



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Métodos experimentales en
el pez cebra (*Danio rerio*)
para la caracterización de
genes humanos
relacionados con trastornos
del neurodesarrollo

Maidier Fernández Santos

Grado en Veterinaria

Año 2021

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Mainer Fernández Santos y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



Resumen

Los trastornos del neurodesarrollo son un grupo de trastornos que se manifiestan en períodos tempranos del desarrollo. Entre ellos se encuentran la discapacidad intelectual y los trastornos del espectro autista, que se solapan con gran frecuencia y en cuya etiología influyen factores genéticos y ambientales. Los análisis realizados para descubrir genes involucrados en la discapacidad intelectual han señalado la implicación de *TRIP12*, el cual también puede provocar autismo. Para investigar la implicación de *TRIP12* en este tipo de trastornos, se realizó un bloqueo transitorio del gen mediante morfolinós en pez cebra, analizando el fenotipo morfológico resultante y la locomoción, y se realizó una validación de genes *housekeeping* así como del bloqueo transitorio a través de análisis de expresión génica por qPCR. Asimismo, se caracterizaron genotípicamente y fenotípicamente individuos de una línea mutante en pez cebra de *trip12* generada mediante el sistema CRISPR/Cas9. Los resultados del análisis fenotípico de los individuos con bloqueo transitorio del gen revelan diferencias significativas ($p < 0,05$) en la longitud del cuerpo, el diámetro de la cabeza, la distancia del otolito al ojo y el área del ojo, siendo todas las medidas menores en individuos *wild type*. En relación al análisis fenotípico de los individuos mutantes, existe un aumento estadísticamente significativo respecto a los individuos *wild type* en todas las medidas ($p < 0,05$), a excepción del diámetro de la cabeza, que no presenta diferencias en ningún grupo. En cuanto al análisis de locomoción, se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$), presentando los individuos morfolinos un menor movimiento que los *wild type* tanto en condiciones de luz como de oscuridad.

Palabras clave: Discapacidad Intelectual, Trastornos del Espectro Autista, Trastornos del Neurodesarrollo, *trip12*, Pez Cebra, Morfolinos, CRISPR/Cas9

Resumo

Os trastornos do neurodesenvolvemento son un grupo de trastornos que se manifestan en períodos temperáns do desenvolvemento. Entre eles atópanse a discapacidade intelectual e os trastornos do espectro autista, que se solapan con gran frecuencia e en cuxa etioloxía inflúen factores xenéticos e ambientais. As análises realizadas para descubrir xenes involucrados na discapacidade intelectual sinalan a implicación de *TRIP12*, o cal tamén pode provocar autismo. Para investigar a implicación de *TRIP12* neste tipo de trastornos, realizouse un bloqueo transitorio do xen mediante morfolinós en peixe cebra, analizando o fenotipo morfolóxico resultante e a locomoción, e realizouse a validación de xenes *housekeeping* así como do bloqueo transitorio a través de análise de expresión xénica por qPCR. Asimesmo, caracterizáronse xenotípicamente e fenotípicamente individuos dunha liña mutante en peixe cebra de *trip12* xerada mediante o sistema CRISPR/Cas9. Os resultados da análise fenotípica dos individuos con bloqueo transitorio do xen revelan diferenzas significativas ($p < 0,05$) na lonxitude do corpo, o diámetro da cabeza, a distancia do otolito ao ollo e a área do ollo, sendo todas as medidas

menores en individuos *wild type*. En relación á análise fenotípica dos individuos mutantes, existe un aumento estadísticamente significativo respecto aos individuos *wild type* en todas as medidas ($p < 0,05$), a excepción do diámetro da cabeza, que non presenta diferenzas en ningún grupo. En canto á análise da locomoción, detectáronse diferenzas significativas ($p < 0,05$), presentando os individuos morfantes un menor movemento que os *wild type* tanto en condicións de luz como de escuridade.

Palabras chave: Discapacidade Intelectual, Trastornos do Espectro Autista, Trastornos do Neurodesenvolvemento, *trip12*, Peixe Cebra, Morfolinos, CRISPR/Cas9

Abstract

Neurodevelopmental disorders are a group of disorders with manifestation in early stages of development. Among them intellectual disability and autism spectrum disorders are included, which very frequently overlap and whose etiology is influenced by genetic and environmental factors. Tests carried out to uncover genes involved in intellectual disability have pointed to the involvement of *TRIP12*, which can also cause autism. To investigate the implication of *TRIP12* in these disorders, a knockdown of the gene was performed in zebrafish by morpholinos, analyzing the resulting morphologic phenotype and locomotion, and the validation of housekeeping genes and the knockdown was performed through qPCR. Additionally, zebrafish individuals from a mutant line of *trip12* generated by CRISPR/Cas9 system were genotypically and phenotypically characterized. The results of the phenotypic analysis of individuals with knockdown reveal significant differences ($p < 0,05$) in body length, head diameter, otolith distance to eye, and eye area, being all measurements smaller in wild type individuals. In respect of the phenotypic analysis of the mutant individuals, there is a statistically significant increase compared to wild type individuals in all measurements ($p < 0,05$), except for the diameter of the head, which does not present differences in any group. Regarding the locomotion analysis, significant differences were detected ($p < 0,05$), with morphants presenting less movement than wild type individuals both in light and dark conditions.

Keywords: Intellectual Disability, Autism Spectrum Disorders, Neurodevelopmental Disorders, *trip12*, Zebrafish, Morpholinos, CRISPR/Cas9

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. <i>Trastornos del neurodesarrollo.....</i>	<i>1</i>
1.2. <i>Herramientas de estudio de los trastornos del neurodesarrollo.....</i>	<i>3</i>
1.3. <i>TRIP12 como gen candidato de susceptibilidad a TNDs</i>	<i>5</i>
1.4. <i>Estudio del gen trip12 en pez cebra.....</i>	<i>6</i>
1.5. <i>Empleo de morfolinós para bloqueo transitorio del gen (knockdown)</i>	<i>7</i>
1.6. <i>Empleo del sistema CRISPR/Cas9 para bloqueo permanente del gen (knockout).....</i>	<i>8</i>
2. Objetivos	11
3. Material y métodos.....	12
3.1. <i>Mantenimiento de los peces y obtención de embriones</i>	<i>12</i>
3.2. <i>Selección del gen TRIP12 para generar un modelo en pez cebra</i>	<i>12</i>
3.3. <i>Bloqueo transitorio del gen (knockdown) mediante MOs</i>	<i>12</i>
3.4. <i>Extracción de ARN y obtención de ADNc.....</i>	<i>14</i>
3.5. <i>Validación de genes housekeeping y del bloqueo transitorio efectivo mediante qPCR.....</i>	<i>15</i>
3.6. <i>Análisis de imagen y caracterización fenotípica</i>	<i>16</i>
3.7. <i>Análisis de locomoción</i>	<i>16</i>
3.8. <i>Caracterización genotípica de adultos de la generación F2 de una línea mutante de trip12 generada mediante el sistema CRISPR/Cas9</i>	<i>17</i>
3.9. <i>Obtención de embriones de la generación F3 y caracterización genotípica y fenotípica.....</i>	<i>19</i>
4. Resultados y discusión	20
4.1. <i>Validación de genes housekeeping y del bloqueo transitorio efectivo mediante qPCR.....</i>	<i>20</i>
4.2. <i>Caracterización y análisis fenotípico de morfantes.....</i>	<i>20</i>
4.3. <i>Análisis de locomoción</i>	<i>24</i>
4.4. <i>Caracterización genotípica de adultos la generación F2 de una línea mutante de trip12 generada mediante el sistema CRISPR/Cas9</i>	<i>25</i>
4.5. <i>Obtención de embriones de la generación F3 y caracterización genotípica y fenotípica.....</i>	<i>26</i>
5. Conclusiones	30
6. Referencias.....	31
7. Abreviaturas	39

1. Introducción

1.1. Trastornos del neurodesarrollo

Los trastornos del neurodesarrollo (TNDs) son un grupo de trastornos caracterizados por déficits que producen alteraciones persistentes del funcionamiento personal, social, académico u ocupacional, y cuyo inicio se sitúa, generalmente, en períodos tempranos del desarrollo [1]. Los TNDs abarcan los trastornos del espectro autista (TEA), la discapacidad intelectual (DI), el trastorno por déficit de atención/hiperactividad (TDAH), los trastornos de la comunicación, los trastornos motores y los trastornos específicos del aprendizaje, y a pesar de considerarse diagnósticos distintos, presentan una alta tasa de comorbilidad [1-4].

1.1.1. Discapacidad intelectual

La discapacidad intelectual (DI) es un trastorno del desarrollo fenotípicamente heterogéneo en el que se ven implicados de forma negativa el desarrollo físico, emocional, conductual e intelectual, mostrando las habilidades cognitivas y adaptativas, un déficit más significativo [5-6]. Se estima que afecta al 1-3 % de la población mundial, aunque la prevalencia parece ser menor en países desarrollados que en países aún en desarrollo [7]. En relación al género, aunque hay gran disparidad en la información dada por los distintos estudios, parece que la DI ocurre más en varones, presentando la manifestación leve de la enfermedad un ratio varón:mujer de 1,6:1 y la manifestación grave un ratio de 1,2:1 [1].

La severidad del proceso permite clasificar la discapacidad intelectual en profunda, severa, moderada y leve [1, 6, 8]. La etiología también contribuye a su clasificación, ya que se ven involucrados tanto factores genéticos como ambientales que alteran el desarrollo y el funcionamiento del sistema nervioso [5, 7].

Entre las causas genéticas se pueden citar aneuploidías, variaciones en el número de copias (CNVs, del inglés *copy number variations*) y variantes patogénicas en genes específicos, con alrededor de 1,396 genes involucrados [7]. Los factores genéticos pueden a su vez establecer una tercera clasificación, según si la discapacidad intelectual se presenta de forma exclusiva o si se acompaña de características fenotípicas que la relacionen con un síndrome, adquiriendo la distinción de DI no sindrómica y DI sindrómica, respectivamente [6-8].

Hay multitud de factores ambientales implicados en la discapacidad intelectual, pudiendo actuar a lo largo del periodo prenatal cuando el cerebro aún se está formando (como las infecciones durante el embarazo), durante el periodo perinatal (como en la isquemia anóxica durante el parto), o en el periodo postnatal (p. ej. por meningitis o malnutrición) [7, 9].

El daño puede afectar desde la organogénesis hasta el proceso de transmisión sináptica, originando fenotipos más patológicos cuanto más temprano se vea afectado el sistema nervioso

central, pudiendo aparecer desde malformaciones cerebrales hasta modificaciones sinápticas y remodelación estructural de las redes neuronales [9].

La variedad fenotípica de la discapacidad intelectual dificulta enormemente el diagnóstico clínico, por lo que es fundamental una anamnesis detallada que incluya aspectos sobre el desarrollo y posibles factores de riesgo, acompañada de un examen físico y una evaluación neuropsicológica. Generalmente será necesaria una combinación adicional de pruebas bioquímicas, genéticas y análisis enzimáticos para llegar a un diagnóstico definitivo [6].

1.1.2. Trastornos del espectro autista

Los trastornos del espectro autista (TEA) son un conjunto de enfermedades complejas del neurodesarrollo, caracterizadas por deficiencias persistentes en la comunicación e interacción social en diversos contextos, acompañadas de patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento, intereses o actividades. El término 'espectro' permitió la inclusión en la clasificación de otros trastornos conocidos anteriormente como autismo de la 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 Asperger [1]. La prevalencia de los TEA se sitúa actualmente alrededor del 1,5 % de la población, siendo cuatro veces más frecuente en niños que en niñas a pesar de que el ratio disminuye a medida que aumenta la severidad del proceso [1, 10, 11].

La etapa en la que se manifiesta el deterioro funcional, aunque normalmente ocurre durante el segundo año, varía según la gravedad de la afección, la capacidad lingüística, el nivel intelectual, y la posible presencia de comportamiento de enmascaramiento o estrategias de compensación [1, 12]. La 5ª edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales establece 3 niveles de gravedad, de menor a mayor severidad: grado 1 ("necesita ayuda"), grado 2 ("necesita ayuda notable") y grado 3 ("necesita ayuda muy notable"). A los TEA pueden estar asociadas comorbilidades como el deterioro del lenguaje, la catatonía o, más frecuentemente, la discapacidad intelectual [1]. Los trastornos del neurodesarrollo se pueden dividir en dos grupos: el autismo sintomático, que se asocia a alteraciones o síndromes genéticos, y el autismo no sintomático o aislado [13].

La variedad fenotípica y genética de los trastornos del neurodesarrollo sugiere una etiología multifactorial en la que participan factores genéticos y ambientales. Entre los factores de riesgo ambientales se pueden citar la edad avanzada de los padres, enfermedades maternas como la diabetes mellitus, infecciones durante el embarazo, exposición fetal al valproato, contaminación ambiental por materia particulada de diámetro menor a 2,5 µm (PM2.5), e incluso disregulación inmune que altere el desarrollo cerebral [1, 10, 14-16]. Las causas genéticas juegan un papel muy importante en la etiología del autismo, que es altamente heredable, hecho evidenciado por la tasa de concordancia entre gemelos [13, 17]. Alteraciones genéticas identificadas como

responsables de TEA son anomalías cromosómicas, variaciones en el número de copias y alteraciones en un único gen, con afectación de la función sináptica, la comunicación entre células, la regulación transcripcional, y la remodelación de la cromatina, entre otros [13-15].

Para confirmar el diagnóstico de TEA y valorar su severidad se debe realizar una evaluación psiquiátrica y psicológica infantil, junto con un examen neuropediátrico que detecte posibles síntomas neurológicos asociados, como hipotonía o epilepsia, y un examen físico exhaustivo para encontrar posibles rasgos dismórficos. De forma complementaria se pueden realizar pruebas como análisis genéticos, moleculares o bioquímicos [13]. El tratamiento proporcionado a los individuos afectados se basa en la combinación de varias opciones terapéuticas, destacando la terapia conductual y la medicación, cuyo objetivo es mejorar los síntomas del trastorno [11].

1.2. Herramientas de estudio de los trastornos del neurodesarrollo

Una de las áreas más fructíferas en el estudio de los trastornos del neurodesarrollo es el campo de la genética, gracias al avance de tecnologías de secuenciación y de estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *genome-wide association studies*), que han permitido la identificación de muchos genes relevantes, lo cual contribuye a determinar cómo las mutaciones genéticas producen trastornos del neurodesarrollo específicos [18-21].

Existen numerosos modelos experimentales que permiten estudiar los trastornos del neurodesarrollo. El uso de enfoques celulares como cultivos de neuronas o de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*) permite explorar la variación provocada por estos trastornos, especialmente si causan alteraciones en los tipos celulares [11, 18]. Un sistema alternativo que reproduce el proceso de desarrollo neuronal es el uso de organoides cerebrales, formados por células madre capaces de auto-organizarse en cultivo para conformar una estructura similar a un órgano [18, 22]. No obstante, las hipótesis formadas a partir de estos modelos deben ser validadas *in vivo* para estudiar las interacciones sistémicas que se producen entre órganos, de modo que se requiere un organismo completo [22, 23].

El empleo de modelos animales modificados genéticamente (p. ej. mediante edición genómica o con mutagénesis) ha contribuido a entender algunos de los mecanismos moleculares y celulares alterados en los trastornos del neurodesarrollo. Todo modelo animal debe tener tres cualidades: alta analogía con el fenotipo humano, misma alteración biológica que provoca la enfermedad humana, y respuesta similar a tratamientos capaces de mejorar la enfermedad humana [11]. Además, el análisis de los modelos animales de TNDs debe manifestar fenotipos observables, medibles y comprobables mediante evaluación estadística [24]. La elección del organismo se basa en equilibrar estas cualidades con la manejabilidad y el coste de mantenimiento del animal [25, 26].

Aunque los animales más populares en el estudio de TNDs son las ratas y los ratones, se han empleado otros modelos muy diversos, como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el molusco *Aplysia*, la rana *Xenopus laevis* y el pez *Danio rerio* [18, 27-29].

1.2.1. Pez cebra como organismo modelo de trastornos del neurodesarrollo

El pez cebra (*Danio rerio*) es un teleósteo de agua dulce originario del sur de Asia, donde habita en aguas tranquilas [30]. Tiene un tamaño pequeño que oscila entre los 4-5 cm, un cuerpo fusiforme y comprimido lateralmente, y una línea lateral incompleta que llega hasta la base de la aleta pélvica [31, 32]. Las cepas salvajes más utilizadas en laboratorio se caracterizan por poseer aletas cortas y un patrón de pigmentación otorgado por melanóforos de color azul oscuro, xantóforos dorados e iridóforos iridiscentes, que dibujan rayas horizontales oscuras alternadas con claras [30-32].

Aunque no muestran un dimorfismo sexual llamativo, la distinción entre machos y hembras se basa en que, mientras los machos presentan aletas anales de mayor tamaño y una coloración más amarillenta, las hembras tienen mayor longitud corporal, una forma más redondeada y una papila genital pequeña frente al inicio de la aleta anal (Figura 1) [31, 32].

Los peces cebra se reproducen durante todo el año si están en condiciones de laboratorio [30, 32]. La presencia de un macho es esencial para que las hembras desoven, ya que la ovulación depende de su exposición a feromonas gonadales masculinas. En los peces cebra domesticados, el fotoperiodo influye en el desove, cuya actividad comienza desde la primera exposición a la luz después de la oscuridad y se mantiene alrededor de una hora, durante la cual la hembra libera los huevos en lotes de 5 a 20 durante varios encuentros con el macho [31, 32]. Las hembras producen una media de 200 huevos por puesta, siendo capaces de desovar a diario o cada 2-3 días en condiciones de laboratorio [32-34].

Los huevos de pez cebra están protegidos por una membrana coriónica, presentan un diámetro de 0,7 mm y se hunden hasta el fondo. El hecho de que la fecundación sea externa, unido a que tanto los huevos como las larvas durante los primeros días post-fecundación (dpf) son transparentes, posibilitan la monitorización y manipulación de los embriones durante todas las etapas de su desarrollo [31-33, 35]. El desarrollo embrionario del pez cebra se produce muy rápido a 28 °C, y alcanzan la madurez sexual a las 10-12 semanas post-fecundación, aunque el tamaño parece influir más que la edad en este punto [30, 32, 34, 35].



Figura 1. Peces cebra adultos AB. **(a)** Pez cebra macho. **(b)** Pez cebra hembra. Modificado de Meyers (2018) [30].

Por otro lado, todo el genoma del pez cebra ha sido secuenciado, y su comparación con el genoma humano de referencia evidencia que el 71,4 % de genes humanos tienen al menos un ortólogo en pez cebra [36]. Esto lo convierte en una herramienta muy útil que se ha visto impulsada gracias al desarrollo de las técnicas de edición del genoma, facilitando la creación en varias líneas de investigación de modelos de pez cebra con mutaciones en genes causantes de enfermedades, capaces de recapitular algunas características observadas en pacientes humanos [34, 37, 38].

El estudio de los trastornos del neurodesarrollo se ve favorecido con el empleo del pez cebra como modelo, ya que a las características mencionadas anteriormente se suma una homología molecular y estructural de algunas regiones cerebrales relevantes en enfermedades humanas, el cerebro pequeño de las larvas que simplifica su estudio, y una alta neuroplasticidad que permite analizar las adaptaciones neuronales y sus correlaciones con el comportamiento [39-41]. Los cambios genéticos que alteran la diferenciación o función neuronal pueden provocar cambios morfológicos, fisiológicos y de comportamiento, además de alterar el patrón de expresión, y su análisis se ha beneficiado de la disponibilidad de herramientas en pez cebra que se pueden agrupar en ensayos celulares y de comportamiento [38, 42]. Dentro de los ensayos celulares que evalúan el desarrollo neuronal y la función genética se pueden citar técnicas como las basadas en PCR, el análisis de expresión génica *in vivo*, o técnicas de microscopía que permitan visualizar los tejidos o las células *in vivo*. En cuanto a la caracterización del comportamiento, existen ensayos tanto en larvas (p. ej. monitorizando patrones de movimiento o evaluando la respuesta de sobresalto y la respuesta motora visual) como en peces adultos (diversas pruebas de aprendizaje, de ansiedad o miedo, y de interacción social). Asimismo, las ventajas que ofrece el pez cebra en la realización de ensayos de *screening* permiten que los resultados se puedan extrapolar a pacientes, facilitando la creación de tratamientos individualizados para cada caso [38].

1.3. *TRIP12* como gen candidato de susceptibilidad a TNDs

La secuenciación completa del genoma (WGS, del inglés *whole genome sequencing*) de uno de dos hermanos afectados por el Síndrome de Clark-Baraitser, descrito por primera vez en 1987 y con discapacidad intelectual, obesidad y dimorfismo craneofacial como características principales, identificó una variante patogénica en heterocigosis en el gen *TRIP12* [43, 44]. Desde entonces, numerosos estudios han comunicado casos de variantes heterocigóticas en este gen en pacientes con discapacidad intelectual, entre otras manifestaciones [45-49].

TRIP12 (del inglés *Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12*, OMIM 604506), es el único miembro de la familia TRIP con actividad E3 ubiquitina ligasa. En el genoma humano, se localiza en el locus q36.3 del cromosoma 2, ocupando casi 168 kb [50] (Figura 2).

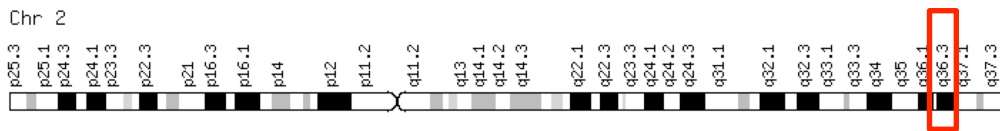


Figura 2. Localización de *TRIP12* en el genoma humano. Modificado de *GeneCards* [51].

La secuencia aminoacídica de *TRIP12* está altamente conservada en vertebrados, existiendo 213 ortólogos de este gen [50, 52]. Por otro lado, cuenta con 20 variantes de *splicing*, 13 de las cuales se traducen en proteínas formadas por 99 aminoácidos la más pequeña, hasta 2068 aminoácidos la más grande [52]. La proteína TRIP12 es una E3 ubiquitina ligasa, siendo su función la poliubiquitinación, es decir, el marcaje de proteínas que van a ser degradadas por el proteasoma. Tiene cuatro dominios: uno catalítico (dominio HECT), dos de interacción proteína-proteína (WWE o Triptófano-Triptófano-Glutamato, y ARM o *Armadillo-Repeats*) y una región intrínsecamente desordenada (IDR) [50].

La implicación de *TRIP12* en numerosos procesos biológicos (proteólisis mediada por ubiquitina, reparación del ADN, regulación del desarrollo embrionario, progresión del ciclo celular y remodelación de la cromatina o el procesamiento de antígenos y la respuesta inmune) subraya la importancia de este gen en el organismo, de modo que si su función se ve afectada se podrán dar desde alteraciones del neurodesarrollo hasta cáncer [46, 50, 52].

Su condición de candidato de susceptibilidad a trastornos del neurodesarrollo se debe a su relación con una discapacidad intelectual autosómica dominante [7]. Los estudios de mutaciones de *TRIP12* describen la presencia de DI, TEA y dismorfismo craneofacial, otorgando al fenotipo el nombre de Síndrome de Clark-Baraitser [46, 48-50]. Las características clínicas de este síndrome son amplias y muy variables, y aunque las más comunes son la DI, el dimorfismo craneofacial, las manifestaciones psiquiátricas conductuales y la obesidad, se pueden citar otras como macrocefalia, retraso psicomotor, hipotonía, clinodactilia o macroorquidismo [49, 50, 53]. A pesar de ello, se han identificado variantes patogénicas de *TRIP12* en individuos con discapacidad intelectual no sindrómica, con o sin TEA [45].

1.4. Estudio del gen *trip12* en pez cebra

El ortólogo del gen humano en pez cebra es *trip12*, y se localiza en el cromosoma 18. Tiene 3 variantes de *splicing* que se traducen en proteínas de 32 aminoácidos la más pequeña, y 2053 aminoácidos la más grande. El 82.29 % de la secuencia humana del gen coincide con la del pez cebra, mientras que el porcentaje de secuencia de pez cebra que coincide con la humana se sitúa en un 82.85 % (Figura 3) [54]. *trip12* alcanza un nivel máximo de expresión durante la gastrulación, aunque se expresa durante todos los 18 momentos del desarrollo estudiados por White et. al (2017) [55].

Species	Type	Orthologue	Target %id	Query %id
Human (<i>Homo sapiens</i>)	1-to-1 View Gene Tree	TRIP12 (ENSG00000153827) Compare Regions (2:229,763,837-229,923,239:-1) View Sequence Alignments	82.29 %	82.85 %

Figura 3. Porcentaje de homología de *TRIP12* humano con *trip12* del pez cebra. Modificado de *Ensembl* [54].

1.5. Empleo de morfolinós para bloqueo transitorio del gen (*knockdown*)

Desde su lanzamiento como reactivos de investigación personalizados en el año 1999, los morfolinós (*Morpholino Oligonucleotides*, MOs) se han usado para bloquear la expresión génica endógena en pez cebra [38, 56]. Los morfolinós son un derivado sintético del ADN, donde la desoxirribosa es reemplazada por un anillo de morfolina de seis miembros al que se unen las bases nitrogenadas, y siendo cada subunidad unida a la siguiente por un enlace fosforodiamidato no iónico (Figura 4) [57, 58].

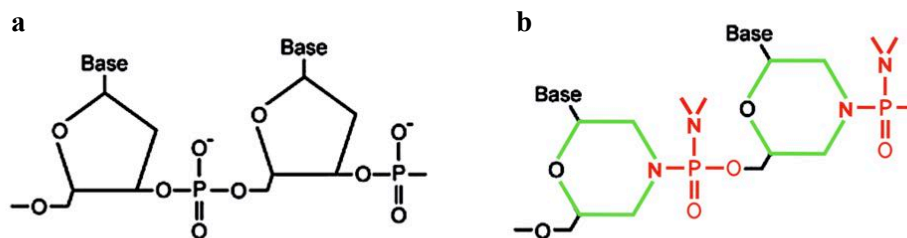


Figura 4. (a) Estructura de un oligonucleótido de ADN. (b) Estructura de un oligonucleótido morfolino. En verde se destaca el anillo morfolino de seis miembros, mientras que el enlace fosforodiamidato no iónico entre los anillos se enfatiza en rojo. Modificado de Eisen (2008) [58].

La carga neutra ofrecida por el diseño de los morfolinós evita la unión electrostática a las proteínas, resultando en una menor toxicidad, y unido al pequeño tamaño de la molécula, de unas 25 bases de longitud, favorece su difusión por todo el embrión. Además, su resistencia a las nucleasas u otras enzimas les proporciona una estabilidad notable [58-60]. Los morfolinós están dirigidos hacia una secuencia de ARN mensajero (ARNm) de interés mediante emparejamiento por complementariedad de bases [59]. Su diseño permite la unión al sitio de inicio de la traducción del ARNm, afectando a la progresión del complejo de inicio ribosómico, o a los límites entre intrones y exones de un pre-ARNm, creando ARNm maduros anormales al alterar el patrón de *splicing* [11, 38, 61].

La inyección de morfolinós en pez cebra se realiza generalmente en el centro del vitelo, para evitar dañar los blastómeros, y en embriones de 1-8 células, asegurando que los MOs se difunden a todas ellas y no se generen mosaicismos [59]. El efecto de los morfolinós es transitorio, y aún teniendo gran eficacia durante los primeros 2 días de desarrollo, se pierde

completamente sobre los 4 dpf, por lo que el estudio del gen en cuestión más allá de las primeras etapas de desarrollo no es posible [11, 57, 62].

La desventaja de los morfolinós es que habitualmente su efecto es incompleto, y resulta en la formación de pequeñas cantidades de proteína. Además, es frecuente que provoquen efectos no asociados con el gen diana (“efectos fuera del objetivo”) e induzcan la regulación positiva del factor de transcripción apoptótico p53, pudiendo ser una variable de confusión a tener en cuenta [11, 38, 57, 59].

1.6. Empleo del sistema CRISPR/Cas9 para bloqueo permanente del gen (*knockout*)

El sistema CRISPR/Cas9 es una herramienta que permite una manipulación genética dirigida y específica, siendo capaz de generar *knockouts* que silencian permanentemente la función del gen de interés [61, 63]. Las siglas CRISPR hacen referencia a Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (del inglés *Clustered Regularly Inter-spaced Short Palindromic Repeats*), mientras que Cas9 adquiere su nombre del inglés *CRISPR associated protein 9*, al ser una nucleasa asociada al CRISPR [63, 64]. El sistema CRISPR/Cas es un mecanismo inmunológico adaptativo que protege a células procariontas (el 84 % de las arqueas y el 45 % de las bacterias conocidas) de elementos genéticos invasores como virus y plásmidos durante un proceso de reinfección [63-65].

La estructura del CRISPR (Figura 5) está formada por unas secuencias de 24-47 pares de bases, palindrómicas y repetidas por el ADN (repeticiones palindrómicas), separadas entre sí por otras secuencias distintas, de 27-72 pares de bases y coincidentes con secuencias genómicas de virus o plásmidos, llamadas espaciadores. Además, estas repeticiones están precedidas por una secuencia rica en adenina y timina denominada secuencia *leader*. En su extremo, se localizan entre 6-20 genes conservados codificadores de nucleasas Cas [64, 66].

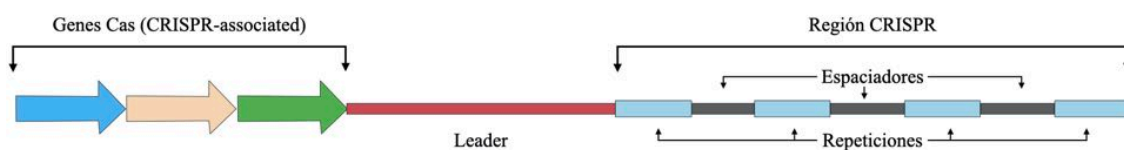


Figura 5. Estructura del CRISPR. Modificado de Barman (2020) [64].

El mecanismo de acción del sistema (Figura 6.a-c) se divide en tres fases: adaptación, expresión y maduración, e interferencia. En la fase de adaptación, las proteínas Cas de la célula procarionta generan cortes en el elemento genético invasor originando fragmentos, cada uno de los cuales se denomina *protoespaciador*, que será introducido entre dos repeticiones palindrómicas de la región CRISPR, adquiriendo el nombre de *espaciador* y creando así memoria inmunológica [64, 67]. La elección de nuevos protoespaciadores depende habitualmente de la presencia de una

secuencia de 2-5 nucleótidos llamada PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), situada junto al protoespaciador en el ácido nucleico invasor y esencial para distinguir los ácidos nucleicos propios de los extraños [64, 66, 68]. Si hay una reinfección entra en juego la fase de expresión y maduración, en la que la secuencia *leader* actúa como promotora y provoca la transcripción de la región CRISPR, formándose un ARN de CRISPR precursor (pre-ARNcr) que se procesa en varios ARNcr, cada uno de los cuales contiene un único espaciador [64, 68]. En la fase de interferencia, la Cas se une al ARNcr para formar un complejo que identifica el elemento genético invasor, al tener este una secuencia complementaria al ARNcr y ser reconocida la secuencia PAM, y media su escisión, protegiendo así de la reinfección [64, 67].

Los sistemas CRISPR/Cas se dividen actualmente en dos clases que engloban seis tipos (I-VI) y 33 subtipos. El sistema más empleado en ingeniería genética se clasifica como *clase II tipo II CRISPR/Cas9*, y hace uso de la endonucleasa Cas9 para editar el genoma [11, 63, 64, 67-69]. La Cas9 es guiada a una secuencia de ADN específica gracias a dos moléculas de ARN que se pueden diseñar en un único ARN guía (ARNsg): el ya comentado ARNcr, y el ARN de CRISPR trans-activante (ARNtracr), que al ser complementario a las repeticiones palindrómicas hibrida con el ARNcr, y permite la unión de la Cas9 a la propia guía [11, 61, 64, 67, 68]. Una vez la Cas9 se une a la secuencia de ADN diana, se produce un corte de doble cadena gracias a dos dominios que le confieren a la Cas9 su propiedad de nucleasa: HNH, que corta la secuencia de ADN complementaria al ARNsg, y RuvC, que rompe la secuencia no complementaria al ARNsg [64, 67] (Figura 6.d).

El corte de doble cadena desencadena la reparación del ADN, que en eucariotas se realiza por uno de dos mecanismos endógenos: unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *non-homologous end joining*) y reparación dirigida por homología (HDR, del inglés *homology directed repair*) [63, 67, 70]. La NHEJ es más rápida, pero en su intento de reparar el daño genera inserciones y/o deleciones cortas (*indels*) que alteran el marco de lectura del gen o insertan codones de parada, generando proteínas truncadas no funcionales. Por otro lado, la HDR corrige el daño de una forma más precisa, pudiendo sustituir bases o introducir una secuencia a partir de una plantilla de ADN exógena [11, 63, 64, 67]. Ambos mecanismos se representan en la Figura 7.

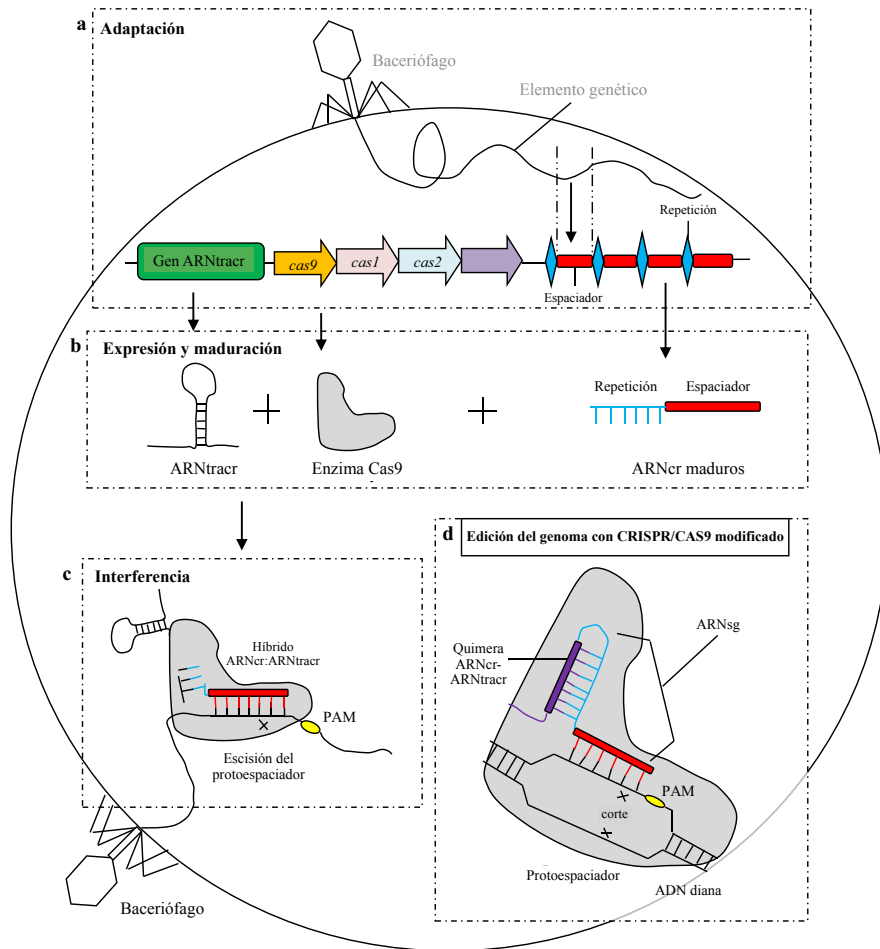


Figura 6. (a-c) Mecanismo de actuación natural del sistema CRISPR/Cas9 con sus tres fases: (a) Fase de adaptación. (b) Fase de expresión y maduración. (c) Fase de interferencia. El ARNtracr hibrida con el ARNcr, provocando el reclutamiento de Cas9. (d) Sistema CRISPR/Cas9 modificado para edición del genoma. La ARNsg se forma al hibridar el extremo 5' del ARNtracr y el extremo 3' del ARNcr, y guiará a la Cas9 hacia el ADN diana para generar un corte de doble cadena. Modificado de Barman (2020) [64].

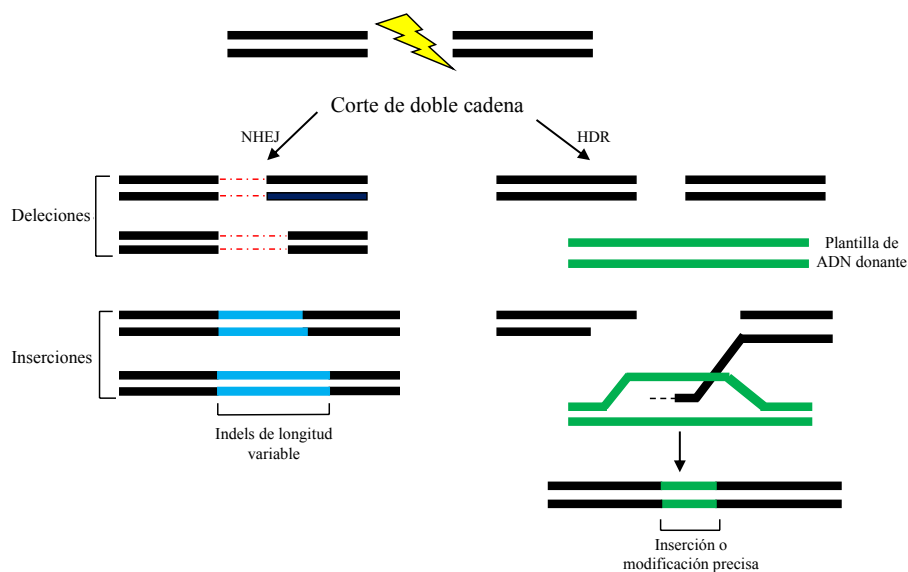


Figura 7. Mecanismos de reparación del corte de doble cadena. Modificado de Barman (2020) [64].

2. Objetivos

- 1) *Knockdown* de *trip12* mediante morfolinós (MOs), y análisis fenotípico y comportamental.
- 2) Validación de genes *housekeeping* y del bloqueo transitorio efectivo, para el posterior análisis de la variación de la expresión de genes relacionados con *trip12* mediante qPCR.
- 3) Caracterización genotípica y fenotípica de una línea mutante de *trip12* mediante el sistema CRISPR/Cas9.

3. Material y métodos

3.1. Mantenimiento de los peces y obtención de embriones

Los peces adultos de la cepa salvaje o *wild type* (WT) AB se encuentran en el animalario (referencia: EA-LU-003) de la Facultad de Veterinaria. Se mantienen en un sistema de peceras de 3 o 10 litros, donde el agua se renueva continuamente gracias a un circuito cerrado de ósmosis inversa. El sistema de canalización por donde recircula el agua posibilita su paso desde las peceras por un filtro inicial mecánico (compuesto por guata), un segundo filtro químico (de carbón activo), un tercer filtro biológico (con bacterias desnitrificantes), y finalmente un filtro ultravioleta después del cual el agua vuelve a incorporarse al sistema. Los peces se mantienen en condiciones estables, con una temperatura de 28,5 °C, el pH a 7, y una conductividad de 600 µS.

Para la obtención de huevos sincrónicos, la noche anterior al inicio del experimento se sitúan machos y hembras en peceras especiales de puesta, llamadas parideras, separados por un separador. A primera hora de la mañana siguiente se retira el separador, de forma que el contacto y el aporte lumínico estimularán la actividad reproductiva. Tras aproximadamente 15 minutos se comprueba si ha habido puesta, se recolectan los huevos y se transfieren a placas de Petri con agua de ósmosis inversa autoclavada. En caso de que el estudio se centre en etapas tempranas de desarrollo, éstos se mantienen a 28,5 °C hasta su uso.

Todos los procedimientos realizados se han llevado a cabo bajo la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela y conforme a la Ley 6/2013, de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

3.2. Selección del gen *TRIP12* para generar un modelo en pez cebra

El gen *TRIP12* fue seleccionado por el grupo del Dr. Ángel Carracedo Álvarez de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, tras el análisis genotípico de individuos que manifiestan la enfermedad y presentan diversas mutaciones en el mismo (Comunicación personal).

3.3. Bloqueo transitorio del gen (*knockdown*) mediante MOs

Para llevar a cabo el bloqueo transitorio de *trip12*, se contactó con la empresa encargada del diseño de los morfolidos (*Gene-Tools*), siendo la secuencia de unión y por ende, de bloqueo del sitio del inicio de la traducción, la siguiente: 5'- GGACATTGGCACCTCTCTCCTGAAG -3'.

Los morfolidos se recibieron liofilizados a 300 nmol, y de acuerdo a la recomendación del vendedor, fueron diluidos en 300 µL de agua desionizada (obteniendo 1 mM) para después mantenerlos a temperatura ambiente hasta su utilización.

Previamente a su uso, los MOs se introdujeron durante 5 minutos en un baño a 60 °C, después del cual se depositaron en hielo para garantizar una correcta solubilización y evitar la formación de estructuras secundarias. Posteriormente, se preparó una solución, utilizando 3 µL de MO y 1 µL de rojo fenol, permitiendo éste último visualizar que la inyección se ha realizado correctamente.

Para elaborar las agujas de microinyección se emplearon capilares de vidrio de borosilicato con filamento interno procedentes de *A-M Systems*, con las siguientes características: 10 cm de longitud, 1 mm de diámetro externo y 0,58 mm de diámetro interno. Los capilares se introdujeron en un *Puller Narishige PC-10* (Figura 8.a), obteniéndose dos agujas de cada capilar. A continuación se cortó la parte distal de la punta de las agujas para abrirla y permitir de esta forma la salida del MO. Posteriormente, las agujas fueron cargadas con la solución de MO y se introdujeron en el micromanipulador *Narishige MM-3*, que está conectado al microinyector *Narishige IM-31* (Figura 8.c-d), a su vez acoplado a una bomba de nitrógeno comprimido que permite la salida del gas a 2 bares. Aunque existan excepciones que justifiquen su modificación (p. ej. el taponamiento de la aguja), los parámetros de inyección han de mantenerse constantes: una presión de inyección de 30 kPa y una presión de balance alrededor de 2,5-3 kPa deberían ser suficientes para inyectar la cantidad necesaria en el embrión. Las inyecciones se visualizaron con la ayuda de la lupa *Leica S6D* (Figura 8.b).

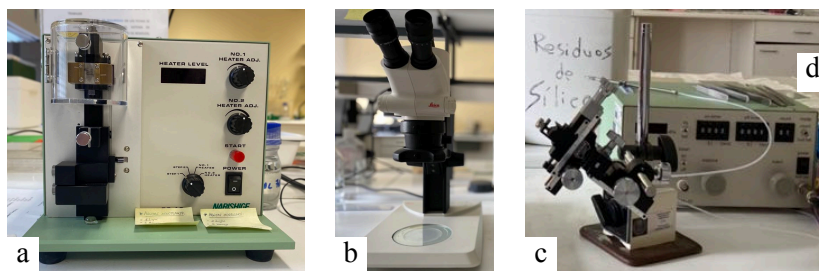


Figura 8. Material de microinyección. (a) Puller Narishige PC-10. (b) Lupa. (c) Micromanipulador. (d) Microinyector.

Los embriones recién fertilizados se dividieron en un grupo para la inyección de MO bloqueo (de aproximadamente 140 individuos) y otro como control (de unos 120 individuos). Para facilitar las inyecciones, los embriones se depositaron sobre una placa de Petri estéril, y se alinearon con ayuda de un portaobjetos. Las inyecciones se realizaron en el vitelo, con alrededor de 3 nL como recomienda la literatura [59]. Una vez inyectados, se trasladaron a placas de Petri estériles con agua de ósmosis inversa autoclavada, manteniéndose en el animalario a 28,5 °C hasta su utilización a las 48 horas post-fecundación (hpf), momento en el cual se realizaron fotografías. Posteriormente, 32 embriones de cada grupo se colocaron una placa de 96 pocillos, individualizados, para realizar análisis de movimiento.

En cuanto al resto de embriones, se introdujeron en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, en una solución protectora y estabilizadora del ARN, el *RNAlater*[®], permitiendo la conservación de estas muestras a -80 °C hasta su uso. Tanto de los morfantes (embriones que han sido inyectados

con morfolin) de *trip12* como de los embriones sin inyectar, se realizaron 4 réplicas biológicas de 15 embriones cada una.

3.4. Extracción de ARN y obtención de ADNc

La extracción de ARN de cada grupo de embriones comenzó por retirar el *RNAlater*[®] de todas las muestras, para después lavar los embriones con PBS 1X. La disgregación del tejido se llevó a cabo añadiendo 500 µL de Trizol a cada muestra y con la ayuda de varillas. A continuación, la adición de cloroformo permitió que, una vez centrifugado, el contenido de cada tubo se separase en una capa acuosa superior, que contiene ARN, y en dos capas inferiores, donde se encuentran ADN y proteínas. Posteriormente, se pasó el sobrenadante de cada muestra a nuevos tubos, adicionando el mismo volumen de sobrenadante retirado que de isopropanol, el cual permite la precipitación del ARN, formando un pellet en el fondo. Además, se añadieron 2 µL de glucógeno (4 mg/mL), que mejora la precipitación y la visibilidad del pellet. Una vez el RNA precipitó (1 hora, -80 °C), el líquido fue retirado y el pellet se lavó con 500 µL de EtOH 70 % para eliminar los componentes solubles en este compuesto. Después de retirar el etanol, se hidrató el pellet con 30 µL de agua DEPC, libre de ARNasas, y se guardaron las muestras a -80 °C hasta la purificación del ARN al día siguiente.

La purificación del ARN comienza con eliminar los posibles restos de ADN que puedan permanecer en las muestras, lo cual se consigue al adicionar 5 µL de *Buffer* 10X y 1 µL de DNasa I. A continuación, se añadió un volumen 1:1 (36 µL) de fenol-cloroformo, cuya función es separar la solución en fases, donde el sobrenadante contiene el ARN. El sobrenadante de cada muestra se pasó a tubos nuevos, mezclándolo con EtOH 100 % para que precipite, y con acetato de sodio (NaAc), el cual permite concentrar el ARN de la solución. El pellet formado por la precipitación del ARN fue lavado con EtOH 70 % para ser hidratado posteriormente con agua DEPC.

El ARN obtenido se cuantificó mediante el espectrofotómetro *NanoDrop*[®] 2000 de *ThermoFisher*, obteniendo los resultados de la Tabla 1. Las muestras fueron conservadas hasta su utilización a -80 °C.

Tabla 1. Resultados del *NanoDrop*[®]

Sin inyectar	1	786,8 ng/µL
	2	474,85 ng/µL
	3	669,65 ng/µL
	4	639,15 ng/µL
MO <i>trip12</i>	1	571,25 ng/µL
	2	539,15 ng/µL
	3	875,6 ng/µL
	4	461,65 ng/µL

El ADN complementario (ADNc) se obtuvo con el kit *HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit* (*Vazyme*). De cada una de las muestras de ARN se pasaron 800 ng a tubos de PCR, y se añadió

1 µL de hexámeros y hasta 8 µL de agua, para después incubar las muestras a 65 °C durante 5 minutos. A continuación, se adicionaron 10 µL de 2xRT Mix y 2 µL de HiScript II Enzyme Mix a cada mezcla. El 2xRT Mix contiene dNTPs y una solución tampón, mientras que HiScript II Enzyme Mix contiene la transcriptasa reversa y un inhibidor de RNAsas. Los tubos se introdujeron en el termociclador *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* en las siguientes condiciones: 25 °C durante 5 minutos, 50 °C durante 45 minutos, y 85°C durante 5 minutos. Una vez terminada la reacción de retrotranscripción, las muestras se diluyeron en agua hasta una concentración final de 10 ng/µL y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

3.5. Validación de genes *housekeeping* y del bloqueo transitorio efectivo mediante qPCR

Para analizar la variación en la expresión de determinados genes potencialmente relacionados con *trip12* mediante qPCR, se requiere el uso de un gen que se exprese de forma ubicua, conocido como gen normalizador (*housekeeping*), para poder cuantificar la expresión relativa de los genes a analizar. Con el fin de asegurar la elección de un gen *housekeeping* fiable, se decidió evaluar y comparar la estabilidad de la expresión de dos genes comúnmente empleados como normalizadores, β -actin y *eef1a* (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha*), empleando a mayores como controles, dos genes implicados en rutas de colesterol, *srebfl* (*sterol regulatory element binding transcription factor 1*) y *nr1h3* (*nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3*), en principio sin relación con *trip12*.

Dado que el bloqueo transitorio de *trip12* se realizó con MOs que bloquean la traducción, pero no la transcripción, la efectividad del bloqueo no puede confirmarse mediante el análisis de su variación en la expresión génica. Asimismo, tampoco se pudo determinar la variación en los niveles de proteína mediante *western blot* debido a la no disponibilidad de anticuerpo de pez cebra. Así, tras una búsqueda extensa en la literatura, se seleccionó el gen *ptfla* (*pancreas associated transcription factor 1a*) para verificar la efectividad del bloqueo, ya que se ha demostrado un incremento significativo en la expresión de dicho gen cuando *trip12* se encuentra bloqueado [71]. Los *primers* utilizados se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2. *Primers* de los genes.

<i>β-actin</i>	<i>Primer forward</i>	5'- TGAAATTGCCGCACTGGTTG -3'
	<i>Primer reverse</i>	5'- TACCAACCATGACACCCTGATG -3'
<i>eef1a</i>	<i>Primer forward</i>	5'- CCGCTAGCATTACCCTCC -3'
	<i>Primer reverse</i>	5'- CTTCTCAGGCTGACTGTCC -3'
<i>srebfl</i>	<i>Primer forward</i>	5'- CTCTGGGTCACCGCTTCTTT -3'
	<i>Primer reverse</i>	5'- CAGATGCTCACGAAACCCT -3'
<i>nr1h3</i>	<i>Primer forward</i>	5'- GCTCGTACCTCTACAGTGGC -3'
	<i>Primer reverse</i>	5'- GGCCATGGAGTGACTTTGGG -3'
<i>ptfla</i>	<i>Primer forward</i>	5'- CCACACAGTGACGCGTAAA -3'
	<i>Primer reverse</i>	5'- AGAGAGTGCCTGCGAGAGG -3'

Para la reacción de qPCR se utilizó el kit *AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme)* y el programa informático *MxPro 4.1.0* del ordenador conectado al aparato de qPCR *Stratagene Mx3005P (Agilent)*. Para cada una de las reacciones se utilizaron 10 μL de Master Mix, 0,4 μL de primer forward 10 μM , 0,4 μL de primer reverse 10 μM , 7,2 μL de agua y 2 μL de ADNc (20 ng), para obtener un volumen final de 20 μL . Con el fin de eliminar cualquier burbuja que pudiese quedar en las reacciones, la placa se sometió a un centrifugado de 1200 revoluciones por minuto (rpm) durante 3 minutos y posteriormente se selló con un precinto térmico de poliéster (Cmb-bioline). Finalmente, la reacción de qPCR se lleva a cabo según los siguientes pasos: 5 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C y 30 segundos a 60 °C y finalmente, un paso de 15 segundos a 95 °C, otro de 60 segundos a 65 °C y 15 segundos a 95 °C.

Los datos obtenidos se convirtieron a formato Excel, realizando el análisis de la expresión relativa de los genes mediante el método *Doble Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$)*, y calculando posteriormente la significación estadística con la prueba *T* de *Student* en el programa *R version 4.1.0* [72].

3.6. Análisis de imagen y caracterización fenotípica

Las fotografías de los embriones a las 48 hpf fueron realizadas con el microscopio óptico *AZI00 Multizoom* conectado a la cámara *DS-R1* de *Nikon*, y analizadas mediante el programa *Nis-Elements BR Ver4.13.04 64bit edition*. Se decidió tomar cuatro medidas diferentes de cada embrión: la longitud del cuerpo, el diámetro de la cabeza, la distancia del centro del otolito a la base del ojo, y el área del ojo.

Los datos obtenidos se convirtieron a formato Excel y se analizaron mediante el programa estadístico *R version 4.1.0* [72], obteniendo la media, la desviación estándar, el mínimo y el máximo de cada parámetro. Además, se realizaron comparaciones dos a dos entre los parámetros de cada grupo mediante la prueba *T* de *Student*. Se consideraron significativas las diferencias con p-valor inferior a 0,05.

3.7. Análisis de locomoción

El análisis de locomoción general de los individuos seleccionados, 32 de cada grupo, se realizó a las 48 hpf y a los 5 dpf mediante el aparato *Zebrabox* y el software *Zebralab* de *Viewpoint Life Sciences*, permitiendo un rastreo automatizado de los movimientos de las larvas. La locomoción fue medida durante 60 minutos, con tres ciclos intermitentes de luz y oscuridad, cada uno de ellos de 10 minutos.

Los datos obtenidos se convirtieron a formato Excel y se analizaron mediante el programa estadístico *R version 4.1.0* [72], realizando comparaciones dos a dos entre los parámetros de cada grupo mediante el test de *Mann-Whitney-Wilcoxon* y considerando significativas las diferencias con un p-valor inferior a 0,05.

3.8. Caracterización genotípica de adultos de la generación F2 de una línea mutante de *trip12* generada mediante el sistema CRISPR/Cas9

En trabajos previos del laboratorio se generó una línea mutante de *trip12* mediante el sistema CRISPR/Cas9. Para ello, y de forma resumida, se llevó a cabo el diseño y síntesis de dos ARNsg dirigidos al exón 1 del gen. A continuación, y de forma análoga a lo expuesto en el apartado 3.3, se inyectó una mezcla de 1-2 nL de los ARNsg y la proteína Cas9. Para un primer cribado de posibles mutantes en la generación F0, se extrajo el ADN de un número reducido de individuos a las 48 hpf, se amplificó mediante PCR (de forma análoga a lo expuesto de forma detallada en siguientes apartados) y las muestras se comprobaron en un gel de acrilamida para examinar la existencia de heterodúplex, lo que indica la existencia de *indels* en dichos individuos. Una vez comprobada la ocurrencia de mutaciones, los individuos de la F0 se criaron para su posterior caracterización en la edad adulta (se repiten los pasos mencionados). Para comprobar la afectación de la línea germinal y la transmisión a la descendencia, se establecieron cruces entre los individuos mutantes de la F0 e individuos salvajes. Para la caracterización de las mutaciones y la determinación de la secuencia genómica afectada, se llevó a cabo secuenciación Sanger de los embriones de la generación F1. Así, se detectaron dos mutaciones diferentes: una delección de 11 pares de bases (pb) y una delección de 2 pb. Los individuos heterocigotos para cada una de las dos mutaciones se cruzaron entre sí para así obtener y criar la generación F2, con la cual se realizaron los experimentos descritos en el presente trabajo.

Extracción de ADN de adultos de la generación F2

Para extraer ADN de peces adultos se precalentó la resina quelante Chelex® (10 %) a 60 °C, dispensando después 125 µL en tubos de PCR debidamente rotulados. A continuación, se anestesió al adulto con triclaína 4 mg/mL (0,02 %) para cortarle una pequeña porción de la aleta caudal con un bisturí e introducirla en el tubo correspondiente. El mismo procedimiento se siguió con el resto de adultos, limpiando el bisturí y las pinzas empleadas con etanol entre cada individuo. Posteriormente, las muestras se introdujeron en el termociclador *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* a 99 °C durante 15 minutos. Finalmente, se añadieron 3,8 µL de proteinasa K (20 mg/mL) a cada muestra, las cuales se introdujeron en el termociclador con el siguiente programa: 56 °C durante 1 hora, y 100 °C durante 15 minutos.

Amplificación del ADN extraído mediante PCR y comprobación en gel de agarosa

El ADN extraído fue amplificado mediante PCR empleando para ello *primers* específicos previamente diseñados y utilizados en pasos anteriores de caracterización genotípica, cuyo tamaño de amplificación son 176 pb. La secuencia es la que sigue:

Primer Forward: 5´- GTGTCTAGAGAGGGTATGTCCC -3´

Primer Reverse: 5'- CTGCTGCACAAACGGAAGT -3'

Asimismo, se utilizaron los reactivos que se muestran en la Tabla 3 para obtener un volumen de 15 μL por muestra, y el termociclador *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* con el siguiente programa: 95 °C durante 10 minutos, 94 °C durante 45 segundos, 60 °C durante 50 segundos y 35 ciclos, 72 °C durante 50 segundos, 72 °C durante 10 minutos, y 4 °C ∞ .

Tabla 3. Reactivos usados en la PCR

Agua	8,6 μL	<i>Primer forward</i> (10 μM)	1 μL
<i>Buffer</i> 10X	1,5 μL	<i>Primer reverse</i> (10 μM)	1 μL
MgCl ₂ (25 mM)	1,05 μL	Taq polimerasa (5 U/ μL)	0,1 μL
dNTPs (2 mM)	0,75 μL	ADN	1 μL

La amplificación fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, que se preparó con 0,35 g de agarosa, 35 mL de buffer TAE 0,5 % y 1,8 μL de *Syber Safe*. Como marcador de peso molecular se mezclaron 3 μL de agua con 1 μL de azul de bromofenol 6X y 1 μL de *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* de *ThermoFisher*. Por otro lado, se mezclaron 5 μL de cada muestra de ADN con 0,5 μL de azul de bromofenol 6X. Una vez cargadas en los pocillos, las muestras se hicieron correr a 100 V, para después visualizar el resultado mediante el programa informático *Kodak Digital Science 1D*.

Análisis de fragmentos de la F2 de CRISPR/Cas9

La presencia de dos alelos distintos en individuos heterocigotos de la F2 hace que la secuenciación Sanger no sea posible, ya que se generan electroferogramas de difícil interpretación. Por ello, y como las mutaciones habían sido previamente caracterizadas, se utilizó el análisis de fragmentos como estrategia sencilla para el genotipado de los individuos. Esta técnica permite determinar el tamaño de las secuencias de ADN presentes en una muestra mediante comparación con un estándar de tamaño, lo que es posible ya que en la PCR se incorpora un *primer forward* con el marcaje fluorescente 6-formamida (6-FAM, señal máxima emitida a 522 nm). Se utilizó una placa de 96 pocillos, en cada uno de los cuales se dispensaron 0,5 μL de producto de PCR y 9 μL de una solución preparada a partir de FAM (897 μL) y el estándar de tamaño *GeneScan 500 LIZ dye* (23 μL). A continuación, la placa se selló con una septa y fue sometida a un paso de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos. La placa se introdujo en el aparato *3730xl DNA Analyzer* de 96 capilares (*Applied Biosystems*TM), que permite separar los fragmentos en función de su tamaño. Tras la separación, un haz láser se encarga de excitar los fluoróforos acoplados a los fragmentos, que emiten una señal y se almacenan digitalmente para su posterior análisis mediante el programa informático *GeneMapper*.

3.9. Obtención de embriones de la generación F3 y caracterización genotípica y fenotípica

Una vez determinada la existencia de adultos mutantes en la F2, se establecieron cruces de los mismos para la obtención de embriones, de forma análoga a lo expuesto en el apartado 3.1. A las 48 hpf los embriones fueron fotografiados y se realizó la caracterización fenotípica de igual forma a como se explica para los morfantes. Una vez fotografiados, se incluyeron en la resina quelante Chelex® para la extracción de ADN. Los pasos que se siguieron para la obtención del ADN, amplificación por PCR, comprobación en gel de agarosa y análisis de fragmentos se corresponden con lo anteriormente expuesto para los individuos adultos.

4. Resultados y discusión

De aquí en adelante, cada grupo se denominará de la siguiente manera: los MOs bloqueo serán 'MoB' y los controles sin inyectar serán 'NoIny'.

4.1. Validación de genes *housekeeping* y del bloqueo transitorio efectivo mediante qPCR

El resultado de los análisis de qPCR para la β -actin fue muy similar al ofrecido por *eef1a*. Al tener la misma expresión tanto en individuos *wild type* como en morfantes, y al ser el gen más estandarizado como *housekeeping* en pez cebra, se decidió continuar los experimentos empleando la β -actin como gen normalizador. Asimismo, no se observan diferencias estadísticamente significativas en los genes utilizados como control. Como era de esperar, la expresión de *ptf1a* se ve significativamente aumentada en los embriones MoB, al ser comparada con los controles NoIny ($p = 0,039$). La Figura 9 representa los resultados de la qPCR.

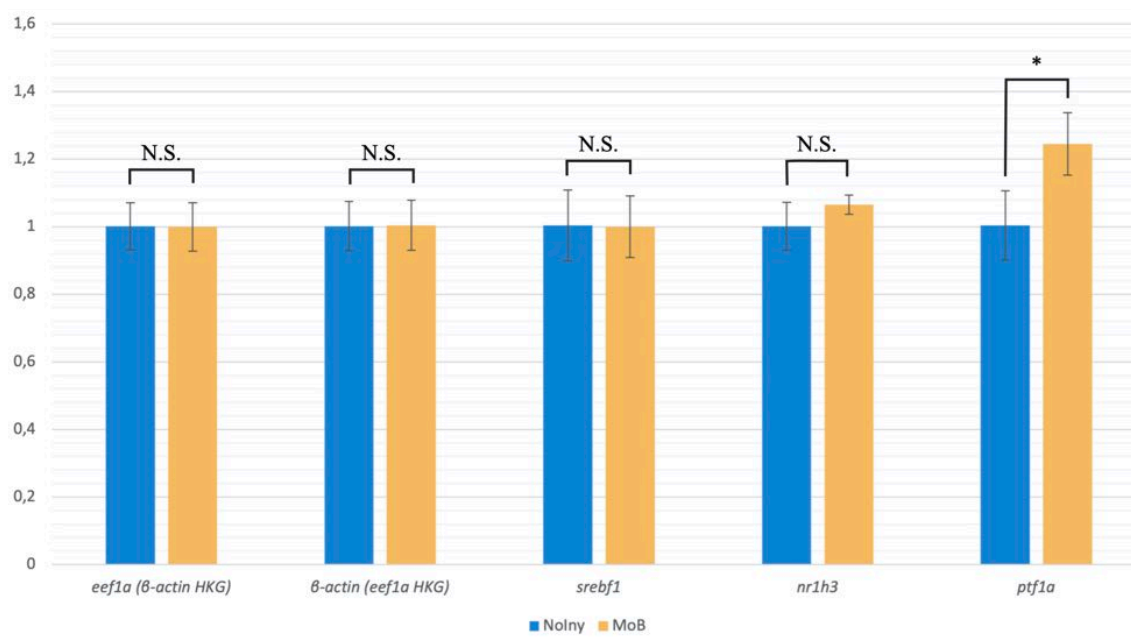


Figura 9. Resultados de la qPCR. Se representa la expresión de *eef1a* empleando la β -actin como *housekeeping* (HKG), la expresión de β -actin empleando *eef1a* como *housekeeping*, y la expresión de *srebf1*, *nr1h3* y *ptf1a* con la β -actin como *housekeeping*. Los MOs bloqueo figuran como 'MoB', mientras que 'NoIny' corresponde a los controles sin inyectar. N.S., no significativo. *, $p < 0,05$.

4.2. Caracterización y análisis fenotípico de morfantes

Las medidas realizadas sobre las fotografías de los embriones a 48 hpf fueron comparadas entre sí para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas.

4.2.1. Longitud del cuerpo

La longitud del cuerpo de cada embrión fue medida desde la parte anterior de la cabeza, atravesando el centro del ojo, hasta el límite posterior del cuerpo, sin incluir la aleta caudal (Figura 10). El análisis estadístico revela un p-valor mucho menor al nivel de significación establecido (0,05), por lo que la longitud media del cuerpo de los embriones MoB es significativamente mayor a la de los controles NoIny. La media, la desviación estándar, el valor mínimo y el máximo de cada variable se exponen en la Tabla 4, representándose los datos en la Figura 11.

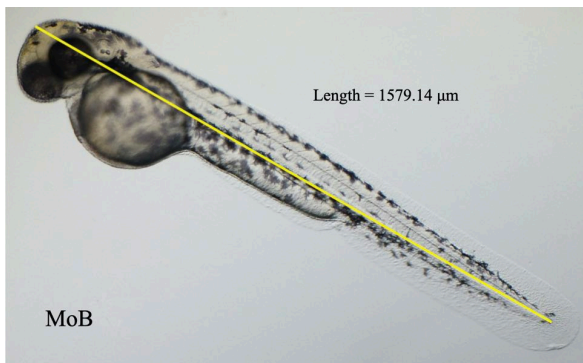


Figura 10. Medida de la longitud del cuerpo.

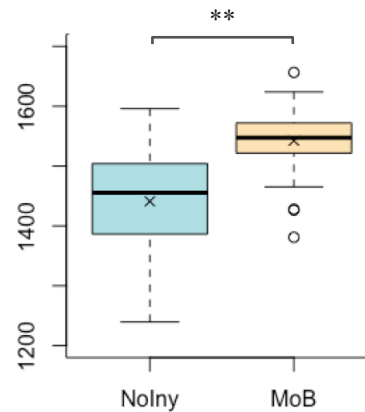


Figura 11. Representación de las medidas de longitud del cuerpo de ambas variables. **, $p < 0,001$.

Tabla 4. Media, desviación estándar y valores mínimos y máximos para la longitud del cuerpo.

	Media (μm)	Desviación estándar	Mínimo (μm)	Máximo (μm)
NoIny	1441,089	80,61804	1239,661	1595,953
MoB	1542,581	42,48328	1381,084	1656,548

La información fenotípica de pacientes con variantes de *TRIP12* recogida por Donoghue et al. (2020) [46] indica una estatura baja en el 17 % de los casos reportados, contrastando de este modo con el aumento de longitud del cuerpo que experimentaron los peces morfantes.

4.2.2. Diámetro de la cabeza

El diámetro de la cabeza fue medido como en la Figura 12. El resultado del análisis estadístico arroja un p-valor menor al nivel de significación establecido, por lo que los valores medios del diámetro de la cabeza de los embriones MoB son significativamente mayores a los de los controles NoIny. La media, la desviación estándar, el valor mínimo y el máximo de cada variable se muestran en la Tabla 5, representándose los datos en la Figura 13.

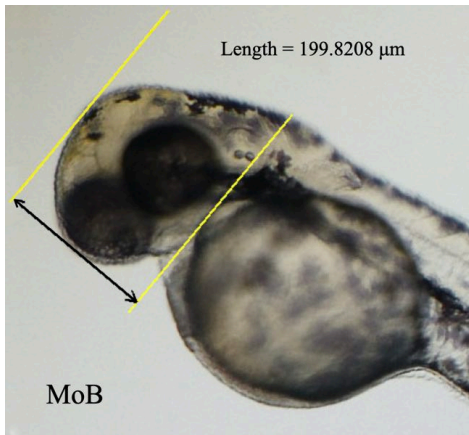


Figura 12. Medida del diámetro de la cabeza.

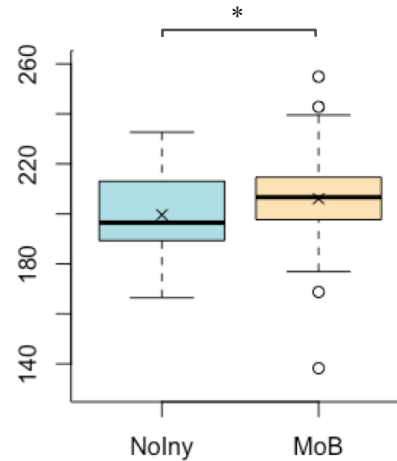


Figura 13. Representación de las medidas del diámetro de la cabeza de ambas variables.
*, $p < 0,05$.

Tabla 5. Media, desviación estándar y valores mínimos y máximos para el diámetro de la cabeza.

	Media (μm)	Desviación estándar	Mínimo (μm)	Máximo (μm)
NoIny	199,623	16,00674	166,4548	232,691
MoB	206,0399	15,12618	138,2746	254,9082

La información fenotípica de pacientes con variantes de *TRIP12* recogida por Donoghue et al. (2020) [46] destaca la presencia de anomalías craneales en el 13 % de los casos reportados, incluyendo macrocefalia. Asimismo, Kondo et al. (2020) [48] también reporta la presencia de macrocefalia en su estudio de una delección que abarca *TRIP12*. Estos resultados concuerdan con el aumento del diámetro de la cabeza experimentado por los embriones morfantes.

4.2.3. Distancia del otolito al ojo

La distancia del otolito al ojo se determinó trazando una línea desde el centro del otolito hacia la base del ojo ipsilateral (Figura 14). El p-valor resultante del análisis estadístico es inferior al nivel de significación establecido, de modo que los valores medios de la distancia del otolito al ojo son significativamente mayores en los embriones MoB que los de los controles NoIny. La media, la desviación estándar, el valor mínimo y el máximo de cada variable se exponen en la Tabla 6, representándose los datos en la Figura 15.

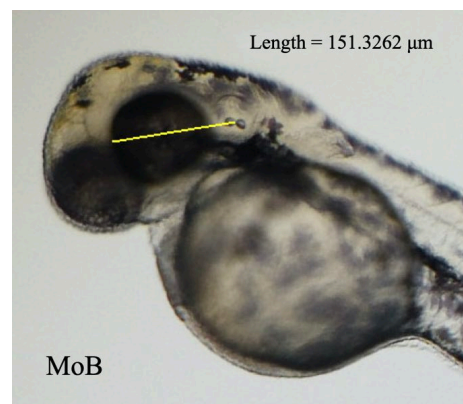


Figura 14. Medida de la distancia del otolito al ojo.

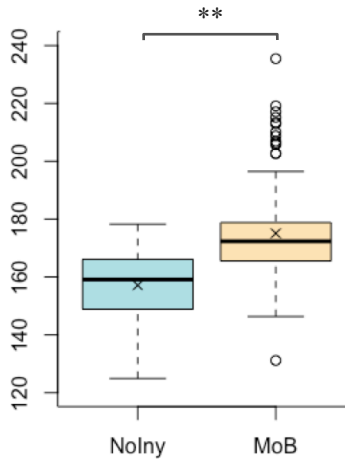


Tabla 6. Media, desviación estándar y valores mínimos y máximos para la distancia del otolito al ojo.

	NoIny	MoB
Media (μm)	157,133	175,082
Desviación estándar	11,73133	16,79095
Mínimo (μm)	124,9014	131,1458
Máximo (μm)	178,2468	235,4648

Figura 15. Representación de las medidas de la distancia del otolito al ojo de ambas variables. **, $p < 0,001$.

El aumento de la distancia del otolito al ojo en individuos morfantes corrobora el aumento del diámetro de la cabeza, reafirmando de este modo la presencia de macrocefalia.

4.2.4. Área del ojo

El área del ojo fue medida trazando una circunferencia que lo delimita (Figura 16). El resultado del análisis estadístico revela la presencia de un área significativamente mayor en los embriones MoB que en los de los controles NoIny, dado que el p-valor es mucho menor al nivel de significación establecido. La media, la desviación estándar, el valor mínimo y el máximo de cada variable se muestran en la Tabla 7, representándose los datos en la Figura 17.

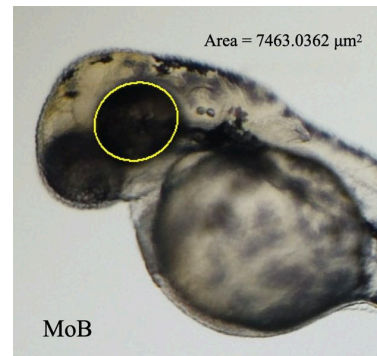


Figura 16 Medida del área del ojo.

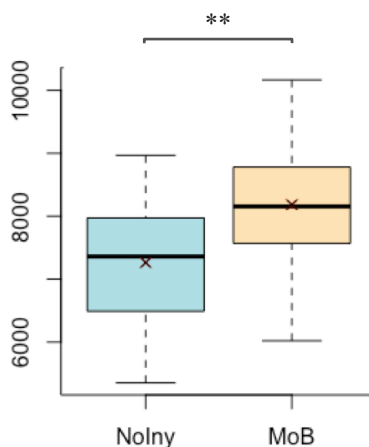


Tabla 7. Media, desviación estándar y valores mínimos y máximos para para el área del ojo.

	NoIny	MoB
Media (μm^2)	7262,57	8181,935
Desviación estándar	903,786	942,2469
Mínimo (μm^2)	5352,322	6019,856
Máximo (μm^2)	8966,704	10165,63

Figura 17. Representación de las medidas del área del ojo de ambas variables. **, $p < 0,001$.

Hasta la fecha, se han reportado anomalías oculares en pacientes con variantes de *TRIP12* [46], pero el área del ojo no ha sido medida. Dadas las diferencias observadas en los peces morfantes, se deberán hacer estudios posteriores para comprender la relación entre la macrocefalia y el aumento del área del ojo.

4.3. Análisis de locomoción

El resultado del análisis de locomoción a las 48 hpf, aunque sí muestra cierta tendencia, no muestra resultados significativos, probablemente debido a la escasa movilidad de los embriones en tal momento del desarrollo.

Las diferencias entre los datos de las larvas MoB y los controles NoIny obtenidos del análisis de locomoción a los 5 dpf fueron significativos (p -valor $< 0,05$) tanto en el caso del experimento en luz, como en oscuridad. De esta forma, se confirma que, a los 5 dpf, las larvas morfantes de *trip12* presentan una locomoción disminuida con respecto a las larvas sin inyectar. Estos resultados prometedores supondrán que en estudios futuros se profundice más en el análisis de locomoción y comportamiento.

Los datos obtenidos para ambos grupos se representan en condiciones de luz (Figura 18.a) y oscuridad (Figura 18.b).

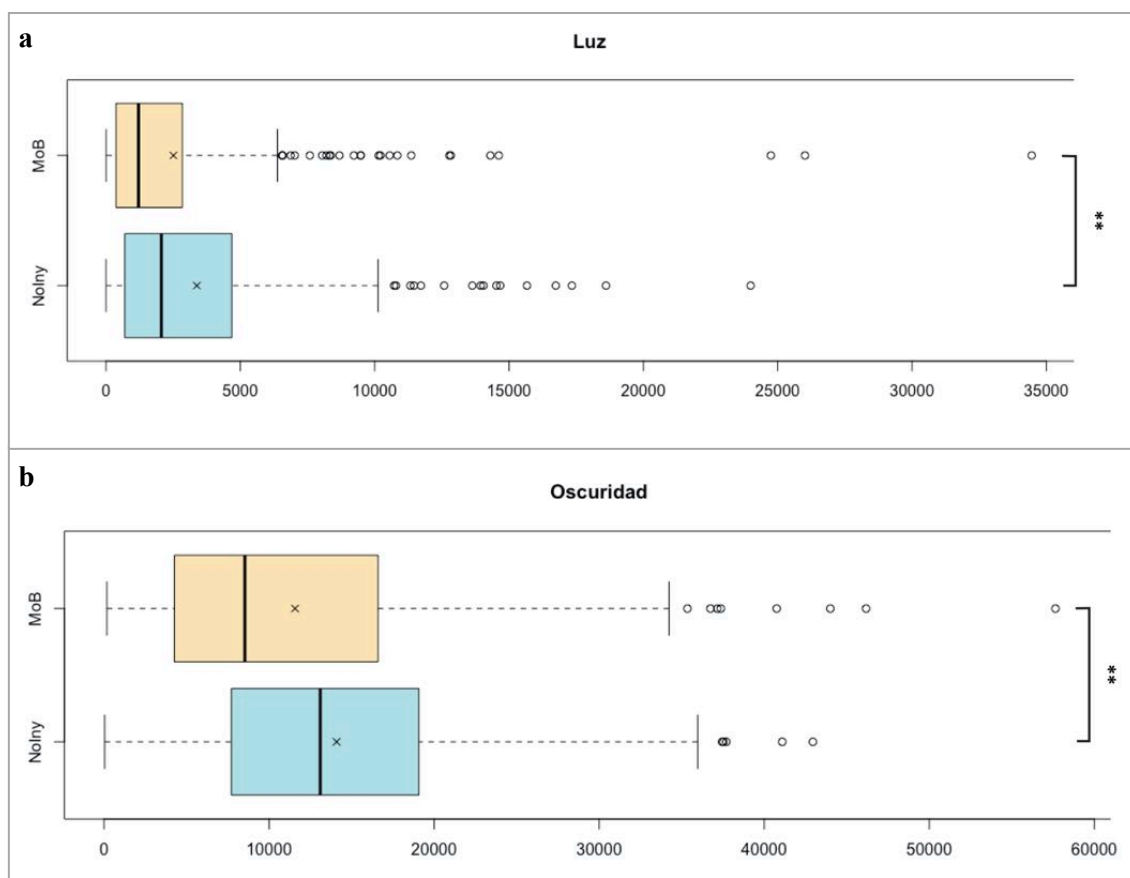


Figura 18. Representación de los valores de locomoción de las larvas MoB y los controles NoIny. (a) En condiciones de luz. (b) En condiciones de oscuridad. **, $p < 0,001$.

La información fenotípica de pacientes con variantes de *TRIP12* recogida por Donoghue et al. (2020) [46] indica la presencia de retraso en el desarrollo motor en el 33 % de los casos reportados, pudiendo presentar además hipotonía muscular [45]. Esto concuerda con la disminución de la locomoción en peces morfantes, confirmando que el desarrollo motor se ve afectado.

4.4. Caracterización genotípica de adultos la generación F2 de una línea mutante de *trip12* generada mediante el sistema CRISPR/Cas9

La electroforesis en gel de agarosa tras la extracción de ADN y la amplificación por PCR, confirmó la correcta amplificación de los fragmentos generados en la PCR, además de permitir una primera distinción entre individuos homocigotos y heterocigotos para la delección de 11 pb (Figura 19.a), aunque no para la delección de 2 pb dado su escaso tamaño (Figura 19.b).

Los resultados del análisis de fragmentos de los individuos 1-23 revelaron la presencia de 9 individuos con un único pico a 176 pb (homocigotos *wild type*), 13 individuos con un pico a 176 pb y otro a 165 pb (heterocigotos), y 1 individuo con un único pico a 165 pb (homocigoto mutante). Por otro lado, entre los individuos 24-46 se revelaron 12 individuos con un único pico a 176 pb (homocigotos *wild type*), y 11 individuos con un pico a 176 pb y otro a 174 pb (heterocigotos).

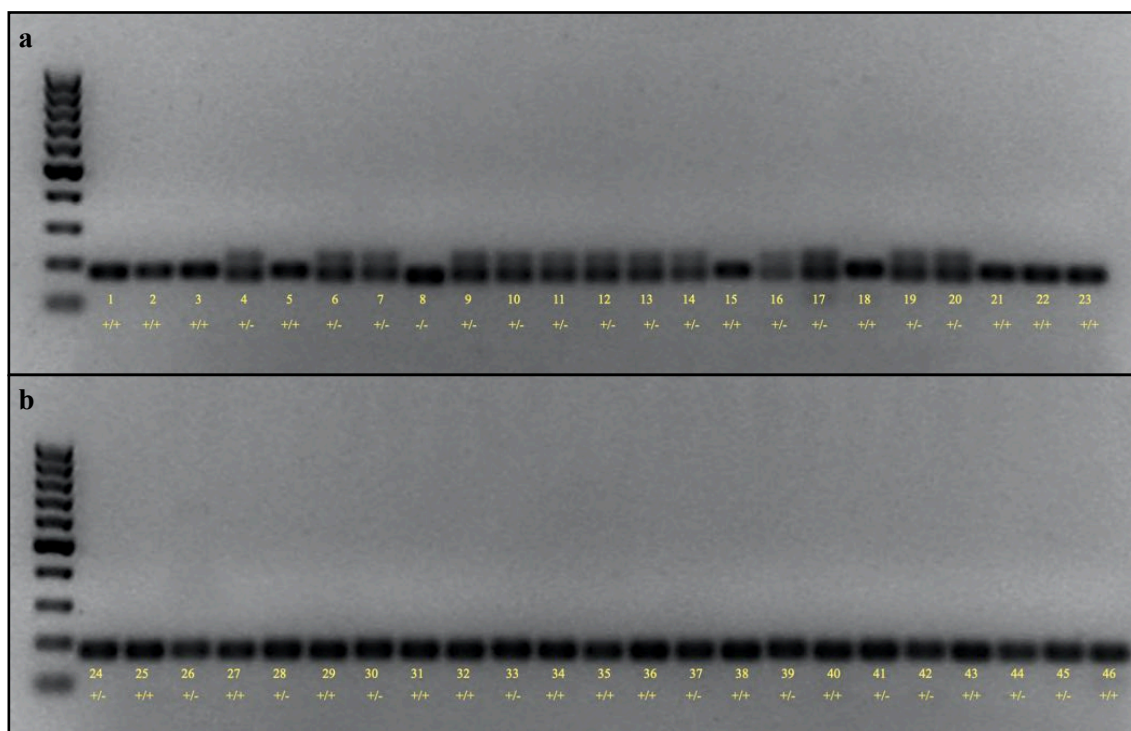


Figura 19. (a) Revelado del gel de agarosa para la mutación de 11 pb. El análisis de fragmentos distingue tres tipos de individuos: homocigotos *wild type* (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos mutantes (-/-). **(b)** Revelado del gel de agarosa para la mutación de 2 pb. El análisis de fragmentos manifiesta dos tipos de individuos: homocigotos *wild type* (+/+) y heterocigotos (+/-).

La ausencia de individuos homocigotos mutantes adultos concuerda con los resultados obtenidos por Kajiro et al. (2011) [73] en su estudio de *Trip12* sobre ratones, demostrando así que la actividad de este gen es también esencial en la embriogénesis del pez cebra, además de confirmar que el *knockout* del gen se ha realizado correctamente. Por otro lado, se deberán investigar los posibles mecanismos que hayan facilitado la supervivencia hasta la edad adulta del único homocigoto mutante para la delección de 11 pb.

4.5. Obtención de embriones de la generación F3 y caracterización genotípica y fenotípica

Debido a la fácil distinción entre individuos homocigotos y heterocigotos para la delección de 11 pb en gel de agarosa, se decide continuar los experimentos con estos individuos.

4.5.1. Caracterización genotípica de la generación F3

Una vez se extrajo y amplificó el ADN de los embriones, se realizó electroforesis en gel de agarosa de varios individuos, confirmando que la amplificación fue adecuada (Figura 20).

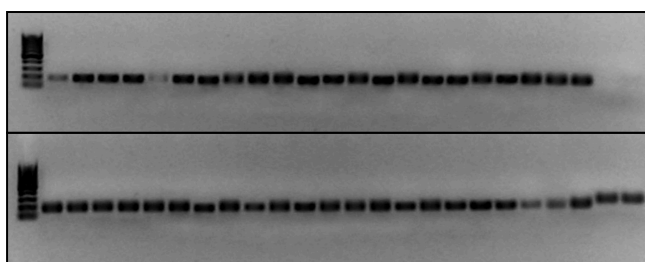


Figura 20. Revelado del gel de agarosa de individuos de la F3.

El análisis de fragmentos reveló la presencia de 51 individuos con un único pico a 176 pb (homocigotos *wild type*), 84 individuos con un pico a 176 pb y otro a 165 pb (heterocigotos), y 41 individuos con un único pico a 165 pb (homocigotos mutantes) ofreciendo unas proporciones (29 %, 48 % y 23 %, respectivamente) semejantes a las esperadas (25 %, 50 % y 25 %, respectivamente). Estos resultados indican que, al igual que en el estudio de Kajiro et al. (2011) [73] los individuos homocigotos mutantes sobreviven hasta cierta etapa del desarrollo. En estudios posteriores se deberá evaluar hasta qué etapa del desarrollo de pez cebra perdura la supervivencia de homocigotos mutantes de *trip12*.

4.5.2. Caracterización fenotípica de la generación F3

Los embriones fotografiados a las 48 hpf fueron medidos, comparando los resultados obtenidos entre sí para detectar posibles diferencias estadísticamente significativas. Los embriones homocigotos mutantes se denominarán $-/-$, mientras que los heterocigotos serán $+/-$ y los

homocigotos *wild type* '+/+'. Todas las medidas se realizaron conforme a lo expuesto en el apartado 4.2.

Longitud del cuerpo

La media, la desviación estándar, el valor mínimo y el máximo de cada variable se exponen en la Tabla 8, representándose los datos en la Figura 21. El resultado del análisis estadístico revela diferencias significativas tanto en heterocigotos como en homocigotos, que presentan una mayor longitud del cuerpo respecto a individuos *wild type*. Además, no existen diferencias significativas entre la longitud corporal de heterocigotos y homocigotos.

Tabla 8. Media, desviación estándar y valores mínimos y máximos para la longitud del cuerpo.

	Media (µm)	Desviación estándar	Mínimo (µm)	Máximo (µm)
-/-	1507,522	78,66207	1321,24	1657,781
+/-	1503,078	70,43266	1346,365	1681,646
+/+	1441,089	80,61804	1239,661	1595,953

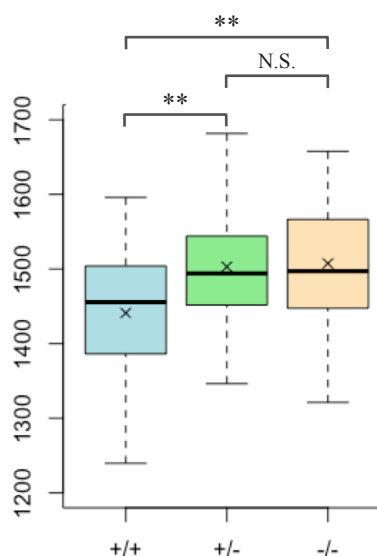


Figura 21. Representación de las medidas de longitud del cuerpo. N.S., no significativo. **, $p < 0,001$.

Diámetro de la cabeza

La media, la desviación estándar, el valor mínimo y el máximo de cada variable se muestran en la Tabla 9, representándose los datos en la Figura 22.

El análisis estadístico no revela diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos. Es probable que este fenotipo, más leve del esperado, se deba a contribución materna, al igual que propone Tseng et al. (2021) [74] en su estudio en pez cebra con otro gen. De este modo, la poca

proteína trip12 que pudiese existir en los individuos mutantes se usaría en el desarrollo de la cabeza, al tener más importancia que el resto de medidas evaluadas.

Tabla 9. Media, desviación estándar y valores mínimos y máximos para el diámetro de la cabeza.

	Media (µm)	Desviación estándar	Mínimo (µm)	Máximo (µm)
-/-	195,0772	18,99663	151,9426	235,0494
+/-	198,0016	13,19406	164,5252	225,0128
+/+	199,623	16,00674	166,4548	232,691

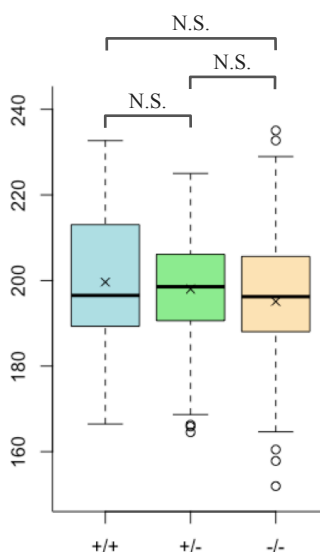


Figura 22. Representación de las medidas del diámetro de la cabeza. N.S., no significativo.

Distancia del otolito al ojo

La media, la desviación estándar, el valor mínimo y el máximo de cada variable se exponen en la Tabla 10, representándose los datos en la Figura 23. El resultado del análisis estadístico indica diferencias significativas entre individuos heterocigotos y homocigotos respecto a los *wild type*, presentando éstos últimos menor distancia entre el otolito y el ojo. La diferencia entre individuos heterocigotos y homocigotos no es significativa.

Tabla 10. Media, desviación estándar y valores mínimos y máximos para la distancia del otolito al ojo.

	Media (µm)	Desviación estándar	Mínimo (µm)	Máximo (µm)
-/-	177,3951	17,13354	140,5258	225,7632
+/-	179,2963	13,69978	136,8676	217,8438
+/+	157,133	11,73133	124,9014	178,2468

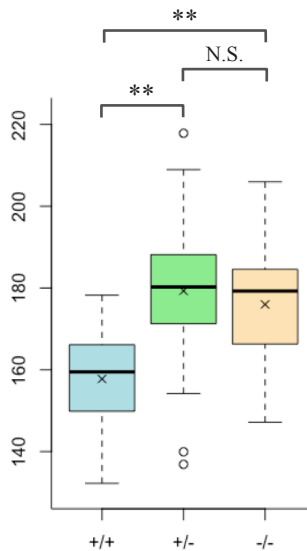


Figura 23. Representación de las medidas del otolito al ojo. N.S., no significativo. **, $p < 0,001$.

Área del ojo

La media, la desviación estándar, el valor mínimo y el máximo de cada variable se muestran en la Tabla 11, representándose los datos junto al p-valor en la Figura 24. El resultado del análisis estadístico revela diferencias significativas entre individuos heterocigotos y homocigotos respecto a los *wild type*, presentando éstos últimos menor área del ojo. La diferencia entre individuos heterocigotos y homocigotos no es significativa.

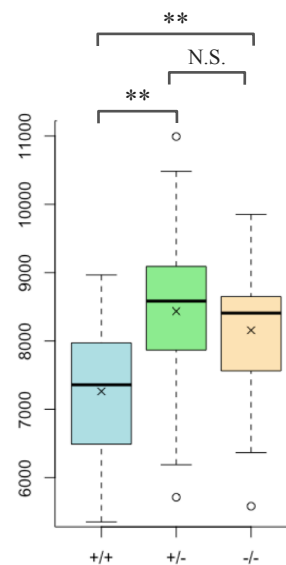


Figura 24. Representación de las medidas del área del ojo. N.S., no significativo. **, $p < 0,001$.

Tabla 11. Media, desviación estándar y valores mínimos y máximos para el área del ojo.

	Media (μm^2)	Desviación estándar	Mínimo (μm^2)	Máximo (μm^2)
-/-	8261,285	1441,934	4605,258	12862,16
+/-	8389,621	1026,545	4613,928	10991,11
+/+	7262,57	903,786	5352,322	8966,704

5. Conclusiones

- I) El análisis fenotípico de los embriones morfantes revela un aumento estadísticamente significativo de la longitud del cuerpo, de la distancia entre el otolito y el ojo, del diámetro de la cabeza y del área del ojo respecto a los embriones sin inyectar.
- II) Se confirma la validez tanto de *β-actin* como de *eef1a* para analizar la expresión de genes relacionados con *trip12*. Asimismo, la expresión de *ptfla* se ve significativamente aumentada en los embriones morfantes, confirmando que el bloqueo transitorio se ha realizado correctamente, además de corroborar que al igual que en humanos, *trip12* y *ptfla* también interaccionan en pez cebra.
- III) El análisis de locomoción evidencia una disminución significativa del movimiento de las larvas morfantes a los 5 dpf, por lo que en estudios futuros se deberá analizar más en profundidad la locomoción de individuos con mutaciones en *trip12*.
- (IV) El genotipado de individuos de la línea mutante de *trip12* revela homocigotos mutantes a las 48 hpf en una proporción similar a la esperada (25 %), y ausencia en adultos. Esto sugiere que la actividad de *trip12* es esencial para la embriogénesis del pez cebra, por lo que en estudios posteriores se deberá determinar hasta qué etapa del desarrollo perdura la supervivencia de individuos homocigotos mutantes.
- (V) El análisis fenotípico de los embriones de la F3 respecto a individuos *wild type* revela un aumento significativo de las medidas de los caracteres fenotípicos previamente descritos, tanto en el caso de los homocigotos mutantes como en los heterocigotos, con la excepción del diámetro de la cabeza, para el cual las diferencias no son estadísticamente significativas, sugiriendo de este modo una posible contribución materna. En todos los casos, las diferencias entre individuos homocigotos y heterocigotos no son significativas.

6. Referencias

- [1] American Psychiatric Association (2014). *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-5 ®)* (5ª ed.). Editorial Médica Panamericana.
- [2] Morris-Rosendahl, D. J., & Crocq, M. A. (2020). Neurodevelopmental disorders-the history and future of a diagnostic concept. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(1), 65-72. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.1/macrocq>
- [3] Parenti, I., Rabaneda, L. G., Schoen, H., & Novarino, G. (2020). Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. *Trends in Neurosciences*, 43(8), 608-621. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.004>
- [4] Stessman, H. A. F., Xiong, B., Coe, B. P., Wang, T., Hoekzema, K., Fenckova, M., Kvarnung, M., Gerds, J., Trinh, S., Cosemans, N., Vives, L., Lin, J., Turner, T. N., Santen, G., Ruivenkamp, C., Kriek, M., van Haeringen, A., Aten, E., Friend, K., ... Eichler, E. E. (2017). Targeted sequencing identifies 91 neurodevelopmental-disorder risk genes with autism and developmental-disability biases. *Nature Genetics*, 49(4), 515-526. <https://doi.org/10.1038/ng.3792>
- [5] Quintela, I., Eirís, J., Gómez-Lado, C., Pérez-Gay, L., Dacruz, D., Cruz, R., Castro-Gago, M., Míguez, L., Carracedo, Á., & Barros, F. (2017). Copy number variation analysis of patients with intellectual disability from North-West Spain. *Gene*, 626, 189-199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.05.032>
- [6] Vengoechea, J., & Garcia, A. G. (2020). 16 - Intellectual and developmental disabilities. In S. U. Dhar, S. C. S. Nagamani, & T. N. Eble (Eds.), *Handbook of Clinical Adult Genetics and Genomics* (pp. 249-259). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817344-2.00016-2>
- [7] Ilyas, M., Mir, A., Efthymiou, S., & Houlden, H. (2020). The genetics of intellectual disability: advancing technology and gene editing [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, 9(22). <https://doi.org/10.12688/f1000research.16315.1>
- [8] van der Werf, I. M., Vandeweyer, G., & Kooy, R. F. (2020). Chapter 3 - A contemporary view on the molecular basis of neurodevelopmental disorders. In I. Gozes & J. Levine (Eds.), *Neuroprotection in Autism, Schizophrenia and Alzheimer's Disease* (pp. 57-78). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814037-6.00003-3>
- [9] des Portes, V. (2020). Chapter 9 - Intellectual disability. In A. Gallagher, C. Bulteau, D. Cohen, & J. L. Michaud (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 174, pp. 113-126). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64148-9.00009-0>

- [10] Lyall, K., Croen, L., Daniels, J., Fallin, M. D., Ladd-Acosta, C., Lee, B. K., Park, B. Y., Snyder, N. W., Schendel, D., Volk, H., Windham, G. C., & Newschaffer, C. (2017). The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annual Review of Public Health*, 38(1), 81-102. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031816-044318>
- [11] Pensado-López, A., Veiga-Rúa, S., Carracedo, Á., Allegue, C., & Sánchez, L. (2020). Experimental Models to Study Autism Spectrum Disorders: hiPSCs, Rodents and Zebrafish. *Genes (Basel)*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/genes11111376>
- [12] Adamou, M., Jones, S. L., & Wetherhill, S. (2021). Predicting diagnostic outcome in adult autism spectrum disorder using the autism diagnostic observation schedule, second edition. *BMC Psychiatry*, 21(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12888-020-03028-7>
- [13] Robert, C., Pasquier, L., Cohen, D., Fradin, M., Canitano, R., Damaj, L., Odent, S., & Tordjman, S. (2017). Role of Genetics in the Etiology of Autistic Spectrum Disorder: Towards a Hierarchical Diagnostic Strategy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030618>
- [14] Ornoy, A., Weinstein-Fudim, L., & Ergaz, Z. (2015). Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reproductive Toxicology*, 56, 155-169. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.05.007>
- [15] Saxena, R., Babadi, M., Namvarhaghighi, H., & Rouillet, F. I. (2020). Chapter Two - Role of environmental factors and epigenetics in autism spectrum disorders. In M. Ilieva & W. K.-W. Lau (Eds.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 173, pp. 35-60). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.05.002>
- [16] Shuid, A. N., Jayusman, P. A., Shuid, N., Ismail, J., Kamal Nor, N., & Mohamed, I. N. (2021). Association between Viral Infections and Risk of Autistic Disorder: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph18062817>
- [17] Taylor, M. J., Rosenqvist, M. A., Larsson, H., Gillberg, C., D'Onofrio, B. M., Lichtenstein, P., & Lundström, S. (2020). Etiology of Autism Spectrum Disorders and Autistic Traits Over Time. *JAMA Psychiatry*, 77(9), 936-943. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2020.0680>
- [18] McCammon, J. M., & Sive, H. (2015). Addressing the Genetics of Human Mental Health Disorders in Model Organisms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 16(1), 173-197. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090314-050048>
- [19] Parenti, I., Rabaneda, L. G., Schoen, H., & Novarino, G. (2020). Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. *Trends in Neurosciences*, 43(8), 608-621. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.004>

- [20] Stefanski, A., Calle-López, Y., Leu, C., Pérez-Palma, E., Pestana-Knight, E., & Lal, D. (2021). Clinical sequencing yield in epilepsy, autism spectrum disorder, and intellectual disability: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia*, 62(1), 143-151. <https://doi.org/10.1111/epi.16755>
- [21] Hu, C., Feng, P., Yang, Q., & Xiao, L. (2021). Clinical and Neurobiological Aspects of TAO Kinase Family in Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in molecular neuroscience*, 14, 655037. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.655037>
- [22] Sidhaye, J., & Knoblich, J. A. (2021). Brain organoids: an ensemble of bioassays to investigate human neurodevelopment and disease. *Cell Death & Differentiation*, 28(1), 52-67. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0566-4>
- [23] Barré-Sinoussi, F., & Montagutelli, X. (2015). Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Science OA*, 1(4). <https://doi.org/10.4155/fso.15.63>
- [24] van der Staay, F. J., Arndt, S. S., & Nordquist, R. E. (2009). Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behavioral and Brain Functions*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-5-11>
- [25] Bolker, J. A. (2019). Selection of Models: Evolution and the Choice of Species for Translational Research. *Brain, Behavior and Evolution*, 93(2-3), 82-91. <https://doi.org/10.1159/000500317>
- [26] Ibeh, B. (2018). Introductory Chapter: Animal Models for Human Diseases, a Major Contributor to Modern Medicine. In I. Bartholomew (Ed.), *Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy* (pp. 3-9). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70745>
- [27] Fardghassemi, Y., & Parker, J. A. (2021). Overexpression of FKH-2/FOXG1 is neuroprotective in a C. elegans model of Machado-Joseph disease. *Experimental Neurology*, 337, 113544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113544>
- [28] Gatto, C. L., & Broadie, K. (2011). Drosophila modeling of heritable neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(6), 834-841. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.04.009>
- [29] Moulin, T. C., Covill, L. E., Itskov, P. M., Williams, M. J., & Schiöth, H. B. (2021). Rodent and fly models in behavioral neuroscience: An evaluation of methodological advances, comparative research, and future perspectives. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 120, 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.11.014>
- [30] Meyers, J. R. (2018). Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 16(1), e19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cpet.19>

- [31] Hickman, D. L., Johnson, J., Vemulapalli, T. H., Crisler, J. R., & Shepherd, R. (2017). Chapter 7 - Commonly Used Animal Models. In M. A. Suckow, & K. L. Stewart (Eds.), *Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students* (pp. 117-175). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802151-4.00007-4>
- [32] Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 83(1), 13-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- [33] Meshalkina, D. A., Kysil, E. V., Warnick, J. E., Demin, K. A., & Kalueff, A. V. (2017). Adult zebrafish in CNS disease modeling: a tank that's half-full, not half-empty, and still filling. *Lab Anim (NY)*, 46(10), 378-387. <https://doi.org/10.1038/labani.1345>
- [34] Ge, W. (2018). Zebrafish. In M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)* (pp. 704-710). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20618-3>
- [35] Kalueff, A. V., Stewart, A. M., & Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(2), 63-75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
- [36] Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- [37] Howe, D. G., Bradford, Y. M., Eagle, A., Fashena, D., Frazer, K., Kalita, P., Mani, P., Martin, R., Moxon, S. T., Paddock, H., Pich, C., Ramachandran, S., Ruzicka, L., Schaper, K., Shao, X., Singer, A., Toro, S., Van Slyke, C., & Westerfield, M. (2017). The Zebrafish Model Organism Database: new support for human disease models, mutation details, gene expression phenotypes and searching. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D758-D768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1116>
- [38] Vaz, R., Hofmeister, W., & Lindstrand, A. (2019). Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders: Limitations and Benefits of Current Tools and Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061296>
- [39] de Abreu, M. S., Genario, R., Giacomini, Ana C. V. V., Demin, K. A., Lakstygala, A. M., Amstislavskaya, T. G., Fontana, B. D., Parker, M. O., & Kalueff, A. V. (2020). Zebrafish as a Model of Neurodevelopmental Disorders. *Neuroscience*, 445, 3-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.034>

- [40] Kozol, R. A. (2018). Prenatal Neuropathologies in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability: The Gestation of a Comprehensive Zebrafish Model. *Journal of Developmental Biology*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/jdb6040029>
- [41] Kozol, R. A., Abrams, A. J., James, D. M., Buglo, E., Yan, Q., & Dallman, J. E. (2016). Function Over Form: Modeling Groups of Inherited Neurological Conditions in Zebrafish. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(55). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00055>
- [42] Stewart, A. M., Ullmann, J. F., Norton, W. H., Parker, M. O., Brennan, C. H., Gerlai, R., & Kalueff, A. V. (2015). Molecular psychiatry of zebrafish. *Molecular Psychiatry*, 20(1), 2-17. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.128>
- [43] Clark, R. D., & Baraitser, M. (1987). A new X-linked mental retardation syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 26(1), 13-15. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320260104>
- [44] Louie, R. J., Friez, M. J., Skinner, C., Baraitser, M., Clark, R. D., Schwartz, C. E., & Stevenson, R. E. (2020). Clark-Baraitser syndrome is associated with a nonsense alteration in the autosomal gene TRIP12. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 182(3), 595-596. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61443>
- [45] Bramswig, N. C., Lüdecke, H. J., Pettersson, M., Albrecht, B., Bernier, R. A., Cremer, K., Eichler, E. E., Falkenstein, D., Gerdts, J., Jansen, S., Kuechler, A., Kvarnung, M., Lindstrand, A., Nilsson, D., Nordgren, A., Pfundt, R., Spruijt, L., Surowy, H. M., de Vries, B. B. A., ... Wieczorek, D. (2017). Identification of new TRIP12 variants and detailed clinical evaluation of individuals with non-syndromic intellectual disability with or without autism. *Human Genetics*, 136(2), 179-192. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1743-x>
- [46] Donoghue, T., Garrity, L., Ziolkowski, A., McPhillips, M., Buckman, M., & Goel, H. (2020). Novel de novo TRIP12 mutation reveals variable phenotypic presentation while emphasizing core features of TRIP12 variations. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 182(7), 1801-1806. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61618>
- [47] Lelieveld, S. H., Reijnders, M. R. F., Pfundt, R., Yntema, H. G., Kamsteeg, E., de Vries, P., de Vries, Bert B. A., Willemsen, M. H., Kleefstra, T., Löhner, K., Vreeburg, M., Stevens, S. J. C., van der Burgt, I., Bongers, Ernie M. H. F., Stegmann, A. P. A., Rump, P., Rinne, T., Nelen, M. R., Veltman, J. A., ... Gilissen, C. (2016). Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nature Neuroscience*, 19(9), 1194-1196. <https://doi.org/10.1038/nn.4352>
- [48] Kondo, Y., Aoyama, K., Suzuki, H., Hattori, A., Hori, I., Ito, K., Yoshida, A., Koroki, M., Ueda, K., Kosaki, K., & Saitoh, S. (2020). De novo 2q36.3q37.1 deletion encompassing TRIP12 and NPPC yields distinct phenotypes. *Human Genome Variation*, 7(1), 19. <https://doi.org/10.1038/s41439-020-0107-1>

- [49] Zhang, J., Gambin, T., Yuan, B., Szafranski, P., Rosenfeld, J. A., Balwi, M. A., Alswaid, A., Al-Gazali, L., Shamsi, A. M. A., Komara, M., Ali, B. R., Roeder, E., McAuley, L., Roy, D. S., Manchester, D. K., Magoulas, P., King, L. E., Hannig, V., Bonneau, D., ... Stankiewicz, P. (2017). Haploinsufficiency of the E3 ubiquitin-protein ligase gene TRIP12 causes intellectual disability with or without autism spectrum disorders, speech delay, and dysmorphic features. *Human Genetics*, 136(4), 377-386. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1763-1>
- [50] Brunet, M., Vargas, C., Larrieu, D., Torrisani, J., & Dufresne, M. (2020). E3 Ubiquitin Ligase TRIP12: Regulation, Structure, and Physiopathological Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228515>
- [51] GeneCards. (2021). *Genomic View for TRIP12 Gene* [Imagen]. GeneCards – the human gene database. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRIP12>
- [52] Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., ... Flicek, P. (2020). Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(1), 884-891. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000153827;r=2:229763837-229923239
- [53] Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. (2020). # 617752 - *Clark-Baraitser Syndrome*. <https://www.omim.org/entry/617752>
- [54] Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., El Houdaigui, B., Fatima, R., ... Flicek, P. (2020). Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(1), 884-891. http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Gene/Summary?db=core;g=ENSDARG00000061397;r=18:41232719-41310976
- [55] White, R. J., Collins, J. E., Sealy, I. M., Wali, N., Dooley, C. M., Digby, Z., Stemple, D. L., Murphy, D. N., Billis, K., Hourlier, T., Füllgrabe, A., Davis, M. P., Enright, A. J., & Busch-Nentwich, E. M. (2017). A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *Elife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.30860>
- [56] Summerton, J. E. (2017). Invention and Early History of Morpholinos: From Pipe Dream to Practical Products. *Methods in Molecular Biology*, 1565, 1-15. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6817-6_1
- [57] Bedell, V. M., Westcot, S. E., & Ekker, S. C. (2011). Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. *Briefings in Functional Genomics*, 10(4), 181-188. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elr021>
- [58] Eisen, J. S., & Smith, J. C. (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development*, 135(10), 1735-1743. <https://doi.org/10.1242/dev.001115>

- [59] Bill, B. R., Petzold, A. M., Clark, K. J., Schimmenti, L. A., & Ekker, S. C. (2009). A Primer for Morpholino Use in Zebrafish. *Zebrafish*, 6(1), 69-77. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0555>
- [60] Schulte-Merker, S., & Stainier, D. Y. R. (2014). Out with the old, in with the new: reassessing morpholino knockdowns in light of genome editing technology. *Development*, 141(16), 3103-3104. <https://doi.org/10.1242/dev.112003>
- [61] Zimmer, A. M., Pan, Y. K., Chandrapalan, T., Kwong, R. W. M., & Perry, S. F. (2019). Loss-of-function approaches in comparative physiology: is there a future for knockdown experiments in the era of genome editing? *Journal of Experimental Biology*, 222(7), jeb175737. <https://doi.org/10.1242/jeb.175737>
- [62] Wyatt, C., Bartoszek, E. M., & Yaksi, E. (2015). Methods for studying the zebrafish brain: past, present and future. *European Journal of Neuroscience*, 42(2), 1746-1763. <https://doi.org/10.1111/ejn.12932>
- [63] Powell, S. K., Gregory, J., Akbarian, S., & Brennand, K. J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 to the study of brain development and neuropsychiatric disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 82, 157-166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.05.007>
- [64] Barman, A., Deb, B., & Chakraborty, S. (2020). A glance at genome editing with CRISPR–Cas9 technology. *Current Genetics*, 66(3), 447-462. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01040-3>
- [65] Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 227-264. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>
- [66] Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), 733-740. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>
- [67] Janik, E., Niemcewicz, M., Ceremuga, M., Krzowski, L., Saluk-Bijak, J., & Bijak, M. (2020). Various Aspects of a Gene Editing System—CRISPR–Cas9. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249604>
- [68] Wright, A. V., Nuñez, J. K., & Doudna, J. A. (2016). Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell*, 164(1-2), 29-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.035>
- [69] Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>

- [70] Tyagi, S., Kumar, R., Das, A., Won, S. Y., & Shukla, P. (2020). CRISPR-Cas9 system: A genome-editing tool with endless possibilities. *Journal of Biotechnology*, 319, 36-53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.008>
- [71] Hanoun, N., Fritsch, S., Gayet, O., Gigoux, V., Cordelier, P., Dusetti, N., Torrisani, J., & Dufresne, M. (2014). The E3 ubiquitin ligase thyroid hormone receptor-interacting protein 12 targets pancreas transcription factor 1a for proteasomal degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(51), 35593-35604. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.620104>
- [72] R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- [73] Kajiro, M., Tsuchiya, M., Kawabe, Y., Furumai, R., Iwasaki, N., Hayashi, Y., Katano, M., Nakajima, Y., Goto, N., Watanabe, T., Murayama, A., Oishi, H., Ema, M., Takahashi, S., Kishimoto, H., & Yanagisawa, J. (2011). The E3 ubiquitin ligase activity of Trip12 is essential for mouse embryogenesis. *PLoS One*, 6(10), e25871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025871>
- [74] Tseng, W.-C., Johnson Escauriza, A. J., Tsai-Morris, C.-H., Feldman, B., Dale, R. K., Wassif, C. A., & Porter, F. D. (2021). The role of Niemann–Pick type C2 in zebrafish embryonic development. *Development*, 148(7), dev194258. <https://doi.org/10.1242/dev.194258>

7. Abreviaturas

6-FAM: 6-formamida

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

ARM: *Armadillo-Repeats*

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNcr: ARN de CRISPR

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ARNsg: ARN Guía

ARNtracr: ARN de CRISPR trans-activante

Cas9: *CRISPR associated protein 9*

cm: Centímetros

CNVs: *Copy Number Variations*

CRISPR/Cas9: *Clustered Regularly Inter-spaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9*

DI: Discapacidad Intelectual

DEPC: *Diethylpyrocarbonate*

dNTPs: *Deoxynucleotide Triphosphate*

dpf: Días Post-Fecundación

eef1a: *Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha*

EtOH: Etanol

HDR: *Homology Directed Repair*

hpf: Horas Post-Fecundación

GWAS: *Genome-wide association studies*

IDR: Región Intrínsecamente Desordenada

indels: Inserciones o Deleciones

iPSCs: *Induced Pluripotent Stem Cells*

kPa: Kilopascales

µm: Micrómetros

µl: Microlitros

μ S: Microsiemens
mg: Miligramos
MgCl₂: Cloruro de Magnesio
mL: Mililitros
mm: Milímetros
mM: Milimolar
MOs: *Morpholino Oligonucleotides*
NaAc: Acetato de Sodio
ng: Nanogramos
NHEJ: *Non-Homologous End Joining*
nm: Nanómetros
nmol: Nanomol
nL: Nanolitros
nr1h3: Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3
PAM: *Protospacer Adjacent Motif*
pb: Pares de bases
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PM2.5: Materia Particulada de diámetro menor a 2,5 μ m
ptf1a: Pancreas associated transcription factor 1a
qPCR: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*
rpm: Revoluciones por minuto
srebf1: Sterol regulatory element binding transcription factor 1
TDAH: Trastorno por Déficit de Atención/Hiperactividad
TEA: Trastornos de Espectro Autista
TNDs: Trastornos del Neurodesarrollo
TRIP12: Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12
U: Unidad de actividad enzimática
V: Voltios
WGS: *Whole Genome Sequencing*
WT: *Wild type*
WWE: Triptófano-Triptófano-Glutamato