

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 072 550**

21 Número de solicitud: 202431122

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

A01K 67/0276 (2014.01)

A01K 67/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

31.12.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.07.2026

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100,00%)
AVDA DAS CIENCIAS 6 4D
15782 SANTIAGO DE COMPOSTELA (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ PIÑÓN, Laura Elena;
PENSADO LÓPEZ, Alba;
FERNÁNDEZ SANTOS, Maider;
CARRACEDO ÁLVAREZ, Ángel María y
ALLEGUE TOSCANO, Catarina**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

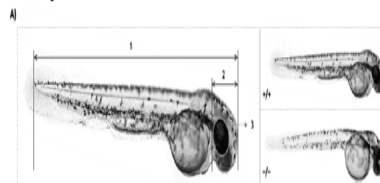
La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **MODELO DE ANIMAL NO HUMANO CON INACTIVACIÓN GÉNICA DE PATOLOGÍAS DEL DESARROLLO NEUROLÓGICO**

57 Resumen:

Modelo de animal no humano con inactivación génica de patologías del desarrollo neurológico.
La presente invención se refiere al campo médico. Particularmente, se refiere a un modelo de animal con inactivación génica de patologías del desarrollo neurológico asociadas con mutaciones en el gen trip 12. Además, la presente invención también se refiere al uso del modelo de animal de la invención en un método para seleccionar compuestos candidatos para el tratamiento de patologías del desarrollo neurológico.

Fig.3



DESCRIPCIÓN**MODELO DE ANIMAL NO HUMANO CON INACTIVACIÓN GÉNICA DE PATOLOGÍAS DEL DESARROLLO NEUROLÓGICO**

5

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere al campo médico. Particularmente, se refiere a un modelo de animal con inactivación génica, preferiblemente pez cebra, para el gen *trip12* para estudiar patologías del desarrollo neurológico asociadas con mutaciones en este gen. Además, la presente invención también se refiere al uso del modelo de animal de la invención en un método para seleccionar compuestos candidatos para el tratamiento de patologías del desarrollo neurológico.

15 **Antecedentes de la técnica**

El interactor 12 del receptor de hormona tiroidea (TRIP12) es una ubiquitina ligasa E3 que contiene dominio HECT (homólogo al extremo carboxilo-terminal de E6-AP), con la capacidad de mediar en la proteólisis dependiente de ubiquitina de sustratos proteicos específicos, regulando de ese modo procesos biológicos clave, incluyendo la progresión del ciclo celular, la diferenciación celular, la remodelación de cromatina y la reparación del daño al ADN. Debido a las funciones principales de TRIP12, las variantes patógenas de *TRIP12* se han relacionado con una amplia variedad de trastornos humanos, tales como cáncer o trastornos neurológicos y del desarrollo neurológico. Con respecto a estos últimos, *TRIP12* se ha identificado como un gen primario para trastorno del espectro autista (TEA) y discapacidad intelectual (DI) y se ha citado como gen causante del síndrome de Clark-Baraitser, un trastorno del desarrollo neurológico autosómico dominante raro que incluye deterioro cognitivo, dismorfia craneofacial y manifestaciones conductuales graves, entre otros síntomas. Otros hallazgos clínicos relacionados con mutaciones en *TRIP12* incluyen restricción del crecimiento, obesidad, convulsiones o retraso motores y rasgos faciales reconocibles, tales como ojos hundidos, punta nasal ancha, boca ancha y orejas de implantación baja. Las variantes patógenas incluyen delecciones, duplicaciones o sustituciones que conducen a codones de parada prematura (PSC), mutaciones de desplazamiento del marco de lectura, cambios de aminoácidos o falta de producción de proteínas, pero curiosamente, la gravedad fenotípica no parece correlacionarse con el tipo o la ubicación de las variantes.

El gen *TRIP12* (GRCh38.p14, cromosoma 2: 229.763.837-229.923.239, ENSG00000153827.15) codifica para 30 variantes de corte y empalme, 19 de las cuales son codificantes de proteínas. El transcrito más conservado y con la mayor expresión (NM_001348323.3, ENST00000675903.1) incluye 42 exones y codifica para una proteína de 2067 aminoácidos que consiste en cuatro dominios: dominio HECT, que contiene la enzima E2 de conjugación a ubiquitina y el residuo cisteína catalítico, por tanto esencial para la actividad catalítica de ubiquitina ligasa; dominio de triptófano-triptófano-glutamato (WWE), requerido para la interacción de *TRIP12* con algunos de sus sustratos tales como PTF1a o APP-BP1; repeticiones armadillo (ARM), también requeridas para las interacciones proteína-proteína; y dominio de regiones intrínsecamente desordenadas (IDR), responsable de la interacción de *TRIP12* con la cromatina, modificando de ese modo la estructura de la cromatina y regulando la expresión génica. La secuencia de aminoácidos y los dominios de *TRIP12* están muy conservados a lo largo de la evolución, especialmente en vertebrados, con aproximadamente el 82 % y el 98 % de identidad para pez cebra y ratón, respectivamente, que asume funciones esenciales para la proteína en organismos vivos. De hecho, el papel principal de *TRIP12* se ha evidenciado por la letalidad embrionaria de un modelo murino que porta una mutación inactivante en *TRIP12*. No obstante, las rutas moleculares afectadas como consecuencia de la alteración de *TRIP12* y su implicación en la fisiopatología de TEA y DI no se entienden por completo. El pez cebra es un modelo de animal usado ampliamente para el estudio de varios procesos patológicos humanos, especialmente enfermedades neurodegenerativas y del desarrollo neurológico. Aparte de la fácil manipulación o el rápido desarrollo del pez cebra, entre otras ventajas, las principales subdivisiones y las regiones cerebrales más importantes, así como los tipos de células, el mecanismo de diferenciación, los patrones de conectividad, las rutas de señalización y los perfiles de expresión génica, están muy conservados. Dados estos hechos, junto con una homología de ~83 % entre el gen *TRIP12* humano y el gen *trip12* de pez cebra, en primer lugar se optó por realizar un modelo de pez cebra con atenuación génica de *trip12* usando morfolinós para explorar el papel de *Trip12* en el desarrollo neurológico, con resultados prometedores. Además, para tener un conocimiento más profundo, en esta invención se ha generado una línea mutante de pez cebra de *trip12* con CRISPR/Cas9 con el objetivo de explorar su impacto sobre la embriogénesis, el fenotipo y la conducta y, más específicamente, de describir los mecanismos moleculares subyacentes a la enfermedad.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Mutaciones inducidas en *trip12* por CRISPR/Cas9. A) Representación

esquemática de dominios Trip12 y correspondencia de exones y aminoácidos, que muestra el sitio diana (asterisco rojo). B) Secuencia de *trip12* WT (primera línea) y secuencias de mutaciones encontradas en *trip12* (siguientes líneas). El número de bases delecionadas (-) e insertadas (+) se describe en el lado derecho de cada secuencia. Las mutaciones de interés están marcadas en verde (M4; - 2 pb) y azul (M5; -12, +1 pb). C) Secuencia de aminoácidos predicha codificada por la secuencia WT, la secuencia con mutación M4 y la secuencia con mutación M5. Los cuadrados y las flechas verdes y azules indican cambios de aminoácidos inducidos por las mutaciones de desplazamiento del marco de lectura M4 y M5, respectivamente. Los codones de parada se indican en rojo.

Figura 2. Análisis de supervivencia. Curva de Kaplan-Meier que muestra la comparación de las tasas de supervivencia de WT, mutantes heterocigóticos *trip12* +/- y mutantes homocigóticos *trip12* -/-.

Figura 3. Análisis de fenotipo y frecuencia cardíaca de mutantes de *trip12*. A) Representación esquemática de mediciones tomadas en WT y mutantes de *trip12* para longitud corporal (1), diámetro cefálico (2) y área ocular (3) (panel izquierdo). Imágenes representativas de WT y mutante homocigótico de *trip12* (panel derecho). B) Comparación de longitud corporal, diámetro cefálico y área ocular entre WT y mutantes heterocigóticos y homocigóticos (paneles izquierdos). Se muestran valores detallados en la tabla (panel derecho). C) Porcentaje de individuos heterocigóticos y homocigóticos que presentan longitud corporal más larga, microcefalia y área ocular más grande. D) Comparación de la frecuencia cardíaca, en cuanto a latidos por minuto, para WT y mutantes de *trip12*.

Figura 4. Análisis locomotor de mutantes de *trip12*. Recuento total de píxeles movidos por minuto en condiciones de luz y oscuridad para individuos WT y heterocigóticos y homocigóticos de *trip12* 5 dpf (A) y 7 dpf (B), representados independientemente por condición (paneles superiores) y conjuntamente (paneles inferiores).

Figura 5. Análisis de ontología génica (GO) para los procesos biológicos (BP). BP enriquecidos por genes regulados por incremento (naranja) y regulados por disminución (verde) en mutantes *trip12* +/- (A) y *trip12* -/- (B) en comparación con WT.

Figura 6. Análisis de KEGG. Rutas enriquecidas por genes regulados por incremento (naranja) y regulados por disminución (verde) en mutantes *trip12* +/- (A) y *trip12* -/- (B) en

comparación con WT.

Figura 7. Inactivación génica de *trip12* con CRISPR/Cas9. A) Representación esquemática de inactivación génica de *trip12* con CRISPR/Cas9 y caracterización de genotipo. B) Imágenes representativas de análisis de heterodúplex para adultos F0 (izquierda) e individuos F1 (derecha). C) Representación esquemática de la proteína Trip12 de 2053 aa y la secuencia mutante del exón 1 resultante de la inactivación génica con CRISPR/Cas9. D) Ejemplo de resultados obtenidos a partir del análisis de fragmentos de individuos F2 WT, heterocigóticos y homocigóticos.

Figura 8. Análisis de fenotipo y locomoción de morfantes de *trip12*. A) Comparación de longitud corporal, diámetro cefálico y área ocular entre WT y morfantes. B) Porcentaje de morfantes que presentan longitud corporal más larga, macrocefalia y área ocular más grande. C) Análisis locomotor de morfantes de *trip12*. Recuento total de píxeles movidos por minuto en condiciones de luz y oscuridad para individuos 5 dpf. D) Expresión relativa de *ptf1a* en morfantes de *trip12*.

Figura 9. Análisis de ontología Go (GO) para los componentes celulares (CC). CC enriquecidos de genes regulados por incremento (naranja) y regulados por disminución (verde) en mutantes *trip12* +/- (A) y *trip12* -/- (B) en comparación con WT.

Descripción de realizaciones

En la presente invención se ha desarrollado satisfactoriamente con CRISPR/Cas9 un mutante de pez cebra para *trip12*, un gen primario para DI, que recapitula varias anomalías fenotípicas y motoras observadas en pacientes que portan una mutación en *TRIP12*. Según el conocimiento de los presentes inventores, la presente invención proporciona el primer modelo de animal mutante caracterizado completamente no sólo a nivel fenotípico, sino también a nivel molecular, tanto en cuanto a heterocigosis como en cuanto a homocigosis.

La generación de mutantes de pez cebra de *trip12* con CRISPR/Cas9 se evaluó mediante detección de heterodúplex y la introducción de PSC se confirmó adicionalmente mediante clonación, secuenciación de Sanger y análisis *in silico* (figura 1). Aunque el mantenimiento de la línea heterocigótica se consiguió con éxito y fue posible la cría, no se identificó ningún mutante homocigótico adulto. Por tanto, se decidió realizar un análisis de supervivencia desde 0 hpf para determinar en qué fase del desarrollo la mutación

homocigótica de *trip12* conduce a la letalidad. Los presentes resultados muestran que los
mutantes homocigóticos no sobreviven más allá de 23 dpf, al tiempo que se observó una
tasa de mortalidad sustancial del 90 % el día 35 en mutantes heterocigóticos, alcanzando
la fase adulta sólo el 10 % de individuos. Estos datos resaltan el papel crítico de Trip12
5 en el desarrollo embrionario y larvario.

Con respecto al fenotipo, la caracterización de los mutantes, tal como se representa en la
figura 3, reveló características anómalas tales como longitud corporal y área ocular
aumentadas o diámetro cefálico reducido, indicando microcefalia éste último. Estos
10 resultados son según las características dismórficas observadas en prácticamente el
100 % de los pacientes que portan mutaciones de *TRIP12*, siendo las más comunes las
anomalías craneofaciales y oculares. Por el contrario, aunque el presente modelo
muestra una longitud corporal más larga, los pacientes tienen habitualmente una estatura
normal, presentando una estatura más corta sólo el 17 %. Con respecto a los morfantos,
15 los resultados para la longitud corporal y el área ocular también indican un aumento
significativo, mientras que el 68 % de los peces presentan macrocefalia. Aunque esto
último difiere de la microcefalia observada en los mutantes, también se ha notificado
macrocefalia en el 13 % de una cohorte de pacientes con variantes de *TRIP12*.

20 Dada la letalidad previamente descrita en mutantes homocigóticos de pez cebra y la
supervivencia disminuida en individuos mutantes heterocigóticos de pez cebra, se decidió
evaluar la actividad cardíaca a través de un análisis de latidos del corazón para
determinar si el funcionamiento del corazón era responsable de la disminución en la
supervivencia, ya que ya se había notificado un fenómeno similar. Adicionalmente, se
25 sabe bien que, al regular la estabilidad y fomentar la proteólisis, TRIP12 actúa sobre
SOX6, cuya expresión apropiada es crucial para el mantenimiento de las células
cardíacas y musculoesqueléticas. En contra de todas las expectativas, se halló que la
morfología macroscópica del corazón y la frecuencia cardíaca de las larvas eran
normales en mutantes tanto heterocigóticos como homocigóticos (figura 3D), lo que
30 sugiere que la insuficiencia cardíaca no es la causa de la supervivencia anómala. Están
realizándose análisis adicionales para explorar el papel que tiene Trip12 en la esperanza
de vida de embriones y larvas.

Se han notificado anomalías motoras, específicamente retraso motor y deficiencias en
35 habilidades motoras globales, en todas las cohortes de pacientes *TRIP12* y
prácticamente en el 90 % de sujetos. Por tanto, se decidió evaluar la actividad locomotora
general de individuos morfantos y mutantes de pez cebra. Aunque la locomoción fue

similar en mutantes 5 dpf (figura 4A), independientemente de los estímulos, se observó una actividad inferior significativa en condiciones tanto de luz como de oscuridad en mutantes heterocigóticos y homocigóticos 7 dpf (figura 4B). De manera similar, los morfantes 5 dpf mostraron una actividad locomotora reducida significativa, independientemente de las condiciones de luz. Las alteraciones motoras de aparición temprana en morfantes en comparación con los mutantes podrían explicarse por la contribución materna de Trip12, tal como observaron previamente Tseng *et al.* (2021). En general, los mutantes de pez cebra recapitulan las anomalías motoras presentes en los pacientes.

Finalmente, con el fin de aclarar la implicación de Trip12 a nivel transcriptómico y molecular, se realizó secuenciación de ARN. El análisis de GO revela que los genes regulados por incremento están implicados en varios procesos biológicos (BP), lo que sugiere papeles multifuncionales.

Los BP enriquecidos relacionados con el ciclo celular se alinean con el papel de TRIP12 en la progresión del ciclo celular y el enriquecimiento en procesos del ADN respalda la implicación de TRIP12 en la respuesta de daño al ADN y la remodelación de cromatina. Los términos relacionados con el desarrollo indican el papel crucial de Trip12 en la embriogénesis. Notablemente, se ve afectado el desarrollo craneal, que proporciona información sobre la microcefalia observada en embriones mutantes. Aunque parece verse afectado el desarrollo del corazón, no se observaron diferencias significativas en el análisis de latidos del corazón en el presente modelo mutante (figura 3D), lo que sugiere que están implicadas las demás características cardíacas. Otros términos destacan papeles cruciales en la neurogénesis, la diferenciación neuronal y el desarrollo del sistema nervioso central. Por consiguiente, la mayoría de las rutas de KEGG enriquecidas de genes regulados por incremento están relacionadas con la embriogénesis y/o los trastornos del desarrollo neurológico (figura 6).

Con respecto a la maquinaria transcripcional, los mutantes de *trip12* muestran regulación por incremento de genes implicados en los complejos represivos de Polycomb (PRC) que, al ejercer control transcripcional, es esencial para una diferenciación neuronal apropiada, según la regulación por incremento observada en la diferenciación neuronal. Específicamente, mientras que *TRIP12* contribuye al mantenimiento del silenciamiento génico por los PRC, su deficiencia regula por incremento los genes en el complejo represivo de Polycomb-desubiquitinasa (PR-DUB), capaz de revertir el silenciamiento génico. Adicionalmente, se ha demostrado que las alteraciones en el mecanismo de PR-

DUB contribuyen a la dismorfia craneofacial, lo que posiblemente explica la microcefalia observada en mutantes de *trip12*. Además, los embriones mutantes muestran una expresión elevada significativa de los factores de transcripción basales TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE y TFIIH, cuya función apropiada en el inicio de la transcripción es vital para el desarrollo embrionario. Por consiguiente, estos hallazgos sugieren fuertemente que la deficiencia de *trip12* conduce a graves alteraciones en la expresión de genes clave implicados en el desarrollo embrionario temprano.

La ruta de fosforilación oxidativa (OXPHOS) es esencial para el desarrollo cerebral y la diferenciación neuronal a través de procesos de producción de energía. Esta ruta genera especies reactivas del oxígeno (ROS), cuyo exceso conduce a estrés oxidativo (EO), dando como resultado un posible daño a componentes celulares, siendo el cerebro particularmente susceptible a estos efectos. Curiosamente, se ha demostrado que un exceso de ROS influye negativamente en la proliferación de células progenitoras neuronales. Adicionalmente, el enriquecimiento por genes regulados por incremento de la ruta de mitofagia implica una respuesta celular excesiva al EO, lo que conduce a un daño significativo a las mitocondrias. Estos resultados son según la regulación por incremento en las rutas de reparación de excisión de bases y reparación de excisión de bases nucleares, que se sabe que mitigan el daño oxidativo en el ADNmt. Notablemente, la biosíntesis de aminoacil-ARNt, implicada en el desarrollo neurológico y hallada regulada por incremento en la presente invención, también está vinculada al EO y a los marcadores de inflamación. Estas rutas podrían contribuir a la fisiopatología del síndrome de Clark-Baraitser, dado que el EO y la disfunción mitocondrial están comúnmente asociadas con trastornos del desarrollo neurológico tales como DI y TEA.

El ciclo celular, la remodelación de cromatina dependiente de ATP, el empalmosoma, el procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico y los PRC mencionados anteriormente, que se halló que están alterados en mutantes de pez cebra de *trip12*, también se han asociado con DI y TEA. Además, se hallaron genes regulados por incremento en la ruta de proteólisis mediada por ubiquitina. El sistema de ubiquitina desempeña un papel crucial en la fisiopatología de DI y TEA al controlar múltiples rutas de señalización clave y, dado que esta ruta regula la cromatina, la importancia de estos resultados se resalta por el hecho de que la desregulación de cromatina es un factor causante en los trastornos del desarrollo neurológico.

Del mismo modo, los genes regulados por disminución identificados en mutantes de *trip12* ejercen un impacto significativo sobre el desarrollo neurológico. Los BP cruciales

para el establecimiento de circuitos neurales funcionales están alterados, mientras que los términos de CC enriquecidos enfatizan su papel en la estructura y función de las neuronas. En general, las presentes observaciones señalan a los genes alterados asociados con el transporte iónico, la transducción de señales, las respuestas celulares, las modificaciones de proteínas y, notablemente, el desarrollo de células y órganos, la extensión y guía de axones, y la transmisión sináptica gabaérgica y neuromuscular, que se alinean con estudios en pacientes con TEA y DI. Por consiguiente, los genes regulados por disminución enriquecen predominantemente las rutas de KEGG vinculadas al desarrollo neurológico y a la comunicación neuronal, algunas implicadas en trastornos del desarrollo neurológico como la DI y el TEA, incluyendo la ruta de moléculas de adhesión celular, la ruta de señalización de calcio, ErbB y MAPK, la unión comunicante, el sistema de señalización de fosfatidilinositol, el metabolismo de fosfato de inositol y la endocitosis. Estos hallazgos proporcionan una información valiosa sobre la comprensión del síndrome de Clark-Baraitser, caracterizado principalmente por DI y asociado habitualmente con TEA.

En el contexto del desarrollo neurológico, la ruta de moléculas de adhesión celular, que se halló que está enriquecida en *trip12* ^{-/-}, está implicada en la formación de circuitos neurales, contribuyendo a la guía de axones, la neurogénesis, la migración neuronal, la sinaptogénesis y la mielinización. La migración neuronal es fundamental para el desarrollo neurológico al organizar a las neuronas espacialmente para unas interacciones apropiadas. Las proteínas de adhesión focal, esenciales en la migración neuronal, permiten el movimiento de células al interactuar con la matriz extracelular (MEC). La interacción MEC-receptor, aunque sólo está significativamente enriquecida en *trip12* ^{+/-}, está vinculada a conexiones neuronales estables y a la regulación de plasticidad sináptica. Además, las adhesiones focales ayudan a controlar el crecimiento de neuritas en células neuronales al coordinar la reorganización citoesquelética, crucial para el crecimiento neuronal y la funcionalidad sináptica. La liberación de calcio (Ca²⁺), que sirve como segundo mensajero, desempeña un papel vital en la inducción de células precursoras neurales, las actividades de sinapsis, la guía de axones, la ramificación dendrítica y la determinación de neurotransmisores. Adicionalmente, la señalización de Ca²⁺ se ha asociado con la biopatología de la epilepsia, lo que posiblemente explica por qué algunos pacientes presentan convulsiones. La ruta de señalización de ErbB está implicada en el desarrollo, el mantenimiento y la reparación de los sistemas nerviosos central y periférico (SNC y SNP). Influye en funciones esenciales como la migración neuronal, la plasticidad y el desarrollo de neuritas de diferenciación, la guía de axones, la formación de sinapsis, la función y plasticidad, la neurotransmisión, y la formación de

uniones neuromusculares. Notablemente, la señalización de Nrg-1, que interacciona con los receptores ErbB2-4, se ha asociado con enfermedades de las motoneuronas, lo que podría explicar la locomoción deteriorada que se observó en larvas mutantes de *trip12* y el retraso en las habilidades motoras observado en pacientes *TRIP12*. Además, la haploinsuficiencia de ERBB4 se ha vinculado a la epilepsia, lo que posiblemente aclara, de nuevo, las convulsiones en algunos pacientes. Como ruta aguas abajo para los receptores ErbB, la ruta de señalización de MAPK desempeña un papel crucial en el desarrollo y la maduración del sistema nervioso central (SNC), regulando el crecimiento, la proliferación y la diferenciación.

Las uniones comunicantes, compuestas por proteínas conexina, contribuyen a la comunicación intercelular en el SNC, regulando la función, la supervivencia, el mantenimiento y la diferenciación neuronal. La desregulación de la expresión de conexina durante el desarrollo cerebral se ha asociado con la microcefalia, lo que posiblemente explica el fenotipo observado en embriones mutantes. Numerosos procesos del desarrollo dependen de la endocitosis, particularmente la maquinaria endocítica está implicada en el desarrollo neurológico y en la fase adulta, regulando procesos tales como la diferenciación neuronal, la migración, la guía y el crecimiento de axones. Además, aunque sólo está significativamente enriquecida por genes regulados por disminución en *trip12* *-/-*, la actividad de transportadores ABC está vinculada a eventos morfogénicos, y las mutaciones en determinados genes se han asociado con trastornos del desarrollo intelectual. La apelina está implicada en la estructura o función de las neuronas, el estrés oxidativo y la señalización de Ca^{2+} . Por tanto, la regulación por disminución de la ruta podría contribuir a NDD. Implicada en la homeostasis de energía, la ruta de señalización de adipocitocina puede explicar la obesidad en pacientes con mutaciones en *TRIP12*. Más allá de su papel metabólico, esta ruta influye en procesos neurológicos tales como la neurogénesis y la sinaptogénesis.

En general, esta invención proporciona una explicación completa sobre como la alteración de *trip12* afecta a la expresión génica, dilucidando su papel en la determinación de la estructura y la función del sistema nervioso, entre otras cosas. Notablemente, este es el primer estudio en profundidad que aclara la intrincada dinámica molecular resultante de la mutación en *trip12*, lo que posiblemente dilucida las alteraciones observadas en pacientes con mutaciones en este gene.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a la creación y utilización de un modelo de animal no humano que porta al menos un alelo no funcional del gen

trip12, denominado a continuación en el presente documento “gen *trip12*” o “*trip12*”, en particular al gen *trip12* (interactor 12 del receptor de hormona tiroidea) (GRCh38.p14, cromosoma 2: 229.763.837-229.923.239, ENSG00000153827.15). Un modelo de este tipo sirve como una valiosa herramienta para investigar patologías del desarrollo neurológico asociadas con mutaciones en el gen *trip12*, incluyendo, pero sin limitarse a, trastorno del espectro autista (TEA) y discapacidad intelectual (DI). En realizaciones preferidas, este modelo de animal es una línea de pez cebra (*Danio rerio*) que recapitula los fenotipos morfológicos, fisiológicos y conductuales esenciales característicos de los trastornos del desarrollo neurológico. El fenotipo resultante puede emplearse en estrategias de selección analítica masiva para identificar y evaluar compuestos terapéuticos candidatos y para dilucidar mecanismos moleculares subyacentes.

Tal como se usa en el presente documento, cuando se introduce un término técnico por primera vez, se definirá inmediatamente después para garantizar la claridad.

Visión general del gen *trip12* y su papel en el desarrollo neurológico

El gen *TRIP12* (interactor 12 del receptor de hormona tiroidea) codifica para una proteína ubiquitina ligasa E3, un tipo de enzima que desempeña un papel crítico en el sistema ubiquitina-proteasoma. Este sistema es esencial para regular los niveles de proteínas dentro de las células seleccionando como diana proteínas específicas para su degradación. Al influir en qué proteínas se marcan para su descomposición, *TRIP12* ayuda a mantener el delicado equilibrio de moléculas de señalización, componentes estructurales y proteínas reguladoras que afectan a la función y viabilidad celulares.

TRIP12 está caracterizado por un dominio de repeticiones ARM/HEAT y un dominio HECT (homólogo al extremo C-terminal de E6-AP) catalítico, que confieren especificidad de sustrato y actividad ubiquitina ligasa, respectivamente. A través de la ubiquitinación, *TRIP12* puede modular la estabilidad, la localización y las interacciones de una amplia gama de proteínas implicadas en diversas rutas celulares. Aunque no todos sus sustratos se han caracterizado completamente, los estudios indican que *TRIP12* participa en procesos tales como la reparación del ADN, la progresión del ciclo celular y el control del crecimiento celular.

Dentro del sistema nervioso, la regulación del recambio de proteínas es vital para un desarrollo neurológico y una plasticidad sináptica apropiados. Nuevas evidencias sugieren que *TRIP12* está implicado en varios procesos del desarrollo neurológico:

Las neuronas dependen de una síntesis y una degradación de proteínas bien coordinadas para formar las sinapsis, refinar los circuitos neurales, y mantener la resistencia sináptica a lo largo del tiempo. Las ligasas E3 como TRIP12 garantizan que las proteínas sinápticas clave no se acumulen a niveles perjudiciales. Al modular la estabilidad de estas proteínas, TRIP12 puede influir en cómo las neuronas forman conexiones y adaptan su señalización en respuesta a la experiencia.

Durante el desarrollo cerebral, las células progenitoras y madre neurales deben regular cuidadosamente su progresión a través del ciclo celular y sus transiciones hacia destinos neuronales o gliales especializados. La regulación de proteínas de señalización del crecimiento y reguladores del ciclo celular por TRIP12 puede ayudar a garantizar que las células abandonen el ciclo celular en el momento apropiado y se diferencien correctamente.

La forma de las neuronas (ramificación dendrítica, crecimiento axonal) y la eliminación o estabilización de las sinapsis dependen de una dinámica de proteínas estrechamente controlada. La regulación incorrecta de las ubiquitina ligasas como TRIP12 puede conducir a una morfología neuronal anómala, una conectividad alterada, y deterioros en la formación de redes neurales funcionales estables.

Estudios genómicos e informes de casos clínicos recientes han identificado variantes en *TRIP12* asociadas con trastornos del desarrollo neurológico. Éstos incluyen discapacidad intelectual, rasgos relacionados con trastorno del espectro autista (TEA), retrasos del lenguaje, y otras diferencias cognitivas y conductuales. Aunque los mecanismos patógenos exactos no están completamente aclarados, surgen varios puntos clave:

Haploinsuficiencia de *TRIP12*: las mutaciones o deleciones de pérdida de función que reducen la cantidad normal de proteína TRIP12 funcional pueden conducir a fenotipos del desarrollo. Esto sugiere que son necesarios niveles precisos de actividad de TRIP12 para un desarrollo cerebral normal.

Presentaciones clínicas: los individuos con trastornos relacionados con *TRIP12* pueden mostrar un retraso del desarrollo global, dificultades de aprendizaje, diferencias en la conducta social, problemas de coordinación motora y, en algunos casos, rasgos faciales o patrones de crecimiento distintivos. Estos fenotipos resaltan la importancia de TRIP12 en el desarrollo cognitivo y cerebral temprano.

Por tanto, el gen *TRIP12* codifica para una ubiquitina ligasa E3 que regula proteínas clave vitales para el desarrollo y la función cerebrales. Su actividad apropiada es crucial para la formación de sinapsis, el crecimiento neuronal y el mantenimiento de funciones cognitivas y conductuales normales. Las alteraciones en la función de *TRIP12* pueden contribuir a un espectro de trastornos del desarrollo neurológico, destacando su importancia como gen regulador en el desarrollo cerebral típico y como posible diana para la intervención terapéutica en afecciones relacionadas.

10 Alelos no funcionales y modelos con inactivación génica

El término “inactivación génica”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, se refiere a una alteración genética que da como resultado la inactivación o reducción grave de la función normal de un gen, generalmente conseguida a través de mutaciones dirigidas. Un “alelo no funcional”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, es un alelo de un gen que no logra producir un producto de proteína funcional. Tales alelos no funcionales pueden generarse mediante deleciones, inserciones, mutaciones interruptoras, mutaciones de desplazamiento del marco de lectura, o cualquier modificación que altera el marco de lectura de tipo natural y da como resultado una proteína truncada o plegada incorrectamente.

En determinadas realizaciones de la presente invención, el alelo no funcional del gen *trip12* se genera mediante una mutación de desplazamiento del marco de lectura (tal como se usa por primera vez en el presente documento, “mutación de desplazamiento del marco de lectura” se refiere a una alteración genética que implica la inserción o delección de nucleótidos que no están en múltiplos de tres, desplazando de ese modo el marco de lectura ribosómico y dando como resultado habitualmente un codón de parada prematura y una proteína no funcional), que preferiblemente consiste en una delección de 12 pares de bases (pb) y una inserción de 1 pb en el exón 1 del gen *trip12*, en particular en el gen *trip12* (interactor 12 del receptor de hormona tiroidea) (GRCh38.p14, cromosoma 2: 229.763.837-229.923.239, ENSG00000153827.15). Esta alteración suprime efectivamente la capacidad del gen para producir una proteína funcional. Preferiblemente, el alelo no funcional corresponde a SEQ ID NO 1 (M4) o SEQ ID NO 2 (M5), véase a continuación:

35

WT-	ATGTCCAACCGGCCTAATTCCAATCCAGGGGGGTCACAGAGGAACACA
M1-	ATGTCCAACCGGCCTAATTCCAATCCAGG---GTCACAGAGGAACACA
M2-	ATGTCCAACCGGCCTAATTCCAATCCAGGGGGGTC-----CCGTTACAGAGGAACACA
M3-	ATGTCCAACCGGCCTAATTCCAATCCAGGGGGG-----CGTTACAGAGGAACACA
M4-	ATGTCCAACCGGCCTAATTCCAATCCAGGGG--TCACTGCGCCGTTACAGAGGAACACA
M5-	ATGTCCAACCGGCCTAATTCCAATC-----gTGCAGAGGAACACA

Patologías del desarrollo neurológico

5 Las “patologías del desarrollo neurológico”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, incluyen un amplio espectro de trastornos que surgen durante el desarrollo cerebral, que afectan a la capacidad intelectual, a la conducta, a la comunicación, y a las funciones motoras. Entre éstas, TEA y DI son particularmente relevantes para el gen *trip12*, en particular en mutaciones del gen *trip12* (interactor 12 del

10 receptor de hormona tiroidea) (GRCh38.p14, cromosoma 2: 229.763.837-229.923.239, ENSG00000153827.15). El “trastorno del espectro autista (TEA)”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, es un grupo heterogéneo de afecciones del desarrollo neurológico caracterizadas por deficiencias en la comunicación social y patrones de conducta restringidos y repetitivos. La “discapacidad intelectual (DI)”, tal

15 como se usa por primera vez en el presente documento, se refiere a una conducta adaptativa y una función cognitiva significativamente deterioradas. La alteración de la función del gen *trip12* en modelos de animal crea fenotipos que son paralelos a las características clave de TEA y DI, permitiendo de ese modo una mejor comprensión y exploración terapéutica.

20

Control sano

Un “control sano”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, es un animal de la misma especie y antecedentes genéticos, criado en las mismas condiciones,

25 pero que carece de la mutación alterativa en el gen *trip12*, en particular en el gen *trip12* (interactor 12 del receptor de hormona tiroidea) (GRCh38.p14, cromosoma 2: 229.763.837-229.923.239, ENSG00000153827.15). Tales controles son esenciales como puntos de referencia para comparar cambios fenotípicos y evaluar la gravedad y naturaleza de las alteraciones en animales con inactivación génica.

30

Características generales del modelo de animal con inactivación génica

En realizaciones preferidas, el animal con inactivación génica es un pez cebra. El pez cebra (*Danio rerio*), tal como se usa por primera vez en el presente documento, es un pez teleosteo pequeño de agua dulce usado frecuentemente en investigación en genética y biología del desarrollo. Ofrece un rápido desarrollo externo, embriones transparentes, y una fácil manipulación genética. Estos atributos hacen que el pez cebra sea un sistema ideal para modelar trastornos del desarrollo neurológico en humanos.

El modelo de animal no humano con inactivación génica puede ser homocigótico (*trip12* -/-) para el alelo no funcional, lo que significa que ambas copias del gen *trip12* están alteradas, o heterocigótico (*trip12* +/-), donde un alelo no es funcional y el otro es funcional. “Homocigótico”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, significa que posee dos alelos idénticos en un locus genético dado. “Heterocigótico”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, significa que posee dos alelos diferentes en un locus dado. Los mutantes homocigóticos muestran normalmente fenotipos más pronunciados, mientras que los heterocigotos muestran efectos intermedios, útiles para estudiar sensibilidades a la dosificación de los genes.

Características fenotípicas del modelo de animal con inactivación génica

Una ventaja clave del modelo de pez cebra es la capacidad de observar y cuantificar características morfológicas, fisiológicas y conductuales en etapas tempranas del desarrollo. Estas mediciones sirven como lecturas fenotípicas robustas.

Parámetros morfológicos:

Los animales con inactivación génica muestran fenotipos morfológicos distintivos con respecto a los controles sanos. Los cambios morfológicos específicos incluyen diferencias en la longitud corporal, el área ocular y el diámetro cefálico. Por ejemplo, el pez cebra con inactivación génica puede mostrar un aumento de ~73 % en la longitud corporal y de ~83 % en el área ocular o una reducción de ~65 % en el diámetro cefálico, lo que indica que la alteración del gen *trip12* tiene un impacto sobre el crecimiento y el desarrollo craneofacial. Tales mediciones cuantitativas precisas proporcionan una base objetiva para comparar poblaciones de mutantes y controles.

Después de mencionar por primera vez “longitud corporal”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la longitud convencional desde la punta de la boca

hasta la base de la cola. Después de mencionar por primera vez “área ocular”, en el presente documento se refiere al área de superficie bidimensional medida de la región ocular capturada mediante técnicas de obtención de imágenes. Después de mencionar por primera vez “diámetro cefálico”, se refiere a una dimensión lineal cuantificable de la región craneal, a menudo usada como medida indirecta de la morfología craneofacial.

Morfología y fisiología cardíacas:

A pesar de los fenotipos del desarrollo neurológico pronunciados, los animales con inactivación génica no muestran diferencias significativas en la morfología del corazón o frecuencia cardíaca. “Morfología del corazón”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, se refiere a la estructura anatómica macroscópica del corazón, y “frecuencia cardíaca”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, es la frecuencia de latidos del corazón medida a lo largo de un periodo dado. La ausencia de diferencias cardíacas sustanciales sugiere que es improbable que la letalidad de mutantes homocigóticos esté relacionada con las anomalías cardíacas, al menos basándose en las evaluaciones de frecuencia cardíaca y morfología macroscópica del corazón.

Retraso motor y deficiencias en las habilidades motoras:

Los animales con inactivación génica muestran deficiencias en habilidades motoras globales y retrasos motores considerables. “Retraso motor”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, indica un inicio o desarrollo más lento de conductas locomotoras normales, mientras que “deficiencias en las habilidades motoras”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, se refiere a un rendimiento reducido en pruebas tales como resistencia de nado, capacidad de respuesta direccional, o respuestas reflejas a estímulos. Estos deterioros en la función locomotora imitan a las dificultades motoras a menudo observadas en determinados trastornos del desarrollo neurológico, reforzando de ese modo la relevancia del modelo.

Alteraciones moleculares y celulares en el modelo con inactivación génica

La alteración de la función del gen *trip12*, en particular en el gen *trip12* (interactor 12 del receptor de hormona tiroidea) (GRCh38.p14, cromosoma 2: 229.763.837-229.923.239, ENSG00000153827.15), conduce a amplios cambios moleculares que afectan a diversos procesos biológicos:

Alteración en el transporte iónico, la transducción de señales, las respuestas celulares y las modificaciones de proteínas: los transportadores iónicos, las moléculas de señalización, y las proteínas implicadas en las rutas de respuesta celular se expresan de manera diferente en el modelo con inactivación génica. “Transporte iónico”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, implica el movimiento regulado de iones (por ejemplo, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) a través de membranas, crucial para la excitabilidad neuronal. “Transducción de señales”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, se refiere a los procesos mediante los cuales las células convierten las señales extracelulares en respuestas intracelulares funcionales, implicando complejas cascadas de interacciones de proteínas. “Respuestas celulares”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, abarca cambios en la conducta celular (por ejemplo, proliferación, diferenciación, apoptosis) desencadenados por indicaciones externas o internas. “Modificaciones de proteínas”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, incluye modificaciones posteriores a la traducción como la fosforilación, la glicosilación y la ubiquitinación que modulan la función, la estabilidad y las interacciones de proteínas.

La regulación anómala de estas rutas en el modelo con inactivación génica influye en el desarrollo neural. Las perturbaciones puede alterar el desarrollo de células y órganos, la extensión y guía de axones, y la transmisión sináptica gabaérgica y neuromuscular, manifestándose en última instancia en los fenotipos motores y craneofaciales observados. Las células y los órganos dependen de programas genéticos precisos para una diferenciación y un crecimiento apropiados. “Extensión y guía de axones”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, se refiere al proceso mediante el cual las neuronas extienden sus axones y navegan a ubicaciones diana, a menudo guiadas por gradientes moleculares. La “transmisión sináptica neuromuscular”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, describe la comunicación entre motoneuronas y fibras musculares, permitiendo movimientos coordinados. “Transmisión sináptica gabaérgica”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, se refiere a la neurotransmisión inhibitoria mediada por el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA). Los animales con inactivación génica muestran patrones de expresión alterados en genes asociados con estos procesos, dando como resultado una conectividad neuronal aberrante y una función de uniones neuromusculares deteriorada. Estas alteraciones moleculares se alinean con las deficiencias motoras observadas, vinculando la función del gen *trip12* a aspectos fundamentales de la formación y estabilización de redes.

Regulación por incremento de genes relacionados con complejos represivos de Polycomb (PRC) y factores de transcripción basales: la pérdida de la función del gen *trip12*, en particular en el gen *trip12* (interactor 12 del receptor de hormona tiroidea) (GRCh38.p14, cromosoma 2: 229.763.837-229.923.239, ENSG00000153827.15), desencadena la
 5 desregulación transcripcional. Los “complejos represivos de Polycomb (PRC)”, tal como se usa por primera vez en el presente documento, son conjuntos de múltiples proteínas que modulan la expresión génica y la estructura de la cromatina, a menudo manteniendo los genes en un estado reprimido durante el desarrollo. El modelo con inactivación génica
 10 muestra regulación por incremento de genes asociados con PRC, que indica remodelación epigenética en respuesta a la alteración del gen *trip12*.

Adicionalmente, los factores de transcripción basales, incluyendo TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE y TFIIH, muestran una expresión elevada. Los “factores de transcripción basales”,
 15 tal como se usa por primera vez en el presente documento, son los componentes proteicos esenciales requeridos para el inicio de la síntesis de ARN mediante ARN polimerasa II en los promotores. Sus niveles alterados sugieren que la maquinaria transcripcional central está perturbada, conduciendo a cambios generalizados en los patrones de expresión génica que respaldan el fenotipo con inactivación génica.

Modelo de animal preferido: pez cebra

Aunque la invención es aplicable a diversos animales no humanos tales como roedores u otras especies de peces, se prefiere el pez cebra debido a su rápido desarrollo externo,
 25 embriones transparentes, y una genética bien establecida. Dentro de esta realización, se generan y mantienen líneas de pez cebra estables que portan el alelo no funcional de *trip12* (preferiblemente a través de una mutación de desplazamiento del marco de lectura). La fecundación externa y la alta fecundidad del pez cebra facilitan selecciones a gran escala, permitiendo la evaluación de fenotipos en cientos de individuos
 30 simultáneamente. Esta escalabilidad es particularmente ventajosa para los procesos de descubrimiento de fármacos que buscan lecturas fenotípicas eficientes.

Para mejorar adicionalmente esta realización, pueden analizarse larvas de pez cebra en múltiples fases de desarrollo (por ejemplo, 24 horas después de la fecundación (hpf), 48
 35 hpf, 72 hpf, y 5 días después de la fecundación (dpf)) para documentar la aparición y progresión de rasgos fenotípicos. Al correlacionar estas ventanas del desarrollo con los perfiles de expresión, los investigadores obtienen información sobre los puntos de tiempo

críticos para la función del gen *trip12* y las posibles ventanas terapéuticas para la intervención.

Métodos de manipulación genética

5

Las realizaciones preferidas emplean tecnologías tales como CRISPR/Cas9 para crear el alelo con inactivación génica. Después de mencionar por primera vez “CRISPR/Cas9”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una herramienta de edición del genoma derivada de sistemas inmunitarios bacterianos que usa un ARN guía para dirigir la nucleasa Cas9 a una ubicación genómica específica, induciendo roturas bicatenarias que se reparan con errores que conducen a inserciones o deleciones.

10

Al inyectar ARN guía y Cas9 en embriones de pez cebra en fase de una sola célula, pueden inducirse eficientemente mutaciones específicas en el gen *trip12*. Los fundadores seleccionados (F0) se identifican mediante genotipado y luego se crían para producir líneas estables (F1, F2, etc.). La realización preferida implica realizar una selección sistemática de estas líneas en busca de la mutación de desplazamiento del marco de lectura deseada que produce el alelo no funcional del gen *trip12*. El refinado adicional incluye el cruzamiento exogámico de mutantes con razas de tipo natural para minimizar los efectos inespecíficos, garantizando que los fenotipos observados son directamente atribuibles a la alteración del gen *trip12*.

15

20

Métodos de caracterización fenotípica

25

Una realización preferida implica un fenotipado cuantitativo riguroso. Los sistemas de obtención de imágenes de alta resolución capturan la morfología larvaria, permitiendo la medición precisa de la longitud corporal, el área ocular y el diámetro cefálico. Un software de seguimiento automatizado cuantifica la distancia de nado para determinar la actividad locomotora y la competencia de habilidades motoras.

30

Para una robustez mejorada, se evalúa cada fenotipo en grandes cohortes de mutantes y controles para garantizar la significación estadística. Este fenotipado detallado es una etapa crucial en la validación de la relevancia y la sensibilidad del modelo a las manipulaciones experimentales, incluyendo los tratamientos farmacológicos.

35

Técnicas de obtención de perfiles moleculares

En una realización preferida, se realizan análisis transcriptómicos completos (por ejemplo, secuenciación de ARN, paneles de qRT-PCR) en larvas de mutantes y controles en fases del desarrollo definidas para identificar redes de genes influidas por la pérdida del gen *trip12*. Pueden emplearse métodos adicionales tales como secuenciación ChIP (secuenciación por inmunoprecipitación de cromatina) para entender cómo los genes relacionados con PRC y los factores de transcripción basales modulan los estados de la cromatina. Los estudios proteómicos también pueden revelar cambios en las modificaciones posteriores a la traducción, ayudando en el mapeo de la cascada molecular aguas abajo del gen *trip12*.

Al integrar los datos moleculares con las mediciones fenotípicas, surge una perspectiva al nivel de sistema, que ilustra cómo el gen *trip12* influye en múltiples capas biológicas: genética, epigenética, morfológica, funcional, y conductual.

Selección de fármacos e intervenciones terapéuticas

Una realización crucial de la invención implica utilizar el modelo con inactivación génica como plataforma para la selección analítica masiva de fármacos para identificar compuestos candidatos capaces de prevenir o aliviar los fenotipos del desarrollo neurológico. Los compuestos que se sospecha que modifican las trayectorias del desarrollo neurológico, tales como moléculas pequeñas, péptidos o productos biológicos, se administran a larvas de pez cebra de control y mutantes. Las mejoras en los parámetros morfológicos, la normalización de la actividad motora o el restablecimiento parcial de la función fisiológica normal o los patrones de expresión típicos sugieren una posible eficacia terapéutica.

Para una visión más profunda, se someten a prueba múltiples concentraciones y duraciones de exposición para establecer relaciones dosis-respuesta e identificar la dosis eficaz mínima. Los controles incluyen mutantes no tratados, tipos naturales tratados con fármaco y, si es aplicable, compañeros de banco que portan genotipos diferentes. Los compuestos que se muestran prometedores en el modelo de pez cebra pueden avanzar a modelos de mamífero o sistemas de cultivo celular de origen humano para su validación adicional.

Esta realización permite selecciones farmacológicas rápidas, rentables e *in vivo*. La naturaleza transparente de las larvas de pez cebra permite la obtención de imágenes no

invasiva de las respuestas farmacológicas, facilitando el análisis en tiempo real de la distribución de compuesto y los tejidos diana.

Generación de modelos de animal no humano adicionales

5

Si bien se prefiere el pez cebra, los métodos descritos en el presente documento son aplicables a otras especies. Los roedores, por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería para portar una mutación de desplazamiento del marco de lectura similar en su gen *trip12*, proporcionando evidencias adicionales para la conservación evolutiva de su función. Esta realización fortalece la relevancia traslacional de los hallazgos, garantizando que las intervenciones eficaces en el pez cebra también tienen el potencial de funcionar en mamíferos.

10

Además, tener múltiples modelos de animal permite estudios comparativos. Por ejemplo, puede realizarse una selección rápida de una gran biblioteca química con un modelo de pez cebra, mientras que luego puede usarse un modelo de ratón para una electrofisiología detallada, pruebas conductuales de orden mayor, y estudios a largo plazo de la plasticidad sináptica. Este enfoque estratificado acelera el proceso desde el descubrimiento de la función génica hasta la identificación de candidatos clínicos.

20

Identificación y validación de biomarcadores

Otra realización preferida implica identificar biomarcadores, firmas moleculares que reflejan la presencia o gravedad de los fenotipos del desarrollo neurológico. Al correlacionar los datos transcriptómicos, proteómicos y epigenómicos con los desenlaces fenotípicos, puede definirse modificaciones de proteínas o conjuntos de genes específicos como biomarcadores. Estos biomarcadores pueden facilitar la detección temprana de anomalías del desarrollo neurológico tanto en el modelo experimental como en pacientes posiblemente humanos.

25

30

Los estudios de validación garantizan que estos biomarcadores son reproducibles y están directamente vinculados a la función del gen *trip12*. Los biomarcadores también pueden servir como lecturas farmacodinámicas en experimentos de selección de fármacos, permitiendo una rápida evaluación de si un compuesto candidato ha participado en las rutas relevantes antes de que las mejoras morfológicas o conductuales sean evidentes.

35

Métodos para producir el modelo con inactivación génica

En un flujo de trabajo típico, a embriones de pez cebra recién fecundados se les microinyectan reactivos CRISPR/Cas9 que seleccionan como diana el exón 1 del gen *trip12*. Se crían los fundadores F0 resultantes hasta la fase adulta y se someten a

5 cruzamiento exogámico con peces de tipo natural. La descendencia (generación F1) se somete a genotipado mediante PCR y secuenciación para identificar aquellos que portan la mutación de desplazamiento del marco de lectura deseada. Los peces F1 se someten a intercruzamiento para producir peces con inactivación génica heterocigóticos y homocigóticos (generación F2).

Una vez establecidas, se mantienen estas líneas estables mediante el cruzamiento de portadores mutantes, garantizando un suministro consistente de embriones para los experimentos. Los protocolos de cría convencionales garantizan que las variables ambientales (por ejemplo, temperatura, ciclo de luz, cronograma de alimentación)

15 permanezcan consistentes, minimizando los factores de confusión en los fenotipos observados.

Métodos para usar el modelo con inactivación génica para identificar productos terapéuticos

Para la selección, se colocan lotes de larvas de mutantes y controles en una fase del desarrollo definida (por ejemplo, 2-3 dpf) en placas de múltiples pocillos. Se disuelven los compuestos candidatos en el medio embrionario y se exponen las larvas durante intervalos especificados. Los sistemas de seguimiento automatizado y obtención de

25 imágenes de alto contenido capturan los datos morfológicos y conductuales antes y después del tratamiento. Simultáneamente, pueden recogerse subconjuntos de larvas para el análisis molecular, proporcionando biomarcadores tempranos de acción farmacológica.

Los compuestos que mejoran las conductas motoras se consideran aciertos. Los experimentos de seguimiento refinan las listas de candidatos al someter a prueba múltiples dosis, confirmando la especificidad (ausencia de rescate en mutantes no relacionados), y verificando la seguridad y la falta de toxicidad. Este enfoque integrado, que vincula el genotipo con el fenotipo con la intervención, es una fortaleza central de la

35 invención. Proporciona un proceso eficiente para moverse desde la información genética hasta oportunidades terapéuticas tangibles.

Conclusión y ventajas del modelo con inactivación génica

Al emplear un sistema de vertebrado manejable genéticamente, la presente invención ofrece una poderosa herramienta para analizar minuciosamente los mecanismos moleculares detrás de los trastornos del desarrollo neurológico. A diferencia de los modelos de cultivo celular, que carecen de un sistema nervioso completamente integrado, el modelo de pez cebra recapitula los aspectos esenciales de la fisiología y el desarrollo *in vivo*. A diferencia de los vertebrados superiores, el pez cebra permite selecciones de fármacos y evaluaciones analíticas masivas más rápidas en etapas tempranas del desarrollo.

La inactivación génica del gen *trip12* crea un modelo estable y reproducible que puede estudiarse a múltiples niveles, desde alteraciones moleculares y celulares hasta morfología y conducta de organismo completo, permitiendo una comprensión completa de la función del gen. La identificación de redes génicas alteradas, mecanismos sinápticos alterados y cambios epigenéticos en el modelo con inactivación génica proporciona pistas mecanísticas que pueden guiar el desarrollo de intervenciones terapéuticas dirigidas.

En resumen, las realizaciones detalladas descritas en el presente documento presentan una plataforma completa para modelar patologías del desarrollo neurológico, descubrir candidatos a fármaco, y avanzar en la comprensión de procesos biológicos fundamentales subyacentes a TEA, DI, y trastornos relacionados. Las ventajas (capacidad analítica masiva, biología integrada, y fuertes correlaciones fenotípicas-moleculares) posicionan el modelo de animal con inactivación génica como primordial en la investigación en neurobiología traslacional.

EjemplosEjemplo 1

1. Materiales y métodos

1.1. Cría de peces cebra

Se mantuvieron peces cebra de tipo natural (WT) de la raza AB en las instalaciones para peces del Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física de la Universidad

de Santiago de Compostela (AE-LU-003). Se mantuvo la temperatura a 28 °C, pH ~7, conductividad ~600 mS, y el fotoperiodo consistía en 14 h de luz y 10 h de oscuridad, según los protocolos establecidos. Se realizaron el cuidado, el mantenimiento y los procedimientos según las pautas actuales de la comunidad europea y el gobierno español sobre el cuidado y la experimentación con animales (directriz 2010-63-UE y RD 53/2013) y se aprobaron por el comité bioético de la Universidad de Santiago de Compostela y el gobierno de la Junta de Galicia.

1.2. Inactivación génica mediada por CRISPR/Cas9 de *trip12* y caracterización de genotipo

Se generó la mutación de pérdida de función de *trip12* usando el sistema de edición génica CRISPR-Cas9.

Se adoptó el protocolo de CRISPR a partir del proporcionado amablemente por la Dra. Fernández Miñán (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CABD). Después de seleccionar la región diana (primer exón codificante, en este caso), se identificó un oligonucleótido específico de gen con la herramienta web CRISPRscan, 5'-aattaatacgactcactataGGACGGCGCAGTGACCCCCCgttttagagctagaatagc-3'.

Se amplificó el oligonucleótido mediante PCR con un oligonucleótido de armazón habitual 5'-GATCCGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3' para obtener un fragmento de 125 pares de bases (pb), usando la ADN polimerasa de alta fidelidad iProof™ (Bio-Rad), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se transcribió el producto de PCR con el kit de transcripción MAXIscript™ T7 (Thermo Fisher Scientific), se purificó usando el kit RNA Clean&Concentrator-5 (Zymo Research) y se midió la concentración del producto (ARN guía, ARNg) con el espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, a embriones de pez cebra en fase de una sola célula se les microinyectaron 2-4 nl de una mezcla que consistía en 15-40 ng/ml del ARNg, 1,2 mg/ml de la proteína Cas9 TrueCut™ v2 (Thermo Fisher Scientific) y disolución de rojo de fenol (0,1 %).

Se realizó la verificación de la eficiencia del protocolo de CRISPR/Cas9 y la producción de mutaciones mediante la detección de heterodúplex en un gel de poliacrilamida al 5 %. Para este fin, se aisló ADN genómico procedente de embriones inyectados 48 horas después de la fecundación (hpf) con resina Chelex-100 (Bio-Rad) y se amplificó mediante

PCR con ADN polimerasa AmpliTaq Gold™ (Thermo Fisher Scientific), según las instrucciones del fabricante, con los siguientes cebadores: directo 5'-GAGGATGAGGGAACATCCAGA-3' e inverso 5'-CTGCTGCACAAACGGAAGT-3'. Una vez confirmadas las mutaciones, se criaron embriones F0 hasta la fase adulta, se detectaron mutantes fundadores por la presencia de heterodúplex y se sometieron a cruzamiento exogámico adicionalmente con individuos WT. Se verificó la presencia de mutaciones en embriones F1 y adultos F1 mediante análisis de heterodúplex, y se realizó la caracterización de tales mutaciones mediante clonación TA usando el kit de clonación TA original (Invitrogen) y secuenciación de Sanger adicional con el kit de secuenciación de ciclo BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se analizaron las secuencias usando el software CodonCode Aligner y se realizó el análisis *in silico* de las proteínas resultantes de secuencias mutadas con la herramienta de traducción ExPASy.

Se sometieron a cruzamiento endogámico animales adultos heterocigóticos (*trip12 +/-*) de la generación F1 que portaban la misma mutación para obtener la generación F2 (25 % +/+, 50 % +/-, 25 % -/-), que se usaron para los experimentos posteriores. Se analizó el genotipo de cada pez mediante gel de agarosa y análisis de fragmentos (colorante GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems)) al final de cada experimento, ya que no se consiguió la generación de la línea estable homocigótica debido a la letalidad de mutantes homocigóticos en el plazo de los primeros 23 dpf (véase a continuación).

1.3. Análisis de supervivencia

Debido a la ausencia de mutantes adultos homocigóticos, se llevó a cabo un análisis de supervivencia para determinar el punto de desarrollo en el que la homocigosis conduce a letalidad. Para este fin, se realizaron varios cruces entre mutantes heterocigóticos, se verificó la fecundación de huevos, y posteriormente se evaluaron el desarrollo apropiado y la mortalidad de la descendencia dos veces al día. Se recogieron las larvas y los embriones muertos y se congelaron inmediatamente en Chelex-100 para el genotipado posterior, tal como se describió previamente. A los 35 dpf, se sometieron a genotipado las larvas restantes mediante pinzado de la aleta caudal. Se analizaron los datos tal como se describe en la sección 1.8.

1.4. Caracterización de fenotipo

Se usaron embriones 48 hpf de la generación F2 para la caracterización fenotípica. Para

este propósito, se anestesiaron los embriones con metanosulfonato de tricaína al 0,02 % (MS-222, Sigma-Aldrich) y se capturaron imágenes con una cámara Nikon Ds-Ri1 acoplada a un microscopio de fluorescencia invertido (AZ100 Multizoom, Nikon). Se analizaron adicionalmente las imágenes usando el software Nis-Elements BR (versión 4.13.04 64 bit) y se midieron tres características fenotípicas a partir de cada embrión tal como se describe en la sección 1.8.

1.5. Frecuencia cardiaca de los mutantes

Para detectar posibles anomalías cardíacas en mutantes de pez cebra, se analizó la frecuencia cardíaca de embriones de pez cebra 3 dpf. Se seleccionó esta fase específica. Para este fin, se anestesiaron las larvas con tricaína tal como se describe en la sección 1.4, y luego se colocaron lateralmente en un portaobjetos de microscopio. Se registraron y midieron los latidos del corazón durante 20 segundos usando un microscopio de Nikon conectado al software Heart-Beat/Blow-Flow de Viewpoint (Viewpoint Life Sciences). Se exportaron a Microsoft Excel los datos resultantes y se analizaron tal como se describe en la sección 1.8.

1.6. Actividad locomotora de las larvas

Se evaluaron las funcionalidades motoras generales en larvas 5 y 7 dpf. En las fases más tempranas, las larvas tienden a mostrar movimientos de tipo explosivo, mientras que en las fases más tardías, coincidentes con la completa reabsorción del vitelo y la alimentación inicial, su movimiento normal puede verse alterado durante su búsqueda de alimento. Se transfirieron las larvas a placas de 24 pocillos (una larva por pocillo) y se colocó cada placa en el dispositivo Zebrabox conectado al software Zebralab (Viewpoint Life Sciences). Para el seguimiento automatizado de cada movimiento de cada pez, se estableció un análisis de 60 minutos que consistía en alternar periodos de 10 minutos de luz y oscuridad en un bucle continuo. Se exportó a Microsoft Excel la actividad integrada expresada como el número de píxeles movidos por minuto proporcionado por el software y se analizó adicionalmente tal como se describe en la sección 1.8.

1.7. Secuenciación de ARN

Para el análisis transcriptómico, se anestesiaron embriones 48 hpf resultantes de la generación F2 y se sacrificaron adicionalmente con una sobredosis de tricaína (0,2 %). Posteriormente, se recogió la cabeza, se sumergió en RNAlater (Sigma-Aldrich), y se

conserve a -80°C hasta su uso, mientras que el tejido restante se recogió para el genotipado tal como se describió previamente. Después del genotipado, se agruparon los embriones según su genotipo y se realizó extracción de ARN con el microkit miRNeasy (Qiagen). Se cuantificaron los productos de ARN usando el espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se enviaron un total de 9 muestras (3 +/+, 3 +/-, 3 -/-), de 1-2 mg cada una, para la secuenciación. Se evaluó la integridad del ARN en un bioanalizador 2100 (Agilent), y todas las muestras mostraron valores de número de integridad de ARN (RIN) ≥ 4 , el valor establecido mínimo para la construcción y secuenciación de bibliotecas de ARN mensajero (ARNm). Se secuenciaron las bibliotecas en una ejecución con PE 150 pb Nova-Seq de Illumina por parte de Novogene (Cambridge, Reino Unido) y se evaluó la calidad de la salida de secuenciación usando el software FastQC v.0.12.13.

Se realizó la eliminación de lecturas de baja calidad, secuencias contaminantes, lecturas de baja complejidad (secuencias de ADN repetitivas) y lecturas cortas en pares de lectura usando el software Fastp v.0.22.0. Se alinearon las lecturas filtradas frente a la última versión del genoma del pez cebra (GRCz11) y se realizó la cuantificación de la abundancia de transcritos usando el software Kallisto v.0.46.1. Se realizó el análisis computacional usando los recursos del Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA).

Se empleó análisis PCA para la agrupación de muestras y la identificación de valores atípicos. Se realizó análisis de expresión génica diferencial entre individuos +/+, +/- y -/- usando el software DESeq2 v.1.42. [27], y se sometieron los DEG (valor de p ajustado por FDR $<0,05$) a ontología génica (GO) y análisis de rutas de Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) usando la base de datos para Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado (DAVID v2023q4) [28, 29], sirviendo como fondo el transcriptoma de pez cebra obtenido del experimento. Se identificaron rutas de KEGG y términos de GO significativamente enriquecidos basándose en valores de p ajustados por FDR $<0,05$. Se generaron gráficos usando el paquete “ggplot2”.

1.8. Análisis estadístico

Se analizaron los datos de fenotipo, latidos del corazón y locomoción usando el software GraphPad Prism versión 7.02. Se realizó comparación estadística usando ANOVA unilateral para datos independientes seguido de comparaciones múltiples de Dunnett. Se realizaron análisis de supervivencia y secuenciación de ARN usando el software Rstudio

v.2023.9.1.494. Para el ensayo de supervivencia, se generó una curva de supervivencia de Kaplan-Meier, se evaluó la significación estadística mediante comparación por pares usando la prueba de rangos logarítmicos y se ajustó el valor de p mediante corrección de Bonferroni. El análisis detallado de los datos de secuenciación de ARN se describe en la sección 1.7. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$. Las diferencias se representan en las figuras tal como sigue: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

2. RESULTADOS

2.1. Inactivación génica mediada por CRISPR/Cas9 de *trip12*

Se generaron mutantes de *trip12* usando CRISPR/Cas9. Tal como se muestra en la figura 1A, se seleccionó el primer exón codificante como sitio diana, específicamente, 24 pb aguas arriba del codón de inicio ATG. El análisis del genotipo reveló cinco alelos mutantes diferentes (figura 1A): los alelos M1, M2 y M3 carecían de 3, 6 y 9 pb respectivamente dentro del sitio diana, pero conservaban el marco de lectura abierto normal, y sólo faltaban 1, 2 y 3 aminoácidos con respecto a la proteína WT, pudiendo generar posiblemente una proteína funcional. Por el contrario, el análisis *in silico* para los alelos M4 y M5, que portan una delección de 2 pb y una delección de 12 pb y una inserción de 1 pb (figura 1A), respectivamente, reveló que ambos eran mutaciones de desplazamiento del marco de lectura y también generaban codones de parada prematura, conduciendo a una proteína con 83 aminoácidos en el caso del alelo M4 y una proteína de 80 aminoácidos para el alelo M5, a diferencia de la proteína WT de 2053 aminoácidos (figura 1B). Ambas proteínas mutadas perdieron la mayor parte del dominio IDR, esencial para la interacción con la cromatina, y todos los dominios ARM y WWE, que son responsables de las interacciones proteína-proteína. De manera importante, las proteínas mutadas carecían del dominio HECT C-terminal, que es crucial para la actividad de ubiquitinación. La morfología macroscópica de peces que portan estas dos mutaciones fue similar, de modo que, debido a la posibilidad de distinguir individuos heterocigóticos que portan la delección de 12 pb y la inserción de 1 pb (alelo M5) en gel de agarosa, se decidió continuar el análisis con esta mutación.

2.2. Análisis de supervivencia

Tal como se muestra en la figura 2, tanto *trip12* +/- como *trip12* -/- mostraron una disminución pronunciada en las probabilidades de supervivencia, alcanzando *trip12* +/-

una probabilidad de supervivencia del 50 % a los 12 días y *trip12* $-/-$ a los 11 días. Al final del análisis de 35 días, las probabilidades de supervivencia disminuyeron adicionalmente hasta el 10 % para *trip12* $+/-$ y el 0 % para *trip12* $-/-$. Notablemente, el análisis de supervivencia reveló que los mutantes *trip12* $-/-$ no sobrevivieron más allá de 23 días después de la fecundación (dpf). La prueba de rangos logarítmicos ajustada por Bonferroni reveló diferencias significativas en la supervivencia entre individuos *trip12* $+/+$ y *trip12* $+/-$ ($p = 0,01231$), así como entre individuos *trip12* $+/+$ y *trip12* $-/-$ ($p = 0,00076$), mientras que la comparación de *trip12* $+/-$ y *trip12* $-/-$ no fue significativa ($p = 0,34288$).

2.3. Análisis de fenotipo de mutantes de *trip12*

Con el fin de determinar posibles anomalías morfológicas, se tomaron fotografías de embriones 48 hpf y posteriormente se analizaron las imágenes. Aunque la morfología macroscópica de los embriones mutantes era normal en comparación con individuos WT (figura 3A), el resultado de medir la longitud corporal, el diámetro cefálico y el área ocular reveló diferencias estadísticamente significativas para las tres características. Tal como se muestra en la figura 3B, en mutantes tanto heterocigóticos como homocigóticos, se observó un aumento en la longitud corporal ($+/+$: 1462,73 mm; $+/-$: 1507,91 mm; $-/-$: 1518,83 mm) y en el área ocular ($+/+$: 9959,24 mm²; $+/-$: 12848,12 mm²; $-/-$: 13190,31 mm²), mientras que el diámetro cefálico resultó que estaba disminuido en mutantes de *trip12* ($+/+$: 205,73 mm; $+/-$: 199,16 mm; $-/-$: 196,82 mm). En términos generales, el 73 % de mutantes heterocigóticos y el 72 % de mutantes homocigóticos presentaban una longitud corporal más larga (figura 3C, panel izquierdo), el 63 % de mutantes heterocigóticos y el 68 % de mutantes homocigóticos presentaban un diámetro cefálico reducido (figura 3C, panel central) y el 85 % de mutantes heterocigóticos y el 82 % de mutantes homocigóticos presentaban un diámetro ocular aumentado (figura 3C, panel derecho). De manera similar, los morfantes 48 hpf de *trip12* muestran un fenotipo anómalo en comparación con sus compañeros WT.

2.4. Frecuencia cardiaca

La disminución de supervivencia en individuos heterocigóticos y letalidad en homocigosis, junto con el hecho de que la insuficiencia cardiaca ya se ha relacionado con una supervivencia disminuida en pacientes con DI, motivaron la evaluación de la actividad cardiaca en mutantes de pez cebra de *trip12*. Además, se sabe que TRIP12 actúa sobre SOX6, crucial para el mantenimiento de las células cardiacas, y se ha hallado que está regulado por incremento en algunos pacientes con mutaciones en *TRIP12*. Se evaluó el

funcionamiento general del corazón midiendo la frecuencia cardiaca. Se halló que ni los mutantes heterocigóticos ni los homocigóticos muestran diferencias significativas en los latidos del corazón en comparación con los individuos WT (figura 3D). Adicionalmente, la morfología macroscópica del corazón era normal en mutantes en comparación con los animales WT. Este resultado sugiere que la letalidad de individuos homocigóticos podría no estar relacionada con las anomalías cardíacas, al menos en lo que respecta a los latidos del corazón.

2.5. Análisis locomotor de mutantes de *trip12*

El seguimiento automatizado de los movimientos de los peces hizo posible determinar la distancia recorrida por cada pez (medida en píxeles por minuto) a los 5 y 7 dpf en condiciones de luz y oscuridad. Tal como se muestra en la figura 4A, el análisis reveló que, en ambas condiciones, la distancia recorrida por individuos heterocigóticos y homocigóticos 5 dpf no fue significativamente diferente a la de individuos WT. Por el contrario, cuando se midió la actividad locomotora a los 7 dpf, los mutantes heterocigóticos y homocigóticos mostraron una disminución de movimiento estadísticamente significativa tanto en luz como en oscuridad, en comparación con los individuos WT (figura 4B). Adicionalmente, en todos los casos se observó que la locomoción es superior en condiciones de oscuridad, normalmente relacionada con un aumento en la ansiedad debida al cambio de estímulo. Estos resultados muestran que, en términos generales, los mutantes de *trip12* presentan funcionalidades motoras alteradas. Del mismo modo, los morfantes de *trip12* 5 dpf mostraron una motilidad significativamente menor que sus homólogos WT, independientemente de las condiciones de luz u oscuridad.

2.6. Secuenciación de ARN

Para explorar aquellos genes y rutas moleculares afectados por la inactivación génica de *trip12*, se comparó el transcriptoma de individuos WT con mutantes *trip12* +/- y *trip12* -/-. En el análisis comparativo entre *trip12* +/+ y *trip12* +/-, se identificaron un total de 11432 genes expresados de manera diferente (DEG). Entre éstos, 5396 genes estaban regulados por incremento, mientras que 6036 genes mostraron regulación por disminución en el grupo *trip12* +/-. Cuando se compara *trip12* +/+ frente a *trip12* -/-, se observaron 7920 DEG, mostrando 3658 genes regulación por incremento y mostrando 4262 genes regulación por disminución en el grupo *trip12* -/-. El análisis de GO reveló varios procesos biológicos (BP) regulados por incremento, principalmente relacionados

con la regulación del ciclo celular, el procesamiento de ADN, ARN y proteínas, los procesos metabólicos y del desarrollo y, tal como se esperaba, implicados en procesos del desarrollo neurológico (por ejemplo, regulación de la neurogénesis y diferenciación neuronal, morfogénesis viscerocraneal embrionaria y desarrollo del cerebro, la retina y el cristalino) (figura 5A). A la inversa, los genes regulados por disminución apuntan hacia un impacto significativo sobre los BP relacionados con el transporte iónico (calcio, sodio, potasio), la transducción de señales, las respuestas celulares, las modificaciones de proteínas y, notablemente, en procesos neuronales y del desarrollo (por ejemplo, desarrollo de células y órganos, extensión y guía de axones, y transmisión sináptica gabaérgica y neuromuscular) (figura 5B). Según los BP alterados, los componentes celulares (CC) enriquecidos abarcan complejos del ribosoma y empalmosoma, estructuras nucleares y estructuras y orgánulos celulares, especialmente mitocondrias, mientras que los CC regulados por disminución se agrupan predominantemente en componentes sinápticos (membrana presináptica y postsináptica, cuerpo celular neuronal, espinas dendríticas, complejo de receptor GABA-A, complejos de los canales iónicos, y componentes de membranas y uniones). Finalmente, las funciones moleculares (MF) reguladas por incremento implican principalmente actividades reguladoras, enzimáticas (ubiquinona, ubiquitina o ATPasa) y de unión de ácidos nucleicos, mientras que las MF reguladas por disminución incluyen actividades de transportadores, canales iónicos (calcio, sodio, potasio, cloruro), enzimas, cinasas, así como receptores (GABA-A) y de unión.

Para investigar adicionalmente las implicaciones funcionales que ejercen los DEG sobre los individuos *trip12* +/- y *trip12* -/-, se realizó análisis de rutas de KEGG. Con respecto a los genes regulados por incremento (figura 6A), el presente análisis reveló implicaciones sustanciales en diversas rutas biológicas. Aquellas asociadas con la reparación del ADN fueron la ruta de anemia de Fanconi, la reparación de apareamientos erróneos, la reparación de excisión de nucleótidos y bases, mientras que en relación con la regulación y degradación de proteínas, se observó un enriquecimiento en las rutas de proteólisis mediada por ubiquitina y del proteasoma. Las rutas de regulación y procesamiento del ARN estaban notablemente implicadas, demostrando el enriquecimiento en empalmosoma, degradación de ARN, ruta de vigilancia de ARNm, biogénesis de ribosomas, y biosíntesis de aminoacil-ARNt. Los mecanismos de regulación de la cromatina también se ven afectados, con enriquecimiento en las rutas de remodelación de cromatina dependiente de ATP y complejo represivo de Polycomb. La energética celular también está enriquecida, impulsada por genes regulados por incremento en las rutas de fosforilación oxidativa y mitofagia-animal. Además de éstos, otros procesos

celulares esenciales muestran regulación por incremento, incluyendo el ciclo celular, la replicación de ADN, los factores de transcripción basales, y el transporte nucleocitoplásmico. El presente análisis también aclara cómo influyen los genes regulados por disminución en rutas clave (figura 6B), principalmente relacionadas con la comunicación y señalización celular. Éstas incluyen las rutas de señalización de adipocitocina, GnRH, fosfatidilinositol, calcio, ErbB, apelina y MAPK o la señalización adrenérgica en miocardiocitos, unión comunicante, adhesión focal y endocitosis. Además, los genes regulados por disminución también contribuyen al enriquecimiento de la ruta de contracción de músculos lisos vasculares.

10

REIVINDICACIONES

1. Modelo de animal no humano con inactivación génica del gen *trip12* para patologías del desarrollo neurológico asociadas con mutaciones en dicho gen, en el que el modelo de animal no humano con inactivación génica comprende al menos un alelo no funcional del gen interactor 12 del receptor de hormona tiroidea (*trip12*).
5
2. Modelo de animal no humano con inactivación génica según la reivindicación 1, en el que el gen *trip12* es el gen *trip12* (interactor 12 del receptor de hormona tiroidea) (GRCh38.p14, cromosoma 2: 229.763.837-229.923.239, ENSG00000153827.15).
10
3. Modelo de animal no humano con inactivación génica según la reivindicación 1 ó 2, en el que el modelo de animal no humano con inactivación génica es homocigótico, *trip12* ^{-/-}, o heterocigótico, *trip12* ^{+/-}, para el alelo no funcional.
15
4. Modelo de animal no humano con inactivación génica según la reivindicación 2 ó 3, en el que el alelo se hace no funcional mediante una mutación de desplazamiento del marco de lectura que consiste en una delección de 12 pb y una inserción de 1 pb en el exón 1 del gen *trip12*.
20
5. Modelo de animal no humano con inactivación génica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el modelo de animal está caracterizado además por las siguientes características fenotípicas:
25
 - a. un aumento significativo del 0,05 % en la longitud corporal observado en aproximadamente el 73 % (± 10 % del 73 %) de individuos, un aumento significativo del 0,05 % en el área ocular observado en aproximadamente el 82 % (± 10 % del 82 % %) de individuos, o una reducción significativa del 0,05 % en el diámetro cefálico observada en aproximadamente el 65 % (± 10 % del 65 %) de individuos, con respecto a una población de controles sanos;
30
 - b. una morfología macroscópica del corazón y una frecuencia cardíaca que no difieren significativamente con respecto a un control sano; y
35
 - c. retraso motor y deficiencias en habilidades motoras globales con respecto a un

control sano.

6. Modelo de animal no humano con inactivación génica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el modelo de animal está caracterizado por tener genes alterados asociados con el transporte iónico, la transducción de señales, las respuestas celulares, las modificaciones de proteínas y, notablemente, el desarrollo de células y órganos, la extensión y guía de axones, y la transmisión sináptica gabaérgica y neuromuscular con respecto a un control sano.
7. Modelo de animal no humano con inactivación génica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el modelo de animal muestra regulación por incremento de genes implicados en los complejos represivos de Polycomb (PRC) y una expresión elevada significativa de los factores de transcripción basales TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE y TFIIH con respecto a un control sano.
8. Modelo de animal no humano con inactivación génica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el alelo no funcional del gen interactor 12 del receptor de hormona tiroidea (*trip12*) se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 1 (M4) y SEQ ID NO 2 (M5).
9. Modelo de animal no humano con inactivación génica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el modelo de animal no humano con inactivación génica es un modelo de trastorno del espectro autista (TEA) y/o discapacidad intelectual (DI).
10. Modelo de animal no humano con inactivación génica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el animal es un pez cebra.
11. Línea con inactivación génica de pez cebra para patologías del desarrollo neurológico relacionadas con mutaciones en el gen *trip12*, en la que el gen *trip12* corresponde a GRCh38.p14, cromosoma 2: 229.763.837-229.923.239, ENSG00000153827.15, y en la que el pez cebra mutante comprende al menos un alelo no funcional del gen interactor 12 del receptor de hormona tiroidea (*trip12*).
12. Pez cebra mutante según la reivindicación 11, en el que el pez cebra mutante es homocigótico, *trip12* ^{-/-}, o heterocigótico, *trip12* ^{+/-}, para el alelo no funcional.

13. Pez cebra mutante según la reivindicación 11 ó 12, en el que el alelo no funcional del gen interactor 12 del receptor de hormona tiroidea (*trip12*) comprende una mutación caracterizada por una delección de 12 pb y una inserción de 1 pb, dando como resultado una mutación de desplazamiento del marco de lectura.

5

14. Pez cebra mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el alelo no funcional del interactor 12 del receptor de hormona tiroidea (*trip12*) se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 1 (M4) y SEQ ID NO 2 (M5).

- 10 15. Modelo de animal con inactivación génica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el modelo de animal con inactivación génica es un modelo de trastorno del espectro autista (TEA) y/o discapacidad intelectual (DI).

- 15 16. Método para seleccionar compuestos candidatos capaces de tratar patologías del desarrollo neurológico asociadas con mutaciones en el gen *trip12* (GRCh38.p14, cromosoma 2: 229.763.837-229.923.239, ENSG00000153827.15), que comprende: a) medir los parámetros descritos en la reivindicación 5, y opcionalmente uno o más parámetros descritos en las reivindicaciones 6 a 7, después de administrar el compuesto de molécula candidato al modelo de animal no humano con inactivación génica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, y b) determinar la eficacia del compuesto candidato comparando los parámetros medidos con los de controles sanos y/o animales mutantes no tratados, en el que una mejora en los parámetros indica efectividad del compuesto.
- 20
- 25

17. Método según la reivindicación 16, en el que la patología del desarrollo neurológico se selecciona de trastorno del espectro autista (TEA) y discapacidad intelectual (DI).

30

18. Método para obtener un modelo de animal no humano de patologías del desarrollo neurológico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende la alteración o inactivación del gen *trip12*, y opcionalmente el establecimiento de los parámetros descritos en las reivindicaciones 5 a 7.

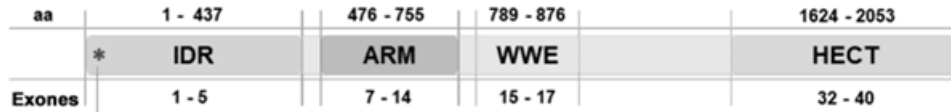
35

19. Método para obtener un modelo de animal no humano de patologías del desarrollo neurológico según la reivindicación 18, en el que el modelo de animal no humano

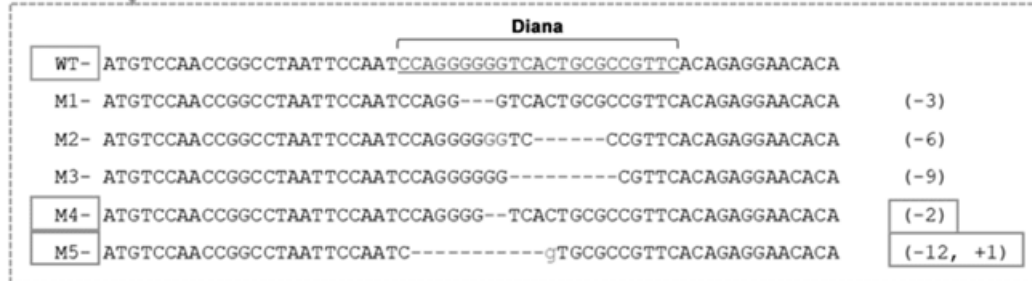
es un modelo de pez cebra, y en el que el método comprende la alteración o inactivación del gen *trip12* al portar una delección de 12 pb y una inserción de 1 pb con respecto a la secuencia de tipo natural, dando como resultado de ese modo una secuencia del gen *trip12* de SEQ ID NO 1 ó 2, y opcionalmente el establecimiento de los parámetros descritos en las reivindicaciones 5 a 7.

5

A)



B)



C)

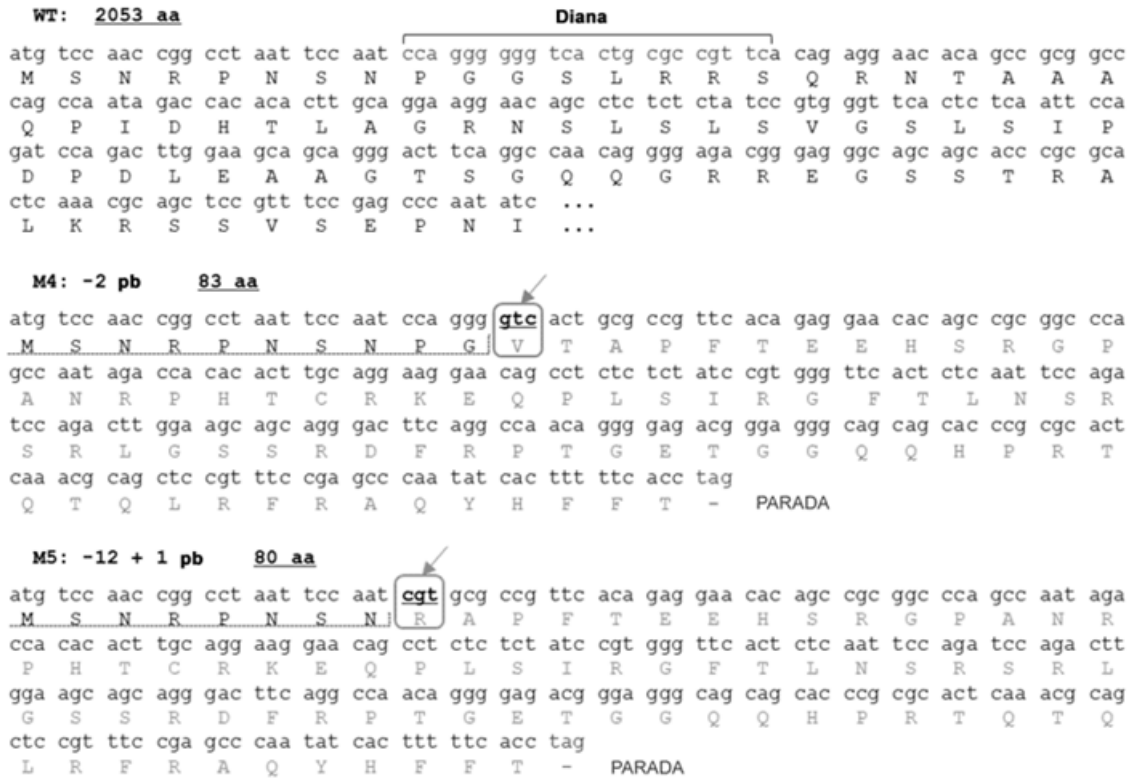


Fig. 1

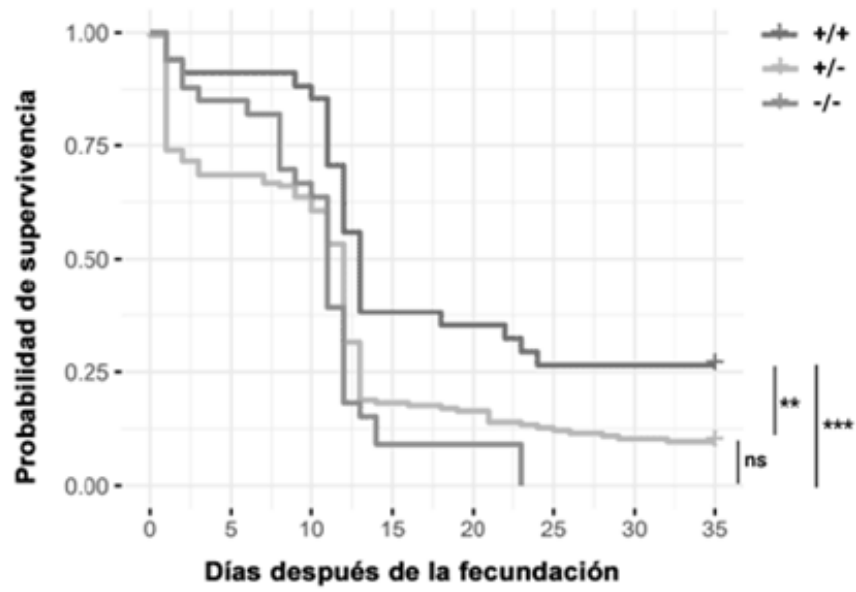


Fig. 2

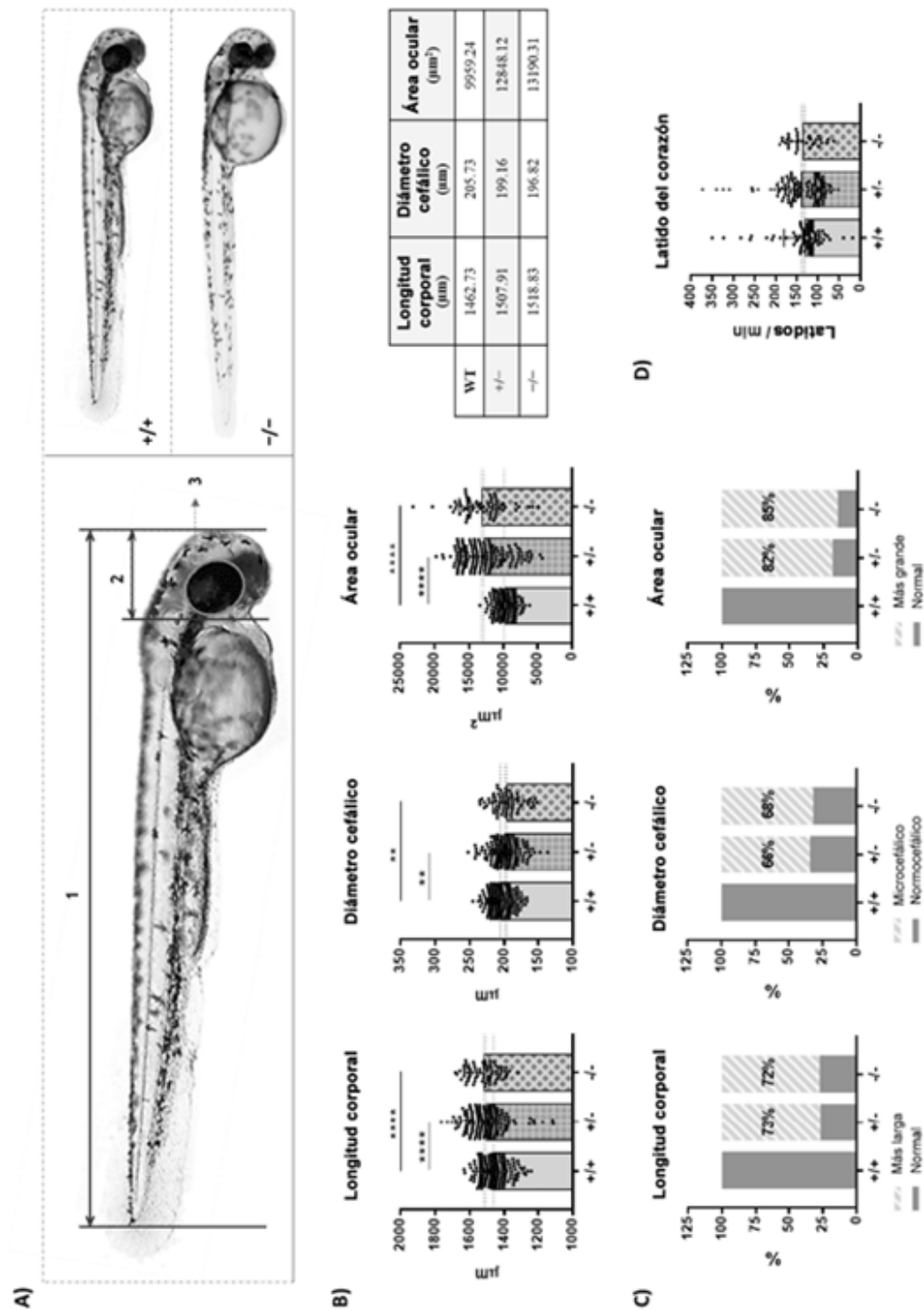


Fig. 3

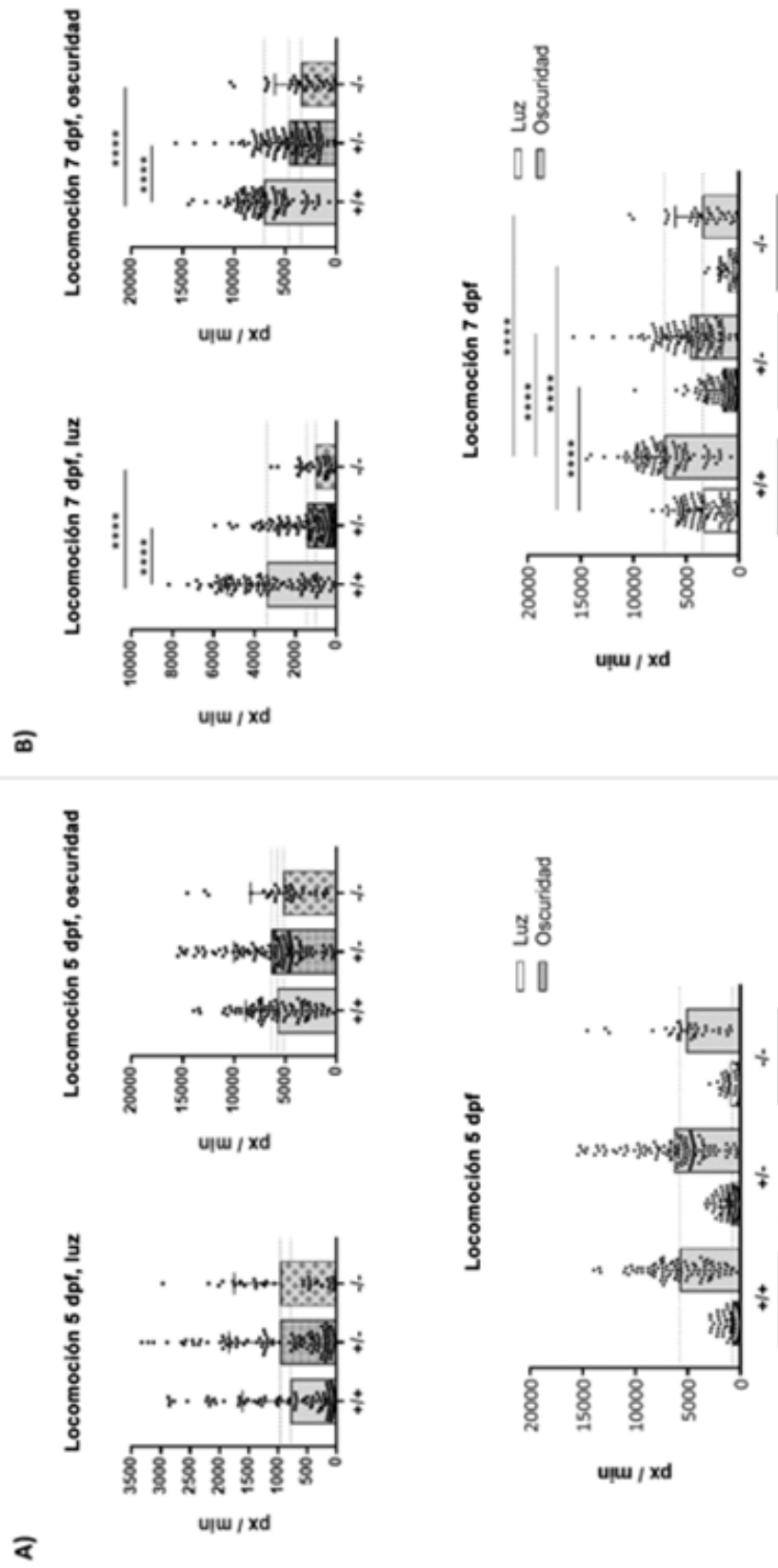


Fig. 4

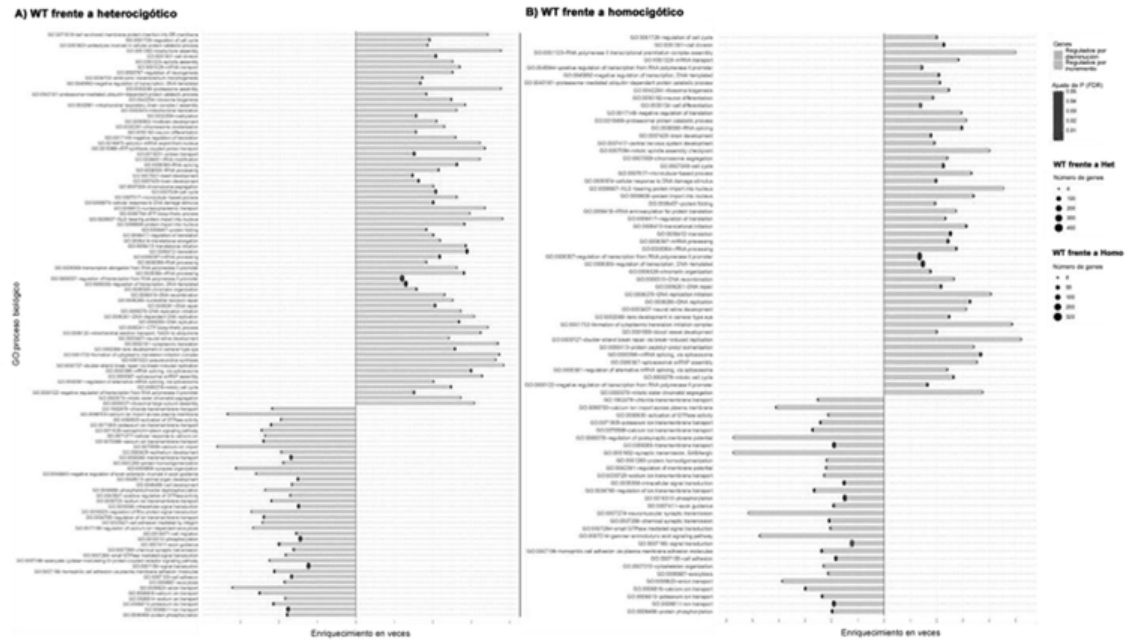


Fig. 5

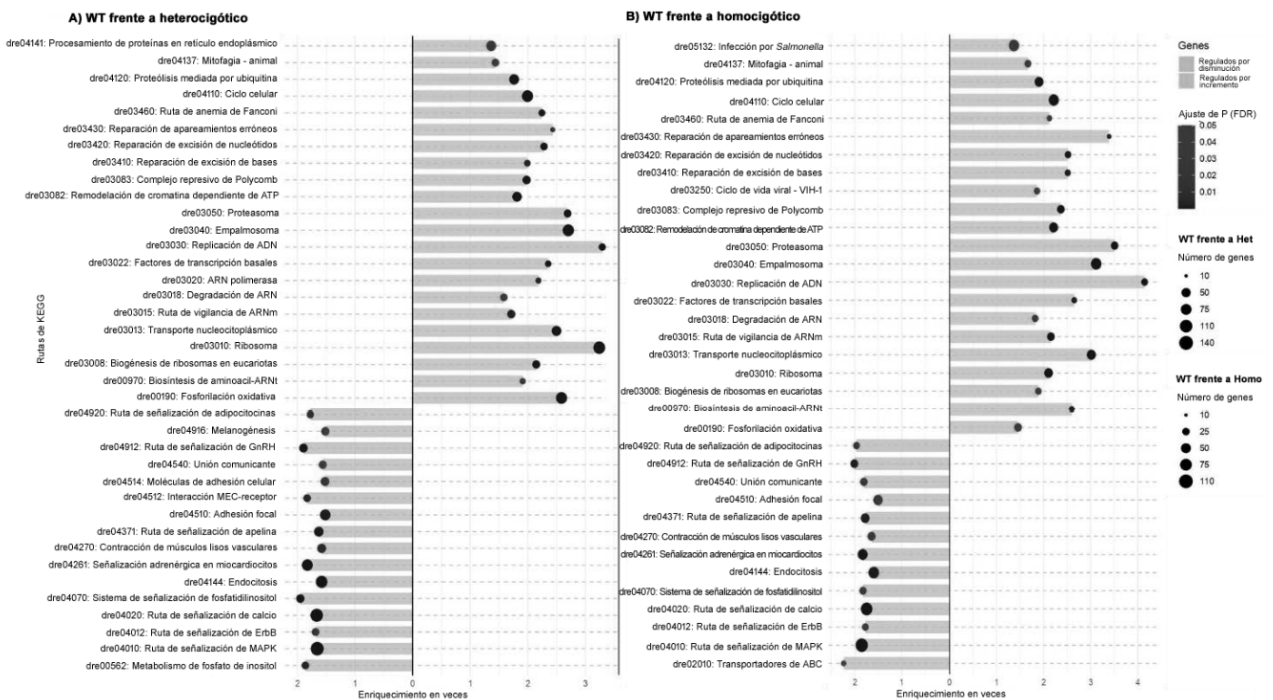


Fig. 6

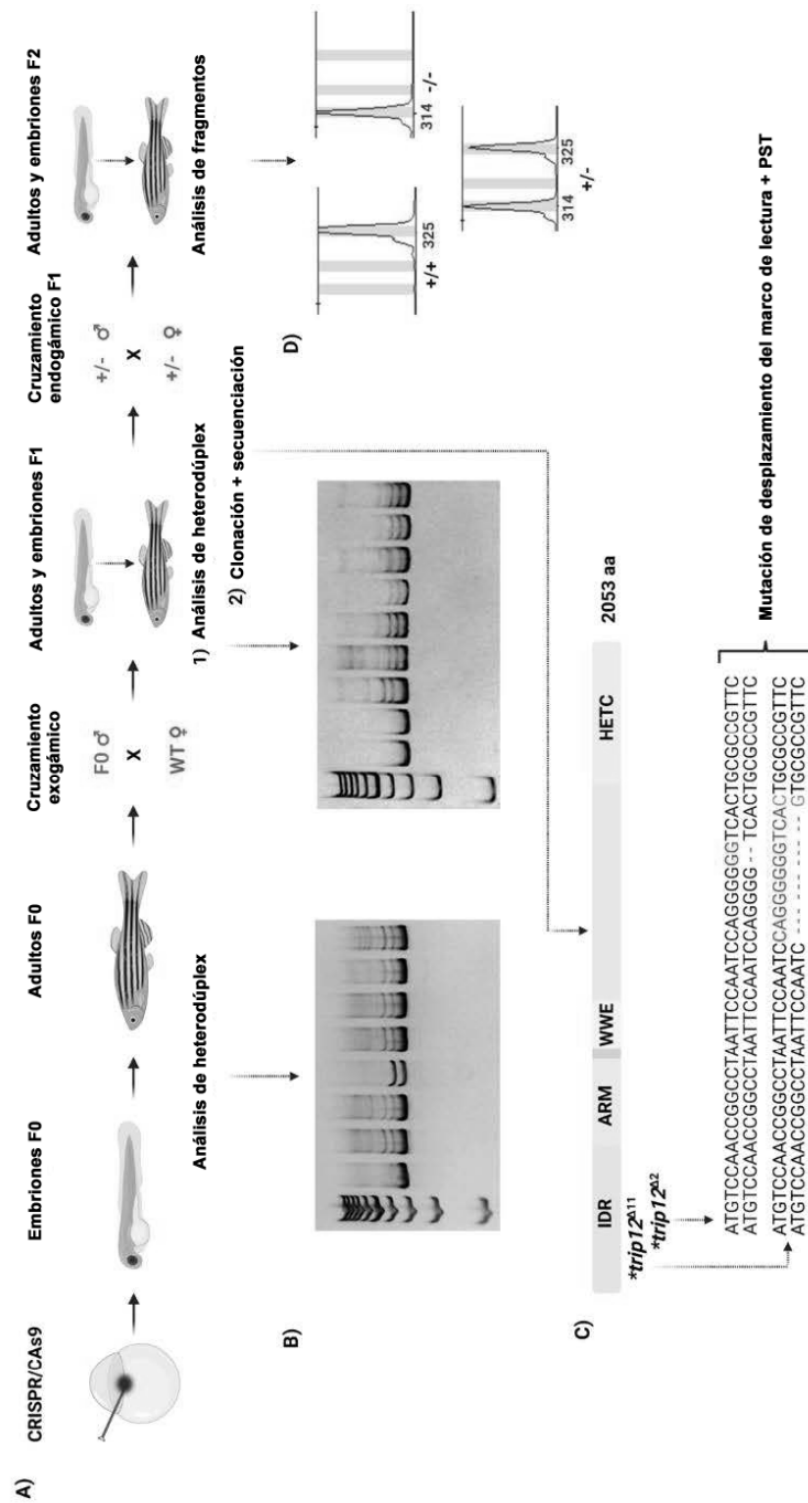


Fig. 7

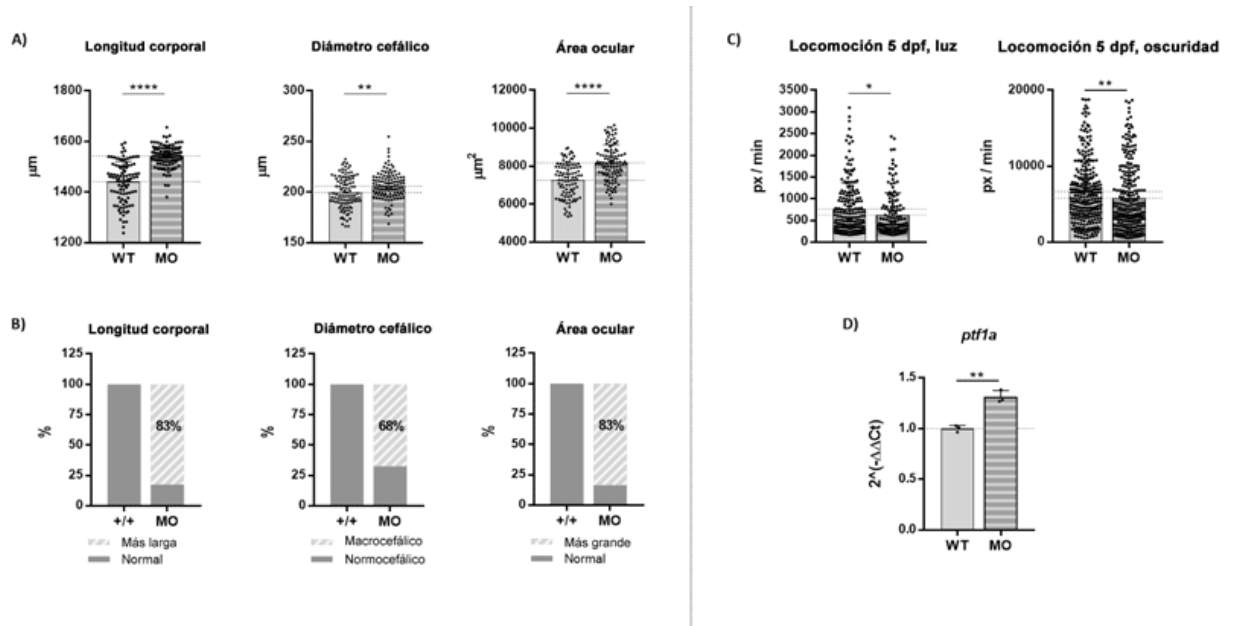


Fig. 8

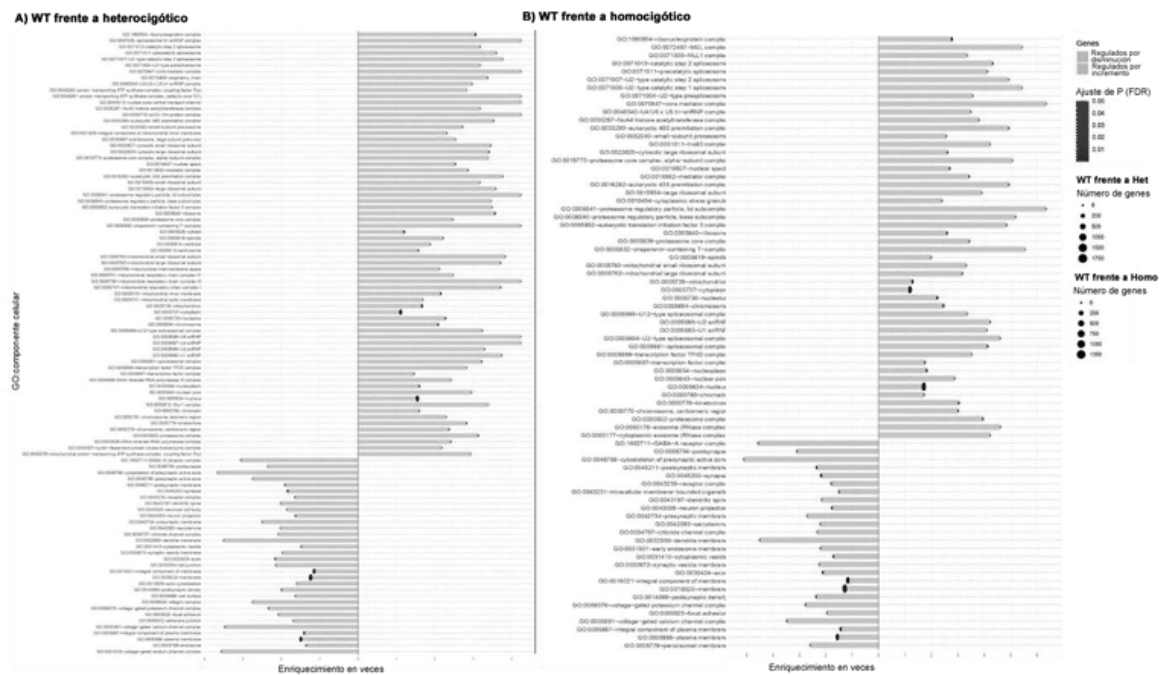


Fig. 9



21 N.º solicitud: 202431122
22 Fecha de presentación de la solicitud: 31.12.2024
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FERNÁNDEZ SANTOS, M. Métodos experimentales en el pez cebra (Danio rerio) para la caracterización de genes humanos relacionados con trastornos del neurodesarrollo. Trabajo de fin de grado en Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 2021 Recuperado de Internet <URL: https://minerva.usc.gal/entities/publication/7493c877-1635-4785-b844-0bbdd4ac3c4f >. Resumen; páginas: 8, 17, 20; tabla 8	1-19
X	KEYAN, K. S. et al. Control of TGFβ signalling by ubiquitination independent function of E3 ubiquitin ligase TRIP12. Cell Death and Disease, 20/10/2023, Vol. 14, Nº 10, artículo nº 692 ISSN 2041-4889 (electronic), <DOI: 10.1038/s41419-023-06215-y>. Páginas 6 y 14. Figura 4.	1-19
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:		
Fecha de realización del informe 07.10.2025	Examinador A. Ugidos Valladares	Página 1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/00 (2006.01)
A01K67/0276 (2024.01)
A01K67/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

AbS colección patentes, AbS colección literatura no patente, INVENES/LATIPAT, MEDLINE