., Salvignol, G. & Vergnaud, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading)* **151**, 653-663 (2005).
65. Jansen, R., Embden, J.D., Gaastra, W. & Schouls, L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology* **43**, 1565-75 (2002).
66. Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I. & Koonin, E.V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct* **1**, 7-7 (2006).
67. Barrangou, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709-12 (2007).
68. Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almendros, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* **155**, 733-740 (2009).
69. Shmakov, S. *et al.* Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature reviews. Microbiology* **15**, 169-182 (2017).
70. Clark, D.P., Pazdernik, N.J. & McGehee, M.R. Chapter 20 - Genome Defense. in *Molecular Biology (Third Edition)* (eds. Clark, D.P., Pazdernik, N.J. & McGehee, M.R.) 622-653 (Academic Cell, 2019).
71. Loureiro, A. & da Silva, G.J. CRISPR-Cas: Converting A Bacterial Defence Mechanism into A State-of-the-Art Genetic Manipulation Tool. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* **8**, 18 (2019).
72. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)* **337**, 816-821 (2012).
73. Jinek, M. *et al.* RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* **2**, e00471-e00471 (2013).
74. Friedland, A.E. *et al.* Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nature methods* **10**, 741-3 (2013).
75. Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P. & Liu, J.L. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell reports* **4**, 220-8 (2013).
76. Hwang, W.Y. *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* **31**, 227-229 (2013).

77. Li, D. *et al.* Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* **31**, 681-683 (2013).
78. Baltimore, D. *et al.* Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science (New York, N.Y.)* **348**, 36-38 (2015).
79. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-76 (2006).
80. Juopperi, T.A., Song, H. & Ming, G.L. Modeling neurological diseases using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Future neurology* **6**, 363-373 (2011).
81. Brennand, K.J., Simone, A., Tran, N. & Gage, F.H. Modeling psychiatric disorders at the cellular and network levels. *Molecular psychiatry* **17**, 1239-53 (2012).
82. Zaslavsky, K. *et al.* SHANK2 mutations associated with autism spectrum disorder cause hyperconnectivity of human neurons. *Nature neuroscience* **22**, 556-564 (2019).
83. Arioka, Y. *et al.* Single-cell trajectory analysis of human homogenous neurons carrying a rare RELN variant. *Translational psychiatry* **8**, 129-129 (2018).
84. Deneault, E. *et al.* Complete Disruption of Autism-Susceptibility Genes by Gene Editing Predominantly Reduces Functional Connectivity of Isogenic Human Neurons. *Stem cell reports* **11**, 1211-1225 (2018).
85. Wang, P. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in cerebral organoids derived from iPS cells. *Molecular autism* **8**, 11 (2017).
86. Chinwalla, A.T. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562 (2002).
87. Silverman, J.L., Yang, M., Lord, C. & Crawley, J.N. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature reviews. Neuroscience* **11**, 490-502 (2010).
88. Celen, C. *et al.* Arid1b haploinsufficient mice reveal neuropsychiatric phenotypes and reversible causes of growth impairment. *eLife* **6**, e25730 (2017).
89. Shibutani, M. *et al.* Arid1b Haploinsufficiency Causes Abnormal Brain Gene Expression and Autism-Related Behaviors in Mice. *International journal of molecular sciences* **18**, 1872 (2017).
90. Platt, R.J. *et al.* Chd8 Mutation Leads to Autistic-like Behaviors and Impaired Striatal Circuits. *Cell reports* **19**, 335-350 (2017).
91. Gompers, A.L. *et al.* Germline Chd8 haploinsufficiency alters brain development in mouse. *Nature neuroscience* **20**, 1062-1073 (2017).
92. Zhao, C. *et al.* Dual Requirement of CHD8 for Chromatin Landscape Establishment and Histone Methyltransferase Recruitment to Promote CNS Myelination and Repair. *Developmental cell* **45**, 753-768.e8 (2018).
93. Silva, A.I. *et al.* Cyfip1 haploinsufficient rats show white matter changes, myelin thinning, abnormal oligodendrocytes and behavioural inflexibility. *Nature communications* **10**, 3455 (2019).
94. Rannals, M.D. *et al.* Neurodevelopmental models of transcription factor 4 deficiency converge on a common ion channel as a potential therapeutic target for Pitt Hopkins syndrome. *Rare Diseases* **4**, e1220468 (2016).

95. Dodge, A. *et al.* Generation of a Novel Rat Model of Angelman Syndrome with a Complete Ube3a Gene Deletion. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* **13**, 397-409 (2020).
96. Hamilton, F. *An account of the fishes found in the river Ganges and its branches*, (Bishen Singh Mahendra Pal Singh, 1822).
97. Weber, M.C.W., de Beaufort, L.F. & Weber, M.W.C. *The fishes of the Indo-Australian archipelago*, (Brill Archive, 1911).
98. Chu, X.-L. A preliminary revision of fishes of the genus *Danio* from China. *Zoological Research* **2**, 145-156 (1981).
99. Barman, R. A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio* Hamilton Buchanan (Pisces: Cyprinidae). *Rec. Zool. Survey India, Occ. Pap.* **137**, 1-91 (1991).
100. Schoch, C.L. *et al.* NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database : the journal of biological databases and curation* **2020**, baaa062 (2020).
101. Parichy, D.M. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *Elife* **4**(2015).
102. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. & Smith, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* **83**, 13-34 (2008).
103. Spence, R., Fatema, M.K., Ellis, S., Ahmed, Z.F. & Smith, C. Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* **71**, 304-309 (2007).
104. Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics* **203**, 253-310 (1995).
105. Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. & Singer, F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* **291**, 293-296 (1981).
106. Ahrens, M.B., Orger, M.B., Robson, D.N., Li, J.M. & Keller, P.J. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nature Methods* **10**, 413-420 (2013).
107. Lam, S., Chua, H., Gong, Z., Lam, T. & Sin, Y. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Developmental & Comparative Immunology* **28**, 9-28 (2004).
108. Marques, I.J., Lupi, E. & Mercader, N. Model systems for regeneration: zebrafish. *Development* **146**(2019).
109. Howe, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **496**, 498-503 (2013).
110. Workman, A.D., Charvet, C.J., Clancy, B., Darlington, R.B. & Finlay, B.L. Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**, 7368-7383 (2013).

111. Lumsden, A. & Krumlauf, R. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, 1109-15 (1996).
112. Vaillancourt, C. & Lafond, J. Human embryogenesis: overview. *Methods in Molecular Biology* **550**, 3-7 (2009).
113. Mueller, T., Dong, Z., Berberoglu, M.A. & Guo, S. The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). *Brain research* **1381**, 95-105 (2011).
114. Mueller, T., Vernier, P. & Wullimann, M.F. The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. *Brain Research* **1011**, 156-169 (2004).
115. Kani, S. *et al.* Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum. *Developmental biology* **343**, 1-17 (2010).
116. Hibi, M., Matsuda, K., Takeuchi, M., Shimizu, T. & Murakami, Y. Evolutionary mechanisms that generate morphology and neural-circuit diversity of the cerebellum. *Development, growth & differentiation* **59**, 228-243 (2017).
117. Bae, Y.-K. *et al.* Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Developmental Biology* **330**, 406-426 (2009).
118. Sudarov, A. Defining the role of cerebellar Purkinje cells in autism spectrum disorders. *Cerebellum (London, England)* **12**, 950-955 (2013).
119. Bauman, M.L. & Kemper, T.L. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *International Journal of Developmental Neuroscience* **23**, 183-187 (2005).
120. Jeong, J.-W., Tiwari, V.N., Behen, M.E., Chugani, H.T. & Chugani, D.C. In vivo detection of reduced Purkinje cell fibers with diffusion MRI tractography in children with autistic spectrum disorders. *Frontiers in human neuroscience* **8**, 110-110 (2014).
121. Masai, I. *et al.* N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development* **130**, 2479 (2003).
122. Xi, Y. *et al.* Transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein in dopaminergic neurons of the ventral diencephalon. *Developmental Dynamics* **240**, 2539-2547 (2011).
123. dal Maschio, M., Donovan, J.C., Helmbrecht, T.O. & Baier, H. Linking Neurons to Network Function and Behavior by Two-Photon Holographic Optogenetics and Volumetric Imaging. *Neuron* **94**, 774-789.e5 (2017).
124. Higashijima, S.-i., Masino, M.A., Mandel, G. & Fetcho, J.R. Engrailed-1 Expression Marks a Primitive Class of Inhibitory Spinal Interneuron. *The Journal of Neuroscience* **24**, 5827 (2004).
125. Choi, J. *et al.* FoxH1 negatively modulates flk1 gene expression and vascular formation in zebrafish. *Developmental Biology* **304**, 735-744 (2007).
126. Satou, C. *et al.* Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* **140**, 3927 (2013).
127. Bernardos, R.L. & Raymond, P.A. GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expression Patterns* **6**, 1007-1013 (2006).

128. McLean, D.L., Fan, J., Higashijima, S., Hale, M.E. & Fetcho, J.R. A topographic map of recruitment in spinal cord. *Nature* **446**, 71-5 (2007).
129. Higashijima, S., Hotta, Y. & Okamoto, H. Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the islet-1 promoter/enhancer. *Journal of Neuroscience* **20**, 206-18 (2000).
130. Heffer, A. *et al.* Generation and characterization of Kctd15 mutations in zebrafish. *PLOS ONE* **12**, e0189162 (2017).
131. Spiró, Z., Koh, A., Tay, S., See, K. & Winkler, C. Transcriptional enhancement of *Snn* levels in motoneurons is crucial for proper axon morphology in zebrafish. *Scientific Reports* **6**, 27470 (2016).
132. Obholzer, N. *et al.* Vesicular Glutamate Transporter 3 Is Required for Synaptic Transmission in Zebrafish Hair Cells. *The Journal of Neuroscience* **28**, 2110 (2008).
133. Blader, P., Plessy, C. & Strähle, U. Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development* **120**, 211-218 (2003).
134. Shin, J., Park, H.-C., Topczewska, J., Mawdsley, D. & Appel, B. Neural cell fate analysis in zebrafish using *olig2* BAC transgenics. *Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology* **25**, 7-14 (2003).
135. Lillesaar, C., Stigloher, C., Tannhäuser, B., Wullimann, M.F. & Bally-Cuif, L. Axonal projections originating from raphe serotonergic neurons in the developing and adult zebrafish, *Danio rerio*, using transgenics to visualize raphe-specific *pet1* expression. *Journal of Comparative Neurology* **512**, 158-182 (2009).
136. Chen, A. *et al.* QRFP and Its Receptors Regulate Locomotor Activity and Sleep in Zebrafish. *The Journal of Neuroscience* **36**, 1823 (2016).
137. Wada, N. *et al.* Hedgehog signaling is required for cranial neural crest morphogenesis and chondrogenesis at the midline in the zebrafish skull. *Development* **132**, 3977 (2005).
138. Takechi, M., Hamaoka, T. & Kawamura, S. Fluorescence visualization of ultraviolet-sensitive cone photoreceptor development in living zebrafish. *FEBS Letters* **553**, 90-94 (2003).
139. Wen, L. *et al.* Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Developmental Biology* **314**, 84-92 (2008).
140. Partridge, M. *et al.* A simple method for delivering morpholino antisense oligos into the cytoplasm of cells. *Antisense & nucleic acid drug development* **6** **3**, 169-75 (1996).
141. Summerton, J. & Weller, D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* **7**, 187-95 (1997).
142. Corey, D.R. & Abrams, J.M. Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome biology* **2**, 1-3 (2001).
143. Bill, B.R., Petzold, A.M., Clark, K.J., Schimmenti, L.A. & Ekker, S.C. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* **6**, 69-77 (2009).
144. Eisen, J.S. & Smith, J.C. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* **135**, 1735 (2008).

145. Stainier, D.Y.R. *et al.* Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLOS Genetics* **13**, e1007000 (2017).
146. Robu, M.E. *et al.* p53 activation by knockdown technologies. *PLoS genetics* **3**, e78-e78 (2007).
147. Liu, X. *et al.* De Novo ARID1B mutations cause growth delay associated with aberrant Wnt/ β -catenin signaling. *Human Mutation* **41**, 1012-1024 (2020).
148. Ishibashi, M. *et al.* Copy number variants in patients with intellectual disability affect the regulation of ARX transcription factor gene. *Human genetics* **134**, 1163-82 (2015).
149. Oksenberg, N., Stevison, L., Wall, J.D. & Ahituv, N. Function and regulation of AUTS2, a gene implicated in autism and human evolution. *PLoS genetics* **9**, e1003221 (2013).
150. Ramachandran, K.V. *et al.* Calcium influx through L-type CaV1.2 Ca²⁺ channels regulates mandibular development. *The Journal of clinical investigation* **123**, 1638-1646 (2013).
151. Patowary, A. *et al.* Family-based exome sequencing and case-control analysis implicate CEP41 as an ASD gene. *Translational psychiatry* **9**, 4 (2019).
152. Suls, A. *et al.* De novo loss-of-function mutations in CHD2 cause a fever-sensitive myoclonic epileptic encephalopathy sharing features with Dravet syndrome. *American journal of human genetics* **93**, 967-975 (2013).
153. Bernier, R. *et al.* Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell* **158**, 263-276 (2014).
154. Sugathan, A. *et al.* CHD8 regulates neurodevelopmental pathways associated with autism spectrum disorder in neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, E4468-77 (2014).
155. Turner, T.N. *et al.* Loss of δ -catenin function in severe autism. *Nature* **520**, 51-56 (2015).
156. Sicca, F. *et al.* Gain-of-function defects of astrocytic Kir4.1 channels in children with autism spectrum disorders and epilepsy. *Scientific reports* **6**, 34325-34325 (2016).
157. Bögershausen, N. *et al.* RAP1-mediated MEK/ERK pathway defects in Kabuki syndrome. *The Journal of clinical investigation* **125**, 3585-99 (2015).
158. Van Laarhoven, P.M. *et al.* Kabuki syndrome genes KMT2D and KDM6A: functional analyses demonstrate critical roles in craniofacial, heart and brain development. *Human molecular genetics* **24**, 4443-4453 (2015).
159. Leong, W.Y., Lim, Z.H., Korzh, V., Pietri, T. & Goh, E.L.K. Methyl-CpG Binding Protein 2 (Mecp2) Regulates Sensory Function Through Sema5b and Robo2. *Frontiers in cellular neuroscience* **9**, 481-481 (2015).
160. Elsen, G.E., Choi, L.Y., Prince, V.E. & Ho, R.K. The autism susceptibility gene met regulates zebrafish cerebellar development and facial motor neuron migration. *Developmental biology* **335**, 78-92 (2009).
161. Blanchet, P. *et al.* MYT1L mutations cause intellectual disability and variable obesity by dysregulating gene expression and development of the neuroendocrine hypothalamus. *PLoS Genet* **13**, e1006957 (2017).

162. Frints, S.G.M. *et al.* Pathogenic variants in E3 ubiquitin ligase RLIM/RNF12 lead to a syndromic X-linked intellectual disability and behavior disorder. *Molecular psychiatry* **24**, 1748-1768 (2019).
163. Brooks, S.S. *et al.* A novel ribosomopathy caused by dysfunction of RPL10 disrupts neurodevelopment and causes X-linked microcephaly in humans. *Genetics* **198**, 723-33 (2014).
164. Kozol, R.A. *et al.* Two knockdown models of the autism genes SYNGAP1 and SHANK3 in zebrafish produce similar behavioral phenotypes associated with embryonic disruptions of brain morphogenesis. *Human molecular genetics* **24**, 4006-4023 (2015).
165. Marin-Valencia, I. *et al.* A homozygous founder mutation in TRAPPC6B associates with a neurodevelopmental disorder characterised by microcephaly, epilepsy and autistic features. *Journal of medical genetics* **55**, 48-54 (2018).
166. Kuroyanagi, M. *et al.* New approach for fish breeding by chemical mutagenesis: establishment of TILLING method in fugu (*Takifugu rubripes*) with ENU mutagenesis. *BMC genomics* **14**, 786-786 (2013).
167. McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A. & Henikoff, S. Targeted screening for induced mutations. *Nature biotechnology* **18**, 455-7 (2000).
168. Wienholds, E. *et al.* Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome research* **13**, 2700-7 (2003).
169. Vejnar, C.E., Moreno-Mateos, M.A., Cifuentes, D., Bazzini, A.A. & Giraldez, A.J. Optimized CRISPR-Cas9 System for Genome Editing in Zebrafish. *Cold Spring Harbor Protocols* **2016**(2016).
170. Thyme, S.B. *et al.* Phenotypic Landscape of Schizophrenia-Associated Genes Defines Candidates and Their Shared Functions. *Cell* **177**, 478-491.e20 (2019).
171. Guissart, C. *et al.* Dual Molecular Effects of Dominant RORA Mutations Cause Two Variants of Syndromic Intellectual Disability with Either Autism or Cerebellar Ataxia. *American journal of human genetics* **102**, 744-759 (2018).
172. Hoffman, E.J. *et al.* Estrogens Suppress a Behavioral Phenotype in Zebrafish Mutants of the Autism Risk Gene, CNTNAP2. *Neuron* **89**, 725-733 (2016).
173. Kim, O.H. *et al.* Zebrafish knockout of Down syndrome gene, DYRK1A, shows social impairments relevant to autism. *Molecular autism* **8**, 50 (2017).
174. Hu, J. *et al.* Hyperactivity, Memory Defects, and Craniofacial Abnormalities in Zebrafish *fmr1* Mutant Larvae. *Behavior Genetics* **50**, 152-160 (2020).
175. Kim, L. *et al.* Anxiety, hyperactivity and stereotypy in a zebrafish model of fragile X syndrome and autism spectrum disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **55**, 40-49 (2014).
176. Wu, Y.J. *et al.* Fragile X Mental Retardation-1 Knockout Zebrafish Shows Precocious Development in Social Behavior. *Zebrafish* **14**, 438-443 (2017).
177. Pietri, T. *et al.* The first *mecp2*-null zebrafish model shows altered motor behaviors. *Frontiers in neural circuits* **7**, 118-118 (2013).

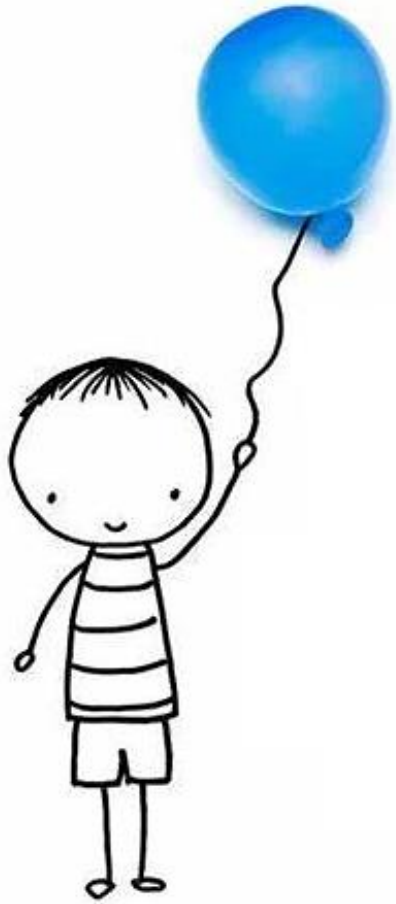
178. van der Vaart, M. *et al.* Mecp2 regulates tnfa during zebrafish embryonic development and acute inflammation. *Disease models & mechanisms* **10**, 1439-1451 (2017).
179. Miller, A.C., Voelker, L.H., Shah, A.N. & Moens, C.B. Neurobeachin is required postsynaptically for electrical and chemical synapse formation. *Current biology : CB* **25**, 16-28 (2015).
180. Ribeiro, D. *et al.* Oxytocin receptor signalling modulates novelty recognition but not social preference in zebrafish. *Journal of Neuroendocrinology* **32**, e12834 (2020).
181. Dalla Vecchia, E., Di Donato, V., Young, A.M.J., Del Bene, F. & Norton, W.H.J. Reelin Signaling Controls the Preference for Social Novelty in Zebrafish. *Frontiers in behavioral neuroscience* **13**, 214-214 (2019).
182. Plaster, N., Sonntag, C., Schilling, T.F. & Hammerschmidt, M. REREa/Atrophin-2 interacts with histone deacetylase and Fgf8 signaling to regulate multiple processes of zebrafish development. *Developmental Dynamics* **236**, 1891-1904 (2007).
183. Liu, C.X. *et al.* CRISPR/Cas9-induced shank3b mutant zebrafish display autism-like behaviors. *Molecular autism* **9**, 23 (2018).
184. James, D.M. *et al.* Intestinal dysmotility in a zebrafish (*Danio rerio*) shank3a;shank3b mutant model of autism. *Molecular autism* **10**, 3 (2019).
185. Ando, H. *et al.* Cereblon Control of Zebrafish Brain Size by Regulation of Neural Stem Cell Proliferation. *iScience* **15**, 95-108 (2019).
186. Liu, T. *et al.* Developmental protein kinase C hyper-activation results in microcephaly and behavioral abnormalities in zebrafish. *Translational psychiatry* **8**, 232 (2018).
187. Pilorge, M. *et al.* Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic signaling in autism. *Molecular Psychiatry* **21**, 936-945 (2016).
188. Baronio, D. *et al.* Embryonic exposure to valproic acid affects the histaminergic system and the social behaviour of adult zebrafish (*Danio rerio*). *British Journal of Pharmacology* **175**, 797-809 (2018).
189. Lee, S. *et al.* Plausibility of the zebrafish embryos/larvae as an alternative animal model for autism: A comparison study of transcriptome changes. *PloS one* **13**, e0203543 (2018).
190. Sessa, A. *et al.* SETD5 Regulates Chromatin Methylation State and Preserves Global Transcriptional Fidelity during Brain Development and Neuronal Wiring. *Neuron* **104**, 271-289.e13 (2019).
191. Sahu, M.P. *et al.* Neurotrophin receptor Ntrk2b function in the maintenance of dopamine and serotonin neurons in zebrafish. *Scientific Reports* **9**, 2036 (2019).
192. Brustein, E. *et al.* Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *Journal of Physiology-Paris* **97**, 77-86 (2003).
193. Stewart, A.M., Nguyen, M., Wong, K., Poudel, M.K. & Kalueff, A.V. Developing zebrafish models of autism spectrum disorder (ASD). *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **50**, 27-36 (2014).
194. Dwivedi, S. *et al.* Larval zebrafish model for studying the effects of valproic acid on neurodevelopment: An approach towards modeling autism. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **95**, 56-65 (2019).

195. Sultana, R. *et al.* Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins. *Genomics* **80**, 129-34 (2002).
196. Consortium, I.M.G.S.o.A. A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. *Human Molecular Genetics* **7**, 571-578 (1998).
197. Amarillo, I.E., Li, W.L., Li, X., Vilain, E. & Kantarci, S. De novo single exon deletion of AUTS2 in a patient with speech and language disorder: a review of disrupted AUTS2 and further evidence for its role in neurodevelopmental disorders. *American Journal of Medical Genetics Part A* **164a**, 958-65 (2014).
198. Zhang, B. *et al.* Association study identifying a new susceptibility gene (AUTS2) for schizophrenia. *International journal of molecular sciences* **15**, 19406-19416 (2014).
199. Mefford, H.C. *et al.* Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. *PLoS genetics* **6**, e1000962-e1000962 (2010).
200. Beunders, G. *et al.* Exonic deletions in AUTS2 cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus. *American journal of human genetics* **92**, 210-220 (2013).
201. Sanchez-Jimeno, C. *et al.* Attention Deficit Hyperactivity and Autism Spectrum Disorders as the Core Symptoms of AUTS2 Syndrome: Description of Five New Patients and Update of the Frequency of Manifestations and Genotype-Phenotype Correlation. *Genes* **12**, 1360 (2021).
202. Howe, K.L. *et al.* Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research* **49**, D884-D891 (2021).
203. Oksenberg, N. & Ahituv, N. The role of AUTS2 in neurodevelopment and human evolution. *Trends in Genetics* **29**, 600-8 (2013).
204. Hori, K. *et al.* Cytoskeletal regulation by AUTS2 in neuronal migration and neurogenesis. *Cell Reports* **9**, 2166-79 (2014).
205. Hori, K. & Hoshino, M. Neuronal Migration and AUTS2 Syndrome. *Brain Sci* **7**(2017).
206. Kozol, R.A. *et al.* Function Over Form: Modeling Groups of Inherited Neurological Conditions in Zebrafish. *Frontiers in molecular neuroscience* **9**, 55-55 (2016).
207. Oksenberg, N. *et al.* Genome-wide distribution of Auts2 binding localizes with active neurodevelopmental genes. *Translational Psychiatry* **4**, e431-e431 (2014).
208. Wang, H. *et al.* Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873-8 (2004).
209. Liu, S. *et al.* NRF1 association with AUTS2-Polycomb mediates specific gene activation in the brain. *Molecular cell* **81**, 4663-4676.e8 (2021).
210. Chittock, E.C., Latwiel, S., Miller, T.C. & Müller, C.W. Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochemical Society Transactions* **45**, 193-205 (2017).
211. Wang, Q. *et al.* WDR68 is essential for the transcriptional activation of the PRC1-AUTS2 complex and neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Research* **33**, 206-214 (2018).

212. Monderer-Rothkoff, G. *et al.* AUTS2 isoforms control neuronal differentiation. *Molecular Psychiatry* **26**, 666-681 (2021).
213. Jha, U., Kondrychyn, I., Korzh, V. & Thirumalai, V. High Behavioral Variability Mediated by Altered Neuronal Excitability in auts2 Mutant Zebrafish. *eNeuro* **8**, ENEURO.0493-20.2021 (2021).
214. Gao, Z. *et al.* An AUTS2-Polycomb complex activates gene expression in the CNS. *Nature* **516**, 349-354 (2014).
215. Hori, K. *et al.* AUTS2 Regulation of Synapses for Proper Synaptic Inputs and Social Communication. *iScience* **23**, 101183-101183 (2020).
216. Yamashiro, K. *et al.* AUTS2 Governs Cerebellar Development, Purkinje Cell Maturation, Motor Function and Social Communication. *iScience* **23**, 101820-101820 (2020).
217. Bradford, Y.M. *et al.* Zebrafish information network, the knowledgebase for Danio rerio research. *Genetics* **220**, iyac016 (2022).
218. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**, 403-10 (1990).
219. Moreno-Mateos, M.A. *et al.* CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nature Methods* **12**, 982-8 (2015).
220. Gasteiger, E. *et al.* ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* **31**, 3784-8 (2003).
221. Duvaud, S. *et al.* Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Research* **49**, W216-W227 (2021).
222. den Hoed, J. *et al.* Functional characterization of TBR1 variants in neurodevelopmental disorder. *Scientific Reports* **8**, 14279 (2018).
223. Ziffra, R.S. *et al.* Single-cell epigenomics reveals mechanisms of human cortical development. *Nature* **598**, 205-213 (2021).
224. Kopp, N.D. *et al.* Functions of Gtf2i and Gtf2ird1 in the developing brain: transcription, DNA binding and long-term behavioral consequences. *Human molecular genetics* **29**, 1498-1519 (2020).
225. Pang, W. *et al.* Untangle the Multi-Facet Functions of AutS2 as an Entry Point to Understand Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Psychiatry* **12**(2021).
226. Cheng, Y., Quinn, J.F. & Weiss, L.A. An eQTL mapping approach reveals that rare variants in the SEMA5A regulatory network impact autism risk. *Human molecular genetics* **22**, 2960-2972 (2013).
227. Huillard, E. *et al.* Disruption of CK2beta in embryonic neural stem cells compromises proliferation and oligodendrogenesis in the mouse telencephalon. *Molecular and cellular biology* **30**, 2737-2749 (2010).
228. Kovacs, G., Szabo, V. & Pirity, M.K. Absence of Rybp Compromises Neural Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Stem cells international* **2016**, 4034620 (2016).
229. Popp, M.W. & Maquat, L.E. Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine. *Cell* **165**, 1319-1322 (2016).

230. Pascual, M. *et al.* Cerebellar GABAergic progenitors adopt an external granule cell-like phenotype in the absence of Ptf1a transcription factor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 5193-8 (2007).
231. Nakayama, M., Nakajima, D., Yoshimura, R., Endo, Y. & Ohara, O. MEGF1/fat2 Proteins Containing Extraordinarily Large Extracellular Domains Are Localized to Thin Parallel Fibers of Cerebellar Granule Cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* **20**, 563-578 (2002).
232. Kim, B.J. & Scott, D.A. Mouse model reveals the role of RERE in cerebellar foliation and the migration and maturation of Purkinje cells. *PLoS One* **9**, e87518 (2014).
233. Zhubi, A., Chen, Y., Guidotti, A. & Grayson, D.R. Epigenetic regulation of RELN and GAD1 in the frontal cortex (FC) of autism spectrum disorder (ASD) subjects. *International Journal of Developmental Neuroscience* **62**, 63-72 (2017).
234. Ortiz, A.R.R., Saldarriaga, M.A.B., Villegas, J.C.M. & García-Vallejo, F. Temporal and Spatial Differential Expression of Glutamate Receptor Genes in the Brain of Down Syndrome. in *Gene Regulation* (IntechOpen, 2019).
235. Scheggi, S. *et al.* Targeting PPAR α in the rat valproic acid model of autism: focus on social motivational impairment and sex-related differences. *Molecular Autism* **11**, 62 (2020).
236. Lopuch, A.J. *et al.* Integrin β 3 in forebrain Emx1-expressing cells regulates repetitive self-grooming and sociability in mice. *BMC neuroscience* **23**, 12-12 (2022).
237. Edmonson, C., Ziats, M.N. & Rennert, O.M. Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. *Molecular Autism* **5**, 3 (2014).
238. Gao, H. *et al.* Mecp2 regulates neural cell differentiation by suppressing the Id1 to Her2 axis in zebrafish. *Journal of Cell Science* **128**, 2340-2350 (2015).
239. Azmitia, E.C., Saccomano, Z.T., Alzoobae, M.F., Boldrini, M. & Whitaker-Azmitia, P.M. Persistent Angiogenesis in the Autism Brain: An Immunocytochemical Study of Postmortem Cortex, Brainstem and Cerebellum. *Journal of autism and developmental disorders* **46**, 1307-18 (2016).
240. Bronzuoli, M.R. *et al.* Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. *Molecular Autism* **9**, 66 (2018).
241. Szu, J., Wojcinski, A., Jiang, P. & Kesari, S. Impact of the Olig Family on Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Neurosciences* **15**, 659601 (2021).
242. Cheng, A.H., Fung, S.W., Hegazi, S., Abdalla, O.H.M.H. & Cheng, H.-Y.M. SOX2 Regulates Neuronal Differentiation of the Suprachiasmatic Nucleus. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 229 (2022).
243. Zinin, N. *et al.* MYC proteins promote neuronal differentiation by controlling the mode of progenitor cell division. *EMBO reports* **15**, 383-391 (2014).
244. Ogawa, Y. *et al.* Elavl3 is essential for the maintenance of Purkinje neuron axons. *Scientific reports* **8**, 2722-2722 (2018).
245. Bohuslavova, R. *et al.* Pax2-Islet1 Transgenic Mice Are Hyperactive and Have Altered Cerebellar Foliation. *Molecular neurobiology* **54**, 1352-1368 (2017).

246. Tutukova, S., Tarabykin, V. & Hernandez-Miranda, L.R. The Role of Neurod Genes in Brain Development, Function, and Disease. *Frontiers in molecular neuroscience* **14**, 662774-662774 (2021).
247. Mech, A.M. *et al.* Behavioral and Gene Regulatory Responses to Developmental Drug Exposures in Zebrafish. *Frontiers in Psychiatry* **12**(2022).
248. Armstrong, J.L. *et al.* (S)-5-(2'-Fluorophenyl)-N,N-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-amine, a Serotonin Receptor Modulator, Possesses Anticonvulsant, Prosocial, and Anxiolytic-like Properties in an Fmr1 Knockout Mouse Model of Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorder. *ACS pharmacology & translational science* **3**, 509-523 (2020).
249. Young, E.J. *et al.* Reduced fear and aggression and altered serotonin metabolism in Gtf2ird1-targeted mice. *Genes, brain, and behavior* **7**, 224-234 (2008).
250. El-Brolosy, M.A. *et al.* Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* **568**, 193-197 (2019).
251. Gilmore, E.C. & Walsh, C.A. Genetic causes of microcephaly and lessons for neuronal development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **2**, 461-478 (2013).
252. Visel, A. *et al.* A high-resolution enhancer atlas of the developing telencephalon. *Cell* **152**, 895-908 (2013).
253. Nagarajan, R.P., Hogart, A.R., Gwyne, Y., Martin, M.R. & LaSalle, J.M. Reduced MeCP2 expression is frequent in autism frontal cortex and correlates with aberrant MECP2 promoter methylation. *Epigenetics* **1**, e1-11 (2006).
254. Wen, Z. *et al.* Identification of autism-related MECP2 mutations by whole-exome sequencing and functional validation. *Molecular Autism* **8**, 43 (2017).
255. Sedaghat, Y., Mazur, C., Sabripour, M., Hung, G. & Monia, B.P. Genomic analysis of wig-1 pathways. *PLoS One* **7**, e29429 (2012).
256. Petrelli, F., Pucci, L. & Bezzi, P. Astrocytes and Microglia and Their Potential Link with Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in cellular neuroscience* **10**, 21-21 (2016).
257. Boger-Megiddo, I. *et al.* Corpus callosum morphometrics in young children with autism spectrum disorder. *Journal of autism and developmental disorders* **36**, 733-9 (2006).
258. Galvez-Contreras, A.Y., Zarate-Lopez, D., Torres-Chavez, A.L. & Gonzalez-Perez, O. Role of Oligodendrocytes and Myelin in the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder. *Brain sciences* **10**(2020).



La etiología multifactorial de los trastornos del espectro autista (TEA) dificulta en gran medida la comprensión de los mecanismos desencadenantes, por lo que investigar la implicación de genes candidatos es fundamental. El empleo de líneas mutantes de pez cebra ofrece información con gran potencial para ser trasladada a la práctica clínica. En esta tesis se ha desarrollado una línea mutante para *auts2a*, ortólogo del gen humano *AUTS2*, mediante CRISPR/Cas9, y se ha caracterizado a nivel fenotípico, celular y transcriptómico. Conocidas las alteraciones que la disrupción del gen provoca, se pretende establecer a *auts2a* como potencial diana terapéutica para la búsqueda de nuevos tratamientos y así implementar el consejo genético, lo que redundaría en una mejora de la calidad de vida de los pacientes y sus familiares.