



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Ana
Quelle Regaldie

Tesis doctoral

Desarrollo de modelos de pez
cebra (*Danio rerio*) para la
investigación de SCA36 y otras
ataxias

Lugo, 2023

Programa de doctorado en Medicina Molecular



TESIS DE DOCTORADO

**DESARROLLO DE MODELOS DE
PEZ CEBRA (DANIO RERIO)
PARA LA INVESTIGACIÓN DE
SCA36 Y OTRAS ATAXIAS**

Ana Quelle Regaldie

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

LUGO

2023



D. /Dña. **Ana Quelle Regaldie**

Título de la tesis: **Desarrollo de modelos de pez cebra (Danio rerio) para la investigación de SCA36 y otras ataxias.**

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

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

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

En Lugo, 01 de marzo de 2023

Fdo. Ana Quelle Regaldie



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Desarrollo de modelos de pez cebra (*Danio rerio*) para la investigación de SCA36 y otras ataxias

D^a. Laura Sánchez Piñón
D^a. María Jesús Sobrido Gómez

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/D^a. Ana Quelle Regaldie, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

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

En Lugo, 1 de marzo de 2023

Fdo. Laura Sánchez Piñón

Fdo. María Jesús Sobrido Gómez



Yo Ana Quelle Regaldie, con DNI 53309790E y con domicilio a efectos de notificación:
RíoMandeo 7, Culleredo 15174 (A Coruña), declaro que esta tesis doctoral no presenta
conflictosde interés.

En Lugo, 8 de marzo de 2023

Fdo. Ana Quelle Regaldie

Yo Ana Quelle Regaldie, con DNI 53309790E y con domicilio a efectos de notificación: Río Mandeo 7, Culleredo 15174 (A Coruña), declaro que esta tesis doctoral fue realizada al amparo de proyectos de investigación siguiendo las regulaciones y leyes establecidas por la Unión Europea (2010/63/UE) y por el Real Decreto 1386/2018 para la experimentación animal y aprobadas por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela y de la Xunta de Galicia (código de registro: ES270280346401 AE-LU-003, número de expediente: 03/20/LU-003). (ver Anexo I). La doctoranda, Ana Quelle Regaldie cuenta con los certificados de capacitación necesarios para la experimentación animal (Categorías A, B y C en peces y anfibios y categoría D) (ver Anexo II).

En Lugo, 8 de marzo de 2023

Fdo. Ana Quelle Regaldie

Financiación

Proyecto de investigación

Organización financiadora: Instituto de Salud Carlos III.

Entidades participantes: SERGAS: Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) e Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Universidad de Santiago de Compostela.

Duración: 2018-2022.

Investigador principal: María Jesús Sobrido Gómez.

Título del proyecto: Investigación de mutaciones y mecanismos moleculares en ataxias espinocerebelosas y síndromes neurológicos relacionados.

Número de referencia: PI17_01582.

Beca y donaciones al grupo de investigación

Organización financiadora: Asociación Galega de Ataxias.

Entidades receptoras: Grupo Neurogenética perteneciente primero al IDIS y después al INIBIC.
Beca de investigación donada a Ana Quelle Regaldie.

Duración: Diversas donaciones entre 2017-2022.

Investigador principal: María Jesús Sobrido Gómez.

Relación de publicaciones

Capítulo I

Título: Zebrafish Models of Autosomal Dominant Ataxias.

Autores: Ana Quelle-Regaldie¹, Daniel Sobrido-Cameán², Antón Barreiro-Iglesias², María Jesús Sobrido³ and Laura Sánchez^{1,4}.

Afiliación: ¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo. ²Departamento de Biología Funcional, Facultad de Biología, Centro de Investigaciones Biológicas CIBUS, Universidad de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela. ³Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Servicio Galego de Saúde, 15006 Coruña. ⁴Grupo de animales preclínicos, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), 15706 Santiago de Compostela.

Publicado en: *Cells*, (2021), 10(2), 421. doi: 10.3390/cells10020421.

Índices de calidad: Factor de impacto: 7,66 (2021). Q1 (Biochemistry, Genetics and Molecular Biology) Rango: 43/204.

Contribución: Diseñar la metodología, realizar el trabajo, redacción del manuscrito, preparación de las figuras, revisión y edición.

Conflicto de interés: Los autores declaran que la investigación fue realizada en la ausencia de relaciones comerciales o financieras que puedan constituir un potencial conflicto de interés.

Copyright: © 2021 Quelle-Regaldie, A., Sobrido-Cameán, D., Barreiro-Iglesias, A., Sobrido, M. J., & Sánchez, L. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Capítulo II

Título: A nop56 Zebrafish Loss-of-Function Model Exhibits a Severe Neurodegenerative Phenotype.

Autores: Ana Quelle-Regaldie^{1,2}, Mónica Folgueira^{3,4}, Julián Yáñez^{3,4}, Daniel Sobrido-Cameán⁵, Anabel Alba-González^{3,4}, Antón Barreiro-Iglesias⁵, María-Jesús Sobrido² and Laura Sánchez¹

Afiliación: ¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo. ²Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Servicio Galego de Saúde, 15008 A Coruña. ³Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña, 15008 A Coruña. ⁴Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), Universidad de A Coruña, 15008 A Coruña. ⁵Departamento de Biología Funcional, Facultad de Biología, Centro de Investigaciones Biológicas CIBUS, Universidad de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela.

Publicado en: *Biomedicines* (2022), 10(8), 1814. doi: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081814>.

Índices de calidad: Factor de impacto: 4,757 (2022). Q1 (Medicine) Rango: 132/276.

Contribución: Diseño experimental, mantenimiento de líneas mutantes, caracterización genética, caracterización morfológica, análisis de supervivencia, análisis de expresión, tinción de apoptosis, análisis comportamental, inyección de morfolinós, estadística, análisis de datos, preparación de figuras, redacción del manuscrito, revisión y edición.

Conflicto de interés: Los autores declaran que la investigación fue realizada en la ausencia de relaciones comerciales o financieras que puedan constituir un potencial conflicto de interés.

Copyright: © 2022 Quelle-Regaldie, A., Folgueira, M., Yáñez, J., Sobrido-Cameán, D., Alba-González, A., Barreiro-Iglesias, A., Sobrido, M. J. & Sánchez, L. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Capítulo III

Título: Zebrafish Models of Autosomal Recessive Ataxias.

Autores: Ana Quelle-Regaldie¹, Daniel Sobrido-Cameán², Antón Barreiro-Iglesias², María Jesús Sobrido³, and Laura Sánchez^{1,4}.

Afiliación: ¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo. ²Departamento de Biología Funcional, Facultad de Biología, Centro de Investigaciones Biológicas CIBUS, Universidad de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela. ³Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Servicio Galego de Saúde, 15006 Coruña. ⁴Grupo de animales preclínicos, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), 15706 Santiago de Compostela.



Publicado en: *Cells*, (2021), 10(4), 836. doi: [10.3390/cells10040836](https://doi.org/10.3390/cells10040836).

Índices de calidad: Factor de impacto: 7,66 (2021). Q1 (Biochemistry, Genetics and Molecular Biology) Rango: 43/204.

Contribución: Diseñar la metodología, realizar el trabajo, redacción del manuscrito, preparación de las figuras, revisión y edición.

Conflicto de interés: Los autores declaran que la investigación fue realizada en la ausencia de relaciones comerciales o financieras que puedan constituir un potencial conflicto de interés.

Copyright: © 2021 Quelle-Regaldie, A., Sobrido-Cameán, D., Barreiro-Iglesias, A., Sobrido, M. J., & Sánchez, L. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Capítulo IV

Título: Severe neurometabolic phenotype in *npc1*^{-/-} zebrafish with a C-terminal mutation.

Autores: Ana Quelle-Regaldie¹, Nerea Gandoy-Fieiras², Paula Rodríguez-Villamayor^{1,2}, Sandra Maceiras², Ana Paula Losada², Mónica Folgueira³, Pablo Cabezas-Sáinz¹, Antón Barreiro-Iglesias⁴, María Villar-López¹, María Isabel Quiroga Berdeal², Laura Sánchez¹, María-Jesús Sobrido⁵.

Afiliación: ¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo. ²Departamento de Anatomía, Producción Animal y Ciencias Clínicas Veterinarias. Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo. ³Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña, 15008 A Coruña. ⁴Departamento de Biología Funcional, Facultad de Biología, Centro de Investigaciones Biológicas CIBUS, Universidad de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela. ⁵Hospital Teresa Herrera, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña, 15006 A Coruña.

Publicado en: *Frontiers in Molecular Neuroscience*, (2023), 16: 1078634. doi: 10.3389/fnmol.2023.1078634.

Índices de calidad: Factor de impacto: 6,261 (2021). Q1 (Cellular and Molecular Neuroscience) Rango: 15/88.

Contribución: Diseño experimental, creación de líneas mutantes mediante CRISPR/Cas9, mantenimiento de líneas mutantes, caracterización genética, caracterización morfológica, análisis de supervivencia, análisis comportamental, Tinción de lípidos, preparación de muestras para RNAseq y lipidómica, estadística, análisis de datos, preparación de figuras, redacción del manuscrito, revisión y edición.

Conflicto de interés: Los autores declaran que la investigación fue realizada en la ausencia de relaciones comerciales o financieras que puedan constituir un potencial conflicto de interés.

Copyright:© 2023 Quelle-Regaldie, Gandoy-Fieiras, Rodríguez-Villamayor, Maceiras, Losada, Folgueira, Cabezas-Sáinz, Barreiro-Iglesias, Villar-López, Quiroga-Berdeal, Sánchez and Sobrido. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Agradecimientos

Cumplir sueños implica trabajar duro y pocas cosas hay más difíciles que acabar una tesis. Como todo en esta vida, esto sería imposible completarlo sin ayuda. De mi familia, que es muy extensa, lo cual es maravilloso, pero me imposibilita nombraros a todos, aunque os lleve en el corazón. Mis padres, que siempre me animaron a cumplir mis sueños, recordándome que era mucho más importante ser feliz. Mi hermano, que está para todo cuando lo necesito y consigue sacarme una sonrisa incluso en los peores momentos. Mis abuelas, las mujeres más duras que he conocido, de ellas aprendí que todo se puede superar y que de todo se aprende. Mi abuelo, un gran ejemplo que, sabiendo que quería ser bióloga, me regaló mi primera enciclopedia del reino animal. Alex, mi compañero de vida y mi mayor apoyo.

Los amigos, la familia que elegimos y a mí me han tocado los mejores. Muy especialmente a Carla, mi hermana de otros padres. Pero también a mis otras maravillosas confidentes: Lara R. y Natalie que siempre están disponibles tanto para escuchar mis ralladas como para salir de fiesta. Al resto de la pandilla de Viveiro: Jose, Alex, Artur, Adrián y Miguel que me alegran el fin de semana con los mejores planes cada vez que voy. Bea, Loly y Lara M. que están lejos, pero eso hace mucho más especial el momento de vernos. Samu, Jano y Dani compañeros de bares y de risas. Jessica y Noelia, en nuestras cenas solucionamos el mundo. Ayla, Fay, Bruno, Leni, Raquel, Helena y Lucía que me enseñaron todo lo bueno de Lugo.

En el ámbito profesional, he tenido a los mejores compañeros, directoras de tesis y colaboradores. Empezando por Julián, que aceptó dirigirme el TFG y me lo enseñó todo sobre el pez cebra. Susi, que me acogió como alumna de TFM, guiándome a través de las ataxias cerebelosas, sin imaginarse que años más tarde estaríamos en este punto, finalizando una tesis. Laura, que me albergó en su grupo y no dudó ni por un instante sobre mi idea de investigar en ataxias utilizando el pez cebra. Todos mis compañeros del departamento de Genética, el mejor departamento del mundo. Alba, Álvaro y Coppel con los cuales inicié la tesis y la aventura de la edición genética en el pez cebra. Alba, además, no solo es una maravillosa compañera que siempre me facilitó todo, sino que también es la mejor compañera de piso que se puede tener, no sé qué habría hecho sin ella. Vanesita, mi media mandarina, cuya alegría es contagiosa y consigue hacer mejores incluso los días más grises. Peque, desde el principio se implicó conmigo, siempre dispuesta a echarme una mano con una sonrisa. Chiclana, no sé qué sería de mí sin escuchar tus historias y chistes malos. Paula, con mil ideas y proyectos, mi negociadora favorita. Nerea, mi heredera, estoy muy orgullosa de haberte visto dar tus primeros pasos y ver cómo vas evolucionando, convirtiéndote en una investigadora top. Sin olvidarme del resto de mis compañeros de despacho: Pablo, Iago, Inés, Marina, Martín, Rocío, Mainer, Marialaura, Oscar, Sara, Francesco, Nico y Andrés, sin vosotros mis días serían mucho menos divertidos. Soni y Moni, que siempre solucionan todos los problemas, sin ellas no funcionaría nada en el departamento. Lucía, Cris, Porte y Susana las mejores técnicas de laboratorio que puede haber, que desde el principio nos enseñan y nos guían para hacernos mejores. El departamento de AP cuya directora, Maribel siempre está dispuesta a proponer y colaborar en diversos proyectos. Sandra, el corazón de anatomía, laboriosa como una abejita trabajadora pero dispuesta a consolarte y darte un abrazo cuando lo necesitas. Ana Paula dispuesta a enfrentarse a cualquier reto que les propongas. Por último y no menos importante a Mónica y Antón (que fácilmente podrían ser mis terceros directores de tesis) y a sus respectivos grupos, indispensables para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	10
Introducción.....	14
Objetivos.....	27
Material y métodos	30
Capítulo I.....	34
Capítulo II.....	57
Capítulo III	79
Capítulo IV	108
Discusión	125
Conclusiones.....	138
Referencias	142
Anexo I.....	158
Anexo II.....	160

Todas las imágenes incluidas en este documento son originales y han sido elaboradas por Ana Quelle Regaldie.

Los materiales suplementarios de los capítulos I, II, III y IV se encuentran online en los enlaces disponibles en los capítulos mencionados. No pueden ser incluidos en la presente tesis debido a que se componen de vídeos y tablas de Excel.

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ARNr: ARN ribosómico

ARSACS: Ataxia autosómica recesiva de Charlevoix-Saguenay.

Cas: Proteína asociada a CRISPR.

crRNA: CRISPR ARN.

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas.

Dpf: Días post fecundación.

DSB: Roturas de cadena doble.

EA: Ataxia episódica.

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica.

ENU: N-ethyl-N-nitrosourea.

EZRC: *European Zebrafish Resource Center*.

FXTAS/FMR1: Síndrome del temblor/ataxia asociado a X-frágil causado por mutaciones en el gen *FMR1*.

HR: Recombinación homóloga.

NHEJ: Unión de extremos no homólogos.

NPC: Niemann Pick tipo C.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RNAseq: Secuenciación de ARN.

RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real.

SCA: Ataxia espinocerebelosa.

SCA36: Ataxia espinocerebelosa tipo 36.

SCAR: Ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva.



snoRNPs: Complejo C/D de ribonucleoproteína nucleolar pequeña.

Spf: Semanas post fecundación.

TALENs: Nucleasas efectoras del tipo activador de transcripción.

Tilling: Lesiones locales inducidas dirigidas a genomas.

tracrRNA: ARN de transición.

Traducción RAN: Traducción no mediada por ATG.

ZIRC: Zebrafish International Resource Center.

ZFNs: Nucleasas de dedos de zinc.

INTRODUCCIÓN

Introducción

Las ataxias cerebelosas hereditarias son un grupo de enfermedades neurodegenerativas de fenotipo heterogéneo causadas por la disfunción del cerebelo y sus conexiones aferentes y eferentes como la corteza cerebelosa, los núcleos dentados y los núcleos de la oliva inferior además de la degeneración de las células de Purkinje (Koeppen *et al.*, 2013). Clínicamente se caracterizan por un deterioro progresivo de la coordinación motora, del equilibrio y de la marcha acompañados frecuentemente por otros signos cerebelosos como temblor, disartria, disfagia y afectación de los movimientos oculares (Evidente *et al.*, 2000; Jayadev y Bird, 2013; Bird, 2019).

Las ataxias son consideradas enfermedades raras; con una prevalencia estimada a nivel mundial de 1 caso por cada 10.000 habitantes, aunque esta varía según la región geográfica y el tipo de ataxia (Ruano *et al.*, 2014). En España, su prevalencia se estima en 5,48 casos por cada 100.000 habitantes (Suero *et al.*, 2021). Esta baja prevalencia dificulta su estudio, tanto desde el punto de vista molecular como desde el farmacológico. Además, presentan dificultades en su diagnóstico y clasificación debido al elevado número de entidades, clínica y genéticamente heterogéneas, así como el solapamiento fenotípico con otras patologías neurológicas que pueden presentar descoordinación motora o ataxia. (Harding, 1983).

Entre las enfermedades causantes de ataxia cerebelosa se incluyen entidades con herencia autosómica dominante, autosómica recesiva o menos frecuentemente ligada al cromosoma X. (Jayadev y Bird, 2013; Bird, 2019).

Las ataxias dominantes se caracterizan frecuentemente por manifestarse en la edad adulta. Sus síntomas clínicos pueden estar restringidos al cerebelo o acompañarse de otros síntomas neurológicos como neuropatía periférica, retinopatía, signos piramidales y extrapiramidales, demencia y epilepsia. Las ataxias dominantes suelen denominarse SCAs (del inglés Spinocerebellar Ataxia) seguido de un número de orden de su descubrimiento. Hasta la fecha se han descrito alrededor de 40 loci SCA (<https://www.omim.org/>). Las ataxias recesivas suelen tener una edad de inicio más temprana y un fenotipo más complejo, en ocasiones asociado a alteraciones del metabolismo u otras manifestaciones extraneurológicas. La clasificación de las ataxias recesivas (SCAR) no está tan bien establecida como en las ataxias dominantes y deja fuera errores congénitos del metabolismo, leucodistrofias y muchas otras enfermedades que cursan con ataxia y con transmisión autosómica recesiva (Beaudin *et al.*, 2017; Synofzik *et al.*, 2018). Las ataxias ligadas a X son todavía menos frecuentes que las ataxias dominantes y recesivas, se manifiestan principalmente en varones y con frecuencia asocian retraso en el neurodesarrollo y discapacidad intelectual (Zanni y Bertini, 2018).

Los mecanismos patológicos de las ataxias causan disrupción de la homeostasis cerebelosa lo que conduce en último término a la degeneración progresiva del cerebelo (Eidhof *et al.*, 2019). Podemos citar la aparición de mutaciones sin sentido, inserciones o deleciones o en el caso de las ataxias dominantes de expansiones de poliglutamina o expansiones repetidas no codificantes entre los principales tipos de mutaciones encontradas en ataxias. Las expansiones patológicas que son el tipo de mutaciones más comunes en las ataxias dominantes surgen de repeticiones polimórficas comunes en la población que se amplificaron hasta un rango patogénico debido a

la aparición de mutaciones *de novo* o hereditarias. Estas expansiones suelen relacionarse con una ganancia de función tóxica y el tamaño de la expansión se correlaciona con la edad de inicio de los síntomas y su gravedad. El tamaño de expansión suele aumentar con el paso de las generaciones en un proceso llamado anticipación. Las expansiones de poliglutamina promueven el plegamiento incorrecto de las proteínas y alteran las interacciones ADN-proteína o proteína-proteína, lo que puede causar desregulación de la transcripción, inhibición de la función de las histonas acetiltransferasas y la formación de agregados de poliglutamina neuronal citoplásmica o intranuclear. Se cree que las expansiones repetidas no codificantes provocan ganancia de función debido a la formación de focos de ARN, interrumpen el empalme de genes esenciales y dan lugar a la traducción RAN que es aquella que se produce sin la necesidad de un codón de inicio ATG, lo que da como resultado la producción de polipéptidos tóxicos (Matilla-Dueñas et al., 2014; Hekman y Gomez, 2015; Paulson, 2018). La patogénesis en las ataxias recesivas en cambio se relaciona con la pérdida de función de las proteínas asociadas. Las mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas causan la alteración de sus vías metabólicas y pueden dar lugar entre otras: fallos en la reparación del ADN, interrupción del ciclo celular y apoptosis, autofagia, estrés mitocondrial, fallos en el plegamiento de proteínas, alteración de la estructura del citoesqueleto, desregulación de la transcripción, fallo en el metabolismo y transporte lipídico, alteración del tráfico intracelular y transmembrana, disfunción de los canales de calcio y potasio y degeneración en las células de Purkinje debido a fallos en la sinaptogénesis o alteraciones de la vaina de mielina (Matilla-Dueñas *et al.*, 2010; Matilla-Dueñas *et al.*, 2014). Las ataxias recesivas son enfermedades multisistémicas caracterizadas por mutaciones que resultan en la pérdida de función de la proteína mientras que la muerte celular asociada a las ataxias dominantes en general está más restringida al sistema nervioso y suele estar afectado el procesamiento y plegamiento de las proteínas (Taroni y DiDonato., 2004). Recientemente se ha sugerido que la mayor parte de las proteínas afectadas en las ataxias interactúan en redes y procesos biológicos comunes, independientemente de su tipo de herencia (figura 1) (Smeets y Verbeek, 2014; Eidhof *et al.*, 2019).

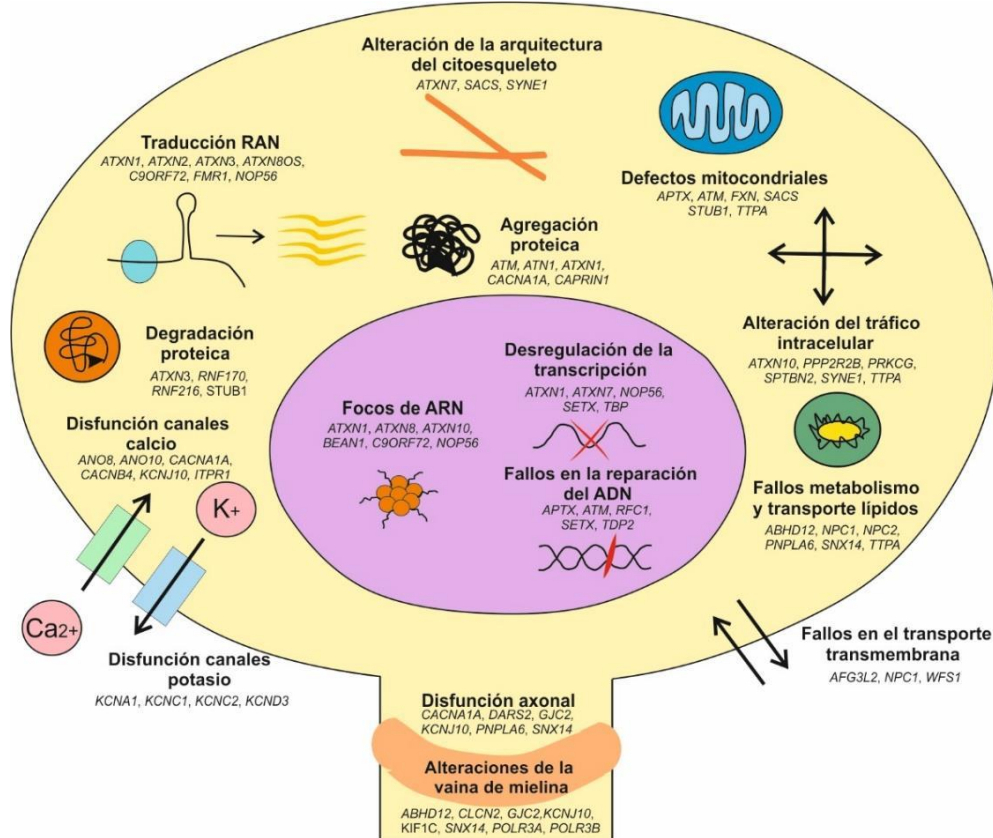


Figura 1: Algunos de los principales mecanismos patogénicos causados por mutaciones en varios genes causantes de ataxias.

Aunque clásicamente se diferencia entre enfermedades neurodegenerativas dominantes y trastornos genéticos del metabolismo, generalmente de herencia autosómica recesiva, cada vez disponemos de más indicios de una relación estrecha y compleja entre estos dos grandes capítulos de la neurología. Ambos tipos de enfermedades comparten no solo fenotipos superpuestos y genes subyacentes, sino también vías celulares y moleculares. Eso se puede ejemplificar en el hecho de que algunos genes como *SPTBN2* y *AFG3L2* son responsables de ataxia tanto dominante como recesiva. Además, en algunos casos de trastornos genéticos del metabolismo recesivos como la enfermedad de Gaucher, se ha demostrado que las mutaciones en heterocigosis son un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad de Parkinson al igual que sucede en otras enfermedades de almacenamiento lisosomal como la enfermedad de Salla o la lipogranulomatosis de Farber (Sidransky *et al.*, 2009). Otro ejemplo es gen de la progranulina, donde mutaciones en heterocigosis causan demencia frontotemporal mientras que en homocigosis o heterocigosis compuesta dan lugar a un complejo trastorno lisosomal de inicio temprano (Van Swieten y Heutink, 2008). En la enfermedad de Niemann Pick tipo C (NPC), un tipo de ataxia que causa tanto acúmulos lisosomales como neurodegeneración se ha observado en los pacientes heterocigotos, una susceptibilidad elevada a padecer trastornos neurodegenerativos a edades avanzadas (Schneider *et al.*, 2021).

Hasta este momento presente no se dispone de ningún tratamiento efectivo para este grupo de enfermedades, a pesar de todos los avances clínicos en análisis moleculares, celulares, la caracterización del fenotipo locomotor y las mejoras en la adquisición de imágenes del sistema nervioso. El estudio de modelos celulares de enfermedades neurodegenerativas, aunque es útil, presenta limitaciones debido a su falta de complejos circuitos neuronales y ausencia entre otros,

de componentes vasculares y gliales (Dawson *et al.*, 2018). La creación de modelos animales es esencial para tratar de recapitular la funcionalidad de un sistema nervioso completo. En ellos es posible analizar la degeneración de diversos tipos celulares, los defectos en la señalización celular, los fallos de conectividad sinápticas, los fenotipos comportamentales o las alteraciones en la expresión génica. Los descubrimientos en modelos animales han ayudado principalmente a comprender los intrincados mecanismos celulares y moleculares que se encuentran tras la patogénesis de las ataxias y además pueden ser utilizados para probar nuevas terapias que puedan ayudar a tratar o al menos paliar los síntomas de la enfermedad (Manto y Marmolino, 2009; Dawson *et al.*, 2018). Sin embargo, los modelos animales de ataxias dominantes son menos abundantes en comparación con las ataxias recesivas, puesto que la introducción de expansiones repetitivas de ADN tiene una complejidad técnica mucho más elevada que modelizar la pérdida de función génica.

El pez cebra (*Danio rerio*) es uno de los organismos más utilizados en el campo biomédico puesto que presenta ventajas sobre otros modelos animales como: pequeño tamaño (entre 3 y 5 cm) y fácil manejo, fecundación externa, alta fecundidad (cada hembra puede poner más de 100 huevos a la semana), rápido desarrollo (alcanzan la maduración sexual en tres meses) y transparencia óptica que permite observar su desarrollo en tiempo real y aplicar técnicas de imagen avanzadas (Aleström *et al.*, 2006). Además, la secuenciación de su genoma se inició en el 2002 y finalizó en el 2013 y su información es actualizada frecuentemente (Lawson *et al.*, 2022). Su comparación con el genoma humano demostró que un 71,4% de los genes humanos tienen un ortólogo en el pez cebra. De los genes humanos implicados en las enfermedades se comprobó que un 82% estaban presentes en el pez cebra (Howe *et al.*, 2013). Además, al igual que el genoma humano, el genoma del pez cebra es altamente repetitivo, el 55% de su genoma está formado por repeticiones, principalmente de transposones de ADN. En contraste, los elementos repetitivos del genoma humano (que comprenden el 66% del genoma) son su mayoría retrotransposones (Chalopin *et al.*, 2015). Sin embargo, parte del genoma del pez cebra se presenta duplicado puesto que al igual que el resto de los teleósteos, ha sufrido la duplicación del genoma completo de los actinopterigios (Glasauer y Neuhaus, 2014). El pez cebra posee 26206 genes codificantes de proteínas, muchos más que cualquier vertebrado secuenciado anteriormente con duplicados de una media del 20-24% de sus genes, probablemente debido a la duplicación del genoma completo (Howe *et al.*, 2013). Estos duplicados en algunos casos proporcionan ventajas en la creación de modelos como subfuncionalización, lo que permite estudiar fenotipos pleiotrópicos (Fleish *et al.*, 2008; Good *et al.*, 2012; Lagman *et al.*, 2015) pero en otros casos dan lugar a desventajas como la redundancia génica que hace imposible crear un modelo de pérdida de función de determinados genes puesto que la otra copia, lo compensa (Hinitz *et al.*, 2012; Manoli y Driever, 2014). Por lo que hay que tener cautela al escoger los genes para crear modelos de pez cebra.

El pez cebra al igual que el resto de los modelos animales, están sometidos a las directivas de la Comisión Europea (directiva 2010/63/EU) para la protección de los animales de experimentación y al Real decreto RD 53/2013 para el cuidado animal y de experimentación. Por ello se espera que cumplan las 3 Rs o los principios básicos de experimentación animal que son reemplazo, reducción y refinamiento que consisten en reemplazar los modelos animales siempre que sea posible por modelos menos sensibles al dolor, la reducción del número de ejemplares utilizados en los protocolos de experimentación y el refinamiento que alude al uso de procedimientos que reduzcan al mínimo el sufrimiento animal (Clark *et al.*, 2018). El pez cebra es un modelo con un sistema nervioso más simple que los modelos murinos, por lo que se les presupone menor sufrimiento, siendo estos aptos para reducir y en gran medida

reemplazar otros modelos más complejos. El refinamiento se da en los estudios de pez cebra debido a que su fertilización externa y transparencia permite observaciones no invasivas. Además, en general se utilizan embriones que todavía no poseen un sistema nervioso completamente desarrollado (Cassar *et al.*, 2019). La mayor parte de experimentos realizados con pez cebra, incluidos la creación mediante edición génica de líneas mutantes se llevan a cabo antes del quinto día de vida por lo que estos procedimientos no están recogidos ni en el real decreto RD 53/2013 ni en las directivas de la Comisión Europea (directiva 2010/63/EU) antes mencionadas, que solo contempla larvas de alimentación autónoma, lo que en el pez cebra comienza a partir de 5 dpf (días post-fecundación).

El pez cebra surgió en 1930 como modelo de estudio del desarrollo (Oppenheimer, 1936) debido a que, su crecimiento es rápido y se pueden observar con facilidad las distintas etapas de su desarrollo y organogénesis *in vivo* ya que conserva la transparencia óptica en sus primeras etapas embrionarias y larvarias (Lieschke y Currie, 2007). La clonación del pez cebra se publicó en los años 80 (Streisinger *et al.*, 1981). Entre los años 80 y 90 con el surgimiento de las técnicas de mutagénesis, el laboratorio de Nusslein-Volhard realizó en pez cebra el mayor screening de mutaciones en un animal vertebrado que se había hecho hasta la fecha (Kane *et al.*, 1996). El libro de pez cebra o “zebrafish book” en el que se trataba de estandarizar protocolos de cría, estabulación y procedimientos en el pez cebra se publicó en el año 1993. El manual se hizo muy conocido y fue revisado en varias ocasiones (Westerfield, 2000; Eisen, 2020). Desde entonces el uso del pez cebra como animal de laboratorio ha aumentado de forma exponencial a lo largo de los años (figura 2). A lo largo de los últimos años, según el interés del pez cebra como modelo aumentaba, se desarrollaron diferentes estrategias de mutagénesis (Howe *et al.*, 2013) (figura 3).

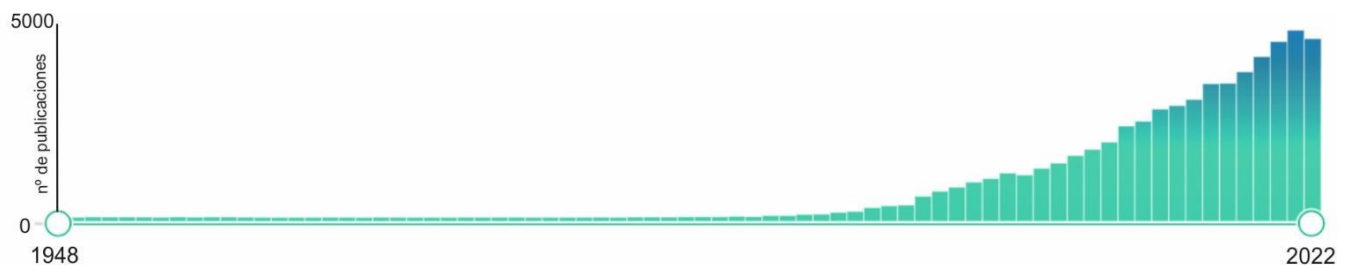


Figura 2: Publicaciones de pez cebra a lo largo de los años. Gráfica obtenida de Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> consultada el 10/02/2023), ligeramente modificada.

Los primeros tipos de peces cebra mutantes se obtuvieron mediante mutagénesis directa. Esta consiste en que se provoca una mutación con la que se observa un fenotipo y luego se estudia su base genética (genotipo). Esta mutagénesis puede ser química, mediante radiación o insercional y siempre es aleatoria ya que no puede ser dirigida a un gen específico. En el 2000 surgió un tipo de mutagénesis química denominada *Tilling* (En inglés: Targeting Induced Local Lesions in Genomes, en español: Lesiones locales inducidas dirigidas a genomas) que consiste en causar mutaciones en los peces a partir del mutágeno ENU. ENU también llamado *N-ethyl-N-nitrosourea*, es un potente mutágeno, en ratones es capaz de crear una mutación cada 700 loci; además suele producir mutaciones puntuales. Para su aplicación se provocan las mutaciones solo en los machos y se produce una librería de esperma a partir de estos. Estos se cruzan con una hembra salvaje y se buscan las mutaciones que posee la descendencia por PCR y secuenciación. Este método es muy laborioso ya que se requiere el mapeo del gen afectado mediante cartografía genética y estudios de asociación, para lo que también son necesarias

grandes instalaciones para separar a los individuos con distintas mutaciones. (Wienholds *et al.*, 2003; Amsterdam *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2012). Mediante *tilling* se crearon mutantes de 40000 alelos de pez cebra (el 60% de los genes codificantes) en el proyecto *Zebrafish mutation project* del instituto Sanger que tuvo lugar del 2011 al 2016. En Europa es posible adquirir estas líneas a través del *European Zebrafish Resource Center* (EZRC) y en Estados Unidos a partir del *Zebrafish International Resource Center* (ZIRC) (Geisler *et al.*, 2016).

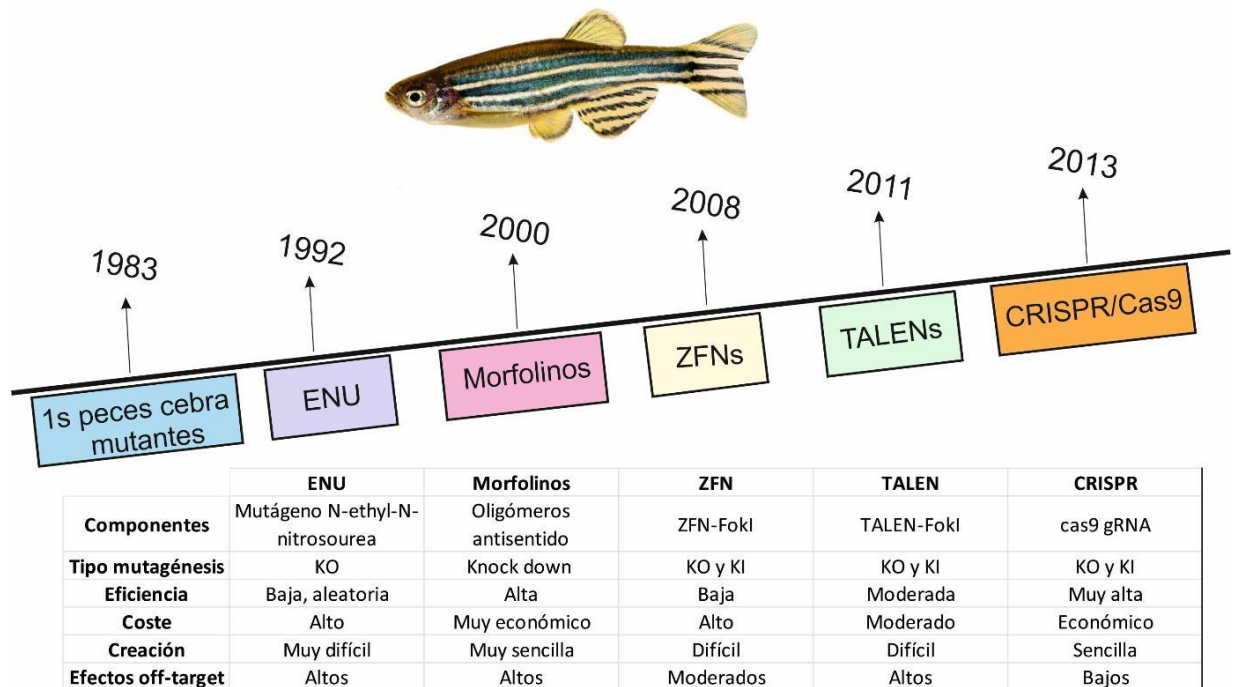


Figura 3: Principales métodos de mutagénesis en pez cebra. KO: *knock out* y KI: *knock in*.

A continuación, surgieron diversos tipos de mutagénesis reversa, la cual está dirigida al gen y no al fenotipo, se modifica la secuencia génica y se observa el impacto de este cambio en el fenotipo del organismo (Huang *et al.*, 2012).

En el año 2000 apareció la técnica de los morfolinos que, con su simplicidad, facilitó mucho la creación de modelos en pez cebra. Estos son oligómeros antisentido análogos de ácidos nucleicos que bloquean el acceso de otras moléculas al ARN, disminuyendo por tanto la función del gen al impedir al ARNm traducirse en una proteína o bloqueando el corte y empalme de la proteína (provocando lo que se conoce como *knock down*) (Nasevicius y Ekker, 2000). Los morfolinos a pesar de ser modelos transitorios (puesto que el ARN se degrada muy rápido) son muy útiles para conocer la función de un gen, sin embargo, su principal desventaja es que pueden producir efectos *off target* o efectos fuera de su sitio objetivo. Con el desarrollo de nucleasas específicas de sitio programables, se comprobó que aproximadamente el 80 % de los fenotipos de morfolinos no se observaban en los embriones mutantes, por lo que se considera

que un modelo de morfolinos siempre debe de ser verificado con un modelo mutante estable (Stainier *et al.*, 2017).

El desarrollo de nucleasas específicas de sitio artificiales tales como nucleasas de dedos de zinc (ZFNs) descubiertas en los años 90 (Kim *et al.*, 1996) y nucleasas efectoras del tipo activador de transcripción (TALENs) que se empezaron a utilizar en el 2010 (Christian, *et al.*, 2010) permitió la investigación de los fenotipos de pérdida de función de genes de interés. Mediante las nucleasas se puede insertar, eliminar o sustituir el ADN de un organismo. Tanto ZFNs como TALENs se componen de un dominio de unión al ADN (dominio de dedo de zinc o de dominio TALE) y el dominio catalítico de nucleasa FokI. Las roturas de cadena doble (DSB) inducidas por ZFNs o TALENs en el locus genómico específico pueden ser reparadas por la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o recombinación homóloga (HR). NHEJ utiliza una variedad de enzimas para unir directamente el DNA de DSB, HR en cambio utiliza una secuencia homóloga con molde para la regeneración de la secuencia de DNA en el punto de rotura. La reparación mediada por NHEJ a menudo introduce mutaciones de inserción y / o delección (indel) en el sitio de las DSBs, dando como resultado mutaciones de desplazamiento del marco de lectura que alteran la función génica y producen pérdida de función o *knock out*. A la inversa, HR en presencia de un modelo donante da como resultado una precisa modificación del genoma por inserción génica o *knock in*. En general, ambos ZFNs y TALENs son potentes herramientas para la edición génica, sin embargo, son técnicas bastante laboriosas ya que consisten en proteínas de fusión relativamente largas que consisten en un dominio de unión al DNA y el dominio catalítico de la nucleasa FokI (Huang *et al.*, 2012).

Más recientemente (en 2013) surgió la tecnología CRISPR/Cas9. Esta tecnología fue descubierta mediante la investigación de Francis Mojica del sistema inmune de procariontes que protege a las bacterias y arqueas de la invasión de virus y plásmidos (Mojica *et al.*, 2005). Las secuencias CRISPR (en inglés: clustered regularly interspaced short palindromic repeats, en español: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) consisten en repeticiones cortas palindrómicas con secuencias cortas intercaladas de DNA externo, que reconocen las secuencias externas mediante su unión a ellas. Tienen dos partes: el crRNA que marca el lugar de corte de las enzimas asociadas Cas (acrónimo de proteína asociada a CRISPR) mediante apareamiento de bases y el tracrRNA se une al crRNA para dar lugar a un RNA dúplex que se asocia a las proteínas nucleasas cas para dar lugar a un doble corte, en ambas hebras del DNA externo. Tras las repeticiones cortas palindrómicas se encuentran segmentos cortos de ADN espaciador (provenientes de exposiciones previas a virus) que reconocen secuencias específicas y guían a las nucleasas cas para cortar y degradar esos segmentos exógenos (Jiang y Doudna, 2015).

Actualmente se considera que hay dos clases de CRISPR/Cas que contienen 6 tipos principales y 33 subtipos en total que se clasificaron a partir de la organización de su locus y de la conservación de sus genes (Makarova *et al.*, 2020). Para la edición génica se optimizó el sistema CRISPR/Cas9 tipo II de *Streptococcus pyogenes*. Este sistema es muy simple y consiste en una endonucleasa Cas 9 y en dos pequeños ARNs: CRISPR ARN (crRNA) y en un ARN de transición (tracrRNA). La edición génica a partir de este sistema es muy sencilla puesto que solo se necesita un ARN sintético guía (gRNA) complementario a la secuencia diana, que consiste en una fusión de crRNA y tracrRNA capaz de reconocer la secuencia diana y guiar a la cas9 para producir roturas de ADN de doble cadena en un sitio específico del ADN diana. Al igual que en ZFN y TALENs las roturas se pueden reparar a través de NHEJ o HR (Doudna y Charpentier, 2014).

La eficiencia de la mutagénesis *knock out* mediante CRISPR/Cas 9 es muy alta, alcanzando el 86% y es heredable (Guo *et al.*, 2016) sin embargo la eficiencia del *knock in* es mucho más baja alcanzando como máximo un 25% (Kimura *et al.*, 2014). El sistema de CRISPR/cas9 tiene eficiencias similares de edición génica que ZFNs y TALENs, sin embargo, a diferencia de estos, el gRNA es el único componente que necesita personalización para cada gen diana, lo que lo que simplifica enormemente el diseño y reduce los costes (Doudna y Charpentier, 2014).

El pez cebra ha demostrado ser muy útil como modelo en diversas enfermedades neurodegenerativas (Kozol *et al.*, 2016). La organización de su sistema nervioso es similar a la de otros vertebrados incluyendo los humanos, puesto que dispone de las áreas principales del sistema nervioso central: prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal (figura 4). Estas regiones presentan identidades neuroquímicas (neurotransmisores y receptores) y conectividad entre áreas, similares a las de los humanos. Carece no obstante de algunas áreas presentes en el cerebro humano como la protuberancia, los tractos corticotálamicos y corticoespinales (Kozol *et al.*, 2016). Sin embargo, su sistema nervioso más sencillo supone una ventaja, puesto que simplifica los estudios funcionales de los circuitos neuronales y los estudios de comportamiento y su transparencia óptica permite el estudio *in vivo* de su sistema nervioso (Goulding, 2009). Además, se han desarrollado numerosos softwares y equipos (Viewpoint por ejemplo) que permiten una simplificación de la cuantificación de sus fenotipos comportamentales (Xi *et al.*, 2011). A pesar de los numerosos modelos generados en pez cebra, no hay revisiones exhaustivas específicas de los modelos generados para ataxias en pez cebra. Esto supone una gran limitación a la hora de conocer los avances hechos en la caracterización de fenotipos, las técnicas experimentales y los esfuerzos empleados en la búsqueda de fármacos.

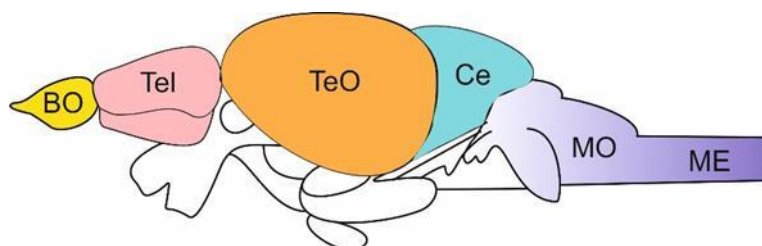


Figura 4: Sistema nervioso del pez cebra. El bulbo olfativo (BO) y el telencéfalo (Tel) pertenecen al prosencéfalo, el techo óptico (TeO) al mesencéfalo y el cerebelo (Ce) al rombencéfalo. Se ilustran también el búlbo raquídeo (o la médula oblongada MO) y la médula espinal (ME).

El pez cebra también ha sido ampliamente utilizado como modelo para el estudio de enfermedades metabólicas puesto que posee todos los órganos necesarios para el control metabólico en humanos. El pez cebra al igual que otros teleósteos, alberga grasa blanca pero no se han encontrado acúmulos de grasa parda debido a que son poiquilotérmicos. Los lípidos se almacenan principalmente como triacilglicérols en depósitos de adipocitos viscerales, intramusculares y subcutáneos. Al igual que en mamíferos los lípidos son hidrolizados por lipasas y emulsionados por los ácidos biliares en el intestino y se transportan en la sangre a través de lipoproteínas. Sin embargo, comparados con mamíferos tienen un elevado contenido en lípidos y colesterol siendo estos especialmente abundantes en el vitelo en la etapa embrionaria. En el sistema nervioso, al igual que en otras especies, la mayor parte de los lípidos

forman parte de la mielina, en pez cebra los más abundantes son la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina y el colesterol (Hölttä-Vuori *et al.*, 2010). Los modelos de pez cebra se han utilizado en enfermedades metabólicas como la obesidad, la diabetes tipo 2, aterosclerosis y la esteatohepatitis no alcohólica entre otras. En estos modelos el pez cebra debido a su transparencia óptica y pequeño tamaño, permitió la caracterización de diversos procesos moleculares y celulares *in vivo*. Por ejemplo, se ha podido medir la acumulación, absorción y transporte de lípidos en tiempo real mediante la administración de análogos de lípidos fluorescentes y también se pudieron realizar imágenes *in vivo* de la activación neuronal hipotalámica utilizando indicadores de Ca²⁺ fluorescentes dirigidos a distintas poblaciones neuronales (Seth *et al.*, 2013).

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de dos ataxias, una dominante: la ataxia tipo 36 (SCA36) y otra recesiva, la enfermedad de Niemann Pick tipo C puesto que son dos enfermedades de interés debido al alto número de pacientes que hay en el grupo de Neurogenética.

La SCA36 también llamada *ataxia da Costa da Morte* o *ataxia del río Asida* es un tipo de ataxia dominante de inicio tardío que presenta el fenotipo clásico de las SCAs: deterioro de la marcha, hipoacusia sensorial e implicación de las neuronas motoras (atrofia y fasciculaciones linguales). Fue descubierta en Galicia (donde recibe el nombre de *ataxia da Costa da Morte*) y en Japón (donde es llamada: *ataxia del río Asida*). Es causada por la repetición GGCCTG en el intrón 1 del gen *NOP56*. (Kobayashi *et al.*, 2011; García-Murias *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2012). *NOP56* es una proteína nucleolar esencial conservada desde arqueas a humanos que interactúa con *NOP58* y *FBL* para formar el complejo C/D de ribonucleoproteína nucleolar pequeña (snoRNPs). Entre las funciones de *NOP56* se incluye ser un factor central en el ensamblaje y funcionamiento del snoRNPs, complejo que se encarga de la formación de la subunidad ribosómica de 60S, de la metilación de residuos específicos en los ARN ribosómicos precursores (pre-rARNs) y las escisiones endonucleolíticas de la transcripción primaria 35S de los ARN ribosómicos (Nepomuceno-Mejía *et al.*, 2018). *NOP56* (al igual que otras proteínas pertenecientes a snoRNPs) se ha relacionado estrechamente con la expresión oncogen promoviendo la formación de tumores en cánceres como la leucemia mieloide aguda o el linfoma de Burkitt. Sin embargo, también se ha encontrado que inhibe la proliferación de algunos tumores como aquellos derivados de mutaciones en el gen *KRAS*. Esto es debido a que *NOP56* que se participa en varias vías de señalización esenciales para el desarrollo como p38/MAPK y JAK/STAT. Por ello, se sugirió que los niveles de mRNA de *NOP56* podrían ser un biomarcador potencial de tumores (Mannoor *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2023). En la SCA36, los alelos normales presentan repeticiones de GGCCTG que varían entre 3 y 14 repeticiones y los alelos patológicos suelen tener 650 o más repeticiones con inestabilidad meiótica, aunque se han encontrado expansiones intermedias (30-50 repeticiones) que se presuponen patológicas. (Kobayashi *et al.*, 2011; García-Murias *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2012). Se ha propuesto que su patología da lugar a mecanismos de ganancia de función tóxica puesto en modelos celulares se ha demostrado que se producen acumulaciones focales de ARN y de dipéptidos resultantes de la traducción RAN (traducción no mediada por ATG). Las acumulaciones focales intracelulares de ARNs en el encéfalo alteran la función normal de los factores involucrados en la transcripción y el empalme de las proteínas a través del secuestro de proteínas de unión al ARN, dando lugar a pérdida neuronal en las células de Purkinje y en los núcleos dentados cerebelosos (McEachin *et al.*, 2020). En modelos de ratones en los que se inyectaron expansiones patológicas de SCA36 se observaron inclusiones de dipéptidos y acumulaciones focales de ARN en el cerebro, pérdida de células de Purkinje y defectos

locomotores (McEachin *et al.*, 2020; Todd *et al.*, 2020). A pesar de los estudios de modelos de ratón de SCA36, los tratamientos actuales para la SCA36 únicamente se limitan a aliviar los síntomas y no se dirigen a los mecanismos biológicos subyacentes. Debido a la interacción de NOP56 en múltiples vías moleculares, resultaría interesante conocer como la infraexpresión de esta proteína podría afectar molecular y fenotípicamente a un organismo vertebrado.

La enfermedad de Niemann Pick tipo C (NPC) es un trastorno metabólico de herencia autosómica recesiva con gran variabilidad en sus manifestaciones clínicas, entre las que es habitual la presencia de ataxia, además de distonía, parkinsonismo, alteraciones cognitivas y psiquiátricas. Aunque suele tener un inicio temprano, puede presentarse también en el adulto, por lo que debe incluirse en el diagnóstico diferencial de las ataxias de inicio tardío. Desde el punto de vista bioquímico e histopatológico el NPC se caracteriza por la acumulación de lípidos en distintos órganos. A nivel visceral puede cursar con hepatoesplenomegalia. En la mayor parte de los casos (estimado en un 95%) se debe a mutaciones en el gen *NPC1*, en el resto de los casos la enfermedad es causada por mutaciones en el gen *NPC2* (Walkley y Suzuki, 2004; Vanier, 2010). Ambos genes tienen funciones en el transporte intracelular de lípidos, por lo que su déficit interfiere en el transporte normal de lípidos desde los endosomas y lisosomas hasta el aparato de Golgi y la membrana plasmática, lo que ocasiona su acumulación (principalmente colesterol y esfingomielina). Aunque la acumulación de lípidos ocurre en todos los tipos celulares, las neuronas son especialmente vulnerables ante las deficiencias de NPC1. Además, la expresión de NPC1 en las neuronas no solo ocurre en los cuerpos celulares, sino también en los terminales de los axones y en los sinaptosomas. Por lo que se cree que NPC1 podría tener también funciones sinápticas (Gascón-Bayarri *et al.*, 2022). Se han identificado hasta la fecha más de 460 mutaciones patogénicas a lo largo del gen *NPC1* y se relacionaron con diversos grados de patogénesis que varían entre inicio temprano y enfermedad del adulto lentamente progresiva. Debido al alto número y variabilidad de variantes (algunas de ellas “privadas” esto es, restringidas a un solo caso o a una sola familia), junto con la gran heterogeneidad de las manifestaciones clínicas incluso entre pacientes portadores de las mismas variantes, hace muy difícil poder establecer una correcta correlación genotipo-fenotipo (Fernandez-Valero *et al.*, 2005; Dardis *et al.*, 2020). Además, la alta variabilidad fenotípica entre individuos de la misma familia (e incluso en gemelos monocigóticos), hace sospechar que esta enfermedad se produce como resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales. Estos podrían ser eventos epigenéticos como cambios en la metilación del ADN o en la acetilación de histonas, que son sensibles a estímulos externos. Sin embargo, se ha observado que los fenotipos severos o letales infantiles se asociaron con mutaciones nulas, mientras los pacientes afectados por mutaciones de cambio de sentido presentaban fenotipos más leves de inicio juvenil o adulto (Dardis *et al.*, 2020). Actualmente el único tratamiento disponible para la enfermedad es Miglustat que inhibe la glucosilceramidasa Beta 2 y retrasa la progresión de los síntomas neurológicos. Actualmente también se está probando en pacientes de NPC, el medicamento Efavirenz que es un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa que se utiliza principalmente para tratar la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. En pacientes con NPC este medicamento actúa corrigiendo los cambios sinápticos debidos a la deficiencia de NPC1 y por lo tanto compensando las alteraciones cognitivas y psiquiátricas (Gascón-Bayarri *et al.*, 2022). No hay ningún tratamiento disponible para los síntomas digestivos (Ridley *et al.*, 2013). La proteína NPC1 está formada por 13 dominios transmembrana entre los que se encuentran un dominio N-terminal, un dominio medio luminal, un dominio de detección de esteroides y un dominio C-terminal asociado a un bucle luminal rico en cisteína. En torno a un 45% de las mutaciones en el gen *NPC1* se encontraron en el bucle luminal rico en cisteína y se asociaron principalmente

a pacientes con alteraciones neurológicas de inicio infantil y alteraciones del colesterol severas (Millat *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2003; Gelsthorpe *et al.*, 2008). Se desarrollaron diversos modelos animales para NPC en los cuales se reprodujeron los síntomas digestivos y neurológicos de la enfermedad y además fueron empleados para testar fármacos. Entre ellos se crearon dos modelos mutantes en pez cebra para *npc1* en el dominio N-terminal, ambos tenían una elevada mortalidad en periodo juvenil, retraso del crecimiento, acumulación de lípidos en el hígado y otros órganos digestivos y alteraciones locomotoras (Lin *et al.*, 2018; Tseng *et al.*, 2018; Tseng *et al.*, 2021).

OBJETIVOS

Objetivos

Los objetivos específicos de esta tesis doctoral son:

- Conocer y comparar la contribución de los estudios realizados hasta la fecha en modelos de pez cebra de ataxias dominantes, recesivas y ligadas a X, analizando sus aportaciones tanto en la caracterización de sus mecanismos como en la búsqueda de posibles tratamientos.
- Estudio fenotípico, celular y molecular de una línea de pérdida de función de *nop56*, el gen causante de SCA36.
- Creación de una línea de SCA36 mediante la inserción de expansiones repetidas intermedias (30-50 repeticiones) y su caracterización.
- Generación y caracterización fenotípica y molecular de una línea de pez cebra *knock out* para *npc1*, el gen causante de la enfermedad de Niemann-Pick C (NPC).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y métodos

En esta sección se describen brevemente los materiales y métodos utilizados en este trabajo. Información más detallada se puede encontrar en la sección de material y métodos de cada uno de los capítulos, con la excepción de los experimentos para generar un modelo con la expansión de SCA56 (datos no publicados).

Para la revisión de los estudios de modelos de pez cebra de ataxias se examinaron en las bases de datos *ZFIN* y *Pubmed* todas las publicaciones relacionadas con el pez cebra referentes a genes causantes de ataxias. Para la búsqueda de los genes causantes de ataxias, estos estudios se basaron en la clasificación de Bird de 2019 de ataxias.

Los peces cebra utilizados en este trabajo pertenecen al animalario de pez cebra del departamento de Zoología, Genética y Antropología Física de la Universidad de Santiago de Compostela (código de registro: ES270280346401 AE-LU-003). Todos los procedimientos empleados fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela y de la Xunta de Galicia (número de expediente: 03/20/LU-003) y siguen las regulaciones y leyes establecidas por la Unión Europea (2010/63/UE) y por el Real Decreto 1386/2018 para la experimentación animal.

Para la creación de un modelo con la expansión de SCA36 se amplificó el ADN de pacientes con expansiones de entre 30 y 50 repeticiones y de controles de 9 repeticiones con el kit *AmpliTaq Gold 360* (Applied Biosystems; Waltam, USA) y los primers: 2581 Fb: 5' CGACGGTGGGGGTTTC 3' y NOL5A-1R: 5' AACGCAACCTCAGCGTCT 3'. Se utilizó el protocolo de termociclador: 95°C 10 min; 35 ciclos de: 95°C 1 min, 60°C 1 min y 72°C 4 min y +10s cada ciclo; 72°C 15 min. El éxito de la amplificación se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se clonaron 4µl de PCR con 1µl de vector TOPO y 1 µl de solución salina del kit *PCR8 pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit* (Thermofisher; Waltam, USA) la reacción se incubó durante 30 min. La transformación bacteriana se realizó con *One Shot TOP10 E.coli* (Thermofisher) añadiendo 2µl de la reacción de clonado, tras la incubación con el protocolo recomendado por el fabricante, entre 30 y 50 µl del cultivo bacteriano se sembró en placas LB con 100 µg/ml de espectinomicina hasta el día siguiente. Las colonias resultantes se recrecieron en LB líquido con 100 µg/ml de espectinomicina y las 12h se purificaron con el protocolo recomendado de *Purelink Quick Plasmid Miniprep Kit* (Thermofisher) y después se corrieron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% y se extrajeron las bandas con *PureLinkR Quick Gel Extraction Kit* (Thermofisher) utilizando el protocolo recomendado por el fabricante. Finalmente se realizó la secuenciación Sanger de las colonias extraídas mediante miniprep con el sistema *3730xl DNA Analyzer* (Thermo Fisher Scientific).

El modelo de pez cebra de *nop56* fue obtenido a través del *European Zebrafish Resource Center* (EZRC). Se analizó el genotipo de embriones procedentes de cruces de heterocigotos a distintas edades (de 1 a 7 dpf) para estimar su porcentaje y poder determinar si había diferencias de supervivencia. Se realizó una caracterización exhaustiva de su fenotipo mediante la toma de imágenes por microscopia confocal (Leica TCS SPE, Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania) y de fluorescencia con el microscopio invertido (*AZ100 Multizoom*, Nikon; Tokio, Japón) y el

uso de los anticuerpos: *rabbit anti-5-HT* (Immunostar; Still Water, USA), *Zebrin II (mouse anti-Aldolase C)*; regalado por el profesor Richard Hawkes), *alpha-tubulin* (Sigma-Aldrich; Saint Louis, USA) o *SV2* (DSHB; Iowa, USA). La locomoción se analizó mediante la cuantificación de la distancia recorrida en un periodo de una hora alternando luz y oscuridad y mediante el análisis de la distancia recorrida tras el test de escape con el equipo Zebrabox (Viewpoint). (Viewpoint; Civrieux, Francia). Se utilizó la tinción de naranja de acridina para cuantificar la apoptosis y se realizó un análisis de expresión mediante RT-qPCR.

El modelo de pez cebra de *npc1* se creó mediante la técnica CRISPR/cas9 (Doudna y Charpentier, 2014). Los gRNAs se diseñaron mediante la aplicación CRISPRscan (Moreno-Mateos et al., 2015) y se inyectaron en embriones de estadio de una célula junto a la proteína de la cas9 (True cut cas9, Thermofisher). Se analizó el genotipo de embriones procedentes de cruces de heterocigotos a distintas edades (de 1 a 6 semanas postfecundación, spf) para estimar su porcentaje y poder determinar si había diferencias de supervivencia. Su fenotipo fue analizado tanto por la toma de imágenes con un microscopio invertido (AZ100 Multizoom, Nikon) como a partir de cortes histológicos. La locomoción se analizó mediante la cuantificación de la distancia recorrida en un periodo de una hora alternando luz y oscuridad con el equipo Zebrabox (Viewpoint). Se realizó una tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal anti-Niemann Pick C1 (ab134113, Abcam; Cambridge, UK). Se utilizaron tinciones de lípidos de filipina (Polysciences; Warrington, UK), de esfingomiélin (sphingomyelin bodipy D3522, ThermoFisher) y de colesterol (Topfluor Cholesterol 810255P, Avanti; Webster, USA). Por último, se realizó un análisis por RNAseq comparando el nivel de expresión del transcriptoma completo en mutantes y controles de la casa comercial Novogene (Cambridge, UK). Se estudió el perfil lipídico de mutantes y controles obtenidos a través de la casa comercial Lipotype GmbH (Dresde, Alemania).

CAPÍTULO I

Zebrafish Models of Autosomal Dominant Ataxias

Ana Quelle-Regaldie ¹ , Daniel Sobrido-Cameán ^{2,†} , Antón Barreiro-Iglesias ^{2,*‡} , María Jesús Sobrido ^{3,‡} and Laura Sánchez ^{1,4,‡} 

¹ Department of Zoology, Genetics and Physical Anthropology, Faculty of Veterinary Science, Universidade of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; ana.quelle@usc.es (A.Q.-R.); lauraelena.sanchez@usc.es (L.S.)

² Department of Functional Biology, CIBUS, Faculty of Biology, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain; ds918@cam.ac.uk

³ Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Servicio Galego de Saúde, 15006 Coruña, Spain; ssobrido@gmail.com

⁴ Preclinical Animal Models Group, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), 15706 Santiago de Compostela, Spain

* Correspondence: anton.barreiro@usc.es

† Present address: Department of Zoology, University of Cambridge, Cambridge CB2 3EJ, UK.

‡ These authors contributed equally to the manuscript.

Keywords: zebrafish; hereditary dominant ataxias; spinocerebellar ataxias; expanded repeats; X-fragile; neurodegenerative disorders; genetic edition

Quelle-Regaldie, A., Sobrido-Cameán, D., Barreiro-Iglesias, A., Sobrido, M. J., & Sánchez, L. (2021). Zebrafish models of autosomal dominant ataxias. *Cells*, 10(2), 421. doi: 10.3390/cells10020421

CAPÍTULO II



Article

A *nop56* Zebrafish Loss-of-Function Model Exhibits a Severe Neurodegenerative Phenotype

Ana Quelle-Regaldie ^{1,2} , Mónica Folgueira ^{3,4} , Julián Yáñez ^{3,4} , Daniel Sobrido-Cameán ^{5,†} ,
Anabel Alba-González ^{3,4} , Antón Barreiro-Iglesias ⁵ , María-Jesús Sobrido ² and Laura Sánchez ^{1,*}

¹ Department of Zoology, Genetics and Physical Anthropology, Faculty of Veterinary Science, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; ana.quelle@usc.es

² Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Servicio Galego de Saúde, 15008 La Coruña, Spain; ssobrido@gmail.com

³ Department of Biology, Faculty of Sciences, University of A Coruña, 15008 La Coruña, Spain; m.folgueira@udc.es (M.F.); julian.yanez@udc.es (J.Y.); anabel.albag@udc.es (A.A.-G.)

⁴ Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), University of A Coruña, 15008 La Coruña, Spain

⁵ Department of Functional Biology, Faculty of Biology, Centro de Investigaciones Biológicas CIBUS, University of Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain; ds918@cam.ac.uk (D.S.-C.); anton.barreiro@usc.es (A.B.-I.)

* Correspondence: lauraelena.sanchez@usc.es

† Present Address: Department of Zoology, University of Cambridge, Cambridge CB2 3EJ, UK.

Keywords: zebrafish; neurodegeneration; animal models; genetic edition





Quelle-Regaldie, A.; Folgueira, M.; Yáñez, J.; Sobrido-Cameán, D.; Alba-González, A.; Barreiro-Iglesias, A.; Sobrido, M.-J.; Sánchez, L. (2022) A *nop56* Zebrafish Loss-of-Function Model Exhibits a Severe Neurodegenerative Phenotype.

Biomedicines, 10 1814. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081814>.

CAPÍTULO III

Review

Zebrafish Models of Autosomal Recessive Ataxias

Ana Quelle-Regaldie ¹ , Daniel Sobrido-Cameán ^{2,†} , Antón Barreiro-Iglesias ^{2,‡} , María Jesús Sobrido ^{3,‡}
and Laura Sánchez ^{1,4,*} 

¹ Department of Zoology, Genetics and Physical Anthropology, Faculty of Veterinary Science, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; ana.quelle@usc.es

² Department of Functional Biology, CIBUS, Faculty of Biology, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain; ds918@cam.ac.uk (D.S.-C.); anton.barreiro@usc.es (A.B.-I.)

³ Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Servicio Galego de Saúde, 15006 A Coruña, Spain; ssobrido@gmail.com

⁴ Preclinical Animal Models Group, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), 15706 Santiago de Compostela, Spain

* Correspondence: lauraelena.sanchez@usc.es

† Current address: Department of Zoology, University of Cambridge, Cambridge CB2 3EJ, UK.

‡ These authors contributed equally to the manuscript.

Keywords: zebrafish; hereditary recessive ataxias; neurodegenerative disorders; genetic edition

Quelle-Regaldie,A.; Sobrido-Cameán,D.; Barreiro-Iglesias,A.; Sobrido,M.J.; Sánchez,L. (2021) Zebrafish Models of Autosomal Recessive Ataxias. *Cells*, *10*, 836.<https://doi.org/10.3390/cells10040836>

CAPÍTULO IV

Severe neurometabolic phenotype in *npc1*^{-/-} zebrafish with a C-terminal mutation

Ana Quelle-Regaldie¹, Nerea Gandoy-Fieiras^{2†},
Paula Rodríguez-Villamayor^{1,2†}, Sandra Maceiras,
Ana Paula Losada^{2†}, Mónica Folgueira³, Pablo Cabezas-Sáinz¹,
Antón Barreiro-Iglesias⁴, María Villar-López¹,
María Isabel Quiroga-Berdeal², Laura Sánchez^{1*†} and
María Jesús Sobrido^{5*†}

¹Department of Zoology, Genetics and Physical Anthropology, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Spain, ²Department of Anatomy, Animal Production and Veterinary Clinical Sciences, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Spain, ³Department of Biology, Universidade da Coruña, A Coruña, Spain, ⁴Department of Functional Biology, Faculty of Biology, CIBUS, Spain, ⁵Hospital Teresa Herrera, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña, A Coruña, Spain

Keywords: zebrafish, Niemann Pick, lipid accumulation, neurodegeneration, genetic edition

Quelle-Regaldie A, Gandoy-Fieiras N, Rodríguez-Villamayor P, Maceiras S, Losada AP, Folgueira M, Cabezas-Sáinz P, Barreiro-Iglesias A, Villar-López M, Quiroga-Berdeal MI, Sánchez L and Sobrido MJ. (2023) Severe neurometabolic phenotype in *npc1*^{-/-} zebrafish with a C-terminal mutation. *Front. Mol. Neurosci.* 16:1078634.
doi:10.3389/fnmol.2023.1078634

DISCUSIÓN

Discusión

Las ataxias son un grupo heterogéneo de enfermedades que tienen en común la disfunción del cerebelo y sus conexiones (Koeppen *et al.*, 2013). Desde el punto de vista molecular la mayor parte de las proteínas afectadas interactúan en múltiples rutas y mecanismos en común independientemente de su herencia autosómica dominante o autosómica recesiva (Smeets y Verbeek, 2014; Eidhof *et al.*, 2019). La frontera entre ataxia autosómica dominante y autosómica recesiva es difusa debido no solo a las rutas moleculares que comparten sino también a los fenotipos superpuestos y a los genes que comparten (Sidransky *et al.*, 2009). Estas enfermedades son discapacitantes y carecen de tratamiento más allá de paliativos para algunos de sus síntomas, por lo que son necesarios modelos *in vivo* adecuados tanto para poder estudiar sus mecanismos patogénicos como para la búsqueda de tratamientos efectivos. El pez cebra es un modelo interesante para la investigación biomédica debido a su disposición corporal similar al ser humano y a su homología genómica de más del 70% (Howe *et al.*, 2013). Además, presenta ventajas sobre otros modelos vertebrados como son su alta fertilidad, tiempos de generación más cortos, ser fácil de estabular y criar, además de ser más barata su producción, lo que hace posible la producción de modelos a gran escala (Lieschke y Currie, 2007). Por lo tanto, en esta tesis hemos estudiado la contribución del pez cebra al estudio de las ataxias autosómicas dominantes y ligadas a X (capítulo I), hemos generado un modelo de pérdida de función para el gen *nop56*, causante de SCA36, una ataxia autosómica dominante (capítulo II), hemos estudiado la contribución del pez cebra al estudio de las ataxias autosómicas recesivas (capítulo III) y hemos generado un modelo para NPC, una ataxia autosómica recesiva (capítulo IV).

En el capítulo I de esta tesis hemos revisado la contribución de 24 estudios de modelos de pez cebra para 11 tipos de ataxias autosómicas dominantes, de 10 estudios de X-frágil y síndrome del temblor/ataxia asociado a X-frágil causado por mutaciones en el gen *FMR1* (FXTAS/FMR1). En total se revisaron 36 modelos distintos de pez cebra de ataxias dominantes y 7 modelos de pez cebra para X-frágil y FXTAS/FMR1. De estos modelos un 49% (18 modelos de ataxias dominantes y 3 de X-frágil y FXTAS/FMR1) fueron creados mediante *knock down* con morfolinos (con la excepción de uno de los modelos de X-frágil y FXTAS/FMR1 para el que se utilizó *knock down* mediante DNazyme). Los morfolinos son modelos transitorios debido a que al consistir en oligómeros antisentido, se degradan en pocos días. Estos fueron muy populares desde su aparición, puesto que son un modelo de aplicación sencilla y económica. Sin embargo, su utilidad para el estudio de las ataxias dominantes es muy discutible puesto que siendo modelos transitorios no permiten modelizar la enfermedad más allá de dos o tres días y además no reproducen la ganancia de función tóxica asociada a estas enfermedades, si no una completa pérdida de función. Únicamente pueden ser beneficiosos para estudiar la función del gen o el efecto de mecanismos de pérdida de función. De todas formas, hay que ser muy cautelosos con los estudios de modelos creados mediante morfolinos debido a que se ha observado que esta técnica habitualmente produce un elevado número de efectos “off-target” lo que quiere decir que a veces provocan alteraciones genéticas lejos de su sitio objetivo. (Heasman, 2002). Además, se ha indicado que en ocasiones los morfolinos causan fenotipos más letales a causa de una hibridación oligonucleotídica que provoca un aumento de la carga catiónica asociada a la entrada del morfolino (Ferguson *et al.*, 2014). Por ello se considera que para su uso eficiente es necesario validarlos con pruebas como rescate de ARNm, inmunohistoquímica, RT-qPCR y Western blot o coinyección con un morfolino para *p53* (para

comprobar que no haya efectos off-target debido a la activación de cascada apoptótica mediada por la proteína p53). Además, siempre hay que complementarlos con estudios en mutantes (Stainier *et al.*, 2017). En todos los estudios que se han revisado de ataxias dominantes y ligadas a X en los que se han empleado morfolidos se ha observado un fenotipo altamente patológico. En todos ellos se ha utilizado algún método de validación de los morfolidos siendo el más común el rescate con mRNA (en un 78% de los modelos) no patológico humano o de pez cebra. También en un 50% de los estudios con morfolidos se ha comprobado el efecto de estos por RT-qPCR o por Western blot en un 36% de los casos. Sin embargo, solo 2 de los 20 estudios en los que se emplearon morfolidos coinyectaron *p53* para comprobar que el fenotipo no se debía a efectos *off-target*. Por lo que en los modelos restantes es muy discutible si el fenotipo es debido a la inactivación del mRNA o la proteína o a efectos fuera del sitio diana. A mayores, únicamente en otro de los estudios en los que se utilizaron morfolidos, se creó también una línea mutante por CRISPR/cas9 para el mismo gen que recapituló el fenotipo patológico observado en el morfolino (Carrillo-Rosas *et al.*, 2019). También resulta curioso que un 28% de los modelos de ataxias dominantes y ligadas a X que hemos estudiado en el capítulo I de esta tesis, sean modelos mutantes de pérdida de función. Por lo que un total de un 77% de los modelos estudiados no representan la ganancia de función tóxica asociada a estas enfermedades.

La creación de modelos de pérdida de función de genes asociados a enfermedades por expansión ha demostrado ser de interés para ayudar a comprender la función del gen y discernir las causas y mecanismos fisiológicos, moleculares y celulares de la proteína asociada. Por ejemplo, en el caso de la ataxia espinocerebelosa tipo 37 (SCA37) cuyos síntomas son bastante similares a los de la SCA36, los modelos de pérdida de función del gen implicado en la enfermedad, *reelina* permitieron observar defectos laminares en las neuronas periventriculares de la retina, posicionamiento atípico de las células de Purkinje, proporción aumentada de células de Purkinje y neuronas de tipo I ectópicas con proyecciones anormales de fibras aferentes paralelas y ascendentes en las regiones dendríticas, células ectópicas euridendroides y células de la glia de Bergmann y reducción de comportamientos exploratorios. Estos defectos demostraron la implicación de la *reelina* en la laminación sináptica del sistema visual, en los mecanismos que subyacen a la novedad social, en la migración de neuronas y células gliales de la zona ventricular y en la atracción de axones aferentes por parte de las células de Purkinje y de las neuronas de tipo I (Di Donato *et al.*, 2018; Dalla Vecchia *et al.*, 2019; Nimura *et al.*, 2019). Conocer las rutas celulares y moleculares es esencial en última instancia para poder buscar futuros tratamientos.

Una de las limitaciones en estudio de las ataxias dominantes es la dificultad para generar modelos vertebrados de mutaciones que producen ganancia de función tóxica debido a repeticiones de poliglutamina o repeticiones expandidas no codificantes. Es por ello por lo que en los modelos de ganancia de función de ataxias dominantes en un 66% de ellos se utilizaron modelos de pez cebra temporales que se inyectaron con ARN de las variantes patológicas en caso de mutaciones con cambio de sentido o con constructos de ARN con distinto tamaño de expansión de las repeticiones patológicas en el caso de las mutaciones consistentes en repeticiones expandidas. En cuanto a los modelos permanentes de *knock in*, solo 2 estudios crearon 3 modelos transgénicos con variantes patológicas de cambio de sentido para SCA13 que presentaban alteraciones en las células de Purkinje y alta mortalidad (Issa *et al.*, 2012; Namikawa *et al.*, 2019) El único modelo permanente entre aquellos que revisamos, que se ha generado para ataxias dominantes en pez cebra con repeticiones expandidas es un modelo transgénico para la ataxia de Machado-Joseph o SCA3 donde se inyectaron 23 (expansión no

patológica) y 84 (expansión patológica) repeticiones de CAG. El modelo con la expansión patológica tenía una locomoción reducida y acúmulos de poliglutamina (Watchon *et al.*, 2017). Para X-frágil y FXTAS/FMR1 resulta curioso que todavía no se haya creado ningún modelo con las repeticiones expandidas en pez cebra. Recientemente, se optimizaron modelos de CRISPR/cas *knock in* en pez cebra utilizando como donante ADN monocatenario largo en los que se consiguió una eficiencia del 90%, muy superior al 15-25% de eficiencia obtenida con anterioridad a partir de moldes donantes de ADN (Ranawakage *et al.*, 2021). Debido a las mejoras en la creación de modelos de pez cebra mediante *knock in*, es muy posible que el número de líneas de pez cebra creadas mediante *knock in* aumente próximamente.

Otra limitación de los modelos de pez cebra de ataxias dominantes y ligadas a X estudiados es que en su mayoría (un 80%) solo se realizaron análisis en etapas embrionarias. Esto no es muy sorprendente debido a que la mayoría de estos modelos consistían en modelos transitorios como los morfolinós o la sobreexpresión de ARN y en algunos modelos mutantes como aquellos utilizados para SCA13 (Issa *et al.*, 2012; Namikawa *et al.*, 2019) presentaban un fenotipo altamente patológico. Sin embargo, los modelos mutantes de SCA3 (Watchon *et al.*, 2017) SCA37 (Dalla Vecchia *et al.*, 2019; Nimura *et al.*, 2019) y X-frágil y FXTAS/FMR1 (Den Broeder *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2013; Shamay-Ramot *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017; Constantin *et al.*, 2020; Doll *et al.*, 2020) se estudiaron en edad adulta. Desafortunadamente con la excepción de un estudio (Namikawa *et al.*, 2019), todos ellos estudiaron adultos jóvenes y no a individuos de edades avanzadas. Las ataxias autosómicas dominantes y FXTAS/FMR1 se caracterizan por aparecer predominantemente a edades avanzadas, por lo que los futuros estudios de peces mutantes para estas enfermedades deberían estar enfocados a ampliar el rango de edades a analizar.

Uno de los objetivos principales de la presente tesis era la creación de modelos de pez cebra con diferentes tamaños de expansiones intrónicas hexanucleotídicas repetidas del gen *NOP56* que causan ataxia espinocerebelosa tipo 36 (SCA36) también llamada *ataxia da Costa da Morte*. Sin embargo, a pesar de los numerosos intentos, la amplificación y clonación de las repeticiones en un vector para su posterior introducción en el pez cebra, fue infructuosa. La dificultad en este caso radicó en que la repetición hexanucleotídica GGCCTG posee un alto porcentaje de GC, cerca de un 80%. La ampliación de regiones con un alto porcentaje de GC ha demostrado ser altamente compleja, debido que producen una mayor fuerza del enlace de hidrógeno y generan estructuras secundarias que dificultan la desnaturalización y la unión de los cebadores. Además, pueden dar lugar a la detención de la polimerasa de ADN resultando en una extensión prematura que se caracteriza por la formación de productos no específicos (Frey *et al.*, 2008; Strien *et al.*, 2013). En este caso a pesar de los diferentes protocolos probados para lograr la amplificación de regiones ricas en GC, solo se logró la amplificación y clonación de la expansión no patológica de la SCA36 (9 repeticiones) y todos los intentos por amplificar y clonar repeticiones expandidas intermedias de 30 a 50 repeticiones dieron lugar a la formación de productos no específicos.

En los últimos años se han creado modelos con la expansión de SCA36 en ratones utilizando virus adenoasociados (AAV) (McEachin *et al.*, 2020; Todd *et al.*, 2020) las expansiones fueron amplificadas a partir de PCRs anidadas incluyendo secuencias flanqueantes 5' y 3'. Estos modelos murinos mostraron características propias de pacientes de SCA36 como inclusiones de dipéptidos y focos de ARN en el cerebro, pérdida de células de Purkinje y deterioro de la locomoción (McEachin *et al.*, 2020; Todd *et al.*, 2020). Se espera que en un futuro se pueda crear un modelo de SCA36 con diferentes tamaños de expansiones repetidas en

pez cebra probablemente mediante la generación de fragmentos de oligonucleótidos sintéticos. Este es un procedimiento más sencillo debido a que no requiere amplificación mediante PCR y permite la generación dirigida de secuencias de ADN altamente repetitivas altamente eficientes mediante procedimientos de clonación estándar (Scior *et al.*, 2011).

Aunque se considera que la ganancia de función tóxica de NOP56 debido a las repeticiones expandidas no codificantes y a los focos de ARNm son las causantes de SCA36, otros estudios en enfermedades causadas por zonas repetitivas de ADN, como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) sugirieron la posibilidad de la combinación de mecanismos tanto de ganancia de función tóxica como de pérdida de función que actúan sinérgicamente en este tipo de enfermedades (Casella *et al.*, 2016; Baskoylu *et al.*, 2018). Debido a ello y a que no se conoce la función de la proteína NOP56 ni lo que sucedería en el caso de una reducción de los niveles de ARNm o de la disfunción de la proteína, en el capítulo II de esta tesis se estudió un modelo de pez cebrado de pérdida de función del gen *nop56*. El estudio de un modelo de pérdida de función de *nop56*, podría ayudar no solo a aumentar el conocimiento sobre las funciones del gen implicado, sino también a profundizar en los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la patogénesis en la SCA36.

El modelo de pérdida de función de *nop56* supone el primer estudio de pérdida de función en *nop56* creado en un vertebrado, ya que anteriormente solo se había creado un modelo de pérdida de función en *Drosophila melanogaster*, en el que únicamente se estudiaron los defectos en el desarrollo del lóbulo óptico (Wang *et al.*, 2013). En el modelo de pez cebrado estudiado se observó un fenotipo altamente patológico, los mutantes carecían de cerebelo, presentaban un reducido mesencéfalo, un tamaño corporal más pequeño, una defectuosa inervación de los miómeros del cuerpo, edema cardíaco, y malformaciones en el oído, ojo y mandíbula que finalmente culminaba con la muerte antes de 7 dpf. La locomoción en este mutante se encontró altamente comprometida. En la caracterización de su fenotipo destacan sin embargo dos hallazgos: la apoptosis prácticamente restringida al sistema nervioso y el reducido número de neuronas serotoninérgicas de la médula espinal. La muerte celular específicamente de células del sistema nervioso se observó en otras enfermedades neurodegenerativas y se relacionó con que estas mutaciones afectaron a un conjunto de factores reguladores y subconjuntos específicos de genes que son particularmente esenciales para la función normal en las células y tejidos neuronales afectados (Matilla-Dueñas *et al.*, 2014). Sería interesante y ayudaría al establecimiento de la patogénesis de la SCA36, caracterizar el transcriptoma de los mutantes de *nop56* para conocer los factores reguladores y subconjunto de genes afectados. El sistema serotoninérgico podría ser una diana para nuevos tratamientos para pacientes de SCA36 y otras ataxias, puesto que se ha observado en modelos animales de ataxia y de otras enfermedades neurodegenerativas, que el tratamiento con agentes serotoninérgicos mejoraba sustancialmente la locomoción (Mochizucki, 2004; Takei *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020).

Además, mediante estudios de expresión por RT-qPCR del modelo de pérdida de función de *nop56*, se observó afectación del procesamiento del ARN ribosómico, sobreexpresión de los genes *nop58* y *fbl*, que junto a *nop56* forman parte de la caja C/D de la ribonucleoproteína pequeña nucleolar que son requeridos para el ensamblaje de la subunidad ribosomal de 60S. Se observó reducida expresión de los genes *c9orf72* (implicado en la autofagia y en el tráfico de endosomas), *fus* (implicado en transcripción empalme y exportación al citoplasma del ARN y la reparación del ADN) y *tardbp* (involucrado en la transcripción, en varios pasos de la biogénesis y procesado del ARN y en la reparación del ADN) que están relacionados con la

ELA, por lo que parece que ambas enfermedades podrían tener vías moleculares en común. También es interesante que la expresión de los genes ortólogos *zpld1a* y *zpld1b* que están directamente implicados en el desarrollo de la cúpula del oído interno, el cual es responsable del equilibrio, estaba muy reducida. En pacientes de ataxia se ha observado que el equilibrio es altamente dependiente de la integridad del sistema vestibular del oído interno (los órganos otolitos y los canales semicirculares), cuando su función está comprometida, se producen mareos o pérdida de equilibrio (Santos *et al.*, 2017). Por último, no resultó sorprendente encontrar expresión muy reducida de genes que se expresan en tipos específicos del cerebelo (debido a su ausencia) como son *ptfla* y *grid2* (que se expresan en las células de Purkinje e intervienen en el desarrollo del sistema nervioso y en la neurotransmisión y sinaptogénesis) y de *cbln12* (que se expresan en las células granulares y tiene funciones en el mantenimiento de las sinapsis) ni sobreexpresión de los genes *p21* y *p53* que están relacionados con el control del ciclo celular y la apoptosis, debido a la apoptosis restringida al sistema nervioso.

En el capítulo III de esta tesis hemos revisado la contribución de 71 estudios de modelos de pez cebra para 25 tipos de ataxias autosómicas recesivas. En total se revisaron 111 modelos de ataxias recesivas de los cuales un 72% de ellos fueron creados mediante morfolinolinos, un 23% eran modelos mutantes (un 42% creados mediante ENU, un 35% mediante CRISPR/cas9 y los restantes mediante TALENs o transgénesis) y solo unos pocos fueron creados por otras técnicas como sobreexpresión de ARN, modelos farmacológicos o siRNA. Al contrario de lo que sucede con las ataxias dominantes, el empleo de los morfolinolinos para el estudio de las ataxias recesivas podría resultar adecuado puesto que estas son consideradas enfermedades de pérdida de función. Sin embargo, tal y como hemos dicho anteriormente, los morfolinolinos necesitan ser validados. El 91% de los estudios de ataxias recesivas que emplearon morfolinolinos fueron validados, siendo los métodos más comunes la RT-qPCR (51%) y el rescate mediante ARN humano, murino o de pez cebra (44%). Además, hubo un aumento significativo respecto a los estudios con ataxias dominantes del empleo de coinyección con *p53* (en un 33% de los modelos) para comprobar que el fenotipo no se debía a efectos *off-target*. Solo en un 15% de estos trabajos, se compararon los modelos morfantes con modelos mutantes. Realizar la validación de los modelos de morfolinolinos mediante modelos mutantes es bastante común en los trabajos más recientes, por lo que próximamente los datos presentados por este tipo de modelos serán considerados mucho más significativos. En un 16% de estos estudios correspondientes a 5 tipos de ataxias recesivas los peces no presentaron ninguno de los síntomas neurológicos asociados con estas ataxias, pero si algún síntoma no neurológico. En varios de esos estudios se buscaba analizar otras vías moleculares no neuronales por lo que no se estudió el sistema nervioso ni se realizaron estudios comportamentales, debido a ello, no se puede descartar la presencia de neurodegeneración en estos modelos. En dos de los casos, los modelos morfantes y mutantes de ataxia telangiectasia (Imamura y Kishi, 2005; Vierstraete *et al.*, 2020) y el modelo mutante para SCAR20 se estudió tanto el sistema nervioso como se realizaron análisis de locomoción y a pesar de ello no mostraron ningún fenotipo neural, por lo que se podría especular que quizás las funciones de las proteínas relacionadas de los peces cebra no se corresponden completamente con las humanas.

En estos modelos, aproximadamente la mitad de estos estudios no se hicieron con la intención de modelizar las ataxias recesivas, sino más bien con la intención de estudiar procesos moleculares y celulares que se producen debido a la disfunción de la proteína asociada. Es por ello que tan solo en un 30% de estos trabajos se realizaron estudios comportamentales que en muchos casos se correspondían simplemente con afirmaciones como “locomoción anormal” “dificultad para mantener la postura”, “síntomas de ataxia” o “temblores” sin la realización de

ninguna medición o análisis. Esto contrasta con los estudios comportamentales de ataxias dominantes donde se analizó el comportamiento en un 45% de los trabajos, principalmente las distancias que recorrieron los distintos genotipos, la respuesta de escape y en algunos casos temblores y ansiedad. En el 70% de los trabajos de X-frágil y FXTAS/FMR1 se reportaron fenotipos de ansiedad e hiperactividad que son característicos de estas patologías (Wheeler *et al.*, 2014). Debido a que no hay un consenso de que tipo de análisis comportamentales son necesarios para modelizar ataxias en pez cebra y cada autor utiliza unos diferentes, es muy necesario estandarizar los análisis para mejorar la optimización de los fenotipos comportamentales en las ataxias.

Otra limitación de estos estudios es la pobre caracterización de la expresión proteica o genómica, la cual es imprescindible para conocer los mecanismos asociados a los procesos de fisiopatología molecular. En las ataxias dominantes solo se realizó este tipo de análisis en el 12,5% de los trabajos, en las ataxias recesivas en un 22% y en X-frágil y FXTAS/FMR1 en el 50%. En su mayoría los análisis de expresión se limitaron a unos pocos genes o proteínas y en ningún caso se realizó un RNAseq o un estudio proteómico exhaustivo.

En los últimos meses desde la publicación de las dos revisiones de modelos de pez cebra para ataxias dominantes (capítulo I) y modelos de pez cebra para ataxias recesivas (capítulo III), se han creado nuevos modelos de pez cebra para ataxias tanto dominantes como recesivas. A diferencia de los modelos anteriores que fueron diseñados principalmente a partir de morfolidos, estos nuevos modelos se crearon en su mayoría a partir de la técnica CRISPR/Cas9. Entre estos modelos de CRISPR/Cas9 destacan los modelos creados de ataxia telangiectasia (Chen *et al.*, 2022; Vierstraete *et al.*, 2022), de ataxia episódica tipo 1 (EA1) (Dogra *et al.*, 2022), del gen *stxb1* que provoca la ataxia espinocerebelosa recesiva tipo 16 (SCAR16) y de la ataxia espinocerebelosa tipo 48 (SCA48) (Pakdaman *et al.*, 2021), de ataxia autosómica recesiva de Charlevoix-Saguenay (ARSACS) (Naef *et al.*, 2021). Estos estudios son muy importantes puesto que de las ataxias SCAR16, SCA48 y ARSACS no existían modelos previos de pez cebra (Naef *et al.*, 2021; Pakdaman *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022) y de la EA1 no había ningún modelo mutante, solo había un modelo creado mediante morfolidos que ha sido validado mediante la creación del modelo mutante (Ibhazehiebo *et al.*, 2018; Dogra *et al.*, 2022).

Además, también se han creado modelos de ataxia espinocerebelosa tipo 49 (SCA49) y de ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) por primera vez en pez cebra. El modelo de SCA49 fue creado mediante sobreexpresión de ARNm y en él se observaron alteraciones en la locomoción y en las funciones vestibulares y sensoriales (Corral-Juan *et al.*, 2022). El modelo de SCA1 se creó mediante transgénesis en las células de Purkinje de expansiones control y patológicas. En el modelo de pez cebra con la expansión patológica se observó una alta degeneración de células de Purkinje que aumentaba con la edad y un reducido comportamiento exploratorio (Elsaey *et al.*, 2021). Este modelo junto con el modelo transgénico de ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3) (Watchon *et al.*, 2017) (revisados en capítulo I), son los únicos modelos permanentes con expansiones repetidas en pez cebra. Además, pocos modelos se han creado en pez cebra con expresión específica en las células de Purkinje siendo este y otro modelo transgénico de ataxia espinocerebelosa tipo 13 (SCA13) con una variante patológica de la enfermedad (Namikawa *et al.*, 2019) los únicos ejemplos en ataxias. La creación de modelos con expresión específica en distintos tipos neurales es muy importante en el estudio de las ataxias, puesto que permite delimitar la contribución de los distintos tipos neurales en la progresión de la enfermedad sobre todo en el caso de las células de Purkinje que se caracterizan por ser el tipo celular más afectado (White *et al.*, 2021).

Cuando decidimos crear el modelo de NPC lo hicimos en base a que al inicio de esta tesis (2017) no había ningún modelo mutante estable de pez cebra creado para NPC. Estudios previos de modelos de morfolinós para *npc1* arrojaban datos interesantes como: retraso de la epibolia, desorganización del citoesqueleto de actina, aumento de apoptosis, reducido tamaño y notocorda y somitas más estrechos, aumento de la trombocitopenia, anemia, reducción de eritrocitos y aumento de colesterol intracelular (Schwend *et al.*, 2011; Louwette *et al.*, 2013). Asimismo, la alta homología del gen *npc1* de pez cebra con el gen humano lo hacía idóneo para la creación de una línea por CRISPR/Cas9. Normalmente los ARNs guías se suelen diseñar para dianas posicionadas lo más cerca posible del inicio de la región codificante del gen, en la región N-terminal, para asegurarse de que las mutaciones de cambio de marco de lectura provoquen una pérdida total de la función del gen (Raes y Van de Peer, 2005). Este fue el caso de los dos modelos de *npc1* en pez cebra diseñados en el año 2018 mediante CRISPR/cas9 que se crearon para los exones 2, 3 y 7 de los 25 exones que tiene el gen *npc1* (Lin *et al.*, 2018; Tseng *et al.*, 2018). Ambos modelos mutantes de pez cebra para *npc1* tenían un tamaño más pequeño comparado con los peces control, una esperanza de vida menor, no sobreviviendo más allá de los 6 u 8 meses, fallos de locomoción, defectos en el hígado, acumulación de colesterol y reducción de células de Purkinje (Lin *et al.*, 2018; Tseng *et al.*, 2018). También se crearon dos modelos para el otro gen implicado en NPC, *npc2*, que mostraron un fenotipo similar a los modelos previos de *npc1*, con tamaño reducido, defectos en la natación, alta respuesta relacionado con la ansiedad y acumulación de colesterol (Tseng *et al.*, 2021; Wiweger *et al.*, 2021).

Los modelos de NPC creados en el capítulo IV de la presente tesis doctoral, *npc1*^{Δ56/ Δ56} y *npc1*^{Δ7/ Δ7}, se crearon para el exón 22 que coincide con el final del bucle luminal rico en cisteína, en la región C-terminal. Es el primer modelo de pez cebra con una mutación en esta región. Las larvas mutantes, de reducido tamaño presentaron defectos en la movilidad y solo un 12% sobrevivieron al mes de vida, falleciendo todas antes de las 5 spf, sin alcanzar la edad adulta. Además, se observaron agregaciones patológicas vacuolares compatibles con la acumulación de colesterol y esfingomielina en el hígado, intestino, túbulos renales y en la materia gris cerebral a partir de las 2 spf. Este tipo de inclusiones en el hígado e intestino fueron reportadas en los modelos anteriormente descritos de NPC (Lin *et al.*, 2018; Tseng *et al.*, 2018; Tseng *et al.*, 2021; Wiweger *et al.*, 2021) apareciendo, sin embargo, en estadios posteriores, en la edad juvenil o adulta. Por lo que los modelos *npc1*^{Δ56/ Δ56} y *npc1*^{Δ7/ Δ7} con un fenotipo más severo, parecen recapitular las formas de inicio más temprano de NPC. Aunque en general se espera que las mutaciones en el extremo C-terminal sean menos dañinas, en estudios previos se observó que influyen mucho en aquellas regiones que son sensibles a la diversificación funcional y están implicadas en interacciones de proteínas como transactivación o represión o en interacciones proteína-proteína (Raes y Van de Peer, 2005). El dominio rico en cisteína ha sido descrito como de baja estabilidad debido a que requiere de mayores uniones de disulfuro para plegarse correctamente (Li *et al.*, 2017) y este tipo de alteraciones genéticas suelen resultar en un incorrecto plegamiento de las proteínas y en la degradación por el retículo endoplasmático (Scott *et al.*, 2004). Esto podría estar sucediendo en los mutantes *npc1*^{Δ56/ Δ56} y *npc1*^{Δ7/ Δ7}, en los cuales la inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal anti-Niemann Pick C1 mostró una ausencia completa de marcaje y el análisis de RNAseq mostró una reducida expresión del ARNm de *npc1*. En modelos de ratón del dominio rico en cisteína, la patogénesis no fue tan severa como en el modelo de pez cebra. Sin embargo, la pérdida de función génica no fue completa ya que no presentaban diferencias en la expresión de niveles de *Npc1* y retenían bajos niveles de la proteína NPC1 (Maue *et al.*, 2012; Praggastis *et al.*, 2015; Rodríguez-Gil *et al.*,

2020). Esto podría ser debido a la localización de la mutación, ya que en ratones se encontraba en el exón 21 y en el caso del modelo de pez cebra aquí descrito, la mutación se situó en el exón 22, al final del dominio rico en cisteína.

Otros datos obtenidos de este trabajo fueron el resultado del análisis de RNAseq de mutantes *npc1*^{Δ56/Δ56} y larvas salvajes de 2 wpf, en el que se encontraron 249 genes diferencialmente expresados que arrojaron nuevas hipótesis sobre las posibles vías moleculares por las que actúa NPC1. Entre estas diferencias de expresión destacan los genes con funciones en el metabolismo y transporte de lípidos, el desarrollo del sistema nervioso, la contracción muscular, actividad del citoesqueleto, la constitución de la matriz extracelular de colágeno y los procesos de angiogénesis y hematopoyesis. Algunas de estas diferencias en la expresión génica como la reducción de la expresión de genes constituyentes de la matriz de colágeno, la angiogénesis y la hematopoyesis, se había visto fisiológicamente afectadas en pacientes de NPC (Louwette *et al.*, 2013; Lyu *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020b). Este es el primer estudio de RNAseq que se ha realizado en tejido completo de un mutante para *npc1*. La mayor parte de las vías moleculares afectadas en mutantes de pez cebra coinciden con las halladas a partir de análisis de RNAseq de fibroblastos de pacientes de NPC (Encarnaçao *et al.*, 2020; Rodriguez-Gil *et al.*, 2021). En los fibroblastos de pacientes se encontraron vías moleculares alteradas de muerte celular, metabolismo de lípidos, desarrollo celular, respuestas de proteínas incorrectas y respuesta al estrés del retículo endoplasmático (Encarnaçao *et al.*, 2020; Rodriguez-Gil *et al.*, 2021) que coincidieron con alteraciones de expresión encontradas en las larvas *npc1* en comparación con las larvas control. Sin embargo, una de las limitaciones de este estudio es que, al haber utilizado tejido completo, genes diferencialmente expresados en el hígado y en el sistema nervioso pueden haber quedado enmascarados. También habría sido interesante estudiar la expresión no solo en controles y mutantes homocigotos, sino también en heterocigotos.

Por último, también se realizó un análisis de perfil lipídico en larvas mutantes *npc1*^{Δ56/Δ56} y en larvas salvajes. El análisis de perfil lipídico demostró una reducción significativa de ésteres de colesterol y un aumento significativo de esfingomiélin. Además, se encontraron diferencias en varios de los fosfolípidos analizados, siendo el fosfatidilglicerol más abundantes en larvas *npc1*^{Δ56/Δ56} y el fosfatidilinositol y el fosfatidato más abundantes en larvas salvajes.

En NPC, la patogénesis y el fenotipo dependen totalmente de la localización de la mutación dentro de los distintos dominios de la proteína, por lo que es muy necesario la creación y caracterización de modelos mutantes con mutaciones situadas en distintos locis. Por ello, otra utilidad de los modelos de pez cebra radica en que pueden ayudar a abordar la complejidad de las correlaciones del genotipo-fenotipo que es uno de los mayores desafíos de estas enfermedades. La mayor parte de las ataxias presentan variantes de mutación en diversos locis del genoma produciendo distintos fenotipos con varios grados de patogénesis. En el caso de algunas de las ataxias revisadas en el Capítulo I, como la SCA13, el tipo de mutación implica que el inicio de la enfermedad sea temprano o tardío (Waters *et al.*, 2006). En numerosos estudios en diversas enfermedades se ha utilizado el pez cebra como modelo para discernir las causas fisiológicas, moleculares y celulares de nuevas variantes recién descubiertas mediante la inyección de estas como ARN en el cigoto. Con ello se ha podido determinar el distinto fenotipo que causan estas mutaciones que en su mayor parte se correspondió con el fenotipo que mostraron los pacientes además de poder discernir las diferencias en las vías moleculares y celulares implicadas (Müller *et al.*, 2001; Issa *et al.*, 2011; Issa *et al.*, 2012; Namikawa *et al.*, 2019; Hsieh *et al.*, 2020). Ahora con la optimización de las técnicas de edición genética por

CRISPR/cas9 la creación de modelos mutantes estables con mutaciones dirigidas a diversos puntos del genoma es más sencilla.

El modelo de pérdida de función de *nop56* caracterizado en la presente tesis doctoral fue creado con ENU y obtenido a partir del EZRC. Los modelos obtenidos a partir de ENU causan mutaciones puntuales y se ha demostrado que son muy fiables. Sin embargo, al contrario que los modelos creados por CRISPR/cas9 y al igual que otros modelos de mutagénesis directa, no pueden ser dirigidos a un lugar específico del genoma (Huang *et al.*, 2012). Como se deseaba diseñar el modelo de *npc1* en una región específica del genoma se decidió crear mediante CRISPR/cas9. Al utilizar la técnica de CRISPR/cas9 se pudo provocar la mutación en la región del genoma que se buscaba, el exón 22 de *npc1* del pez cebra. La creación de modelos a partir de CRISPR/Cas9 presenta entre otras ventajas, que las guías de ARN son fáciles de diseñar, fáciles de usar (sobre todo en pez cebra), es una técnica con una alta eficiencia y se pueden utilizar para editar múltiples genes o regiones génicas de forma simultánea. (Xiao-Jie *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Para ambos genes estudiados existía un alto grado de homología entre estos genes y los correspondientes ortólogos humanos siendo esta de un 71% en *nop56* y de un 67% en *npc1*, por lo que la elección de modelizar estos genes fue adecuada. A pesar de que el modelo de *nop56* presentaba un fenotipo letal, se hallaron vías moleculares comunes con el modelo de *npc1*. En el modelo de *nop56* se encontró apoptosis restringida al sistema nervioso y sobreexpresión de *p53*, aunque la apoptosis no se estudió en el modelo de *npc1*, sí que se encontró sobreexpresión de *p53* por lo que se le presupone que la patogénesis de *npc1* podría llevar asociada mecanismos de muerte celular. Además, entre los pocos genes que se estudiaron mediante RT-qPCR en el modelo de *nop56*, se encontró reducida expresión de genes que regulan la transcripción y de genes que intervienen en el desarrollo del sistema nervioso, la neurotransmisión y la sinaptogénesis. En el modelo de *npc1*, mediante RNAseq se reportó expresión diferencial (en algunos casos sobreexpresados y en otros infraexpresados) de genes relacionados con estas vías moleculares. Futuros estudios sobre la transcriptómica en el caso de la pérdida de función de *nop56*, podrían mostrar más vías en común con el modelo de *npc1*. Esto permitiría afianzar la relación de las vías moleculares y celulares en común de las enfermedades neurodegenerativas dominantes y los trastornos neurometabólicos de herencia autosómica recesiva.

El pez cebra ha demostrado ser un buen modelo tanto para testar nuevos fármacos y compuestos como para evaluar su toxicidad puesto que los embriones de pez cebra pueden metabolizar pequeñas moléculas disueltas en el medio acuoso a través de su piel. Además, se ha comprobado que muchos de los fármacos utilizados para el tratamiento de enfermedades en humanos, tienen efectos similares en el pez cebra (Strähle y Grabher, 2010). En la mayor parte de los análisis de fármacos y ensayos de toxicidad se utilizan embriones de pez cebra de menos de 5 dpf, no solo debido a la ausencia de restricciones éticas y legales, sino que también porque debido a su pequeño tamaño (cabén en placas de 96 pocillos) son aptos para la optimización de cribados de compuestos de alto rendimiento automatizados utilizando librerías de fármacos comerciales. (Lessman, 2011). Además, los fenotipos comportamentales, que son las manifestaciones más complejas de las enfermedades neurodegenerativas pueden ser medidos y analizados mediante sistemas automatizados que permiten analizar diferentes parámetros del comportamiento a gran escala (Zhou *et al.*, 2014). En los modelos que se han revisado (en los capítulos I y III) tanto de ataxias dominantes, X-frágil y FXTAS/FMR1 y ataxias recesivas hemos observado algunos modelos en los que se probaron fármacos que fueron eficaces en rescatar o al menos tratar parte del fenotipo patológico (Tucker *et al.*, 2006; Tobin, y Beales, 2008; Wen *et al.*, 2013; Zdebik *et al.*, 2013; Lattante *et al.*, 2015; Mahmood *et al.*, 2015; Sun

et al., 2015; Watchon *et al.*, 2017; Ibhazehiebo *et al.*, 2018; Tseng *et al.*, 2018; Gawel *et al.*, 2020; Medishetti *et al.*, 2020; Facchinello *et al.*, 2021). Algunos tratamientos como la 3,4 diaminopiridina (bloqueador de la bomba de potasio), la roscovitina (agonista de canales P/Q) (Wen *et al.*, 2013), rapamicina (inhibidor mTOR) (Lattante *et al.*, 2015) el cotratamiento con calpeptina (inhibidor de la calpaina) y cloroquina (inhibidor del flujo autofágico) (Watchon *et al.*, 2017) rescataron el fenotipo motor de estos modelos. En algunos modelos que presentaban temblores, se trataron eficazmente con los fármacos anticonvulsivos pentobarbital (Zdebik *et al.*, 2013), valproato (Mahmood *et al.*, 2015), etosuximida, lamotrigina y topiramato (Gawel *et al.*, 2020). En un modelo de *knock down* del gen *fmr1* causante de X-frágil y FXTAS/FMR1 los comportamientos ansiosos se rescataron con mavoglurant (antagonista de mGluR5) y KU046 (un ansiolítico) (Medishetti *et al.*, 2020).

El único modelo de pez cebra de ataxia que se ha utilizado para realizar un cribado a gran escala de fármacos fue un morfolino para el gen *kcnal1*, el gen causante de la EA1. En este modelo se probaron 24 anticonvulsivos y se seleccionaron otros 870 compuestos por su habilidad de reducir los comportamientos hiperactivos. Entre ellos vorinostat (un inhibidor de la histona acetilasa) se destacó como tratamiento para la epilepsia asociada a la EA1, puesto que mejoraba las medidas bioenergéticas y reducía significativamente los temblores (Ibhazehiebo *et al.*, 2018).

Estos modelos están en constante actualización, recientemente el valproato utilizado como anticonvulsivo en otros modelos de ataxia, se probó sobre un modelo transgénico de SCA3. En este modelo previamente ya se había aplicado un cotratamiento con calpeptina y cloroquina que rescató el fenotipo motor (Watchon *et al.*, 2017). En este caso se comprobó que el valproato también mejoraba la natación en este modelo a través de la vía de señalización de la longevidad de la sirtulina (Watchon *et al.*, 2021). Sin embargo, pocos modelos de los estudiados en los capítulos I y III de esta tesis han sido utilizados para probar tratamientos, únicamente un 15% de ellos, probablemente debido a que algunos (principalmente los modelos transitorios) no eran adecuados para estudiar estas enfermedades y algunos otros solo se crearon con la intención de estudiar los mecanismos subyacentes a la disfunción génica. Los fármacos que arrojaron buenos resultados en pez cebra deberían de ser testados en otros modelos preclínicos o en el caso de fármacos que ya se usan para otras enfermedades, ser testados en pacientes de la nueva enfermedad a analizar para comprobar su eficacia. Lamentablemente, la mayor parte de los fármacos que han sido probados en estos modelos solo rescataron algún síntoma de la enfermedad y solo en un caso se aprovechó el potencial del pez cebra para realizar cribados de fármacos de alto rendimiento. Además, hay que tener cautela con estos resultados de los fármacos, puesto que los modelos de pez cebra en los que se testaron no reproducían por completo el fenotipo humano. En un futuro próximo con la mejora de las técnicas de edición génica se podrán crear mejores modelos de ataxia que reproduzcan más fielmente sus síntomas clínicos y en los que además se podrán realizar cribados de fármacos que puedan ser testados posteriormente en humanos.

- **Perspectivas de futuro**

El único objetivo que no pudo ser alcanzado durante la tesis doctoral fue la creación de un modelo de pez cebra con la expansión patológica de la SCA36. Sin embargo, esperamos alcanzar ese objetivo próximamente mediante la generación de fragmentos de oligonucleótidos sintéticos que serán insertados en el pez cebra mediante la técnica de CRISPR/cas9 *knock in*.

En el modelo de pez cebra que creamos para NPC, nuestros futuros objetivos son realizar una mayor caracterización del fenotipo neuropatológico. Específicamente esperamos localizar a lo largo del sistema nervioso las principales regiones donde se producen las lesiones vacuolares que encontramos en nuestro modelo de *npc1*, además de caracterizar otros posibles defectos en el neurofilamento y en las conexiones sinápticas mediante inmunohistoquímica. En peces adultos heterocigotos para la mutación en *npc1* queríamos buscar alteraciones neurodegenerativas, puesto que previamente se ha observado en pacientes heterocigotos para NPC una susceptibilidad elevada a padecer trastornos neurodegenerativos a edades avanzadas (Schneider *et al.*, 2021)

Finalmente, el modelo de NPC parece tener potencial para testar fármacos. Entre otros sería interesante probar la rapamicina puesto que en otros modelos de ataxias se vio que mejoraba la función motora y rescataba los daños renales (Tobin *et al.*, 2008; Lattante *et al.*, 2015).

En conclusión, en esta tesis se plantea que el pez cebra podría ser un modelo adecuado para el estudio de las ataxias a pesar de que hay es necesario crear más y mejores modelos. Específicamente en el caso de la SCA36 y NPC, los descubrimientos en estos modelos podrían ser útiles para una mayor comprensión de los mecanismos subyacentes a estas enfermedades. En el caso de la SCA36, no se ha podido generar el modelo con las expansiones en el pez cebra, lo que se intentará próximamente, pero el modelo de pérdida de función de *nop56* arrojó datos interesantes. En un futuro se espera que estos modelos pudieran ser beneficiosos para probar fármacos que puedan aliviar los síntomas de estas patologías.

CONCLUSIONES

Conclusiones

- Los modelos de ataxias autosómicas dominantes y ataxias ligadas a X de pez cebra, aunque en conjunto reproducen la neurodegeneración asociada a estas enfermedades, fueron creados en su mayor parte con mutaciones de pérdida de función que no representan la ganancia de función tóxica asociada. Sin embargo, en algunos casos se ha observado que mecanismos de ganancia y pérdida de función actúan sinérgicamente en las ataxias dominantes, por lo que es útil conocer la patogénesis asociada a los mecanismos de pérdida de función. Además, siendo las ataxias dominantes enfermedades de inicio tardío, los modelos de pez cebra deberían ser estudiados en etapas adultas, lo que no ocurre en la mayoría de los casos.
- Presentamos el primer modelo mutante vertebrado de pérdida de función *knock out* para *nop56*, el gen causante de SCA36. En este modelo se observa un fenotipo neurodegenerativo letal con déficit motor e incremento de la apoptosis en el sistema nervioso. Los mutantes muestran alteración en la expresión de genes relacionados con el procesamiento del ARNr, con el desarrollo de la cúpula del oído interno y genes expresados en el cerebelo del pez cebra relacionados con el desarrollo del sistema nervioso, neurotransmisión y sinaptogénesis. Algunos de estos genes también se encuentran alterados en la ELA, una enfermedad con manifestaciones clínicas solapantes con la SCA36.
- Gran parte de los modelos de ataxias autosómicas recesivas no fueron creados con la intención de modelizar estas enfermedades, si no para caracterizar parte de sus procesos moleculares y celulares. A pesar de ello, al ser enfermedades de pérdida de función, estos modelos representan mejor la patogénesis asociada a estas enfermedades que en el caso de los modelos de ataxias autosómicas dominantes y ligadas a X.
- Para el estudio de las ataxias es necesario no solo mejorar la creación de modelos utilizando las técnicas más pioneras de edición génica, sino que también es esencial estandarizar el estudio de los fenotipos comportamentales y aumentar el número y el rango de los estudios de expresión génica y proteómicos. Esto permitirá perfeccionar la evaluación del efecto de diversos fármacos que puedan ser testados posteriormente en humanos.
- Hemos desarrollado una línea de pez cebra *knock out* para el gen *npc1*, causante de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C. Se trata del primer modelo de pez cebra con una mutación situada al final del bucle luminal rico en cisteína. En comparación con otros mutantes *npc1* de pez cebra publicados, el desarrollado en el presente trabajo presenta un fenotipo más severo con acumulación de lípidos en el sistema nervioso, órganos digestivos y túbulos renales, que lleva a la muerte prematura de los peces *knock out*.

- El perfil lipídico del modelo *knock out* de *npc1* se caracteriza por una acumulación de esfingomiélin fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol y reducción de ésteres de colesterol y fosfatidato.
- El modelo de pez cebra *knock out* para *npc1* desarrollado en este trabajo muestra 249 genes diferencialmente expresados (en algunos casos sobreexpresados y en otros infraexpresados) relacionados principalmente con el transporte transmembrana, transporte y metabolismo lipídico, plasticidad neuronal, sinaptogénesis, desarrollo y función muscular, actividad del citoesqueleto, constitución de la matriz de colágeno estructural, actividad hemo oxigenasa y angiogénesis.

REFERENCIAS

Referencias

Aleström, P., Holter, J. L., & Nourizadeh-Lillabadi, R. (2006). Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends in biotechnology*, 24(1), 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.11.004>

Amsterdam, A., & Hopkins, N. (2006). Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends in genetics*, 22(9), 473-478. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.06.011>.

Baskoylu, S. N., Yersak, J., O'Hern, P., Grosser, S., Simon, J., Kim, S., ... & Hart, A. C. (2018). Single copy/knock-in models of ALS SOD1 in *C. elegans* suggest loss and gain of function have different contributions to cholinergic and glutamatergic neurodegeneration. *PLoS genetics*, 14(10), e1007682. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007682>.

Beaudin, M., Klein, C. J., Rouleau, G. A., & Dupré, N. (2017). Systematic review of autosomal recessive ataxias and proposal for a classification. *Cerebellum & ataxias*, 4(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40673-017-0061-y>.

Bird, T. D. (2019). Hereditary ataxia overview. *GeneReviews*@[internet].

Bryant, D., Seda, M., Peskett, E., Maurer, C., Pomeranz, G., Ghosh, M., ... & Stanier, P. (2020). Diverse species-specific phenotypic consequences of loss of function sorting nexin 14 mutations. *Scientific reports*, 10(1), 13763. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70797-2>.

Carrillo-Rosas, S., Weber, C., Fievet, L., Messaddeq, N., Karam, A. & Trottier, Y. (2019) Loss of Zebrafish Ataxin-7, a SAGA Subunit Responsible for SCA7 Retinopathy, Causes Ocular Coloboma and Malformation of Photoreceptors. *Human Molecular Genetics*. 28(6), 912–927. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy401>.

Cascella, R., Capitini, C., Fani, G., Dobson, C. M., Cecchi, C., & Chiti, F. (2016). Quantification of the Relative Contributions of Loss-of-function and Gain-of-function Mechanisms in TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) Proteinopathies. *Journal of Biological Chemistry*, 291(37), 19437-19448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.737726>.

Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., ... & Zon, L. I. (2019). Use of zebrafish in drug discovery toxicology. *Chemical research in toxicology*, 33(1), 95-118. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b003355>.

Chalopin, D., Naville, M., Plard, F., Galiana, D., & Volff, J. N. (2015). Comparative analysis of transposable elements highlights mobilome diversity and evolution in vertebrates. *Genome biology and evolution*, 7(2), 567-580. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv005>.

Chen, Y. S., Hong, Z. X., Lin, S. Z., & Harn, H. J. (2020). Identifying therapeutic targets for spinocerebellar ataxia type 3/Machado–Joseph disease through integration of pathological biomarkers and therapeutic strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3063. <https://doi.org/10.3390/ijms21093063>.

Chen, O. C., Colaco, A., Davis, L. C., Kiskin, F. N., Farhat, N. Y., Speak, A. O., ... & Platt, F. M. (2020)b. Defective platelet function in Niemann–Pick disease type C1. *JIMD reports*, 56(1), 46–57. <https://doi.org/10.1002/jmd2.12148>.

Chen, K., Wang, P., Chen, J., Ying, Y., Chen, Y., Gilson, E., ... & Ye, J. (2022). Loss of atm in Zebrafish as a Model of Ataxia–Telangiectasia Syndrome. *Biomedicines*, 10(2), 392. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020392>.

Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., ... & Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), 757–761. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>.

Clark, J. M. (2018). The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *British Journal of Nutrition*, 120(s1), S1–S7. <https://doi.org/10.1017/S0007114517002227>.

Constantin, L., Poulsen, R. E., Scholz, L. A., Favre-Bulle, I. A., Taylor, M. A., Sun, B., ... & Scott, E. K. (2020). Altered brain-wide auditory networks in a zebrafish model of fragile X syndrome. *BMC biology*, 18, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00857-6>.

Corral-Juan, M., Casquero, P., Giraldo-Restrepo, N., Laurie, S., Martínez-Piñeiro, A., Mateo-Montero, R. C., ... & Matilla-Dueñas, A. (2022). New spinocerebellar ataxia subtype caused by SAMD9L mutation triggering mitochondrial dysregulation (SCA49). *Brain Communications*, 4(2), fcac030. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac030>.

Dalla Vecchia, E., Di Donato, V., Young, A. M., Del Bene, F., & Norton, W. H. (2019). Reelin signaling controls the preference for social novelty in zebrafish. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 214. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.0021>.

Dardis, A., Zampieri, S., Gellera, C., Carozzo, R., Cattarossi, S., Peruzzo, P., ... & Bembi, B. (2020). Molecular genetics of Niemann–Pick type C disease in Italy: an update on 105 patients and description of 18 NPC1 novel variants. *Journal of Clinical Medicine*, 9(3), 679. <https://doi.org/10.3390/jcm9030679>.

Dawson, T. M., Golde, T. E., & Lagier-Tourenne, C. (2018). Animal models of neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, 21(10), 1370–1379. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0236-8>.

den Broeder, M. J., van der Linde, H., Brouwer, J. R., Oostra, B. A., Willemsen, R., & Ketting, R. F. (2009). Generation and characterization of FMR1 knockout zebrafish. *PLoS one*, 4(11), e7910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007910>.

Di Donato, V., De Santis, F., Albadri, S., Auer, T. O., Duroure, K., Charpentier, M., ... & Del Bene, F. (2018). An attractive reelin gradient establishes synaptic lamination in the vertebrate visual system. *Neuron*, 97(5), 1049–1062. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.030>.

Dogra, D., Meza-Santoscoy, P. L., Rehak, R., de la Hoz, C. L., Gavrilovici, C., Ibhazehiebo, K., ... & Kurrasch, D. M. (2022). *kcnal1a* mutant zebrafish as a model of episodic ataxia type 1 and epilepsy. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.09.28.509973>.

- Doll, C. A., Yergert, K. M., & Appel, B. H. (2020). The RNA binding protein fragile X mental retardation protein promotes myelin sheath growth. *Glia*, *68*(3), 495-508. DOI: 10.1002/glia.23731.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), 1258096. Doi: 10.1126/science.12580.
- Eidhof, I., van de Warrenburg, B. P., & Schenck, A. (2019). Integrative network and brain expression analysis reveals mechanistic modules in ataxia. *Journal of Medical Genetics*, *56*(5), 283-292. <http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105703>.
- Eisen, J. S. (2020). History of zebrafish research. *The zebrafish in biomedical research* (pp. 3-14). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00001-4>.
- Elsaey, M. A., Namikawa, K., & Köster, R. W. (2021). Genetic modeling of the neurodegenerative disease spinocerebellar ataxia type 1 in zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(14), 7351. <https://doi.org/10.3390/ijms22147351>.
- Encarnação, M., Coutinho, M. F., Cho, S. M., Cardoso, M. T., Ribeiro, I., Chaves, P., ... & Alves, S. (2020). NPC1 silent variant induces skipping of exon 11 (p. V562V) and unfolded protein response was found in a specific Niemann-Pick type C patient. *Molecular genetics & genomic medicine*, *8*(11), e1451. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1451>
- Evidente, V. G. H., Gwinn-Hardy, K. A., Caviness, J. N., & Gilman, S. (2000). Hereditary ataxias. *Mayo Clinic Proceedings*, *75*(5), 475-490. Elsevier. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.28>.
- Facchinello, N., Laquatra, C., Locatello, L., Beffagna, G., Branas Casas, R., Fornetto, C., ... & Tiso, N. (2021). Efficient clofilium tosylate-mediated rescue of POLG-related disease phenotypes in zebrafish. *Cell death & disease*, *12*(1), 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03359-z>.
- Ferguson, D. P., Dangott, L. J., & Lightfoot, J. T. (2014). Lessons learned from vivo-morpholinos: How to avoid vivo-morpholino toxicity. *Biotechniques*, *56*(5), 251-256. <https://doi.org/10.2144/000114167>.
- Fernandez-Valero, E. M., Ballart, A., Iturriaga, C., Lluch, M., Macias, J., Vanier, M. T., ... & Coll, M. J. (2005). Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. *Clinical genetics*, *68*(3), 245-254. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00490.x>.
- Fleisch, V. C., Schonthaler, H. B., von Lintig, J., and Neuhauss, S. C. (2008). Subfunctionalization of a retinoid-binding protein provides evidence for two parallel visual cycles in the cone-dominant zebrafish retina. *The Journal of Neuroscience*, *28*, 8208–8216. Doi: 10.1523/jneurosci.2367-08.2008.
- Frey, U. H., Bachmann, H. S., Peters, J., & Siffert, W. (2008). PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'. *Nature protocols*, *3*(8), 1312-1317. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.112>.

García-Murias, M., Quintans, B., Arias, M., Seixas, A. I., Cacheiro, P., Tarrío, R., ... & Sobrido, M. J. (2012). 'Costa da Morte' ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization. *Brain*, *135*(5), 1423-1435. <https://doi.org/10.1093/brain/aws069>.

Gascón-Bayarri, J., Simon, P. C., Llop, R., Carnaval, T., Ledesma, M. D., Rico, I., ... & Videla, S. (2022). Efficacy and safety clinical trial with efavirenz in patients diagnosed with adult Niemann-pick type C with cognitive impairment. *Medicine*, *101*(48), e31471. DOI: 10.1097/MD.00000000000031471.

Gawel, K., Turski, W. A., van der Ent, W., Mathai, B. J., Kirstein-Smardzewska, K. J., Simonsen, A., & Esguerra, C. V. (2020). Phenotypic characterization of larval zebrafish (*Danio rerio*) with partial knockdown of the *cacna1a* gene. *Molecular neurobiology*, *57*(4), 1904-1916. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01860-x>.

Geisler, R., Borel, N., Ferg, M., Maier, J. V., & Strähle, U. (2016). Maintenance of zebrafish lines at the European Zebrafish Resource Center. *Zebrafish*, *13*(S1), S-19. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1205>.

Gelsthorpe, M. E., Baumann, N., Millard, E., Gale, S. E., Langmade, S. J., Schaffer, J. E., & Ory, D. S. (2008). Niemann-Pick type C1 I1061T mutant encodes a functional protein that is selected for endoplasmic reticulum-associated degradation due to protein misfolding. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(13), 8229-8236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708735200>.

Glasauer, S. M., and Neuhaus, S. C. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics* *289*(6), 1045–1060. Doi: 10.1007/s00438-014-0889-2.

Good, S., Yegorov, S., Martijn, J., Franck, J., & Bogerd, J. (2012). New insights into ligand-receptor pairing and coevolution of relaxin family peptides and their receptors in teleosts. *International Journal of Evolutionary Biology* 2012:310278. Doi: 10.1155/2012/310278.

Goulding, M. (2009). Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(7), 507-518. <https://doi.org/10.1038/nrn2608>.

Guo, J. C., Tang, Y. D., Zhao, K., Wang, T. Y., Liu, J. T., Gao, J. C., ... & An, T. Q. (2016). Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination promotes the rapid generation of bacterial artificial chromosomes of pseudorabies virus. *Frontiers in microbiology*, *7*, 2110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02110>.

Harding, A. E. (1983). Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *The Lancet*, *321*(8334), 1151-1155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)92879-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92879-9).

Heasman, J. (2002). Morpholino oligos: making sense of antisense?. *Developmental biology*, *243*(2), 209-214. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0565>.

Hekman, K. E., & Gomez, C. M. (2015). The autosomal dominant spinocerebellar ataxias: emerging mechanistic themes suggest pervasive Purkinje cell vulnerability. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *86*(5), 554-561. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2014-308421>.

Hinits, Y., Pan, L., Walker, C., Dowd, J., Moens, C. B., and Hughes, S. M. (2012). Zebrafish Mef2ca and Mef2cb are essential for both first and second heart field cardiomyocyte differentiation. *Developmental Biology*, 369, 199–210. Doi: 10.1016/j.ydbio.2012.06.019.

Höltkä-Vuori, M., Salo, V. T., Nyberg, L., Brackmann, C., Enejder, A., Panula, P., & Ikonen, E. (2010). Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *Biochemical Journal*, 429(2), 235-242. <https://doi.org/10.1042/BJ20100293>.

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... & Teucke, M. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>

Hsieh, J. Y., Ulrich, B. N., Issa, F. A., Meng-chin, A. L., Brown, B., & Papazian, D. M. (2020). Infant and adult SCA13 mutations differentially affect Purkinje cell excitability, maturation, and viability in vivo. *Elife*, 9, e57358. <https://doi.org/10.7554/eLife.57358>.

Huang, P., Zhu, Z., Lin, S., & Zhang, B. (2012). Reverse genetic approaches in zebrafish. *Journal of Genetics and Genomics*, 39(9), 421-433. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.07.004>.

Ibhazehiebo, K., Gavrilovici, C., de la Hoz, C. L., Ma, S. C., Rehak, R., Kaushik, G., & Kurrasch, D. M. (2018). A novel metabolism-based phenotypic drug discovery platform in zebrafish uncovers HDACs 1 and 3 as a potential combined anti-seizure drug target. *Brain*, 141(3), 744-761. <https://doi.org/10.1093/brain/awx364>.

Ikeda, Y., Ohta, Y., Kobayashi, H., Okamoto, M., Takamatsu, K., Ota, T.,.....& Abe, K. (2012). Clinical features of SCA36: a novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan). *Neurology*, 79(4), 333-341. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318260436f>.

Imamura, S., & Kishi, S. (2005). Molecular cloning and functional characterization of zebrafish ATM. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(5), 1105-1116. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.015>.

Issa, F. A., Mazzochi, C., Mock, A. F., & Papazian, D. M. (2011). Spinocerebellar ataxia type 13 mutant potassium channel alters neuronal excitability and causes locomotor deficits in zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 31(18), 6831-6841. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6572-10.2011>.

Issa, F. A., Mock, A. F., Sagasti, A., & Papazian, D. M. (2012). Spinocerebellar ataxia type 13 mutation that is associated with disease onset in infancy disrupts axonal pathfinding during neuronal development. *Disease models & mechanisms*, 5(6), 921-929. <https://doi.org/10.1242/dmm.010157>.

Jayadev, S., & Bird, T. D. (2013). Hereditary ataxias: overview. *Genetics in Medicine*, 15(9), 673-683. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.28>.

Jiang, F., & Doudna, J. A. (2015). The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in structural biology*, 30, 100-111. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.002>.

Kane, D. A., Hammerschmidt, M., Mullins, M. C., Maischein, H. M., Brand, M., van Eeden, F. J., ... & Nusslein-Volhard, C. (1996). The zebrafish epiboly mutants. *Development*, *123*(1), 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.002>.

Kim, Y. G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(3), 1156-1160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.115>.

Kimura, Y., Hisano, Y., Kawahara, A., & Higashijima, S. I. (2014). Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Scientific reports*, *4*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/srep06545>.

Kobayashi, H., Abe, K., Matsuura, T., Ikeda, Y., Hitomi, T., Akechi, Y., ... & Koizumi, A. (2011). Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *The American Journal of Human Genetics*, *89*(1), 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.05.015>.

Koeppen, A. H., Ramirez, R. L., Bjork, S. T., Bauer, P., & Feustel, P. J. (2013). The reciprocal cerebellar circuitry in human hereditary ataxia. *The Cerebellum*, *12*(4), 493-503. <https://doi.org/10.1007/s12311-013-0456-0>.

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.2016.0005>.

Lagman, D., Callado-Pérez, A., Franzén, I. E., Larhammar, D., and Abalo, X. M. (2015). Transducin duplicates in the zebrafish retina and pineal complex: differential specialisation after the teleost tetraploidisation. *PLoS One*, *10*, e0121330. Doi: 10.1371/journal.pone.0121330.

Lattante, S., de Calbiac, H., Le Ber, I., Brice, A., Ciura, S., & Kabashi, E. (2015). Sqstm1 knock-down causes a locomotor phenotype ameliorated by rapamycin in a zebrafish model of ALS/FTLD. *Human molecular genetics*, *24*(6), 1682-1690. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu580>.

Lawson, N. D. (2022). Decoding the zebrafish genome. *Nature Genetics*, *54*(7), 917-919. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01080-5>.

Lessman, C. A. (2011). The developing zebrafish (*Danio rerio*): A vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, *93*(3), 268-280. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20212>.

Li, X., Lu, F., Trinh, M. N., Schmiede, P., Seemann, J., Wang, J., & Blobel, G. (2017). 3.3 Å structure of Niemann–Pick C1 protein reveals insights into the function of the C-terminal luminal domain in cholesterol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(34), 9116-9121. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711716114>.

Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, *8*(5), 353-367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>.

Lin, Y., Cai, X., Wang, G., Ouyang, G., & Cao, H. (2018). Model construction of Niemann-Pick type C disease in zebrafish. *Biological Chemistry*, 399(8), 903-910. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0118>. Liu, J., Zhou, Y., Qi, X., Chen, J., Chen, W., Qiu, G., ... & Wu, N. (2017). CRISPR/Cas9 in zebrafish: an efficient combination for human genetic diseases modeling. *Human genetics*, 136(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1739-6>.

Liu, Q. Q., Yao, X. X., Gao, S. H., Li, R., Li, B. J., Yang, W., & Cui, R. J. (2020). Role of 5-HT receptors in neuropathic pain: potential therapeutic implications. *Pharmacological Research*, 159, 104949. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104949>.

Louvette, S., Régal, L., Wittevrongel, C., Thys, C., Vandeweeghde, G., Decuyper, E., ... & Freson, K. (2013). NPC1 defect results in abnormal platelet formation and function: studies in Niemann–Pick disease type C1 patients and zebrafish. *Human molecular genetics*, 22(1), 61-73. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds401>.

Lyu, J., Yang, E. J., Head, S. A., Ai, N., Zhang, B., Wu, C., ... & Shim, J. S. (2018). Astemizole inhibits mTOR signaling and angiogenesis by blocking cholesterol trafficking. *International journal of biological sciences*, 14(10), 1175. doi:10.7150/ijbs.26011.

Mahmood, F., Zdebik, A., Au, A., Cooke, J., & Russell, C. (2015). Valproic acid extends lifespan of the zebrafish model of CLN2 disease (late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis). ABN abstracts 2015 ABN Annual Meeting, 10 September 2015, Institute of Education, London.

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J., ... & Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 67-83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>.

Manoli, M., and Driever, W. (2014). nkx2.1 and nkx2.4 genes function partially redundant during development of the zebrafish hypothalamus, preoptic region and pallidum. *Frontiers in Neuroanatomy*. 8:145. Doi: 10.3389/fnana.2014.00145

Mannoor, K., Liao, J., & Jiang, F. (2012). Small nucleolar RNAs in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826(1), 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.005>.

Manto, M., & Marmolino, D. (2009). Animal models of human cerebellar ataxias: a cornerstone for the therapies of the twenty-first century. *The Cerebellum*, 8(3), 137-154. <https://doi.org/10.1007/s12311-009-0127-3>.

Matilla-Dueñas, A., Ashizawa, T., Brice, A., Magri, S., McFarland, K. N., Pandolfo, M., ... & Sánchez, I. (2014). Consensus paper: pathological mechanisms underlying neurodegeneration in spinocerebellar ataxias. *The Cerebellum*, 13(2), 269-302. <https://doi.org/10.1007/s12311-013-0539-y>.

Matilla-Dueñas, A., Sánchez, I., Corral-Juan, M., Dávalos, A., Alvarez, R., & Latorre, P. (2010). Cellular and molecular pathways triggering neurodegeneration in the spinocerebellar ataxias. *The Cerebellum*, 9(2), 148-166. <https://doi.org/10.1007/s12311-009-0144-2>.

Maue, R. A., Burgess, R. W., Wang, B., Wooley, C. M., Seburn, K. L., Vanier, M. T., ... & Erickson, R. P. (2012). A novel mouse model of Niemann–Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations. *Human molecular genetics*, 21(4), 730-750. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr505>.

McEachin, Z. T., Gendron, T. F., Raj, N., García-Murias, M., Banerjee, A., Purcell, R. H., ... & Bassell, G. J. (2020). Chimeric peptide species contribute to divergent dipeptide repeat pathology in c9ALS/FTD and SCA36. *Neuron*, 107(2), 292-305. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.04.011>.

Medishetti, R., Rani, R., Kavati, S., Mahilkar, A., Akella, V., Saxena, U., & Sevilimedu, A. (2020). A DNAzyme based knockdown model for Fragile-X syndrome in zebrafish reveals a critical window for therapeutic intervention. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 101, 106656. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.106656>.

Millat, G., Marçais, C., Tomasetto, C., Chikh, K., Fensom, A. H., Harzer, K., & Vanier, M. T. (2001). Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *The American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1373-1385. <https://doi.org/10.1086/320606>.

Mochizucki, D. (2004). Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors in animal models of pain. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 19(S1), S15-S19. <https://doi.org/10.1002/hup.620>.

Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>.

Moreno-Mateos, M. A., Vejnar, C. E., Beaudoin, J. D., Fernandez, J. P., Mis, E. K., Khokha, M. K., & Giraldez, A. J. (2015). CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nature methods*, 12(10), 982-988. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3543>.

Müller, F., Lakatos, L., Dantonel, J. C., Strähle, U., & Tora, L. (2001). TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in zebrafish. *Current biology*, 11(4), 282-287. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00076-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00076-8).

Naef, V., Marchese, M., Ogi, A., Fichi, G., Galatolo, D., Licitra, R., & Santorelli, F. M. (2021). Efficient neuroprotective rescue of saccin-related disease phenotypes in zebrafish. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8401. <https://doi.org/10.3390/ijms22168401>.

Namikawa, K., Dorigo, A., Zagrebelsky, M., Russo, G., Kirmann, T., Fahr, W., & Köster, R. W. (2019). Modeling neurodegenerative spinocerebellar ataxia type 13 in zebrafish using a Purkinje neuron specific tunable coexpression system. *Journal of Neuroscience*, 39(20), 3948-3969. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1862-18.2019>.

Nasevicius, A., & Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene ‘knockdown’ in zebrafish. *Nature genetics*, 26(2), 216-220. <https://doi.org/10.1038/79951>.



Nepomuceno-Mejía, T., Florencio-Martínez, L. E., & Martínez-Calvillo, S. (2018). Nucleolar division in the promastigote stage of leishmania major parasite: A Nop56 point of view. *BioMed Research International*, vol 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1641839>.

Ng, M. C., Yang, Y. L., & Lu, K. T. (2013). Behavioral and synaptic circuit features in a zebrafish model of fragile X syndrome. *PloS one*, 8(3), e51456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051456>.

Nimura, T., Itoh, T., Hagio, H., Hayashi, T., Di Donato, V., Takeuchi, M., ... & Hibi, M. (2019). Role of Reelin in cell positioning in the cerebellum and the cerebellum-like structure in zebrafish. *Developmental biology*, 455(2), 393-408. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.07.010>.

Oppenheimer, J. M. (1936). Historical introduction to the study of teleostean development. *Osiris*, 2, 124-148. <https://doi.org/10.1086/368458>.

Pakdaman, Y., Denker, E., Austad, E., Norton, W. H., Rolfsnes, H. O., Bindoff, L. A., ... & Ellingsen, S. (2021). Chip Protein U-Box Domain Truncation Affects Purkinje Neuron Morphology and Leads to Behavioral Changes in Zebrafish. *Frontiers in molecular neuroscience*, 14. Doi: 10.3389/fnmol.2021.723912.

Park, W. D., O'Brien, J. F., Lundquist, P. A., Kraft, D. L., Vockley, C. W., Karnes, P. S., ... & Snow, K. (2003). Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: Correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Human mutation*, 22(4), 313-325. <https://doi.org/10.1002/humu.10255>.

Paulson, H. (2018). Repeat expansion diseases. *Handbook of clinical neurology*, 147, 105-123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00009-9>.

Praggastis, M., Tortelli, B., Zhang, J., Fujiwara, H., Sidhu, R., Chacko, A., & Ory, D. S. (2015). A murine Niemann-Pick C1 I1061T knock-in model recapitulates the pathological features of the most prevalent human disease allele. *Journal of Neuroscience*, 35(21), 8091-8106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4173-14.2015>.

Raes, J., & Van de Peer, Y. (2005). Functional divergence of proteins through frameshift mutations. *Trends in Genetics*, 21(8), 428-431. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.05.013>.

Ranawakage, D. C., Okada, K., Sugio, K., Kawaguchi, Y., Kuninobu-Bonkohara, Y., Takada, T., & Kamachi, Y. (2021). Efficient CRISPR-Cas9-mediated knock-in of composite tags in zebrafish using long ssDNA as a donor. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 598634. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.598634>.

Ribeiro, I., Marcão, A., Amaral, O., Sá Miranda, M., Vanier, M. T., & Millat, G. (2001). Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Human genetics*, 109(1), 24-32. <https://doi.org/10.1007/s004390100531>.

Ridley, C. M., Thur, K. E., Shanahan, J., Thillaiappan, N. B., Shen, A., Uhl, K., & van der Spoel, A. C. (2013). β -Glucosidase 2 (GBA2) activity and imino sugar pharmacology. *Journal of Biological Chemistry*, 288(36), 26052-26066. doi: 10.1074/jbc.M113.463562.

Rodriguez-Gil, J. L., Watkins-Chow, D. E., Baxter, L. L., Elliot, G., Harper, U. L., Wincovitch, S. M., ... & Pavan, W. J. (2020). Genetic background modifies phenotypic severity and longevity in a mouse model of Niemann-Pick disease type C1. *Disease models & mechanisms*, 13(3), dmm042614. <https://doi.org/10.1242/dmm.042614>.

Rodriguez-Gil, J. L., Baxter, L. L., Watkins-Chow, D. E., Johnson, N. L., Davidson, C. D., Carlson, S. R., ... & Pavan, W. J. (2021). Transcriptome of HP β CD-treated Niemann-Pick disease type C1 cells highlights GPNMB as a biomarker for therapeutics. *Human Molecular Genetics*, 30(24), 2456-2468. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab194>.

Ruano, L., Melo, C., Silva, M. C., & Coutinho, P. (2014). The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*, 42(3), 174-183. <https://doi.org/10.1159/000358801>.

Santos, G., Zeigelboim, D. B. S., Severiano, M., Teive, H., Liberalesso, P., Marques, J., & Cordeiro, M. (2017). Feasibility of virtual reality-based balance rehabilitation in adults with spinocerebellar ataxia: a prospective observational study. *Hearing, Balance and Communication*, 15(4), 244-251. <https://doi.org/10.1080/21695717.2017.1381490>.

Schneider, S. A., Tahirovic, S., Hardy, J., Strupp, M., & Bremova-Ertl, T. (2021). Do heterozygous mutations of Niemann–Pick type C predispose to late-onset neurodegeneration: a review of the literature. *Journal of neurology*, 268, 2055-2064. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09621-5>.

Schwend, T., Loucks, E. J., Snyder, D., & Ahlgren, S. C. (2011). Requirement of Npc1 and availability of cholesterol for early embryonic cell movements in zebrafish [S]. *Journal of lipid research*, 52(7), 1328-1344. <https://doi.org/10.1194/jlr.M012377>.


Scior, A., Preissler, S., Koch, M., & Deuerling, E. (2011). Directed PCR-free engineering of highly repetitive DNA sequences. *BMC biotechnology*, 11(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-87>.

Scott, C., & Ioannou, Y. A. (2004). The NPC1 protein: structure implies function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1685(1-3), 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.006>.

Seth, A., Stemple, D. L., & Barroso, I. (2013). The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Disease models & mechanisms*, 6(5), 1080-1088. <https://doi.org/10.1242/dmm.011346>.

Shamay-Ramot, A., Khermesh, K., Porath, H. T., Barak, M., Pinto, Y., Wachtel, C., & Appelbaum, L. (2015). Fmrp interacts with adar and regulates RNA editing, synaptic density and locomotor activity in zebrafish. *PLoS genetics*, 11(12), e1005702. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005702>.

Sidransky, E., Samaddar, T., & Tayebi, N. (2009). Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology*, 73(17), 1424-1426. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b28601>.

 Smeets, C. J., & Verbeek, D. S. (2014). Cerebellar ataxia and functional genomics: Identifying the routes to cerebellar neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-*

Molecular Basis of Disease, 1842(10), 2030-2038.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.004>

Stainier, D. Y., Raz, E., Lawson, N. D., Ekker, S. C., Burdine, R. D., Eisen, J. S.,& Moens, C. B. (2017). Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS genetics*, 13(10), e1007000. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007000>.

Strähle, U., & Grabher, C. (2010). The zebrafish embryo as a model for assessing off-target drug effects. *Disease models & mechanisms*, 3(11-12), 689-692. <https://doi.org/10.1242/dmm.006312>.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., & Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291(5813), 293-296. <https://doi.org/10.1038/291293a0>.

Strien, J., Sanft, J., & Mall, G. (2013). Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences. *Molecular biotechnology*, 54(3), 1048-1054. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9660-x>.

Sun, J., Pan, C. Q., Chew, T. W., Liang, F., Burmeister, M., & Low, B. C. (2015). BNIP-H recruits the cholinergic machinery to neurite terminals to promote acetylcholine signaling and neuritogenesis. *Developmental Cell*, 34(5), 555-568. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.08.006>.

Takei, A., Hamada, T., Yabe, I., & Sasaki, H. (2005). Treatment of cerebellar ataxia with 5-HT1A agonist. *The cerebellum*, 4(3), 211-215. <https://doi.org/10.1080/14734220500222318>.

Taroni, F., & DiDonato, S. (2004). Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(8), 641-655. <https://doi.org/10.1038/nrn1474>.

Tobin, J. L., & Beales, P. L. (2008). Restoration of renal function in zebrafish models of ciliopathies. *Pediatric nephrology*, 23(11), 2095-2099. <https://doi.org/10.1007/s00467-008-0898-7>.

Todd, T. W., McEachin, Z. T., Chew, J., Burch, A. R., Jansen-West, K., Tong, J.,& Petrucelli, L. (2020). Hexanucleotide repeat expansions in c9FTD/ALS and SCA36 confer selective patterns of neurodegeneration in vivo. *Cell reports*, 31(5), 107616. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107616>.

Tseng, W. C., Loeb, H. E., Pei, W., Tsai-Morris, C. H., Xu, L., Cluzeau, C. V., & Porter, F. D. (2018). Modeling Niemann-Pick disease type C1 in zebrafish: a robust platform for in vivo screening of candidate therapeutic compounds. *Disease models & mechanisms*, 11(9), dmm034165. <https://doi.org/10.1242/dmm.034165>.

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>

Tucker, B., Richards, R. I., & Lardelli, M. (2006). Contribution of mGluR and Fmr1 functional pathways to neurite morphogenesis, craniofacial development and fragile X



syndrome. *Human molecular genetics*, 15(23), 3446-3458. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl422>.

Van Swieten, J. C., & Heutink, P. (2008). Mutations in progranulin (GRN) within the spectrum of clinical and pathological phenotypes of frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology*, 7(10), 965-974. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70194-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70194-7).

Vanier, M. T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet journal of rare diseases*, 5(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-16>.

Vierstraete, J., Fieuws, C., Creytens, D., Van Dorpe, J., Willaert, A., Vral, A., & Claes, K. (2020). Atm deficient zebrafish model reveals conservation of the tumour suppressor function. In *20th BeSHG meeting: Genome for all?*.

Vierstraete, J., Fieuws, C., Creytens, D., Van Dorpe, J., Willaert, A., Vral, A., & Claes, K. B. (2022). Atm deficient zebrafish model reveals conservation of the tumour suppressor function and a role in fertility. *Genes & Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.04.023>.

Walkley, S. U., & Suzuki, K. (2004). Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1685(1-3), 48-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.011>

Wang, H., Chen, X., He, T., Zhou, Y., & Luo, H. (2013). Evidence for tissue-specific Jak/STAT target genes in Drosophila optic lobe development. *Genetics*, 195(4), 1291-1306. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.155945>.

Watchon, M., Yuan, K. C., Mackovski, N., Svahn, A. J., Cole, N. J., Goldsbury, C., & Laird, A. S. (2017). Calpain inhibition is protective in machado-joseph disease zebrafish due to induction of autophagy. *Journal of Neuroscience*, 37(32), 7782-7794. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1142-17.2017>.

Watchon, M., Luu, L., Robinson, K. J., Yuan, K. C., De Luca, A., Suddull, H. J.,..... & Laird, A. S. (2021). Sodium valproate increases activity of the sirtuin pathway resulting in beneficial effects for spinocerebellar ataxia-3 in vivo. *Molecular Brain*, 14(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00839-x>.

Waters, M. F., Minassian, N. A., Stevanin, G., Figueroa, K. P., Bannister, J., Nolte, D., ... & Pulst, S. M. (2006). Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nature genetics*, 38(4), 447-451. <https://doi.org/10.1038/ng1758>.

Wen, H., Linhoff, M. W., Hubbard, J. M., Nelson, N. R., Stensland, D., Dallman, J., & Brehm, P. (2013). Zebrafish calls for reinterpretation for the roles of P/Q calcium channels in neuromuscular transmission. *Journal of Neuroscience*, 33(17), 7384-7392. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5839-12.2013>.

Westerfield, M. (2000). The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish. http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html.

Wheeler, A., Raspa, M., Bann, C., Bishop, E., Hessel, D., Sacco, P., & Bailey Jr, D. B. (2014). Anxiety, attention problems, hyperactivity, and the Aberrant Behavior Checklist in



fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164(1), 141-155. Doi: 10.1002/ajmg.a.36232.

White, J. J., Bosman, L. W., Blot, F. G., Osório, C., Kuppens, B. W., Krijnen, W. H., ... & Schonewille, M. (2021). Region-specific preservation of Purkinje cell morphology and motor behavior in the ATXN1 [82Q] mouse model of spinocerebellar ataxia 1. *Brain Pathology*, 31(5), e12946. <https://doi.org/10.1111/bpa.12946>.

Wienholds, E., Van Eeden, F., Kosters, M., Mudde, J., Plasterk, R. H., & Cuppen, E. (2003). Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome research*, 13(12), 2700-2707. Doi: 10.1101/gr.1725103

Wiweger, M., Majewski, L., Adamek-Urbanska, D., Wasilewska, I., & Kuznicki, J. (2021). npc2-Deficient Zebrafish Reproduce Neurological and Inflammatory Symptoms of Niemann-Pick Type C. Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 131. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.647860>.

Wu, Y. J., Hsu, M. T., Ng, M. C., Amstislavskaya, T. G., Tikhonova, M. A., Yang, Y. L., & Lu, K. T. (2017). Fragile X mental retardation-1 knockout zebrafish shows precocious development in social behavior. *Zebrafish*, 14(5), 438-443. DOI: 10.1089/zeb.2017.1446.

Xiao-Jie, L., Hui-Ying, X., Zun-Ping, K., Jin-Lian, C., & Li-Juan, J. (2015). CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *Journal of medical genetics*, 52(5), 289-296. <http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102968>.

Zanni, G., & Bertini, E. (2018). X-linked ataxias. *Handbook of Clinical Neurology*, 155, 175-189. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64189-2.00011-1>.

Zdebik, A. A., Mahmood, F., Stanescu, H. C., Kleta, R., Bockenhauer, D., & Russell, C. (2013). Epilepsy in kcnj10 morphant zebrafish assessed with a novel method for long-term EEG recordings. *PloS one*, 8(11), e79765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079765>.

Zhang, Y., Lin, Z., Lin, X., Zhang, X., Zhao, Q., & Sun, Y. (2021). A gene module identification algorithm and its applications to identify gene modules and key genes of hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports*, 11(1), 5517. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84837-y>.

Zhao, S., Zhang, D., Liu, S., & Huang, J. (2023). The roles of NOP56 in cancer and SCA36. *Pathology and Oncology Research*, 1. <https://doi.org/10.3389/pore.2023.1610884>.

Zhou, Y., Cattle, R. T., Cario, C. L., Bai, Q., & Burton, E. A. (2014). Quantification of larval zebrafish motor function in multiwell plates using open-source MATLAB applications. *Nature protocols*, 9(7), 1533-1548. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.094>.

ANEXOS



VICERREITORÍA DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN
Oficina de Investigación e Tecnoloxía
Servizo de Convocatorias e Recursos Humanos de I+S
Edificio CACTUS – Campus Vida
15782 Santiago de Compostela
Tel. 981 547 040 - Fax 981 547 077
Correo electrónico: citinfo@usc.es
<http://irmaisd.usc.es>

JOSÉ MANUEL CIFUENTES MARTÍNEZ, PRESIDENTE DO COMITÉ DE BIOÉTICA DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, cuxa Sección de Experimentación animal ten sido designada como Órgano Habilitado para a avaliación de proxectos de experimentación animal por resolución da Xunta de Galicia, con data 11 de novembro de 2013, de acordo co esixido por o RD 53/2013 de 1 de febreiro, por o que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animalas utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia,

INFORMA:

Que o proxecto de investigación titulado: **“Investigación de mutaciones y mecanismos moleculares en ataxias espino-cerebelosas y síndromes neurológicos relacionados”** do que é investigadora responsable **Dona Ana Quelle Regaldie**, ten sido examinado por o Comité de Bioética desta Universidade, Sección de Experimentación Animal, chegando as seguintes conclusións:

Con respecto a súa finalidade, trátase de un proxecto de investigación fundamental cuxo obxectivo é o desenvolvemento de estudos preclínicos en ataxias utilizando como modelo o peixe cebra (*Denio rerio*).

- Con respecto a os requisitos das 3Rs,
 - Non cabe a posibilidade de reemprazo xa que non se atoparon métodos ou estratexias de ensaio que permitan levar a cabo os experimentos propostos neste traballo.
 - A experimentación realizarse nun centro rexistrado como usuario de animais de experimentación por o que a manipulación, manexo e supervisión dos animais durante todo o proxecto será levada a cabo por persoas capacitadas. O grupo investigador compóñeno persoas con capacitacións a, b, c, o que asegura a súa preparación para garantir o benestar animal durante todos os procedementos (requisito de refinamento).
 - Finalmente, con respecto ao requisito de redución, considera que el número de animais a utilizar é o mínimo imprescindible para a obtención dos resultados estatisticamente significativos.
- A clasificación de los procedementos en función do seu grao de severidade é de “severo”.
- Con respecto ao balance dos danos e os beneficios, os procedementos efectúanse baixo anestesia por o que se minimiza a dor, angustia e sufrimento. Os métodos de sacrificio descritos (sobredose de anestesia) atópanse entre os indicados por o propio RD 53/2013.
- Téñense examinado as situacións e excepcións previstas no punto e) do artigo 34. 2 atopando que ningunha delas é aplicable neste proxecto.
- O proxecto clasifícase como tipo III e por o tanto precisa ser sometido a avaliación retrospectiva. Este Comité considera que a devandita avaliación debería efectuarse a os tres anos da concesión de la autorización.

Por todas estas razóns, este Comité acordou emitir un **INFORME FAVORABLE**.



VICERREITORÍA DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN
Oficina de Investigación e Tecnoloxía
Servizo de Convocatorias e Recursos Humanos de I+S
Edificio CACTUS – Campus Vida
15782 Santiago de Compostela
Tel. 981 547 040 - Fax 981 547 077
Correo electrónico: citinfo@usc.es
<http://irmaisd.usc.es>

Na avaliación deste proxecto NO TEN EXISTIDO CONFLICTO DE INTERESES.

20 de xullo de 2020



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

CERTIFICADO DE CAPACITACIÓN

Artículo 13, Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

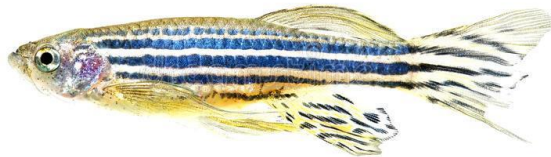
1. IDENTIFICACIÓN		
1.1. Apellidos y Nombre Quelle Regaldie, Ana		
1.2. DNI/NIE 53309790E		
1.3. Fecha de Nacimiento 01/04/1991	1.4. Lugar y país de nacimiento A Coruña (ESPAÑA)	1.5. Nacionalidad ESPAÑA
2. FECHA DE RESOLUCIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE LA CAPACITACIÓN INICIAL Y N° DE CERTIFICADO 24/01/2017 - EXP-000211		
3. FUNCIONES Y GRUPOS DE ESPECIES ANIMALES PARA LOS QUE SE RECONOCE LA CAPACITACIÓN (Artículo 3 y Anexo II Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo) a) Cuidado de los animales b) Eutanasia de los animales c) Realización de los procedimientos GRUPO DE ESPECIES ANIMALES 8. Peces y anfibios		
4. ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO 4.1. Nombre y dirección del organismo que expide el certificado CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y FORMACIÓN AGRARIA Y PESQUERA Edificio de Servicios Múltiples "los Bermejales" Avda. de Grecia s/n. 41012 Sevilla (España)		
4.2. Teléfono 958 056 000	4.3. Fax 955 519 107	4.4. Correo electrónico experimentacion.ifapa@juntadeandalucia.es
4.5. Fecha de expedición* 24/01/2017	4.6. Lugar SEVILLA	4.7. Sello
4.8. Nombre y Firma El Presidente del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera  Fdo. Jerónimo José Pérez Parra		

* La fecha de expedición coincide con el inicio del período de vigencia establecido en el artículo 21.8 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo.



<p>Dña. ANA QUELLE REGALDÍE, con DNI 53309790E ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de:</p> <p>DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS</p> <p>en los siguientes grupos de especies animales: SIN LIMITACIÓN DE ESPECIES</p>	
<p>Nº de certificado: CAP-2338-19</p>	
<p>ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO</p> <p>Dirección General de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio y Sostenibilidad. Comunidad de Madrid</p>	
<p>El reconocimiento de la capacitación para la realización de las funciones relacionadas en este certificado surtirá efecto en todo el territorio nacional.</p>	
<p>Madrid, a fecha de firma</p>	
<p>EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN (P.D.F Resolución de 15 de junio de 2018)</p> <p>EL SUBDIRECTOR GENERAL DE PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA Y BIENESTAR ANIMAL. (firma en el lateral)</p>	





Las ataxias son enfermedades neurodegenerativas de fenotipo complejo que carecen de un tratamiento efectivo por lo que la creación de modelos animales es esencial para el estudio de su patogénesis. El pez cebra (*Danio rerio*) se ha utilizado ampliamente como modelo de enfermedades neurodegenerativas debido a su transparencia óptica que permite observar fácilmente el sistema nervioso central y a su homología del 70% con el genoma humano. En la presente tesis se estudió el estado actual de los modelos de pez cebra para ataxias dominantes, recesivas y ligadas a X. Ello permitió conocer los avances y limitaciones de estos modelos y establecer los siguientes pasos a dar en su caracterización. Para estudiar los mecanismos de las ataxias dominantes, se caracterizó un modelo de pérdida de función de *nop56*, cuyo ortólogo humano está relacionado con la ataxia “da Costa da Morte” (SCA36). Además, mediante la técnica CRISPR/Cas9 se creó un modelo de Niemann Pick tipo C, un tipo de ataxia recesiva. Ambos modelos se caracterizaron mediante estudios anatómicos, moleculares, celulares y comportamentales observándose fenotipos neurodegenerativos que los hacen idóneos para el estudio de estas enfermedades.