



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Biología Celular

Análisis del rol de los genes *ift80* y *pnpla2* en el sistema visual del pez cebra (*Danio rerio*), y su relación con afecciones oculares en el humano

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas para optar al grado de Biólogo

POR: GONZALO ANDRÉS ARIAS GARCÍA

Profesor Guía: Dr. Ricardo Fuentes Pardo
Departamento de Biología Celular
Universidad de Concepción

2023
Concepción, Chile

Hoja de firmas

Profesor Guía

Dr. Ricardo Fuentes Pardo
Departamento de Biología Celular
Universidad de Concepción

Profesores Evaluadores

Dr. Fabián Segovia Miranda
Departamento de Biología Celular
Universidad de Concepción

Dr. Sebastián Boltaña Harms
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero expresar mi agradecimiento a Dios, sí a Él, por haberme dado la fuerza, perseverancia y valentía durante toda mi trayectoria universitaria. Si bien, fue una etapa de altos y bajos, de incertidumbre, cuestionamientos y desaliento, rescato lo aprendido, los momentos de triunfo y porque no también, las instancias cuando me sentí fracasado. A fin de cuentas, prevalecen en mi memoria los buenos momentos, la junta con los amigos, las salidas a terreno, las desveladas maratónicas por aprobar los ramos y las pichangas hasta altas horas de la noche en el estadio. Agradezco a mi familia, por entregarme todo su cariño, apoyo, contención y esfuerzo para lograr perseguir mis sueños, la verdad nada sería posible si no los tuviera a ellos, infinitas gracias. A mi abuela Flor, por su enorme entrega hacia mi persona, cada logro abuela es por tu ayuda. A mis padres y mi hermana por sus oraciones, palabras de aliento e infinita paciencia, no saben cuánto los aprecio. A Rocco, mi perro, por su compañía, por alegrarme con su picardía en los momentos difíciles, en los entretiempos cuando tenía que repensar las cosas.

Agradezco de sobremanera a mis hermanos en la fe, ellos también forman una pieza clave en mi desarrollo como persona, gracias por apoyarme cuando más lo necesité. Recuerdo también a la Sra. Ximena, por su enorme paciencia en enseñarme cuando los números se pusieron complejos, le dije que iba a estar en mis agradecimientos de tesis, no la olvidé. A mis compañeros de universidad, mis profesores y los “tíos” de la facultad, gracias por formar parte de este proceso. No me olvido también de alguien especial, que me ayudó durante un largo trayecto, Ailén Dumont, te aseguro que me quedo con los mejores recuerdos, y agradezco a Dios por tener la instancia de conocerte. Eres una persona maravillosa. Agradezco en gran manera a mi profesor guía, el Dr. Ricardo Fuentes, por acompañarme, aconsejarme y direccionarme durante toda esta etapa. Su calidad humana, motivación y paciencia me sorprenden. También, a sus fuentes de financiamiento, Proyecto Fondecyt de Iniciación 11201118 y VRID Multidisciplinario 220.031.117-M que permitieron el desarrollo de esta tesis.

Quisiera también agradecer a mis compañeros de LAFET, a la Coni en especial por apoyarme en todo lo que necesité; su empatía y liderazgo innato la llevará lejos. Al Ronald por apoyarme con la predicción de los modelos proteicos, a la Ingrid y la Ruth por tomarse el tiempo de enseñarme cuando tenía dudas, a la Cata por las clases de bioinformática, y también al Gustavo por ayudarme con los análisis histológicos.

Finalmente, quisiera también extender mis agradecimientos a la comisión evaluadora, por sus comentarios que contribuirán a mi formación profesional. También al Dr. Víctor Hernández por su paciencia y gestión en todo este proceso.

*Sabiduría ante todo; adquiere sabiduría;
Y sobre todas tus posesiones adquiere inteligencia.
Proverbios 4:7*

ÍNDICE GENERAL

Hoja de firmas.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE GENERAL.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA CÓRNEA Y LA RETINA EN LA VISIÓN DE LOS VERTEBRADOS .	9
1.2 CONOS Y BASTONES: RECEPTORES Y PROCESADORES DE LA LUZ.....	10
1.3 CILIOPATÍAS Y SU RELACIÓN CON AFECCIONES RETINIANAS.....	13
1.3.1 EL TRANSPORTE INTRAFLAGELAR (IFT) Y SU FUNCIÓN PARA EL MANTENIMIENTO DEL CILIO PRIMARIO.....	14
1.4 EL QUERATOCONO: UNA ENFERMEDAD OCULAR QUE AFECTA EL MANTENIMIENTO ESTRUCTURAL DE LA CORNEA.....	17
1.4.1 ETIOLOGÍA GENÉTICA DEL QUERATOCONO.....	20
1.4.2 POTENCIAL FUNCIÓN DE PNPLA2 EN LA CÓRNEA.....	22
1.4.3 ORGANISMOS MODELO PARA ESTUDIAR GENES CANDIDATOS DE CILIOPATÍAS Y DEL QUERATOCONO.....	23
2. HIPÓTESIS.....	26
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL OJO SILVESTRE Y MUTANTE.....	28
3.2 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DEL GEN <i>ift80</i>	28

3.3 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DEL GEN <i>pnpla2</i>	28
3.4 MODELAMIENTO DE LA ESTRUCTURA <i>Ift80</i> y <i>Pnpla2</i>	29
4. RESULTADOS.....	29
4.1 EL GEN <i>ift80</i> CONTROLA LA ADQUISICIÓN DE LA ARQUITECTURA CELULAR DE LA RETINA DEL PEZ CEBRA.....	29
4.2 LA MUTACIÓN DEL GEN <i>ift80</i> IMPACTA EN EL SITIO DONADOR DE <i>SPLICING</i> DE SU TRANSCRITO Y GENERA UN CODÓN DE TERMINO PREMATURO	32
4.3 LA PROTEÍNA <i>Ift80</i> DEL PEZ CEBRA POSEE UN DOMINIO FUNCIONAL WD40 EVOLUTIVAMENTE CONSERVADO.....	36
4.4 LA REGIÓN C-TERMINAL DEL FACTOR <i>Ift80</i> ES RELEVANTE PARA SU FUNCIÓN EN EL PEZ CEBRA	37
4.5 EL GEN <i>pnpla2</i> DEL PEZ CEBRA POSEE CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES SIMILARES A SU HOMÓLOGO EN RATÓN.....	40
4.6 EL FACTOR <i>Pnpla2</i> Y SU ROL COMO LIPASA ADIPOSÍTICA DE TRIGLICERIDOS EN EL PEZ CEBRA	42
5. DISCUSIÓN	45
CONCLUSIÓN	52
ANEXOS	54
LITERATURA CITADA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía general del ojo humano y sus respectivas estructuras.	11
Figura 2. Características estructurales de la retina en vertebrados.	12
Figura 3. Capas celulares presentes en el tejido corneal.....	13
Figura 4. Estructura general de un cilio, transporte intraflagelar (IFT) y sus diferentes tipos de complejo	16
Figura 5. Transporte intraflagelar (IFT) y su función en una célula fotorreceptora	17
Figura 6. Morfología de la córnea en salud y enfermedad	18
Figura 7. Configuración y organización celular de la córnea del pez cebra	24
Figura 8. Configuración y organización celular de la retina del humano y el pez cebra.....	26
Figura 9. Morfología celular y estructural del ojo del pez cebra de 6 dpf silvestre y mutante <i>ift80sa3912</i>	32
Figura 10. Esquema representativo de la estructura fina del gen <i>ift80</i> silvestre y del alelo mutante <i>ift80sa3912</i>	35
Figura 11. Comparación entre la estructura tridimensional de la proteína silvestre <i>Ift80</i> y sus dos versiones originadas por la mutación en el gen	38
Figura 12. Modelo estructural tridimensional de la proteína silvestre <i>Ift80</i> del pez	

cebra.....	39
Figura 13. Estructura del dominio funcional WD40 de la proteína Ift80 del pez cebra	40
Figura 14. Representaciones esquemáticas de la estructura del gen <i>pnpla2</i> en tres diferentes organismos vertebrados	42
Figura 15. Representación esquemática de la proteína Pnpla2 en pez cebra y sus respectivos modelos estructurales en 3D	45
Figura 16. Análisis de posibles dominios transmembrana de Ift80 del pez cebra	54
Figura 17. Análisis de posibles dominios transmembrana de Pnpla2 del pez cebra.	54
Figura 18. Análisis de la conservación de la Ser47 en organismos vertebrados	55

ABREVIATURAS

ADN: Ácido DesoxirriboNucleico
 ARN: Ácido RiboNucleico
 ATGL: Adipose TriGlyceride Lipase
 cDNA: ADN complementario
 CG: Capa de células Ganglionares
 CNE: Capa Nuclear Externa
 CNI: Capa Nuclear Interna
 CPE: Capa Plexiforme Externa
 CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
 EPR: Epitelio Pigmentario de la Retina
 HPF: Horas Post Fertilización
 IFT: Intra Flagelar Transport
 MO: Morfolino
 MT: Microtúbulo
 Pb: Pares de bases
 PDB: Protein Data Bank
 PF: Post Fertilización
 PNPLA2: Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2
 SE: Segmento Externo
 SI: Segmento Interno
 WT: WildType

RESUMEN

El ojo es el órgano sensorial fotosensible encargado de proporcionar la visión en los animales, y que es necesario para el correcto desarrollo y adaptación de los organismos en el medio que habitan. Tanto la retina como la córnea son componentes que otorgan funcionalidad exclusiva al globo ocular. Por lo tanto, alteraciones en su estructura se traducen en un déficit de la capacidad visual de los animales. Tanto las ciliopatías como el queratocono, son dos ejemplos de patologías que afectan a la visión en humanos. Las ciliopatías constituyen un grupo de trastornos que afectan a la retina, entre otras estructuras. Por otro lado, el queratocono se caracteriza por un defecto en la estructura de la córnea, ocasionando un adelgazamiento bilateral progresivo que afecta a la calidad visual de quienes lo padecen. Si bien, en la última década se han logrado avances significativos en el entendimiento de los fenotipos asociados a ambas patologías, aún existe una brecha en el conocimiento de su etiología genética y de los mecanismos moleculares involucrados en su desarrollo.

El sistema modelo de vertebrados pez cebra (*Danio rerio*) representa una valiosa herramienta genética para estudiar afecciones oculares retinianas como corneales. Lo anterior, debido a que dado a que el ojo de este organismo presenta similitudes estructurales de estos dos componentes con el de humano. En este trabajo de tesis se realizó la caracterización genético-molecular de los genes *ift80* y *pnpla2*, cuya pérdida de función se encuentra asociada a ciliopatías y al queratocono, respectivamente. Adicionalmente, se realizó una caracterización fenotípica del mutante *ift80* del pez cebra. Así, el análisis fenotípico del ojo del mutante *ift80* revela la pérdida de las capas externas de la retina que incluyen a los fotorreceptores. Esto sugiere un control por parte del gen *ift80* en la formación y mantenimiento de los fotorreceptores en vertebrados. Por otro lado, nuestros resultados indican que el factor Pnpla2 del pez cebra posee características genéticas, estructurales y funcionales homólogas a su versión descrita en mamíferos. Lo anterior sugiere que Pnpla2 jugaría un rol en el mantenimiento y función de la córnea en teleósteos y que el pez cebra sería un excelente modelo para el estudio de la biología de esta importante estructura ocular. Estudios futuros de pérdida de función de Pnpla2 serán requeridos para determinar su modo de acción molecular en la homeostasis del ojo. Tomar ventaja de los estudios de asociación genotipo-fenotipo durante períodos post-embriónicos del desarrollo incrementarán nuestro conocimiento de la red genética que regula la formación, mantenimiento y función de estructuras oculares, como así también de las causas moleculares de patologías que las afectan y eventualmente, contribuir a mejoras clínicas a estas.

Palabras clave: Fotorreceptores, ciliopatías, *ift80*, transporte intraflagelar, WD40, córnea, queratocono, Pnpla2, pez cebra.

ABSTRACT

The eye is the photosensitive sensory organ responsible for providing vision in animals, and is necessary for the correct development and adaptation of organisms to the environment they inhabit. Both the retina and the cornea are components that provide exclusive functionality to the eyeball. Therefore, alterations in their structure result in a deficit in the visual capacity of animals. Both ciliopathies and keratoconus are two examples of pathologies that affect vision in humans. Ciliopathies are a group of disorders that affect the retina, among other structures. On the other hand, keratoconus is characterized by a defect in the structure of the cornea, causing a progressive bilateral thinning that affects the visual quality of those who suffer from it. Although significant advances have been made in the last decade in the understanding of the phenotypes associated with both pathologies, there is still a gap in the knowledge of their genetic etiology and the molecular mechanisms involved in their development.

The vertebrate model system zebrafish (*Danio rerio*) represents a valuable genetic tool to study retinal and corneal eye conditions. This is due to the fact that the eye of this organism presents structural similarities of these two components with the human eye. In this thesis work, the genetic-molecular characterization of the *ift80* and *pnpla2* genes, whose loss of function is associated with ciliopathy and keratoconus, respectively, was performed. Additionally, a phenotypic characterization of the zebrafish *ift80* mutant was performed. Thus, phenotypic analysis of the eye of the *ift80* mutant reveals loss of the outer retinal layers including photoreceptors. This suggests a control by the *ift80* gene in the formation and maintenance of photoreceptors in vertebrates. On the other hand, our results indicate that the zebrafish Pnpla2 factor possesses genetic, structural and functional characteristics homologous to its version described in mammals. This suggests that Pnpla2 may play a role in the maintenance and function of the cornea in teleosts and that zebrafish would be an excellent model for studying the biology of this important ocular structure. Future loss-of-function studies of Pnpla2 will be required to determine its molecular mode of action in eye homeostasis. Taking advantage of genotype-phenotype association studies during post-embryonic periods of development will increase our knowledge of the genetic network that regulates the formation, maintenance and function of ocular structures, as well as the molecular causes of pathologies that affect them and eventually contribute to clinical improvements to these.

Keywords: Photoreceptor, ciliopathies, *ift80*, intraflagellar transport, WD40, cornea, keratoconus, Pnpla2, zebrafish.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1 RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA CÓRNEA Y LA RETINA EN LA VISIÓN DE LOS VERTEBRADOS

El ojo es el órgano sensorial fotosensible encargado de la visión en los animales (Lamb et al. 2007; Land & Nilsson 2012; Schwab 2017). Este órgano es capaz de absorber la luz proveniente del medio externo y transformarla en impulsos electroquímicos que son posteriormente procesados por el cerebro, otorgando al organismo interactuar y desenvolverse en su entorno (Cajal 1915; Land & Fernald, 1992; Zhu et al. 2012). El ojo humano posee una estructura globular que mide en promedio entre 26-28 milímetros de diámetro y está constituido por tres capas: la más externa o esclerótica, media o coroides y la más interna o retina (Figura 1)(Ferreruela2007; Adler's 2011). La esclerótica o esclerocórnea a su vez consiste en dos componentes: la córnea y la esclera.

La retina consiste en una delgada lámina semitransparente ubicada en la parte posterior del globo ocular (Figura 2A), y que cuenta con la presencia de diversas capas de tejido neural (Wiechers & Moreno 2020). Dicha estructura cumple la función de recibir las señales luminosas que provienen del medio externo para posteriormente transformarlas en una serie de impulsos nerviosos que llegan hasta el cerebro a través del nervio óptico (Vaughan & Asbury 2012). En los vertebrados, la retina se encuentra constituida por dos capas sinápticas; la plexiforme externa y la plexiforme interna, cada una de ellas está interrelacionada junto a tres capas celulares que se disponen en serie: células bipolares, células ganglionares y células fotorreceptoras (Figura 2A)(Martin 2013). Estas células altamente especializadas, juegan un rol imprescindible en lo que respecta a la respuesta visual, debido a que son las encargadas del proceso de fototransducción, en donde la energía luminosa es transformada en energía química. Dependiendo de su morfología y función, los fotorreceptores se clasifican en dos tipos: conos y bastones (Figura 2B) (Rodieck 1973).

La córnea por otro lado, es una estructura avascular transparente que continúa a la esclera anteriormente y representa el principal medio refractivo del ojo. Además, proporciona integridad estructural al globo ocular y protege de las lesiones físicas que puedan dañar a las capas más internas y componentes de este mismo (Figura 3A) (Mora et al. 2016; Gipson & Stepp 2021). Esta posee un grosor de entre 540-700 μm y está organizada en cinco bien diferenciadas capas básicas de anterior a posterior que incluyen: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (Figura 3B). En la córnea es posible también encontrar tres tipos principales de células denominadas: epiteliales, queratocitos estromales y células endoteliales (Figura 3C) (Dawson & Edelhauser 2011).

1.2 CONOS Y BASTONES: RECEPTORES Y PROCESADORES DE LA LUZ

Los conos están encargados principalmente de la visión a color, proporcionan una mayor definición visual que los bastones y son más activos durante la visión diurna (Fox 2017). Por el contrario, los bastones cumplen un rol primordial en lo que respecta a la visión nocturna, son acromáticos (poseen un solo pigmento), y son mucho más sensibles a niveles altos de luminosidad (Kawamura & Tachibanaki 2022). En este sentido, tanto conos como bastones cumplen roles imprescindibles en el correcto procesamiento visual de los organismos, de manera que, ausencias parciales o completas de estas células, provocan una serie de alteraciones que repercuten de manera directa en la calidad visual de los organismos. La fotobia (intolerancia a la luz) y la discromatopsia (impedimento para la percepción de los colores) son dos claros ejemplos de lo descrito anteriormente (Kohl 2009; Simunovic & Moore 1998).

Funcionalmente, conos y bastones presentan diferencias, no así a nivel estructural (Figura 3B). Así, tanto conos como bastones cuentan con la presencia de: un cuerpo celular, un terminal axónico, un segmento interno y otro externo. Estos dos últimos segmentos están conectados a través de un cilio que enlaza a ambas estructuras, permitiendo de esta manera el correcto funcionamiento de los fotorreceptores (Ramamurthy & Cayouette, 2009).

Durante las dos últimas décadas, diversos estudios han reportado la relevancia funcional que este cilio cumple en las células fotorreceptoras, actuando como un verdadero “puente” que comunica tanto el segmento externo como interno de conos y bastones (Wolfrum & Schmitt 2000; Reiter & Leroux 2017; Ran & Zhou 2020). **Dada la importancia funcional otorgada tanto por la retina como por la córnea al globo ocular, en términos de protección, control, definición, procesamiento y enfoque de la entrada de la luz hacia el interior del ojo, alteraciones que repercutan en estas dos estructuras se traducirán en un impacto en la capacidad visual de los vertebrados. Por lo tanto, identificar y caracterizar dichas alteraciones, contribuirán a comprender y extender el conocimiento de su etiología.**

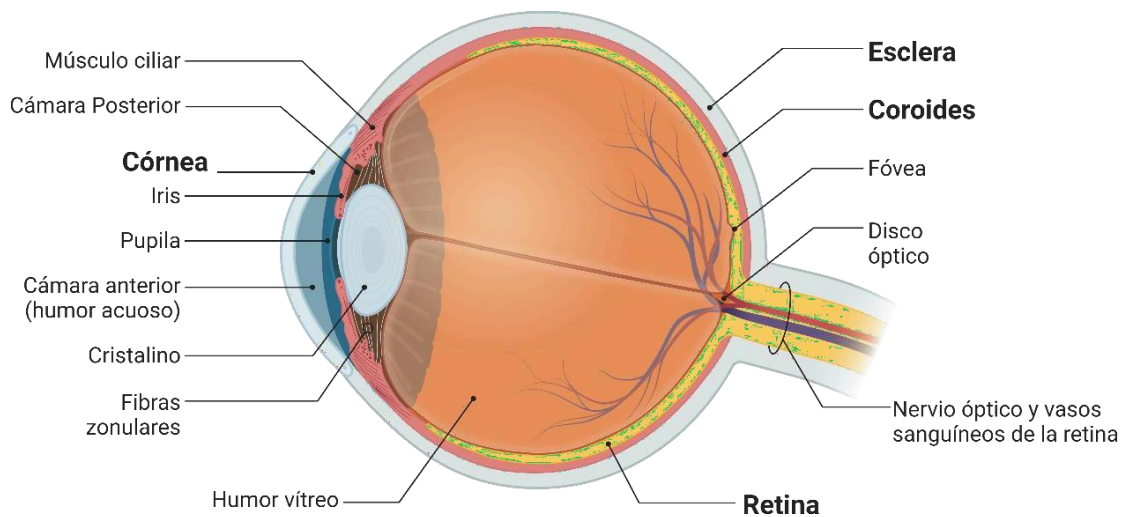


Figura 1. Anatomía general del ojo humano y sus respectivas estructuras. Se destacan en negrita las principales capas externas del globo ocular: la esclerocórnea que incluye a la córnea y la esclera (capa externa), la coroides (capa media) y la retina (capa interna). Modificado de biorender.com.

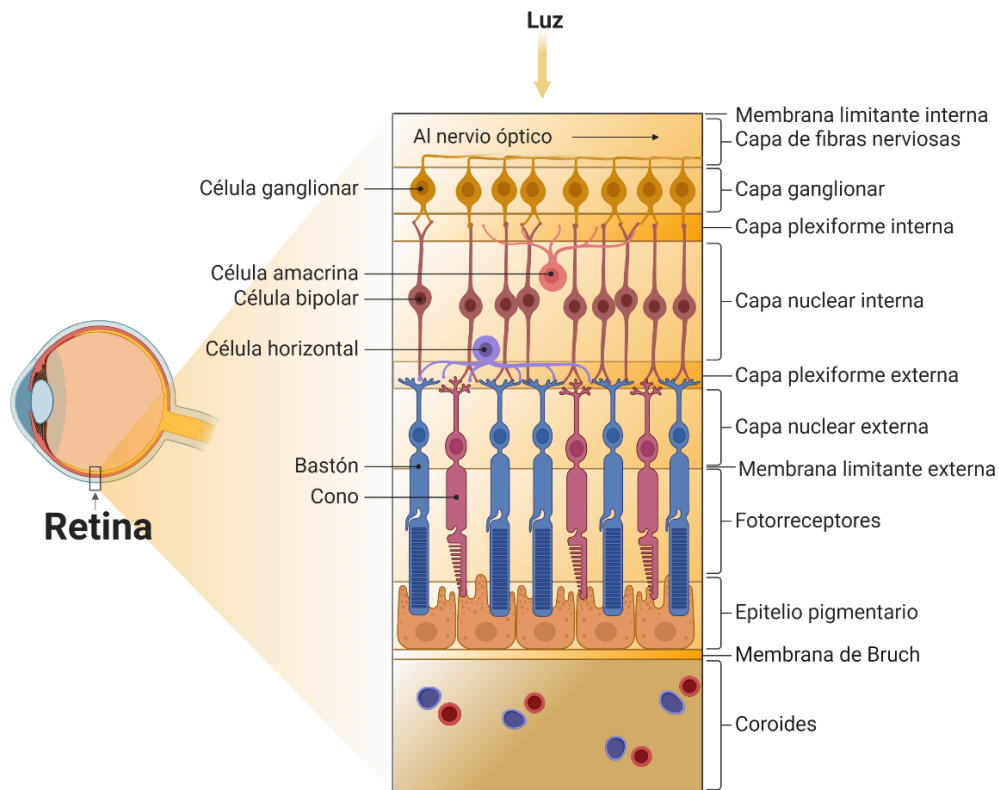
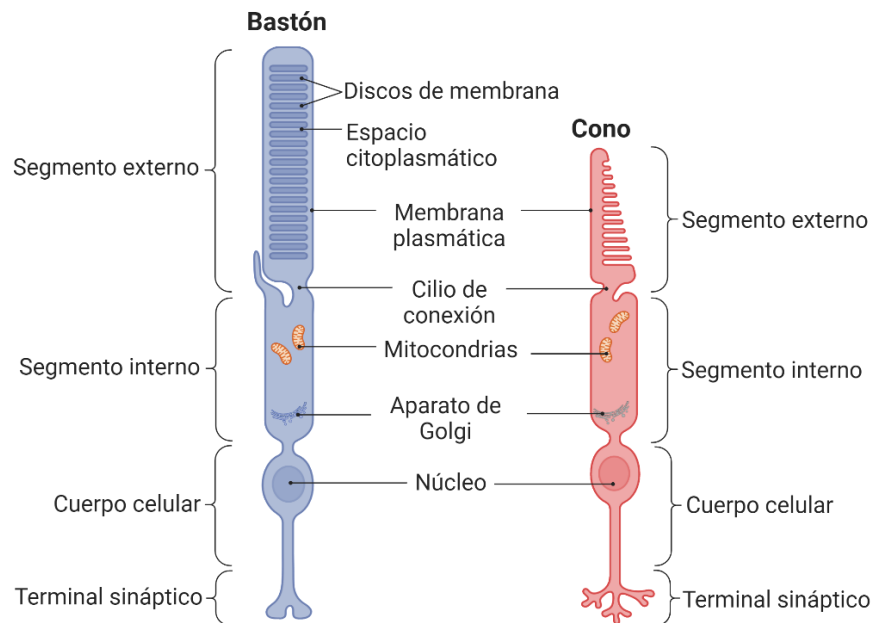
A**B**

Figura 2. Características estructurales de la retina en vertebrados. (A) La retina (indicada con una flecha) es una delgada lámina semitransparente ubicada en la parte posterior del globo ocular, y que cumple la función principal de recibir las señales luminosas que provienen del medio externo para posteriormente transformarlas en una serie de impulsos nerviosos, dicha estructura cuenta con una serie de capas que procesan estos impulsos y lo llevan al cerebro a través del nervio óptico. **(B)** Esquema representativo de los dos tipos de células fotorreceptoras que se encuentran en la retina:

bastones y conos. Ambas estructuras cuentan con un segmento externo fotosensible, unido mediante un cilio al segmento interno, un terminal sináptico que permite la comunicación entre neuronas vecinas y el resto de orgánulos propios para el mantenimiento de la célula. Modificado de **biorender.com & Richardson et al. 2016**.

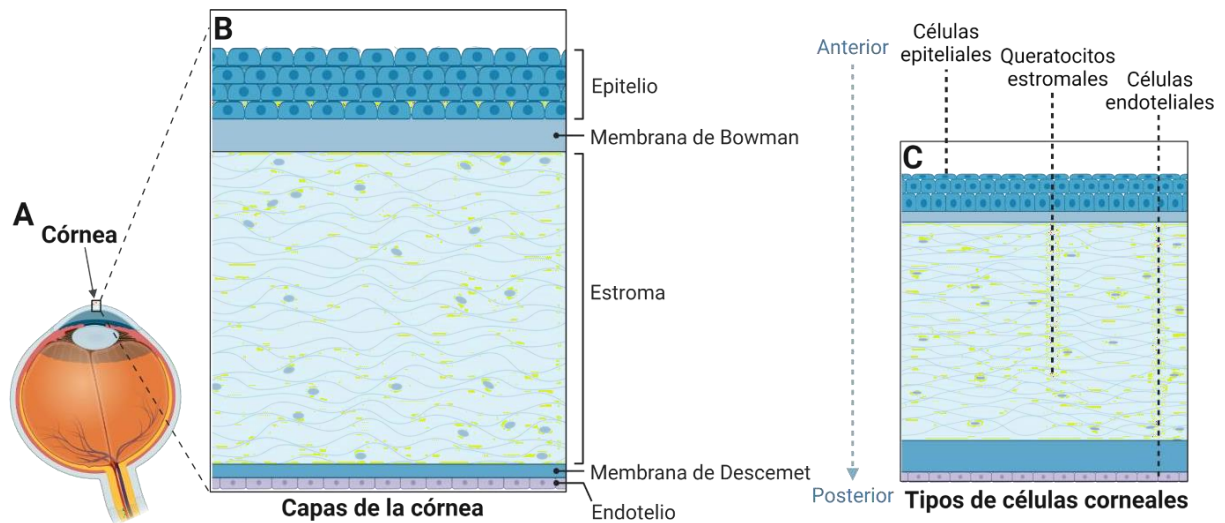


Figura 3. Capas celulares presentes en el tejido corneal. (A) La córnea (indicada con una flecha) es el principal medio refractivo del ojo, junto con ser la primera barrera protectora frente a posibles traumatismos. **(B)** Esquema representativo de las cinco capas que componen el tejido corneal, de anterior a posterior son: Epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. **(C)** Esquema representativo de los diferentes tipos celulares que forman parte de estas capas: células epiteliales (epitelio), queratocitos estromales (estroma) y células endoteliales (endotelio). Modificado de **biorender.com**

1.3 CILIOPATÍAS Y SU RELACIÓN CON AFECCIONES RETINIANAS

Los cilios son estructuras celulares móviles y sensoriales que se encuentran en organismos unicelulares como multicelulares (Satir et al. 2008; Ishikawa & Marshall 2011). En los vertebrados, los cilios cumplen diversas funciones y es posible localizarlos en distintos tipos de células (Gerdes et al. 2009). Estructuralmente, los cilios están conformados por un axonema central compuesto por microtúbulos y rodeados periféricamente por una membrana ciliar que se extiende hasta el cuerpo basal del axonema (Figura 4A). Dependiendo de la disposición de los microtúbulos en

el axonema, los cilios se suelen categorizar en dos clases: móviles e inmóviles, los primeros están conformados por nueve dobletes que encierran a un par central de microtúbulos (9+2), y que junto a brazos de dineína axonemal posibilitan el movimiento ciliar mediado por la hidrólisis de ATP. Por otra parte, los cilios inmóviles no cuentan con este par central de microtúbulos ni tampoco poseen brazos de dineína (Figura 4C y 4D) (Wang & Dynlacht, 2018). Si bien ambos tipos de cilios no presentan diferencias significativas en lo que respecta a su estructura, si lo hacen a nivel funcional. Por ejemplo, los cilios móviles han sido asociados con el flujo de fluidos mediante impulsos rítmicos en las células epiteliales de la tráquea y el oviducto. Por otro lado, los cilios inmóviles actúan como verdaderos sensores de señales extracelulares, ya sean estas físicas o químicas (Pedersen & Rosenbaum 2008; Wang & Dynlacht 2018). Durante las dos últimas décadas, esta compleja estructura ha sido el foco de interés de diversos estudios, debido a que su incorrecto funcionamiento puede ser crítico para cierto tipo celular (Mockel et al. 2011; Chen et al. 2016). Paralelamente, se ha demostrado que diversos trastornos, o ciliopatías, en humanos están relacionados con un mal funcionamiento de los cilios (Waters & Beales 2011; Zaloszc et al. 2021). Las ciliopatías son un grupo heterogéneo de trastornos raros que involucra una variedad enorme de síndromes tales como el de Senior-Løken, Bardet-Biedl (BBS), Meckel-Gruber, Alstrom, Joubert, McKusick-Kaufman, entre otros (Reiter & Leroux, 2017). Importantemente, la comprensión de tales síndromes ha estado fuertemente ligada en conocer las alteraciones subyacentes que afectan a la biología del cilio.

1.3.1 EL TRANSPORTE INTRAFLAGELAR (IFT) Y SU FUNCIÓN PARA EL MANTENIMIENTO DEL CILIO PRIMARIO

Numerosas investigaciones se han enfocado en comprender de manera holística las alteraciones presentes en la biogénesis del cilio, su mantenimiento, estructura e interacciones moleculares de sus componentes (Pan & Snell 2014; Reiter & Leroux 2017; Mirvis et al. 2018). Por ejemplo, es bien sabido que para que ocurra una correcta biogénesis del cilio y un correcto ensamblaje-mantenimiento de este, se requiere de la maquinaria de transporte intraflagelar (IFT), el cual mantiene el transporte y recambio activo de proteínas de manera bidireccional entre la membrana plasmática

y el axonema, permitiendo de esta manera el normal funcionamiento del cilio (Rosenbaum & Witman 2002). El IFT fue descrito por primera vez en 1993 por Kozminski y colaboradores (Kozminski et al. 1993), cuando estudiaban el movimiento intraflagelar en el organismo *Chlamydomonas reinhardtii*. Estos investigadores propusieron un mecanismo complejo de transporte en la cual existía la participación activa de polipéptidos, ATP y otras macromoléculas (Kozminski et al. 1993). Posteriormente, el IFT ha sido explorado con mayor precisión y se ha descrito que existe como un movimiento anterógrado y otro retrógrado. El primero provoca un movimiento en dirección hacia la punta del cilio, mientras que el segundo movimiento va dirigido hacia la base de esta estructura (Ou et al. 2005). Complementariamente, tanto el movimiento anterógrado como retrogrado está mediado por los complejos proteicos llamados partículas IFT (Klena & Pigino 2022). Estas a su vez, se subdividen en dos principales tipos de complejos; el complejo A y el complejo B (Figura 4B). El complejo A está ensamblado a la dineína citoplasmática 2 que recorre de manera retrógrada el axonema ciliar y está constituido por las proteínas IFT A-1, 43, 122, 139, 140 y 144 (Klena & Pigino 2022). Por otro lado, el complejo B se encuentra ensamblado a la Kinesina-2, compuesta de dos subunidades motoras conocidas como KIF3A y KIF3B, sumado a otra subunidad que no es motora (KAP3) y el complejo homodimérico de kinesina KIF17. La kinesina 2 recorre de manera anterógrada el axonema ciliar y contiene la presencia de las proteínas IFT 20, 27, 46, 52, 55, 57, 72, 74, 80, 81, 88 y 172 (Rosenbaum et al. 2002).

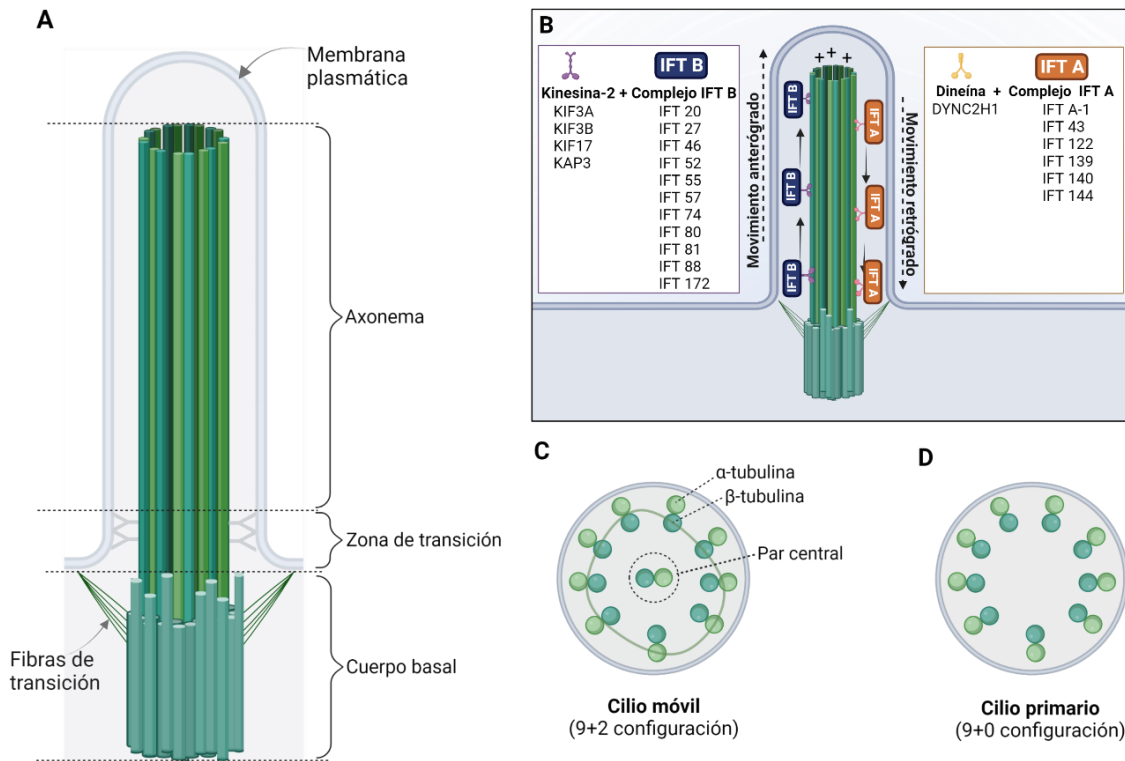


Figura 2. Estructura general de un cilio, transporte intraflagelar (IFT) y sus diferentes tipos de complejo. (A) Representación esquemática de la estructura general que presenta un cilio. Esta consiste en tres grandes porciones: axonema, zona de transición y el cuerpo basal. En (B) se esquematiza un movimiento intraflagelar básico, en donde primordialmente existen dos tipos de movimiento que son: anterógrado y retrogrado, el primero provoca un movimiento en dirección a la punta del cilio, mientras que el segundo movimiento va dirigido hacia el cuerpo basal del axonema. Tanto el movimiento anterógrado como retrogrado está mediado por los complejos proteicos llamados partículas IFT, estos a su vez, se subdividen en dos principales tipos de complejos; el complejo A y el complejo B, el primero está ensamblado al motor de dineína citoplasmática 2 (movimiento retrogrado), mientras que el segundo complejo está asociado al motor de kinesina 2 (movimiento anterógrado), cabe mencionar que, cada uno de estos motores moleculares interactúa con las proteínas IFT. En (C) y (D) se representa el corte transversal de un cilio móvil y un cilio primario. El primero posee una configuración (9+2), en la cual hay nueve dobletes de microtúbulos que encierran a un par central, mientras que el segundo, presenta la misma configuración periférica que el primero, pero con la ausencia del par central. Modificado de biorender.com & Gerdes et al. 2009.

Como fue mencionado anteriormente, las proteínas IFT juegan un rol relevante en el transporte a lo largo de los cilios, los cuales a su vez están presentes en la gran mayoría de células de los vertebrados (Gerdes et al. 2009). **Si bien, a la fecha se han identificado y caracterizado la mayoría de las proteínas IFT, su modo de acción no ha sido del todo dilucidado. El uso de organismos modelo tanto vertebrados como invertebrados, ha contribuido en expandir el conocimiento que se tiene acerca de las proteínas IFT, y como su pérdida de función se traduce en alteraciones fisiológicas (Hirokawa et al. 2006, Krock et al. 2008 & Prevo et al.**

2017). Por ejemplo, Hudak y colaboradores (2010), demostraron que la alteración de la función de *ift80* en el pez cebra, ocasionaba un defecto en el mantenimiento del segmento externo de los fotorreceptores. Sin embargo, la metodología utilizada para generar la pérdida de la función de este factor es imprecisa y sujeta a artefactos (Hudak et al. 2010). Así, el estudio de mutantes se ha convertido en una herramienta útil para estudiar la relación entre secuencia génica y función. Por lo tanto, la caracterización de un mutante de *ift80* podría entregarnos valiosa información de cómo su pérdida de función impacta en el aparato visual de los vertebrados.

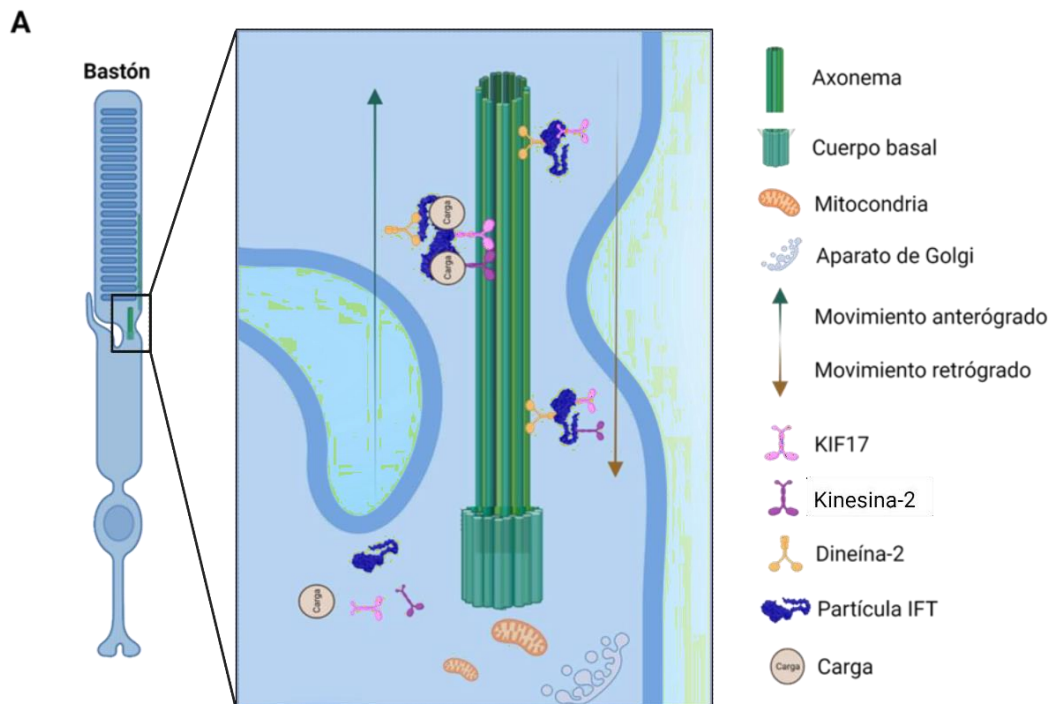


Figura 5. Transporte intraflagelar (IFT) y su función en una célula fotorreceptora. (A) Esquema representativo de un cilio que une al segmento externo e interno de los fotorreceptores, en este caso un bastón. El movimiento intraflagelar (IFT) ocurre en este cilio de conexión, con la participación de diferentes proteínas que interaccionan para llevar a cabo tanto el movimiento anterógrado como el retrógrado. Para que este tipo de transporte se mantenga activo, es necesario que las proteínas interaccionen de manera correcta en su ensamblaje. En el movimiento anterógrado los motores de kinesina-2 y KIF17 se unen a una partícula IFT, y esta a su vez se une a la dineína-2 y a una carga que puede ser una molécula o proteína que se requiera para el mantenimiento del segmento externo o en el proceso de fototransducción. Una vez que termina el movimiento anterógrado de esta maquinaria, la dineína-2 que fue transportada anterógradamente regresa de manera retrógrada trayendo devuelta a los motores Kinesina-2 y KIF17 y la partícula IFT que generalmente son del complejo B. Cabe mencionar que, este tipo de mecanismo varía según el tipo de fotorreceptor.

1.4 EL QUERATOCONO: UNA ENFERMEDAD OCULAR QUE AFECTA EL MANTENIMIENTO ESTRUCTURAL DE LA CORNEA

Una ectasia es definida como una dilatación o distensión de una estructura tubular (Gomes et al. 2015). Así, las ectasias corneales son patologías asociadas con el tejido corneal y que afectan de manera progresiva la forma y la curvatura de la córnea. Entre estas podemos mencionar a la degeneración marginal pelúcida, el queratoglobo y el queratocono (Marcos 2005; Ruiz-Morales et al. 2010). Este último, corresponde a una alteración degenerativa que genera deformación y adelgazamiento progresivo de la córnea (Figura 6) (Bravo Vanegas 2009).

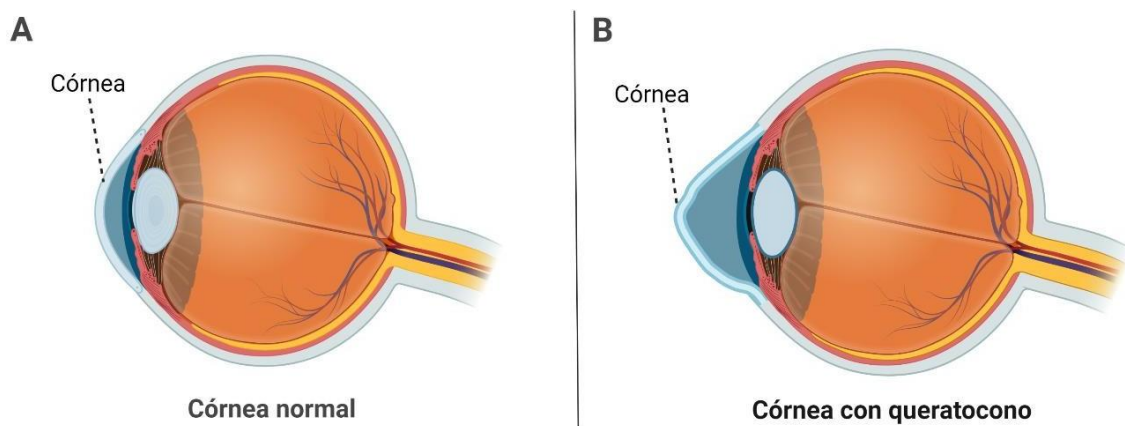


Figura 6. Morfología de la córnea en salud y enfermedad. (A) Esquema representativo de la córnea y su curvatura normal. (B) Esquema representativo de una córnea debilitada, formando una protrusión anterior en el tejido corneal. Esto genera la adquisición de una forma cónica, lo cual ocasiona una distorsión del medio refractivo de la luz, característica propia de la patología conocida como queratocono. Modificado de [biorender.com](https://www.biorender.com)

Su nombre proviene del griego *κέρατο* que significa "cuerno, córnea" y *κωνος* cuyo significado es "cono" (Sánchez Villacís et al. 2018), y se caracteriza por la formación de una protrusión anterior de la córnea en forma cónica lo que genera la pérdida gradual de la visión (Tirado Martínez & Hernández Pérez 2011). Como se mencionó anteriormente, la córnea presenta cinco capas, cada una de las cuales sufre diferentes cambios morfológicos como consecuencia del queratocono (Martínez Afanador & Urrea-Victoria 2015). Esta patología tiene una incidencia de 1/2000 individuos y se distribuye entre ambos sexos sin diferencias significativas (Martínez Afanador & Urrea-Victoria 2015). Diferentes estudios han revelado que, durante el desarrollo de un individuo, el queratocono comienza a evidenciarse durante la pubertad y progresa alrededor de los 30 años de edad (Sánchez Villacís et al. 2018; Rojas-Álvarez 2019).

Puede afectar a uno o ambos ojos, aunque normalmente se desarrolla de manera bilateral (Mora et al. 2007; Villa Collar & González-Méijome 2009) y produce como consecuencia astigmatismo asimétrico, distorsión visual, mayor fotosensibilidad y una menor capacidad visual (Castillo Ruiz & Hernández Quintela 2008). La detección de esta alteración resulta sencilla cuando se encuentra en estado avanzado; sin embargo, presenta dificultades en su detección temprana (Díaz Comínches et al. 1999; Tirado Martínez & Hernández Pérez 2011), debido a la ausencia o presencia mínima de signos clínicos (Pérez Parra et al. 2014).

Si bien a la fecha no existen mecanismos de prevención de esta enfermedad, esta puede ser tratada con el uso de lentes en etapas tempranas de su progresión y con trasplante corneal en etapas tardías de la adolescencia y tempranas de la adultez (Downie & Lindsay 2015). Debido a que las causas biológicas que conllevan a la generación del queratocono son poco entendidas (Sánchez Villacís et al. 2018), hay opciones limitadas para un tratamiento efectivo de la enfermedad desde sus orígenes. Existen ciertos factores, intrínsecos y extrínsecos, que influirían en aquellas personas que padecen de queratocono. Así, esta patología se asocia a algunas enfermedades sistémicas, tales como: síndromes de Apert, de Rieger, de Crouzon y de Marfán, osteogénesis imperfecta, prolapso de la válvula mitral, enfermedades atópicas, enfermedades del colágeno, patologías oculares, amaurosis congénita de Leber, aniridia, retinosis pigmentaria y síndrome del párpado colgante (Pusseto et al. 2011). También, a anomalías cromosómicas como el síndrome de Down y alteraciones metabólicas como el síndrome de Thalasselis o deficiencia al zinc asociada con personalidad tipo A y aumento en las catepsinas (Mora et al. 2007). Además, factores indirectos como hábitos higiénicos y de lectura, ambiente, iluminación, alimentación, condiciones de trabajo, disponibilidad de servicios de salud, entre otros, son causantes de esta patología (Mora et al. 2007; Gordon et al. 2015). También, se ha reportado que el queratocono puede estar fuertemente asociado con influencias ambientales como lo son el uso de lentes de contacto, frotarse de manera frecuente los ojos, atopia del ojo y aquellas relacionadas con un daño oxidativo mayor, como la luz ultravioleta, entre otros (Keating et al. 2010; Balasubramanian et al. 2013).

Sumado a lo anterior, diversos estudios epidemiológicos han estudiado la fisiopatología que subyace al queratocono, mediante metodologías dispares en su detección, y la observación de su variación. Sin embargo, y a pesar de este sesgo, en general los datos sugieren una mayor incidencia en determinados países y/o poblaciones, entre las que se cuentan: la India, Oriente Medio y las poblaciones maoríes (Jonas et al. 2009; Al-Amri 2018; Torres Netto 2019; Papali'i-Curtin 2019). También los asiáticos que viven en el Reino Unido presentan una mayor prevalencia (Pearson et al. 2000; Georgiou et al. 2004). Todos estos estudios sugieren diferencias poblacionales subyacentes a esta enfermedad. **Para entender las alteraciones relacionadas a la biología de la estructura y función corneal, es importante dilucidar los mecanismos genético-moleculares involucrados en su mantenimiento durante la ontogenia de los animales.**

1.4.1 ETIOLOGÍA GENÉTICA DEL QUERATOCONO

Desde el punto de vista genético, la etiología del queratocono es considerada multifactorial. Es decir, está determinada por alteraciones de múltiples genes presentes en distintos loci (Pérez Parra et al. 2014; Bykhovskaya et al. 2016). La idea de que el queratocono sea una enfermedad que involucra factores genéticos asociados, se ha incrementado con fuerza en las últimas tres décadas como consecuencia del desarrollo de técnicas moleculares y de secuenciación, que han permitido dilucidar y entender los mecanismos genéticos que subyacen a esta patología. La consanguinidad representa factor de riesgo para padecer de queratocono (Millodot 2011; Gordon-Shaag et al. 2013). También, los antecedentes familiares de primer grado poseen un riesgo mucho mayor de contraer la enfermedad que la población en general (Rabinowitz 2003). En este sentido, algunos estudios han dilucidado mecanismos genéticos asociados con la herencia (Kriszt 2014). Si bien la detección de esta enfermedad es ampliamente variable, la identificación de marcadores genéticos específicos puede ser una herramienta valiosa y certera en el diagnóstico clínico. Así, se han utilizado múltiples enfoques genómicos para identificar loci cromosómicos y genes implicados en esta patología (Bykhovskaya & Rabinowitz 2019).

El análisis de ligamiento es una herramienta poderosa para mapear a aquellos loci genéticos susceptibles, y se ha utilizado a nivel de todo el genoma en personas que padecen de queratocono. Otro enfoque ha sido el empleo del análisis de genes candidatos para estudiar cohortes de individuos afectados por esta patología (Lucas et al. 2018). Sobre la base de los rasgos biológicos afectados en esta enfermedad, los genes candidatos identificados se predicen según sus funciones biológicas conocidas y patrones de expresión relevantes. En ocasiones, estos genes son seleccionados por estar asociados a otras distrofias corneales, enfermedades del tejido conectivo o aneuploidías cromosómicas. Pese a lo anterior, este enfoque requiere un conocimiento previo o al menos una hipótesis patogénica (Bykhovskaya et al. 2016). Los estudios de asociación de todo el genoma en un individuo (*Genome-wide association study* o *GWAS*) han permitido un mapeo genético de amplio espectro. Sin embargo, la desventaja de este tipo de análisis es que el estudio estadístico debe ser lo suficientemente riguroso para evitar un sesgo en los resultados. En los *GWAS* se han utilizado tanto estudios de vinculación como de asociación de genes candidatos a esta patología y los resultados de secuenciación provienen de poblaciones europeas. Pero, una gran cantidad de los loci identificados se han replicado en otras poblaciones de origen étnico (Hao et al. 2015; Liskova et al. 2017).

Rong y colaboradores (2017) mediante un metanálisis confirmaron la presencia de cinco loci relacionados con el queratocono: *FOXO1*, *COL5A*, *FNDC3B*, *IMMP2L* y *ZNF469* (Rong et al. 2017), junto a otro reciente hallazgo de al menos dos loci genómicos más (*PNPLA2* y *MAML2*) (McComish et al. 2020; Zhang et al. 2020). Adicionalmente, McComish y colaboradores (2020) identificaron un locus significativo presente en el cromosoma 11, donde el principal polimorfismo encontrado (*single nucleotide polymorphism* o *SNP*), denominado como rs61876744, se localizaba en el segundo intrón del gen *PNPLA2* con un alto nivel de expresión en todos los tejidos oculares, incluida la córnea. Por otro lado, se detectó una fuerte señal de expresión para una región codificante de un ARN antisentido (AP006621.8) en el locus rs61876744. AP006621.8 podría tener un rol en la regulación de *PNPLA2* u otros genes asociados a este locus y en donde su sobreexpresión desestabilizaría la

mantención de estructuras corneales (McComish et al. 2020).

1.4.2 POTENCIAL FUNCIÓN DE PNPLA2 EN LA CÓRNEA

El gen *PNPLA2* (*patatin-like phospholipase domain containing 2*) o también conocido como *ATGL* (*Adipose triglyceride lipase*) codifica para una enzima encargada de la liberación de ácidos grasos desde las reservas de triacilglicerol durante la lipólisis intracelular (Grabner et al. 2021). Como es ampliamente conocido, los ácidos grasos son necesarios como sustratos energéticos y precursores cruciales en la síntesis de lípidos de membrana y ligandos de receptores nucleares (Schreiber et al. 2018). Se sabe que los productos e intermedios de la degradación lipolítica durante el proceso de movilización de los ácidos grasos también tienen funciones reguladoras fundamentales que afectan la señalización celular, la expresión génica, el metabolismo, el crecimiento celular, la muerte celular y la lipotoxicidad (Cerk et al. 2018). Por lo tanto, la regulación de la expresión de *PNPLA2* es vital para mantener un equilibrio definido entre el almacenamiento y la movilización de lípidos. A su vez, esta enzima es considerada clave en la homeostasis energética de todo el organismo (Schreiber et al. 2018). Se ha observado que *PNPLA2* se expresa en niveles bajos en varios tejidos no adiposos como lo son el músculo esquelético, hígado, corazón, testículos, pulmón, retina, células inmunes, páncreas e intestino delgado. Por otro lado, presenta altos niveles de expresión en el tejido adiposo blanco y pardo (Schreiber et al. 2018). Taxiarchis y colaboradores (2019) demostraron que el gen *PNPLA2* participa en secreción de triglicéridos, pero no en la homeostasis de la reserva de lípidos en las células del hepatoma humano. Por lo tanto, se sugiere una función fisiológica distinta de este gen no hepático (Taxiarchis et al. 2019). Por su parte, otras investigaciones sugieren que este gen juega un papel de suma importancia en el metabolismo de los lípidos hepáticos en modelos de ratón (*Mus musculus*). Así, la inactivación hepática específica de *Pnpla2* promueve una progresiva esteatosis hepática y su sobreexpresión reduce dicha alteración en roedores obesos (Reid et al. 2008; Wu et al. 2011; Turpin et al. 2011). Finalmente, Subramanian y Becerra (2019), evaluaron el rol del gen *PNPLA2* en la regulación del daño por estrés oxidativo del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Sus resultados sugieren que la deficiencia de este gen induce un mecanismo de defensa celular que

hace que las células EPR sean más resistentes al estrés oxidativo (Subramanian & Becerra 2019). **En resumen, el estudio de la expresión del gen *PNPLA2* es limitada y se desconoce en gran parte su relevancia funcional en el tejido corneal de otros organismos vertebrados.**

1.4.3 ORGANISMOS MODELO PARA ESTUDIAR GENES CANDIDATOS DE CILIOPATÍAS Y DEL QUERATOCONO

Khaled y colaboradores (2019), mediante el uso de un modelo vertebrado como el ratón, lograron evidenciar claras anomalías que indican el rol fundamental que juega el gen *Ppip5k2* en el mantenimiento de la función morfofisiológica de la córnea. Estos investigadores, observaron superficies corneales irregulares y un adelgazamiento corneal patológico muy similar a lo que ocurre en el desarrollo del queratocono (Khaled et al. 2019). Estos hallazgos, proporcionan la única evidencia que respalda la genética detrás de la etiología de esta patología. Durante la era postgenómica, uno de los organismos genéticos modelo que ha gozado de popularidad para el estudio de enfermedades humanas es el pez cebra (*Danio rerio*), incluidas aquellas patologías asociadas al desarrollo ocular (Zhao et al. 2006). La caracterización anatómica y ultraestructural de la córnea del pez cebra demuestra muchas similitudes con la córnea humana y proporciona la base para el uso del modelo del pez cebra (Figura 7) (Zhao et al. 2006). Estas similitudes fenotípicas abren la posibilidad tanto para analizar los mecanismos genéticos básicos del desarrollo corneal, como para estudiar las causas y el origen de enfermedades corneales como el queratocono.

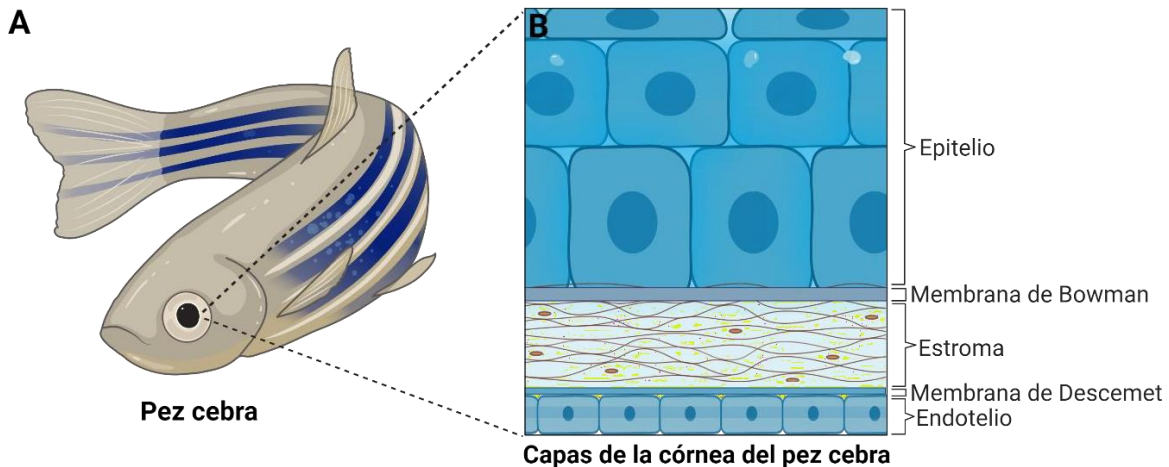


Figura 7. Configuración y organización celular de la córnea del pez cebra. (A) Muestra una representación de un individuo del pez cebra como modelo de estudio, específicamente el tejido corneal. (B) Representa las cinco capas principales de la córnea del pez cebra y su organización. Modificado de biorender.com

Dentro de las principales ventajas que ofrece el pez cebra encontramos: un genoma completamente secuenciado, alta fecundidad y fecundación externa, rápido desarrollo embrionario, corto tiempo de generación del organismo adulto, y por sobretodo su transparencia óptica y fácil manipulación. Además, y usando este modelo vertebrado, se han realizado numerosos proyectos de búsqueda genética (*genetic screens*) mediante el uso de variadas técnicas de mutagénesis. Estas han revelado la función de una valiosa colección de genes reguladores de procesos embrionarios (desde una célula hasta periodos larvales) y postembrionarios (desde la larva hasta el adulto) (Patton & Zon, 2001). De manera importante, el 70-80% de los genes del pez cebra posee un ortólogo en el humano (Howe et al. 2013; Bradford et al. 2017). **Todo lo anterior, ha posicionado al pez cebra como un amigable modelo vertebrado para el estudio a gran escala de las relaciones genotipo-fenotipo (Fuentes et al. 2018). Esto ha permitido ampliar nuestro conocimiento del desarrollo, fisiología y enfermedades en humanos.**

En cuanto al estudio de las ciliopatías humanas, el pez cebra constituye también una excelente herramienta para su estudio, debido a que la gran mayoría de los tipos celulares presentes en este organismo poseen cilios (Liu et al. 2019). Ejemplo de aquello, es la presencia del cilio de conexión localizado entre los segmentos externos e internos de las células fotorreceptoras de la retina, esta última capa del globo ocular

presenta también enormes similitudes con la de los humanos (Figura 8), validando a este modelo animal para el estudio de patologías retinianas y las ciliopatías en general. De igual manera, se ha descrito que ciertos defectos de la organogénesis enmutantes ciliares del pez cebra, han sido caracterizados mediante el uso de la tinción de anticuerpos y la microscopia de campo claro (Malicki et al. 2011). CRISPR/Cas9 y TALEN han sido otras dos poderosas herramientas biotecnológicas que se han utilizado para el estudio de las ciliopatías humanas, ya que mediante la edición del genoma del pez cebra, es posible generar modelos que expresen mutaciones genéticas relacionadas con la patología (Huang et al. 2011; Liu et al. 2019). A la fecha, no existe un mecanismo general para tratar de manera efectiva las ciliopatías humanas, y su comprensión se mantiene desconocida desde el punto de vista molecular. Así, el pez cebra emerge como organismo modelo para contribuir a identificar y dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a estas complejas patologías.

A pesar de las similitudes que presenta la córnea del pez cebra con la córnea humana (Figuras 7B y 2B), existen algunas diferencias estructurales, como lo son el grosor corneal, el grosor estromal y una apariencia disímil del endotelio corneal. Sin embargo, el pez cebra emerge como un excelente sistema modelo para estudiar los mecanismos genéticos-moleculares que subyacen el desarrollo de las enfermedades de la córnea. Referido a esto último, Zhao y colaboradores (2006) demostraron que la córnea en este organismo contiene la capa de Bowman, la cual también está presente en humanos (Zhao et al. 2006). Esta observación es esencial para el modelamiento de ectasias corneales, debido a que la capa de Bowman juega un papel fundamental en la cicatrización de heridas en la córnea y se ve afectada por varios trastornos humanos como lo son la distrofia corneal de Reis-Bücklers y el queratocono (Michael & Hogan, 1977). Por otra parte, la presencia de esta capa en la córnea del ratón es controversial. **Por lo tanto, el hallazgo de que la capa de Bowman está presente en el ojo del pez cebra ofrece un fuerte argumento morfo-genético de la relevancia del uso de este modelo para el estudio de las interacciones genotipo-fenotipo asociados a las distrofias corneales humanas.**

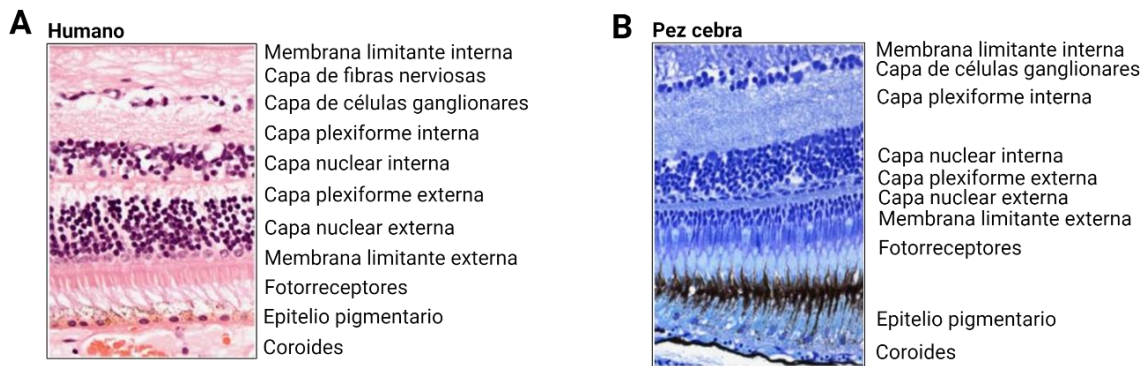


Figura 8. Configuración y organización celular de la retina del humano y el pez cebra. En (A) y (B) se comparan dos cortes transversales histológicos de la retina de humano y pez cebra, ambos vertebrados presentan enormes similitudes de esta estructura, como lo son la presencia de las dos capas plexiformes y las tres capas nucleares. Modificado de [biorender.com & Richardson et al., 2016](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5444-4_1).

En esta propuesta, se pretende estudiar el rol de los genes *ift80* y *pnpla2* en la función y mantenimiento retinal y corneal de vertebrados, respectivamente. Como la identidad de los genes involucrados en la biología de la retina y la córnea es desconocida, estudiar la función de estos factores permitirá generar una herramienta genético-molecular para entender su contribución en el aparato visual. También, servirá como una prueba de concepto para futuros estudios destinados a la búsqueda de otros factores genéticos reguladores de la estructura y función de la retina y la córnea en humanos y de nuevos marcadores biológicos de las ciliopatías y la queratoconogénesis.

2. HIPÓTESIS

La función de los genes *ift80* y *pnpla2* son cruciales en el mantenimiento del sistema visual del pez cebra durante periodos post-embriónicos del desarrollo.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol de *ift80* y *pnpla2* en la formación del sistema visual en pez cebra durante periodos post-embriónicos y su relación con afecciones oculares humanas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterización del fenotipo mutante *ift80* del pez cebra
2. Caracterizar la mutación en el gen *ift80* del pez cebra, como esta impacta en su producto génico y en el sistema visual del pez cebra durante periodos post-embrionarios
3. Caracterización *in silico* del gen *pnpla2* del pez cebra
4. Caracterización *in silico* de la proteína Pnpla2 del pez cebra

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL OJO SILVESTRE Y MUTANTE

Para analizar fenotípicamente el ojo de animales silvestres y mutantes, embriones completos de 6 días post-fertilización (dpf) fueron fijados en paraformaldehído 4% durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día, los animales fijados fueron lavados en PBS 1X y deshidratados en metanol. Posteriormente, los embriones fueron embebidos en la resina plástica JB-4 Plus (Polysciences) y se cortaron secciones de 10 µm en un micrótopo Leica RM 2155. Adicionalmente, las secciones fueron teñidas con Hematoxilina (Sigma), lavadas con agua destilada, teñidas con Eosina (Polysciences), lavadas con agua destilada y aclaradas con etanol 50%. Las secciones tenidas se cubrieron con Permount (Fisher) y fueron montadas en cubre/porta objetos donde se visualizaron y analizaron.

3.2 ANÁLISIS *IN SILICO* DEL GEN *ift80*

Con la finalidad de caracterizar molecularmente la estructura fina del gen *ift80* del pez cebra, se utilizó la base de datos ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>) que contenía las secuencias nucleotídicas codificantes (cDNA), exónicas e intrónicas para este gen. De la misma manera, se hizo uso de la misma plataforma para identificar la mutación *sa3912*. Los resultados obtenidos de este análisis fueron representados utilizando herramientas proporcionadas por el sitio biorender (<https://biorender.com/>).

3.3 ANÁLISIS *IN SILICO* DEL GEN *pnpla2*

Con el objetivo de caracterizar molecularmente la estructura fina del gen *pnpla2* del pez cebra y otros organismos vertebrados (ratón y humano), se utilizó la base de datos ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>). Esta contenía las secuencias nucleotídicas codificantes (cDNA), exónicas e intrónicas para este gen. Los resultados obtenidos de este análisis fueron representados utilizando herramientas proporcionadas por el sitio biorender (<https://biorender.com/>).

3.4 MODELAMIENTO DE LA ESTRUCTURA *Ift80* y *Pnpla2*

Para modelar la estructura 3D de estos factores, las secuencias peptídicas tanto del gen *ift80* como del gen *pnpla2* se ingresaron al servidor I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). De esta manera, se obtuvieron 5 modelos estructurales para la proteína *Ift80* y *Pnpla2*. De los modelos generados se escogieron los primeros, según las recomendaciones que entregaba el propio servidor. Posteriormente, se descargaron estos modelos en formato PDB y fueron visualizados utilizando el software de acceso público PyMol (<https://pymol.org/2/>). De igual manera, la identificación de los dominios para *Ift80* y *Pnpla2* estuvieron basados en la información proporcionada por las plataformas ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>), PFAM (<https://pfam.xfam.org/>) y PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>), sumado a la información encontrada en la literatura para la estructura de ambas proteínas. Se utilizó una estrategia similar para generar los modelos de las proteínas mutantes. De manera adicional, se realizó otro tipo de análisis tanto para *Ift80* como para *Pnpla2*. Este análisis consistió en determinar los posibles dominios transmembranas mediante el uso del servidor (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), la cual otorga un gráfico con la lista de la secuencia, la orientación del N-terminal y de los aminoácidos presentes en los dominios transmembrana, así como también el número de hélices transmembrana predichas, número de aminoácidos esperados en las hélices transmembrana, número de aminoácidos esperados en las hélices transmembrana de los 60 primeros aminoácidos de la proteína y la probabilidad total de que el N-terminal esté en el lado citoplasmático de la membrana. Estos tres tipos de resultados son presentados en la sección de anexos.

4. RESULTADOS

4.1 EL GEN *ift80* CONTROLA LA ADQUISICIÓN DE LA ARQUITECTURA CELULAR DE LA RETINA DEL PEZ CEBRA

El mutante *ift80*^{sa3912} fue generado y aislado por el consorcio del proyecto de

mutagénesis de genoma del pez cebra mediado por TILLING y realizado por el Sanger Institute (<https://zfin.org/ZDB-ALT-130411-2828>) (Kettleborough et al. 2013). A partir de una colección de fenotipos adultos mutantes que afectan períodos post-embrionarios en el pez cebra, se aislaron mutantes que presentaban alteraciones en la anatomía del ojo, entre estos *ift80^{sa3912}*. Para caracterizar el fenotipo mutante, se analizaron imágenes de alta resolución provenientes de cortes histológicos a través del ojo de larvas de 6 dpf.

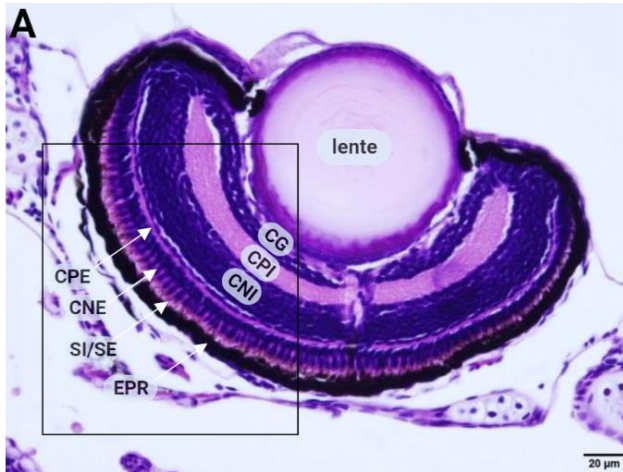
El ojo de larvas silvestres (Figura 9A), presenta distintos tipos celulares en la retina, que se ensamblan y distribuyen en capas ordenadas. Cada una de estas capas fueron visualizadas mediante tinción hematoxilina-eosina, en donde el primer colorante tiñe de color azul oscuro/púrpura los núcleos celulares debido a su carácter básico. Por otro lado, la eosina posee un carácter ácido que tiñe el citoplasma y las fibras de colágeno de color rosado en diferentes grados de intensidad. Por consiguiente, cada una de las capas presentes en la retina del pez cebra, adquirirían diferentes tipos de coloración en base a su acidez.

La capa más externa que encontramos en la retina del pez cebra corresponde al epitelio pigmentario de la retina (EPR o RPE) la cual se distribuía de manera uniforme y poseía un alto grado de pigmentación debido a la presencia de melanosomas de color negro. Posterior a la EPR, encontramos la capa nuclear externa (CNE), en donde residen los fotorreceptores (conos y bastones), los cuales se encontraban espacialmente organizados. Esta capa celular, presentaba una tinción dividida en dos coloraciones debido a la morfología de los fotorreceptores, tanto el segmento interno (SI) como el externo (SE), aparecen en la retina a las 55 hpf (Schmitt & Dowling, 1999). Ambas secciones poseían un mayor espacio citoplasmático, motivo por el cual se hallaban teñidos de color rosa, mientras que, los núcleos de los fotorreceptores se encontraban teñidos de color azul oscuro producto de la naturaleza básica de la hematoxilina. Luego, encontramos a la capa plexiforme externa (CPE), la cual corresponde en los cortes histológicos a una delgada lámina de color rosado, que realiza los contactos sinápticos entre las células fotorreceptoras y las células

bipolares. Más cercano al lente o cristalino, se encontró a la capa nuclear interna (CNI), la cual se presentaba de manera más extensa en comparación a las capas mencionadas anteriormente, y teñida de color azul-oscuro debido a la presencia de los somas de las células bipolares, horizontales y amacrinas, y constituida por los cuerpos celulares de las células gliales de Müller. Estas últimas junto a los bastones son las últimas células en diferenciarse en la retina del pez cebra y los humanos (Richardson et al. 2016). Adyacente a la CNI, y teñida de rosado, se encontraba la capa plexiforme interna (CPI) que evidencia la densa complejidad de los contactos axónicos entre las células ganglionares, amacrinas y las células presentes en la CNI. Finalmente, y teñidas de color azul oscuro aparecen las células ganglionares (CG), las cuales se diferencian a las 32 hpf y son una de las primeras células identificables en el desarrollo retiniano del pez cebra (Schmitt & Dowling 1994; Gestri et al. 2011). Los axones de esta capa de células pasan a través de la retina y forman el nervio óptico. Se ha descrito que existen por lo menos 11 tipos de células ganglionares morfológicamente diferentes, aunque se especula que este número puede ser aún mayor (Mangrum et al. 2002; Rockhill et al. 2002).

En el ojo del mutante *ift80^{sa3912}* se encontró que existen severas alteraciones en la estructura y organización celular de la retina (Figura 9B). Específicamente, se encontró la ausencia completa de la CNE, en donde residen los fotorreceptores (conos y bastones) y la CPE. **Estos resultados, indican que el gen *ift80* regula aspectos específicos de la adquisición de la arquitectura celular de la retina y que su producto de expresión juega un rol relevante en la formación y/o mantenimiento de sus tipos celulares.**

Silvestre



Mutante *ift80*^{sa3912}

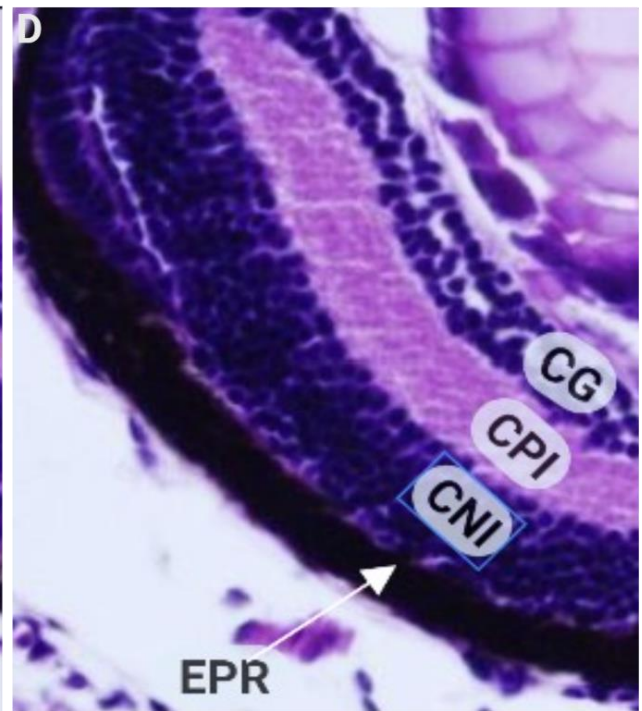
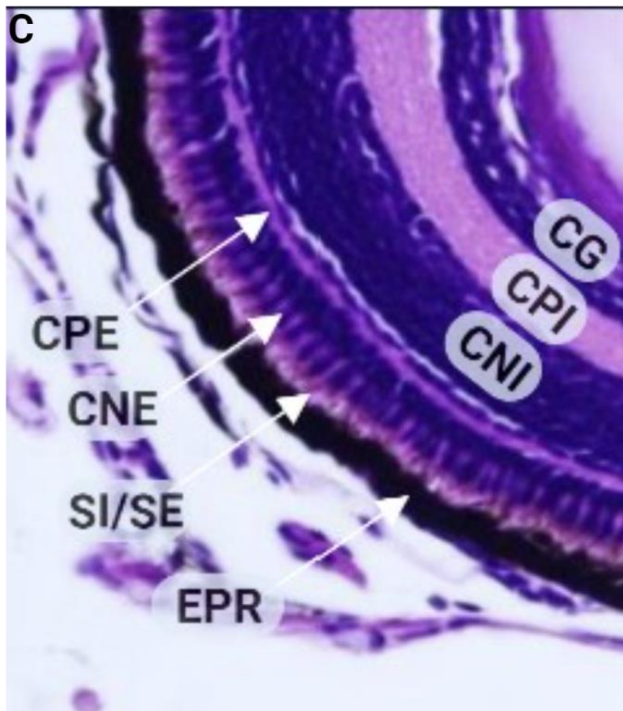
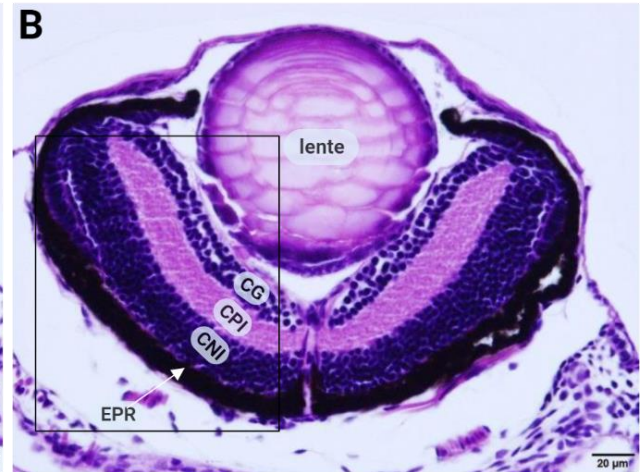


Figura 9. Morfología celular y estructural del ojo del pez cebra de 6 dpf silvestre y mutante *ift80sa3912*. (A) y (B) Cortes transversales a través del ojo de embriones silvestres y mutantes, respectivamente. (C) Imagen de alto aumento (rectángulo en A) de la retina de un embrión silvestre que muestra las distintas capas presentes en la retina del pez cebra, entre estas: el epitelio pigmentariorum de la retina (EPR), segmento externo e interno (SI/SE), capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CG). (D) Imagen de alto aumento (rectángulo en B) de la retina de un embrión silvestre que muestra la ausencia de las capas nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE) y los segmentos externos e internos (SE/SI) de los fotorreceptores presentes en la retina de un individuo silvestre del pez cebra.

4.2 LA MUTACIÓN DEL GEN *ift80* IMPACTA EN EL SITIO DONADOR DE *SPLICING* DE SU TRANSCRITO Y GENERA UN CODÓN DE TERMINO PREMATURO

La identificación de la mutación en el gen *ift80* se realizó mediante la secuenciación

del exoma completo de los espermatozoides de machos mutagenizados (Kettleborough et al. 2013). Para investigar la estructura fina del gen *ift80* del pez cebra y dilucidar el efecto de la mutación *sa3912* generada en el mismo organismo animal, se indagó en la base de datos de libre acceso de genomas vertebrados anotados ENSEMBL (www.ensembl.org). Los resultados de este análisis indicaron que el gen *ift80* se encuentra ubicado en el cromosoma 15 y que su transcrito posee 2811 pares de bases codificantes (Figura 10A). Este transcrito, está constituido por 20 exones y 19 intrones, codificando para un producto proteico de 777 residuos. Un análisis a nivel de las secuencias nucleotídicas, logró determinar que la mutación *sa3912* generó la pérdida del sitio donador de *splicing* en el intrón 16 como consecuencia de una transversión (cambio de T a G) (Figura 10B). Lo anterior, sugirió que existirían dos potenciales alternativas de cambios en la secuencia del transcrito generado. Primero, la delección de los últimos 55 nucleótidos del exón 16. Segundo, la retención de 26 nucleótidos del intrón 16, los cuáles se adicionarían al exón precedente (Figuras 10A,B).

Complementariamente, se realizó una caracterización molecular a nivel de la secuencia aminoacídica de ambos productos génicos producidos por el alelo *ift80^{sa3912}*. Los resultados indican que, para ambas alternativas se generó un tipo de mutación sin sentido, debido a que se alteró el marco de lectura abierto, ocasionando de esta manera la aparición de un codón de término prematuro ubicado en el exón 17 (Figura 10B). A pesar de que, este codón de término prematuro se encontraba localizado en el mismo exón 17 para ambas alternativas, se generaron secuencias aminoacídicas disímiles entre sí. Las diferencias entre ambas alternativas comienzan a hacerse evidentes a partir de la posición aminoacídica 595 para la alternativa 1, en donde se adicionarían 17 residuos nuevos, generando una proteína truncada de 611 aminoácidos (Fig 11B). Por otro lado, la consecuencia de la mutación en la alternativa 2 mantendría 612 aminoácidos de la secuencia silvestre y se adicionarían 26 nuevos residuos, generando una proteína truncada de 638 aminoácidos (Fig 11C). Coincidentemente, ambas proteínas mutantes truncadas, comparten la identidad de los últimos 17 aminoácidos.

En resumen, se determinó que el alelo *ift80*^{sa3912} codificaría para dos tipos de proteínas truncadas (Figuras 11B,C). La primera proteína truncada codificada por el alelo *ift80*^{sa3912} estaría constituida por 611 residuos (mutante 1); mientras que la segunda por 638 residuos (mutante 2). Paralelamente, en las proteínas mutantes 1 y 2, 166 y 139 aminoácidos estarían ausentes, respectivamente. Estos aminoácidos, forman en gran parte el comienzo de la porción C-terminal, la cual está conformada por ocho estructuras α -hélice intercaladas cada una ellas por la presencia de loops y una región distal intrínsecamente desordenada.

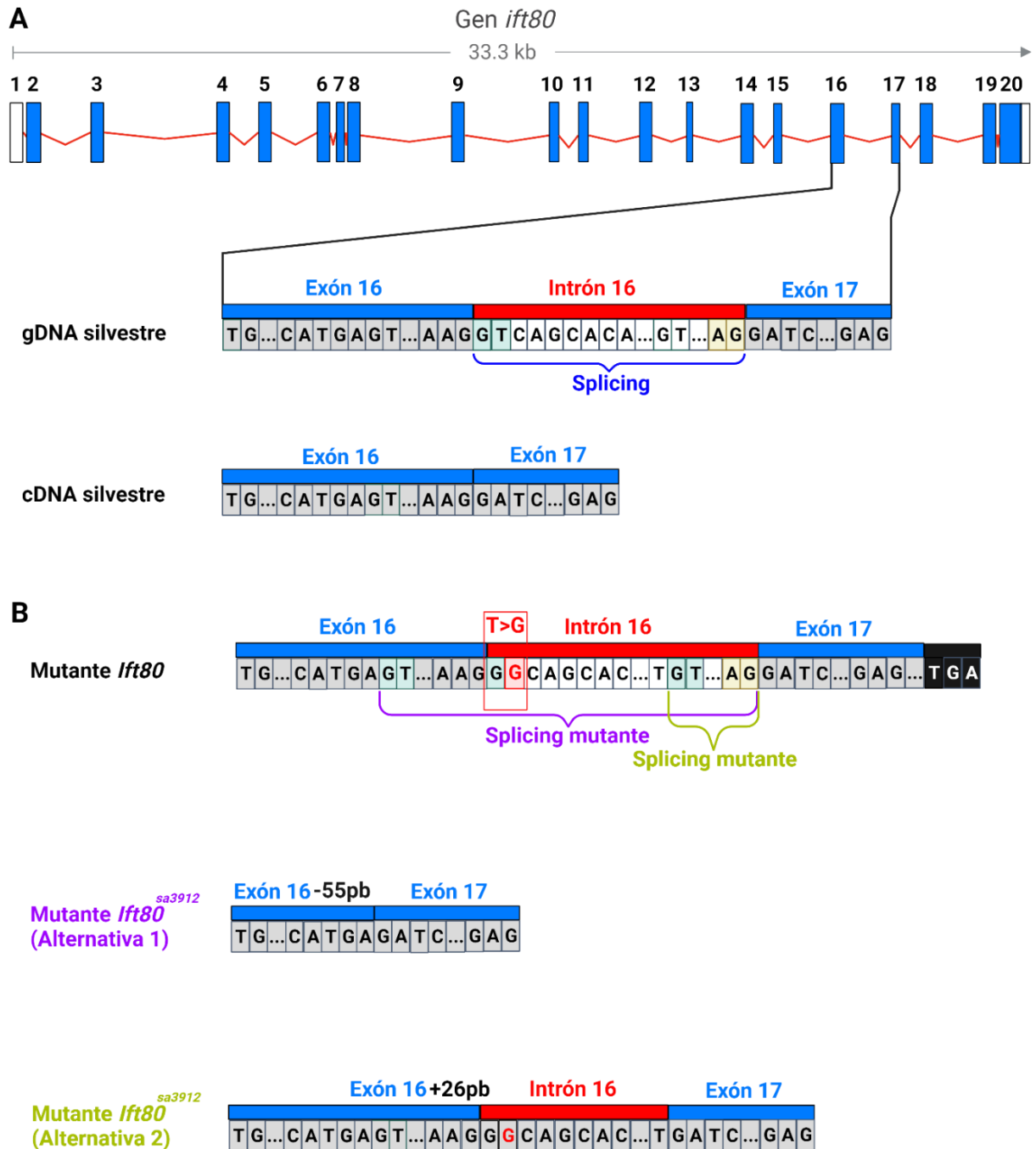


Figura 10. Esquema representativo de la estructura fina del gen *ift80* silvestre y del alelo mutante *ift80*^{sa3912}. (A) Estructura exónica e intrónica del gen *ift80*, el cual consiste de 20 exones (cajas azules) y sus 19 intrones (líneas rojas). Parte de la secuencia nucleotídica codificante se representa en color gris, mientras que la secuencia nucleotídica intrónica se representa en color blanco. En esta última, el sitio donador y aceptor de *splicing* se destacan color verde y amarillo, respectivamente. (B) Estructura exónica e intrónica del alelo mutante *ift80*^{sa3912} que muestra la mutación puntual en el sitio donador de *splicing*, la cual corresponde a una transversión de T por G (rectángulo en rojo). Como consecuencia de lo anterior, se generaría un codón de termino prematuro ubicado en el exón 17 (demarcado en negro), de igual manera, y en base a el producto de *splicing* se generarían las siguientes posibilidades: uno carente de 55 pares de bases (pb) en el exón 16 (purpura), u otro que posee una retención de 26 pb intrónicos entre el exón 16 y 17 (verde). Modificado de biorender.com

4.3 LA PROTEÍNA Ift80 DEL PEZ CEBRA POSEE UN DOMINIO FUNCIONAL WD40 EVOLUTIVAMENTE CONSERVADO

A la fecha, la predicción de la estructura tridimensional (3D) de la proteína Ift80 ha sido dilucidada a partir de la secuencia aminoacídica de primates y humanos (https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9P2H3/entry#similar_proteins). Sin embargo, un modelo comparativo de homólogos provenientes de organismos vertebrados inferiores no ha sido explorado. Para determinar el fenotipo molecular del factor Ift80 del pez cebra, se realizó un modelamiento *in silico* de su estructura 3D (Figura 12A). Los resultados indican que la proteína silvestre consiste de una primera porción N-terminal y una segunda porción C-terminal constituida principalmente por estructuras secundarias β -plegada y α -hélice, respectivamente. Específicamente, la porción N-terminal contiene dos agrupaciones consecutivas de 22 y 17 estructuras de hoja β -plegada organizadas en espiral o hélice. Por otro lado, la porción C-terminal contiene ocho estructuras α -hélice, y en donde la región distal reveló ser intrínsecamente desordenada (Figura 12A).

Estructuralmente, se determinó que el dominio funcional de la proteína Ift80 reside en una de las dos agrupaciones de hélices β -plegada en el N-terminal, el cual presenta alta homología con otros dominios reportados en la literatura (Stirnimann & Petsalaki 2010; Xu & Min 2011). Lo anterior, fue confirmado explorando plataformas bioinformáticas adicionales como PROSITE y PFAM. De igual manera, se reveló que esta proteína no contaba con posibles dominios transmembrana (Figura 16). El dominio funcional identificado, se denomina WD40 o WD repeat, el cual corresponde a uno de los más abundantes entre los organismos eucariontes, y que también se ha descrito en procariontes, y participa en interacciones proteína-proteína y proteína- DNA (Stirnimann & Petsalaki et al. 2010; Xu & Min, 2011). Las repeticiones WD40 se suelen plegar en hélices β en forma de solenoide, en donde es posible dilucidar la presencia de “palas”, las cuales corresponden normalmente a hojas β antiparalelas de cuatro hebras que se disponen alrededor de un eje central pseudosimétrico (Li & Roberts, 2001). Estas “palas” generalmente se establecen cuando las tres hebras de la última hoja forman una hoja β con la hebra exterior de la primera hoja, creando un

cierre de "velcro" que sirve para estabilizar la estructura, sumado a que entre las hojas β ocurren extensas interacciones hidrofóbicas (Xu & Min, 2011).

En la proteína Ift80 del pez cebra, las repeticiones WD se encontraron compuestas de 40-60 aminoácidos, y en donde los dipéptidos de glicina-histidina (G-H) estaban presentes próximos al extremo N-terminal. Por otro lado, el par triptófano (W)-ácido aspártico (D) se localiza al término del dominio WD40. Cabe destacar que estos dipéptidos se encuentran conservados a lo largo de la secuencia lineal de la proteína (Li & Roberts, 2001).

El análisis del dominio WD40 de la proteína Ift80 del pez cebra, reveló la presencia de 3 motivos claramente visibles en una de las hélices β (Figura 13A y 13B), este tipo de patrón resulta ser consistente con lo establecido para este tipo de motivo, salvo leves diferencias en cuanto a la cantidad de hojas β antiparalelas que conformaba cada una de las palas (Figura 13B).

4.4 LA REGIÓN C-TERMINAL DEL FACTOR Ift80 ES RELEVANTE PARA SU FUNCIÓN EN EL PEZ CEBRA

Para investigar como el efecto de la mutación sa3912 en el gen *ift80* impacta en su producto génico, se analizó la estructura 3D de las dos mutaciones predichas en la sección 4.2. Para el modelamiento de Ift80 mutante 1 y 2 se realizó el mismo protocolo aplicado a la proteína silvestre (Figura 11A). Los resultados indicaron que, en ambas estructuras proteicas, más del 78% de estas se encuentran inalteradas como consecuencia de la mutación al compararla con la versión silvestre (Figura 11A). Sin embargo, ambas proteínas codificadas por alelo mutante carecerían del extremo C-terminal (Figura 11B,C).

Juntos, los resultados del análisis *in silico* del fenotipo molecular de Ift80 del pez cebra indicaron que este factor contiene el dominio de interacción WD40 asociado a su región N-terminal y que el extremo C-terminal de su estructura es relevante para su función. Como este factor participa en la biología del cilio, será discutido más adelante.

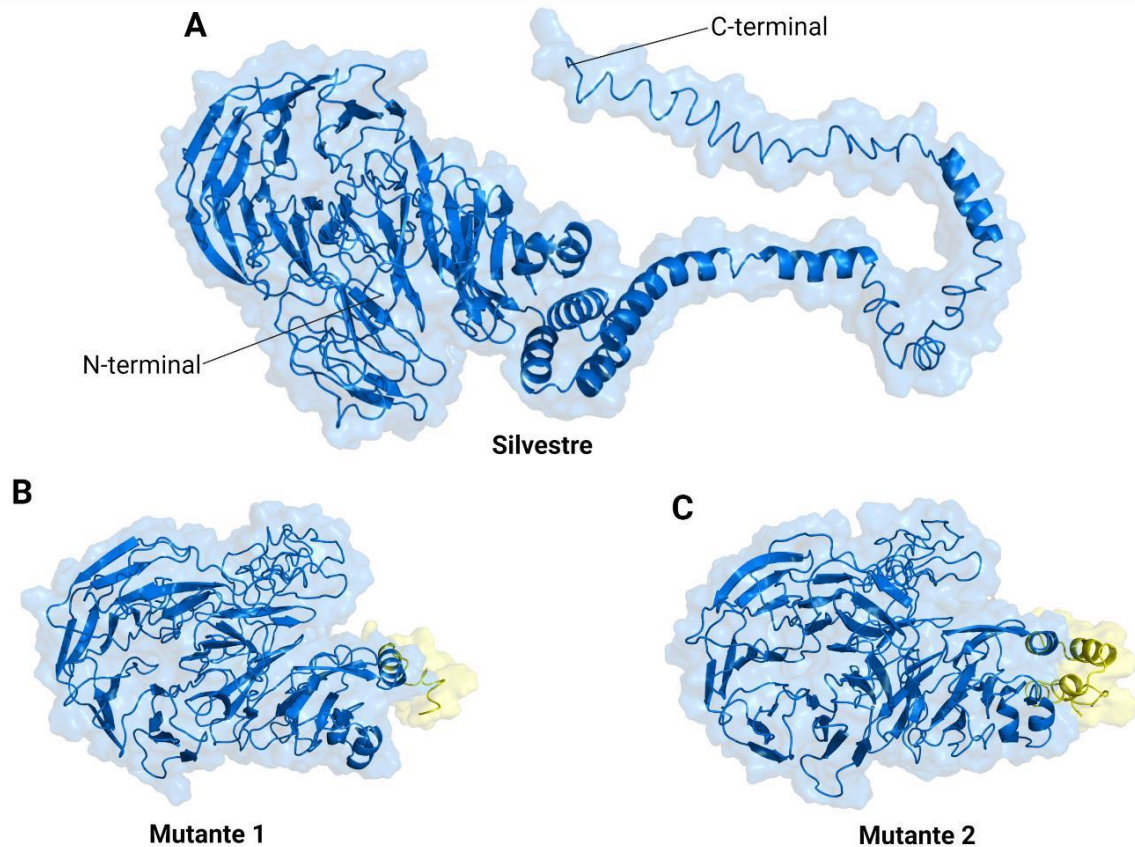


Figura 11. Comparación entre la estructura tridimensional de la proteína silvestre lft80 y sus dos versiones originadas por la mutación en el gen. (A) Estructura de la proteína silvestre lft80. **(B)** Estructura de la proteína mutante 1 de lft80^{sa3912} carente de los últimos 166 aminoácidos que conforman α hélices del extremo C-terminal. **(C)** Estructura de la proteína mutante 2 de lft80^{sa3912} carente de los últimos 139 aminoácidos que conforman α hélices del extremo C-terminal. En amarillo se destacan los nuevos aminoácidos codificados como consecuencia de un cambio en el marco de lectura causados por la mutación.

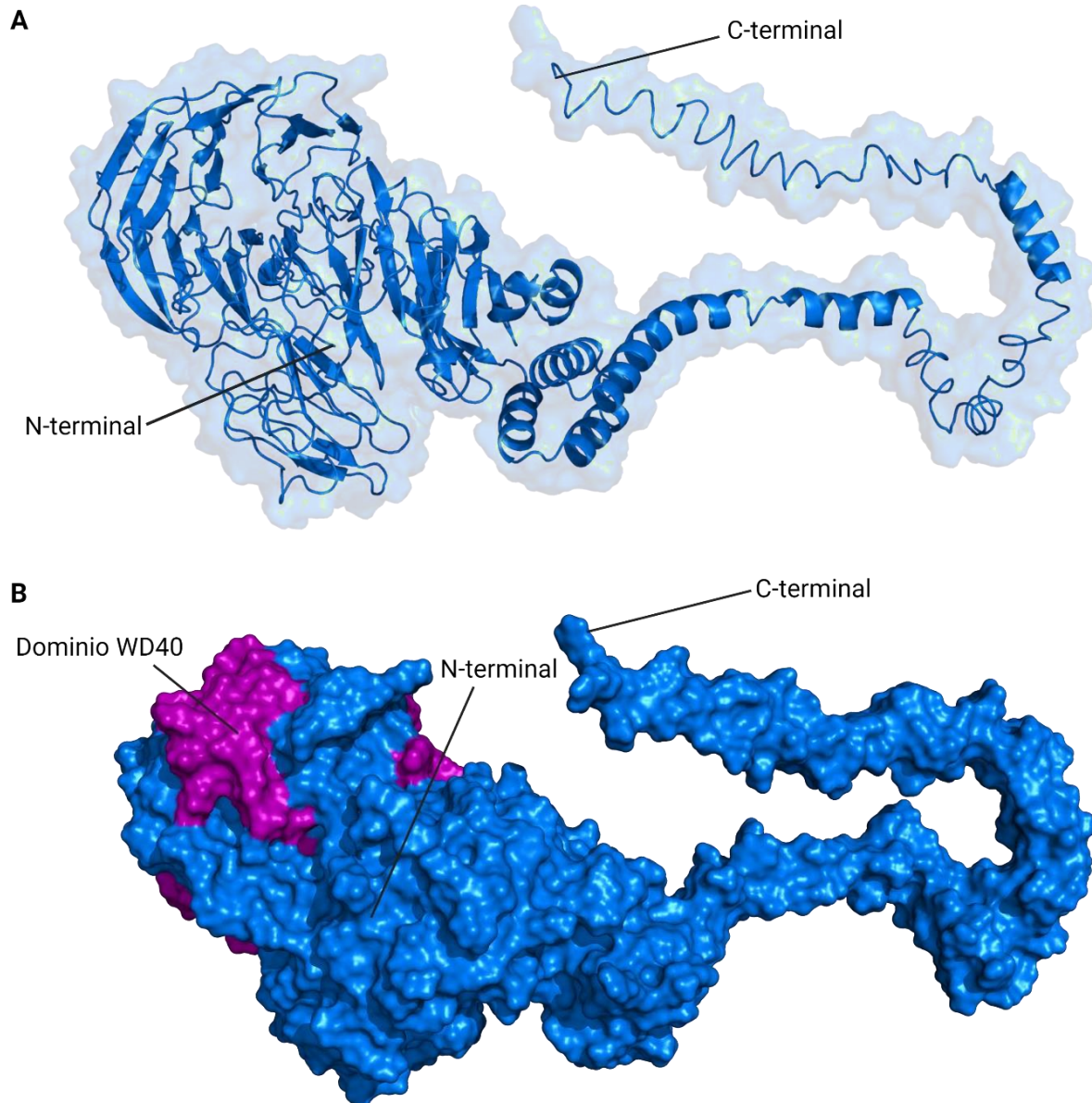


Figura 12. Modelo estructural tridimensional de la proteína silvestre Ift80 del pez cebra. (A) La composición de la estructura secundaria y plegada del factor Ift80 muestra que este consiste de dos hélices consecutivas de hojas β en la región N-terminal, y de ocho conformaciones de α -hélice en la región C-terminal. **(B)** Estructura de superficie molecular que muestra el dominio funcional WD40 (coloreado en púrpura). Ambos modelos fueron procesados utilizando el software Pymol.

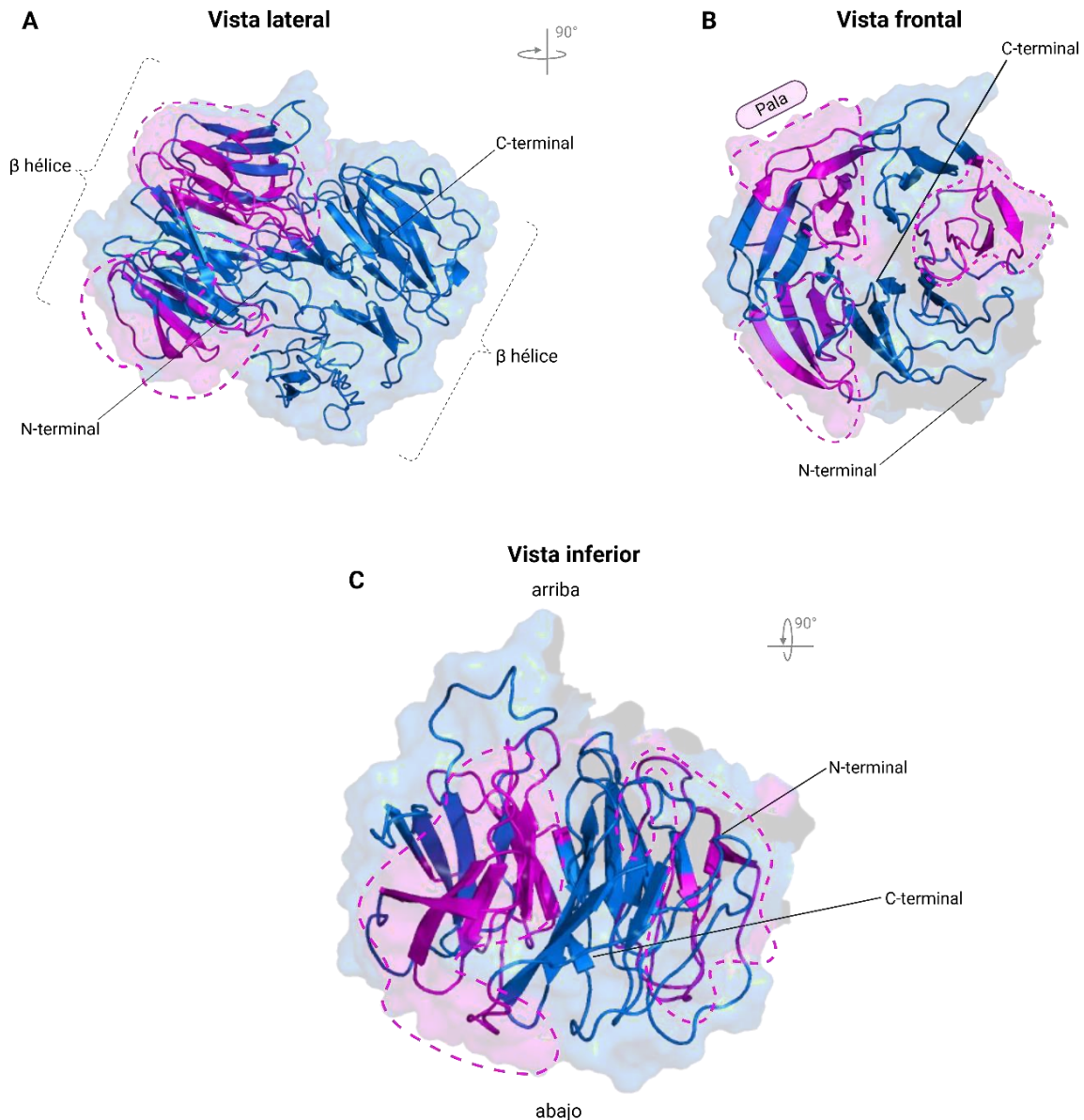


Figura 13. Estructura del dominio funcional WD40 de la proteína *Ift80* del pez cebra. (A) Vista lateral del dominio WD-40, encerrado con líneas discontinuas, rotado en 90° perpendicular a la pantalla, el cual se aprecia con mayor detalle la presencia del dominio WD40 en una de las hélices β localizada en el N-terminal de la proteína. **(B)** Vista frontal del dominio WD40, la cual presenta forma de solenoide y 3 “palas” funcionales (destacadas en purpura). Estas “palas” o motivos se encuentran conformadas por hojas β dispuestas en forma antiparalelas. **(C)** Vista inferior del dominio WD40 rotado en 90° paralelo a la pantalla. Se puede apreciar con mayor claridad la disposición antiparalela de las hojas β que forman parte del dominio WD40.

4.5 EL GEN *pnpla2* DEL PEZ CEBRA POSEE CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES SIMILARES A SU HOMÓLOGO EN RATÓN

Con la finalidad de analizar la estructura del gen *pnpla2* del pez cebra, se realizó una

comparación de secuencias nucleotídicas con otros organismos vertebrados (ratón y humano), en la base de datos de libre acceso de genomas vertebrados anotados ENSEMBL (www.ensembl.org). Los resultados de este análisis indicaron que el gen *pnpla2* en el pez cebra, se encuentra ubicado en el cromosoma 25 y que su transcrito posee 2935 pares de bases codificantes (https://www.ensembl.org/Danio_reio/Transcript/Summary?db=core:g=ENSDARG0000089390;r=25:4541211-4574570;t=ENSDART00000129978). Este transcrito, está constituido por 9 exones y 8 intrones (Figura 14A), codificando para un producto proteico de 486 residuos. De igual manera, se reveló que el gen *Pnpla2* en ratón se encontraba ubicado en el cromosoma 7 y que su transcrito poseía 2625 pares de bases codificantes (https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Transcript/Summary?db=core:g=ENSMUSG00000025509;r=7:141035111-141040656;t=ENSMUST00000164016) (311 pb menos que en pez cebra). Sin embargo, este estaba constituido por la misma cantidad de exones (9) e intrones (8) (Figura 14B), codificando un producto proteico de 486 residuos al igual que en nuestro organismo modelo. En humanos, el gen PNPLA2 revelo ser levemente distinto a los organismos anteriormente descritos, este gen se encontraba ubicado en el cromosoma 15, su transcrito posee 2416 pares de bases codificantes (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core:g=ENSG00000177666;r=11:818914-825573;t=ENST00000336615), y estaba constituido por 10 exones y 9 intrones (Figura 14C), codificando para un producto proteico de 504 residuos.

Todos estos análisis revelaron una alta similitud estructural de este gen con sus ortólogos de ratón y humanos. Lo anterior, no solamente permitió caracterizar la estructura del gen *pnpla2* en tres diferentes organismos, sino que también permitirá revelar si existe una funcionalidad compartida a nivel proteico como se describirá en la siguiente sección.

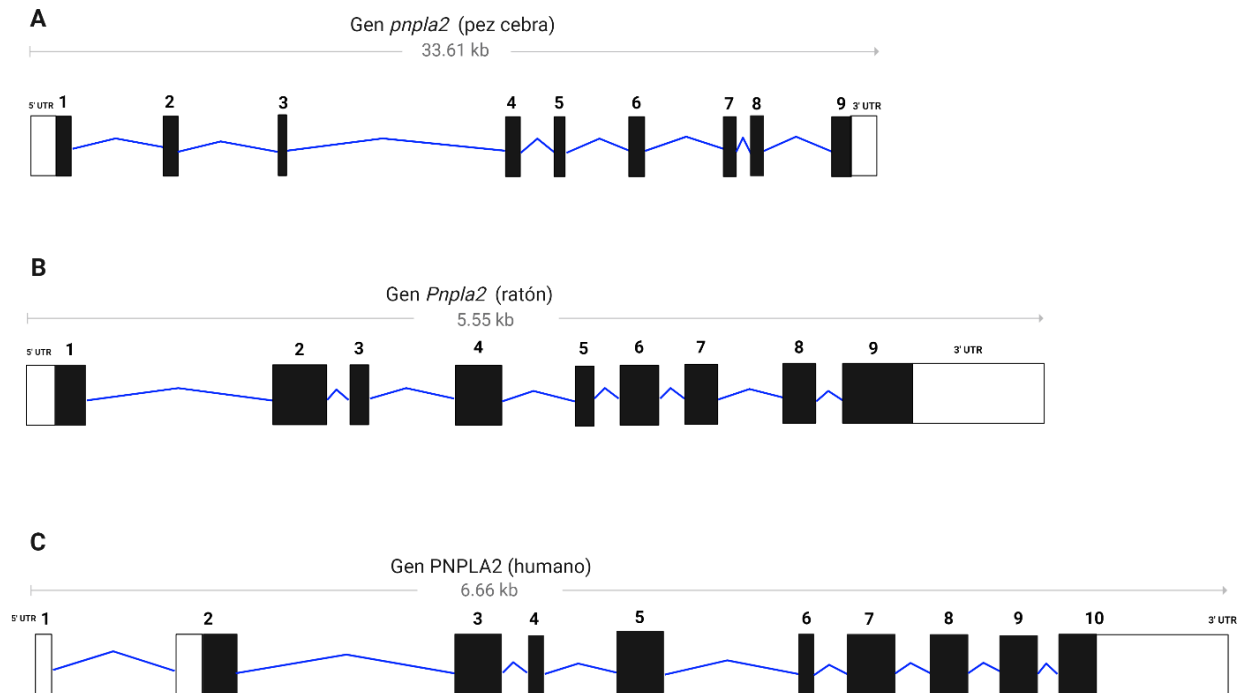


Figura 14. Representaciones esquemáticas de la estructura del gen *pnpla2* en tres diferentes organismos vertebrados. (A) Se muestra el gen *pnpla2* del pez cebra constituido por 9 exones (cajas de color negro) y 8 intrones (líneas de color azul). Las cajas abiertas representan las secuencias exónicas no codificantes. **(B)** Se representa el gen *Pnpla2* de ratón, con 9 exones (cajas en color negro) y 8 intrones (líneas de color azul), a diferencia del organismo modelo, las secuencias exónicas codificantes (cajas negras) son más extensas, lo mismo ocurre para secuencias exónicas no codificantes (cajas abiertas). **(C)** Se representa el gen *PNPLA2* del humano, a diferencia de sus predecesores, cuenta con la presencia de un exón adicional (10 exones) y la longitud de estas cajas (color negro) son similares a las del ratón, por otra parte, la cantidad de intrones igual varía, ya que en humanos son 9 (color azul), las secuencias no codificantes siguen el mismo patrón que las anteriores.

4.6 EL FACTOR *Pnpla2* Y SU ROL COMO LIPASA ADIPOSÍTICA DE TRIGLICERIDOS EN EL PEZ CEBRA

Como fue mencionado en la introducción, la función del gen *PNPLA2* ha sido asociada al EPR en mamíferos (Bullok et al. 2021). Sin embargo, si esta función se encuentra conservada en nuestro modelo de estudio no ha sido investigado. En la sección 4.5 se reveló la naturaleza estructural del gen *pnpla2* en el pez cebra y sus ortólogos en mamíferos. Al igual que el ratón, el pez cebra posee una cantidad de 9 exones, y que codifican para un producto de 486 aminoácidos (aa) (Figura 14A). Funcionalmente, los primeros 240 aa han sido propuestos como relevantes para su actividad (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Transcript/ProteinSummary?db=core:g

[=ENSDARG00000089390;r=25:4541211-4574570;t=ENSDART00000129978](#)). En paralelo, nuestros resultados indican que esta proteína posee características estructurales y funcionales coincidentes con lo que se ha descrito en la literatura para su homólogo de mamíferos (Jha et al. 2013). De manera adicional, se reveló que esta proteína no posee dominios transmembrana significativos (Figura 17).

En el pez cebra, el factor Pnpla2 presenta un dominio denominado “Patatin” o PNPLA que es característico de una gran familia de proteínas de almacenamiento y lípidos acil-hidrolasas, tanto en organismos eucariontes como procariontes. Inicialmente el dominio PNPLA fue descrito en los túberculos de papas, motivo por el cual fue caracterizado con este nombre. En nuestros análisis encontramos que el dominio PNPLA se encontraba presente en nuestra proteína del pez cebra, y que este comprende desde el residuo 10 hasta el 179, próximos al N-terminal (Figura 15A). Simultáneamente, dilucidamos que este dominio está reportado también en los sitios PFAM y PROSITE. Por otro lado, la región N-terminal de Pnpla2 contiene una secuencia consenso denominada GX SXG (Gly-X-Ser-X-Gly) que abarca los residuos 45-49 para las serinaslipasas, la cual incluye la Ser47 activa y un dominio de pliegue de hidrolasa de $\alpha/\beta/\alpha$, donde 3 de 4 hojas beta se presentan de manera paralela, mientras que una de ellas se encuentra dispuesta en forma antiparalela (Figura 15B), también dentro del mismo dominio, se encontró el motivo DGA/G (166-168) que junto a la Ser47 conformaban la díada catalítica S47 y D166 (Figura 15C). En cuanto a la región C-terminal, esta consistió de una serie de estructuras secundarias de α -helice (13 aproximadamente), las cuales poseían rangos variables de giros y se encontraban interrumpidas unas a otras por *loops*, como se aprecia en la Figura 15B.

Lo anterior, sugiere que el factor Pnpla2 del pez cebra posee características genéticas, estructurales y funcionales homólogas a su versión descrita en mamíferos (ratones y humanos). La modelación *in silico* de este factor del pez cebra, logró identificar con éxito la presencia del dominio PNPLA, su sitio catalítico y algunos motivos relevantes como GX SXG, los cuales se encontraban igualmente definidos en la literatura para esta proteína tanto en ratones como los humanos.

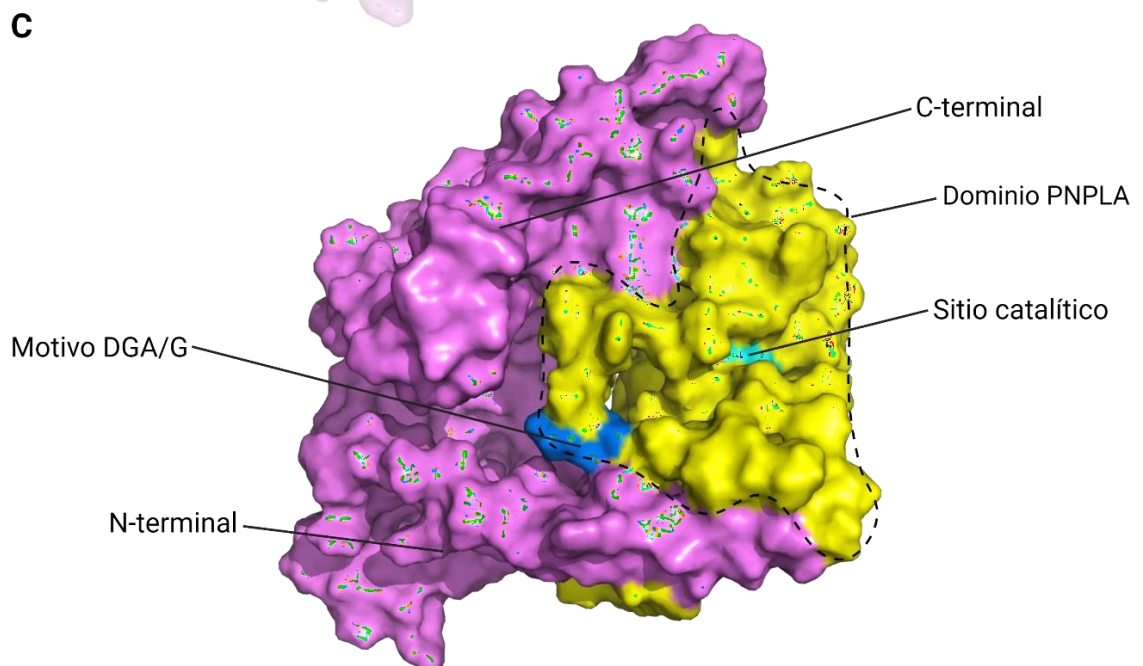
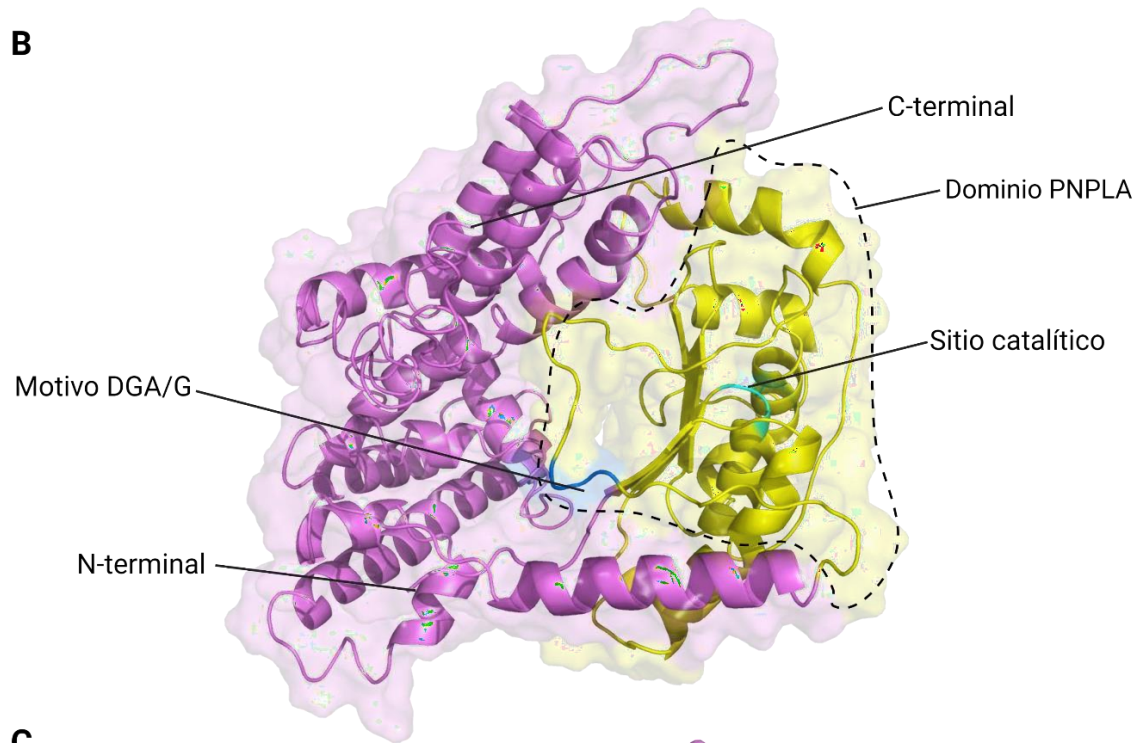
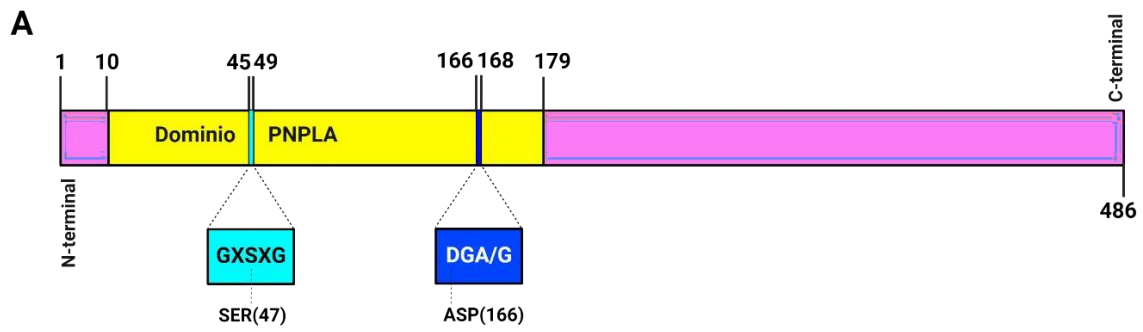


Figura 15. Representación esquemática de la proteína Pnpla2 en pez cebra y sus respectivos modelos estructurales en 3D. (A) Se representa a modo de panel la proteína Pnpla2 del pez cebra, la cual se encuentra constituida por 486 residuos. En la sección N-terminal se ubica el dominio PNPLA (color amarillo), el cual abarca desde la posición 10 hasta la 179, a su vez, este dominio cuenta con dos regiones de importancia catalítica, la primera es la secuencia consenso denominada GXSXG (color celeste) que engloba las posiciones 45-49 respectivamente (incluyendo a la Ser47), paralelamente, la segunda secuencia se denomina DGA/G (color azul), la cual abarca las posiciones 166-168 incluyendo la Asp166. En la sección C-terminal y en color rosado se representan los aminoácidos restantes para esta proteína. **(B)** Composición de la estructura secundaria y plegada del factor Pnpla2, esta consiste de un dominio de pliegue $\alpha/\beta/\alpha$, donde 3 de 4 hojas beta se presentan de manera paralela, mientras que una de ellas se encuentra dispuesta en forma antiparalela, esta sección coincide con el dominio PNPLA (color amarillo) y los sitios catalíticos de la enzima (color celeste y azul). En rosado, se aprecia la sección que cuenta con la mayor presencia de α -helices (13 aproximadamente), donde cada una de ellas, se encuentra interrumpida por loops **(C)** Estructura de superficie molecular que muestra el dominio funcional PNPLA (amarillo), los sitios catalíticos (celeste y azul) y el resto de la secuencia aminoacídica (rosado). Ambos modelos (B y C) fueron procesados utilizando el software Pymol.

5. DISCUSIÓN

El ojo es un órgano sensorial fotosensible encargado de la visión en los vertebrados y que es estrictamente necesario para el correcto desarrollo de los organismos en su entorno. Tanto la retina como la córnea son estructuras que otorgan una funcionalidad única al globo ocular, por lo que, alteraciones en estas se traducen en un déficit de la capacidad visual de los animales. Tanto las ciliopatías como el queratocono son dos ejemplos claros de alteraciones en la visión de los humanos (Acosta-Ochoa et al. 2013; Marrero et al. 2011). Ambas son patologías en las cuales se desconoce en gran parte su etiología genética y los mecanismos que subyacen a su generación (Song et al. 2022; Baker & Beales, 2009). Si bien, en las últimas décadas se han logrado avances significativos en lo que respecta a la comprensión de ambas patologías, los estudios realizados resultan ser insuficientes en proveer una respuesta clara y certera respecto su origen. Como consecuencia de lo anterior, en este trabajo de tesis se pretendió seguir profundizando en su etiología desde el punto de vista genético-molecular, y en como dichas alteraciones generan fenotipos patológicos. Así, se pretende contribuir y entender los mecanismos moleculares involucrados en estas dos patologías relacionadas con el sentido de la visión.

El pez cebra presenta un ojo idéntico a todos los demás vertebrados, incluyendo a los humanos (Roberts y Ellis 2001; Koppang y Bjerkås 2006). Salvo leves diferencias, la retina del pez cebra y el humano mantienen una estructura tremendamente similar

(Figura 3C y 3D). Por esta razón, es utilizada para la comprensión de múltiples patologías visuales como se mencionó al comienzo de este trabajo. Debido a que el pez cebra es un animal diurno, la actividad visual comienza tempranamente, alrededor de las 72 hpf. En este punto, la estructura retiniana es anatómica y funcionalmente equivalente a la de los seres humanos (Avanesov & Malicki 2014).

Con la finalidad de evaluar cómo la mutación en el gen *ift80* del pez cebra impactaba en la estructura del ojo, se realizó un análisis a nivel histológico del fenotipo mutante. La técnica histológica que incluye la tinción con hematoxilina-eosina contribuyó en gran manera a revelar la arquitectura retiniana tanto del fenotipo silvestre, como la del mutante *ift80*. Ambos individuos contaban con 6 dpf, por lo que, se debe descartar cualquier tipo de sesgo en el análisis histológico de ambos individuos, ya que se espera que a ese periodo de tiempo la estructura retiniana se encuentre completamente desarrollada (Easter & Nicola, 1997). De esta manera, se logró dilucidar la ausencia de los fotorreceptores en el ojo de individuos mutantes. Lo anterior, indica la relevancia de la función que posee la proteína Ift80 en el mantenimiento de la arquitectura retiniana del pez cebra. En particular, la correcta conservación de la capa nuclear externa (CNE), que es la sección donde residen ambos tipos de células fotorreceptoras (conos y bastones). El análisis histológico no sólo nos permitió explorar la ausencia de la (CNE), sino que también nos reveló la nula presencia de la capa plexiforme externa (CPE), la cual ha sido definida como una región de conexión sináptica entre las células fotorreceptoras y las células bipolares. Estas últimas células, juegan un rol relevante en lo que respecta a la transmisión de las señales emitidas por las células fotorreceptoras hacia la capa ganglionar (Avanesov & Malicki 2014). Así, aunque hubiese existido un normal funcionamiento de las células fotorreceptoras, estas quedarían disfuncionales al no existir un nexo entre ellas y las células ganglionares.

En lo referente a la caracterización molecular del gen *ift80* se logró determinar que el tipo de mutación identificado se relaciona con una alteración en el sitio donador de *splicing*. Así, la consecuencia de la lesión molecular es una interferencia con el correcto procesamiento del ARNm de *ift80*, lo que generalmente se traduce en

alteraciones de la correcta síntesis de la proteína. En nuestro caso, la transversión de una guanina por una timina en el sitio donador de *splicing* del intrón 16, ocasionaría que la maquinaria del spliceosoma tuviera que reconocer un nuevo sitio donador. La primera opción plausible es que esto ocurriera 55 pb río arriba del extremo 3' de la secuencia codificante del exón 16, mientras que la segunda opción era que este sitio donador se encontrara presente 26 pb río abajo del extremo 3' del mismo exón. Independientemente de estas dos alternativas, estas diferencias entre los dos productos mutantes no parecieran ser significativas a nivel estructural, ya que ambas apuntarían directamente a una disfunción de la proteína debido a la pérdida de su porción C-terminal. Lo anterior, basado en el modelo estructural generado de manera *in silico* para esta proteína (esta tesis) y lo reportado en la literatura respecto a Ift80 (Moran et al. 2018), y en donde la pérdida de su función ha estado fuertemente asociada a disfunciones ciliares, quistes renales, hidrocefalia, defectos en el patrón de izquierda a derecha, degeneración retiniana, y muchas otras anomalías del desarrollo (Lunt et al. 2009). Si bien es cierto, se reconoce a Ift80 como una proteína crucial en el mantenimiento ciliar, también se ha reportado como un factor clave en la proliferación, diferenciación y polarización de odontoblastos de células madre (Yuan et al. 2019), de la misma manera que en la diferenciación de osteoblastos (Yang & Wang 2012).

En lo que respecta al sistema visual, los estudios realizados por Hudack y colaboradores (2010) demostraron que la carencia de *ift80* en morfantes de pez cebra, presentaban defectos característicos a la distrofia torácica asfixiante de Jeune (JATD), la cual se caracteriza por poseer síntomas tales como: condrodisplasia, quistes renales y degeneración retiniana, esta última estructura afectada (retina), se encontraba alterada en los morfantes de *ift80*. El trabajo de Hudack y colaboradores (2010) logró dilucidar la presencia de núcleos picnóticos y agujeros acelulares en todas las capas celulares de la retina del morfante *ift80*, sumado a aquello, gran parte de los fotorreceptores se encontraban disfuncionales. Sin embargo, se reportó la presencia de algunos de ellos con los segmentos externos acortados y las proteínas opsinas mal localizadas. En términos comparativos, tanto los morfantes como los mutantes *ift80* compartirían en común la degeneración de los fotorreceptores. Algo

similar ocurre con la pérdida de función de otra proteína ciliar, IFT172. Bujakowska y colaboradores (2014), lograron demostrar que la ausencia de esta proteína conducía a una degeneración retiniana aislada y al síndrome de Bardet-Biedl (Bujakowska et al. 2014). De manera complementaria, Halbritter y colaboradores (2013) lograron verificar que existe una estrecha interacción genética entre *ift172* e *ift80* en el pez cebra. Ahora bien, el cómo ocurre esta interacción no está del todo descrito (Halbritter et al. 2013). Esto también incluye a las restantes proteínas que participan en el transporte intraflagelar. Como consecuencia de lo anterior, nuestros resultados del estudio del fenotipo mutante, junto con los análisis realizados de manera *in silico* para *Ift80* del pez cebra, constituyen un nuevo antecedente en lo que refiere a una pérdida funcional de esta proteína, y la comprensión del mecanismo que regula. De manera análoga, los análisis realizados a nivel histológico del fenotipo mutante revelaron que tanto el segmento interno como externo de los fotorreceptores no se encontraban presentes en el ojo del pez cebra. Lo anterior, permite proponer a la región C-terminal de *Ift80* como participante de algún tipo de interacción crítica y necesaria para una correcta ciliogénesis y mantenimiento del segmento externo de los fotorreceptores. Si bien, el dominio WD40 parece inalterado en la condición mutante, resultaría novedoso investigar si este dominio interacciona junto a la porción faltante del C-terminal de nuestra proteína. De la misma forma, conocer cómo este dominio se relaciona junto a otras proteínas intraflagelares o elementos que son transportados dentro del cilio resultaría esclarecedor. El dominio WD40 se encuentra diversificado mayoritariamente en los eucariotas, aunque también existen algunos reportes de su presencia en los organismos procariotas (Janda et al. 1996; Hu et al. 2018). Las repeticiones WD40 se suelen plegar en hélices β en forma de solenoide, en donde es posible dilucidar la presencia de “palas”, las cuales corresponden normalmente a hojas β antiparalelas de cuatro hebras que se disponen alrededor de un eje central pseudosimétrico (Li & Roberts 2001). Estas “palas” generalmente se forman cuando las tres hebras de la última hoja forman una hoja β con la hebra exterior de la primera, creando un cierre de “velcro” que sirve para estabilizar la estructura, sumado a que entre las hojas β ocurren extensas interacciones hidrofóbicas (Xu & Min, 2011). Todas estas descripciones que han sido reportadas en la literatura, y son consistentes con lo obtenido en nuestro modelo *in silico*, exceptuando algunas diferencias como lo son el

número de motivos y la cantidad de hebras que contenía cada una de estas palas, en nuestro modelo son 3 precisamente.

Complementariamente, las funciones del dominio WD40 son amplias y no existe alguna función o interacción común que lo defina. Por otro lado, algunas funciones reportadas para este dominio incluyen la transducción de señales, el procesamiento del ARN, la regulación génica, el tráfico vesicular y el ensamblaje del citoesqueleto (Jain & Pandey 2018). Esta última función está íntimamente relacionada con el transporte intraflagelar, debido a que gran parte de la participación del dominio WD40 está ligada a la unión de diversas estructuras citoesqueléticas como lo son la unión a los microtúbulos, los filamentos de actina y las dineínas (Kannan et al. 2017). También, se ha reportado una amplia gama de proteínas que contienen el dominio WD40 en el pez cebra (Afza et al. 2022). Recientemente, Afza y colaboradores (2022) identificaron y analizaron todo el genoma del pez cebra en búsqueda de proteínas que contaban con la presencia de este dominio, encontrándose un total de 251 proteínas que poseían la presencia de WD40 (Afza et al. 2022). Dentro de estas, al menos tres proteínas intraflagelares (Ift172, Ift140, Ift80) fueron identificadas en este estudio, excluyendo además a las proteínas asociadas a motores moleculares. Lo anterior apoya la relevancia funcional que está cumpliendo WD40 en el transporte intraflagelar, debido a que gran parte de este dominio está participando como andamio de interacción, ya que facilita el correcto ensamblaje de complejos multiproteicos (Kannan et al. 2017). Si bien, nuestros resultados se limitan a detallar como WD40 interactúa con los otros complejos proteicos dentro del cilio, podemos deducir que su relevancia se vuelve necesaria a la hora del correcto funcionamiento del transporte intraflagelar. Presumiblemente, parte de este dominio está interaccionando con productos necesarios para el crecimiento ciliar como lo es la tubulina y de la misma forma con los motores moleculares que transportan estos productos (Boubakri 2016). De igual manera, se ha visto que existe una estrecha relación molecular entre las proteínas que conforman el complejo B. En este sentido, Taschner y colaboradores (2018), lograron demostrar la relación existente entre IFT80 e IFT38, ya que IFT80 presenta dos hélices β N-terminales (incluyendo el dominio WD40) seguidas de una extensión helicoidal α (Taschner et al. 2018). Así, se logró dilucidar que una de las

hélices β del extremo N-terminal (que incluyen al dominio WD40) une IFT80 al complejo de trenes IFT-B a través de IFT38, mientras que la segunda hélice β y la porción C-terminal dan como resultado la homodimerización de IFT80 (Taschner et al. 2018). En un trabajo anterior de Taschner y colaboradores (2016) se logró comprobar que IFT80 interactuaba con otra proteína intraflagelar (IFT54/20), la cual requería la extensión del C-terminal de IFT80 (Taschner. 2016). En nuestro conocimiento, estos han sido los únicos trabajos que han revelado la compleja interacción detrás de estas proteínas intraflagelares. Frente aquello, se sugieren estudios adicionales, tales como el mapeo de interacciones proteína-proteína, que identifiquen y revelen si es que existe una interacción molecular diferente del dominio WD40 y la porción C-terminal de IFT80 en el pez cebra.

En cuanto a la caracterización *in silico* de nuestra proteína Pnpla2 del pez cebra, identificamos la presencia del dominio PNPLA, su sitio catalítico y algunos motivos relevantes para esta proteína. Como se mencionó en los resultados, el dominio PNPLA se encuentra fuertemente asociado con el metabolismo de los lípidos y la señalización de estos mismos. Diversos estudios, han avalado la relevancia funcional que el dominio PNPLA presenta en lo que refiere a la homeostasis lipídica y energética en gran parte de los vertebrados (Baulande & Langlois 2010; Kienesberger et al. 2009). Debido a su actividad hidrolasa, el dominio PNPLA juega un rol directo en escindir gran parte los triacilgliceroles, los fosfolípidos y los ésteres de retinol, por lo que, su especificidad es diversa para este tipo de moléculas. Esta escisión, que realiza el dominio PNPLA, es llevada a cabo por una díada catalítica de Ser-Asp o también denominada a veces Ser47, la cual se encuentra conservada en gran parte de los vertebrados (Figura 20). Se ha observado de igual forma, que la región N-terminal donde se encuentra este dominio, presenta una secuencia consenso conservada denominada como GX SXG y que coincidentemente se encuentra ubicada en el sitio catalítico que contiene a la Ser47 de nuestro dominio PNPLA (Zechner et al. 2005). Adicionalmente, se ha encontrado que la proteína PNPLA2 presenta un motivo DGA/G ubicado en la porción C-terminal, y que abarca desde el residuo 166 hasta el 168 (Saarela, 2008). Este motivo, cuenta con la presencia de la Asp166 la cual forma parte

de la díada catalítica anteriormente descrita. En este sentido, el dominio PNPLA de esta proteína ha mostrado una relevancia crítica en lo que respecta a ciertos procesos del metabolismo de los lípidos, y sus alteraciones se traducen en la aparición de enfermedades humanas como la miopatía (Fisher et al. 2007; Akiyama et al. 2007). En el pez cebra, la alteración de la proteína Pnpla2 o ATGL tiene consecuencias similares a los descrito anteriormente (Han et al. 2021). Por ejemplo, Han y colaboradores (2021) describieron que mutaciones en el gen *atgl*, ocasionan severas alteraciones en la homeostasis energética, de tal manera que, su inhibición causa la pérdida en la producción de energía de origen lipídico, y que no puede ser compensada por otras enzimas (Han et al. 2021). Como consecuencia de lo anterior, la literatura describe el rol crítico que cumple la proteína ATGL tanto en organismos humanos como en el pez cebra y sus serias consecuencias en el metabolismo de los lípidos. Sin embargo, la funcionalidad reportada y asociada para este gen en lo que respecta a enfermedades oculares es nula. Por esta razón, una proyección a este trabajo es alterar la funcionalidad de este gen, mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9 en pez cebra, lo cual resulta innovador y persigue el objetivo de asociarle un papel crucial a *pnpla2* en el correcto mantenimiento del tejido corneal en vertebrados. Lo anterior, se propone en base a la literatura descrita para alteraciones corneales como lo son el queratocono. Una prueba de aquello ha sido la hipótesis encascada propuesta por Kenney y Brown (2003), la cual establece que las córneas con queratocono poseen enzimas alteradas o defectuosas en las vías de peroxidación lipídica y/o óxido nítrico, lo cual conduce a daño oxidativo. Esta acumulación de subproductos citotóxicos oxidativos provoca una alteración de varias proteínas del tejido corneal, ocasionando una cascada de eventos como lo son apoptosis, rutas de señalización alteradas, actividades enzimáticas aumentadas, entre otras alteraciones (Kenney & Brown 2003). En paralelo (aunque no relacionada directamente con el queratocono), Ventura y colaboradores (2008), reportaron que ciertas hiperlipoproteinemias están asociadas con el arco senil en pacientes jóvenes (Ventura et al. 2008). Estas alteraciones están conformadas por depósitos de colesterol y fosfolípidos entre las membranas de Bowman y Descemet en el tejido corneal. Consecuentemente, todas estas alteraciones lipídicas reportadas apoyan la idea de dilucidar el rol de *pnpla2* en este tejido. Sin embargo, nuestros resultados solo se

limitan a especular el rol que juega este gen a nivel multisistémico para luego extrapolarlo hacia las afecciones oculares como lo son el queratocono. Por lo que se sugiere llevar a cabo estudios genético-moleculares que permitan esclarecer de manera más específica las alteraciones estructurales del tejido corneal. . Un análisis de la expresión de este gen en el tejido ocular, constituye el primer paso para el diseño de estrategias que permitan estudiar su función en el sistema visual, como la anteriormente descrita y basada en el sistema CRISPR/Cas9.

CONCLUSIÓN

El pez cebra representa un excelente modelo animal para estudiar enfermedades oculares, debido a sus enormes similitudes estructurales que presenta con el ojo humano. De igual manera, la cantidad de genes ortólogos que posee este organismo en relación con el humano es alta, lo que apoya aún más su uso en establecer relaciones genotipo-fenotipo. En esta tesis, se intentó abordar desde el punto de vista genético-molecular el rol de dos genes, *ift80* y *pnpla2*, asociados con enfermedades oculares, las ciliopatías y el queratocono, respectivamente. Ambas patologías comparten el hecho de tener una etiología genética desconocida y compleja, por lo que, abordarlas desde la genética resultaría esclarecedor. Nuestros resultados lograron caracterizar y establecer de manera exitosa una estrecha correlación genotipo-fenotipo en uno de estos dos genes (*ift80*). Su presencia durante la evolución ha demostrado un rol crucial de este factor en lo que refiere al mantenimiento visual de los vertebrados. Si bien, el modelamiento *in silico* de la proteína Ift80 nos ayudó a comprender su función a nivel molecular, en especial con la relevancia que juega la región C-terminal de la proteína, este tipo de análisis tuvo sus limitantes, como el dilucidar las interacciones proteína-proteína, o el cómo interacciona la región C-terminal con el dominio WD40. Resulta tentador especular que este tipo de interacción es crucial. Sin embargo, se necesitarán análisis posteriores que confirmen esta afirmación.

Por otra parte, el rol del gen *pnpla2* sólo se caracterizó a nivel molecular, pero no mediante el estudio de un fenotipo mutante. La alta similitud estructural que Pnpla2

presentó con sus ortólogos de ratón y humanos, logró revelar la funcionalidad compartida que presentaba esta proteína, en donde, se logró dilucidar con éxito el dominio PNPLA, su sitio catalítico (compuesto por la díada catalítica de Ser-Asp) y algunos motivos relevantes como lo fueron GXSXG. Lo anterior, fue complementado en base al modelo generado de manera *in silico* para esta proteína, la cual, a su vez, permitió caracterizar de manera más integral la estructura de este factor.

Una predicción de la función de *pnpla2* en el pez cebra demostró estar relacionada con el metabolismo de lípidos, fosfolípidos, la fosforilación de proteínas y la biosíntesis de glicerofosfolípidos. El rol crítico de este factor se ha visto implicado en severas alteraciones en la homeostasis energética, de tal manera que, su inhibición causa la pérdida en la producción de energía de origen lipídico, sin que pueda existir la compensación de otras enzimas. A pesar de aquello, y el extenso conocimiento reportado para este gen, no existen asociaciones directas que lo impliquen como el causante de patologías corneales, por lo que, la generación de un modelo mutante del gen *pnpla2* mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9 en el pez cebra, resultaría innovador en el sentido de perseguir el objetivo de asociarle un papel crucial a *pnpla2* en el correcto mantenimiento del tejido corneal en vertebrados.

ANEXOS

Dominios transmembrana de *ift80*

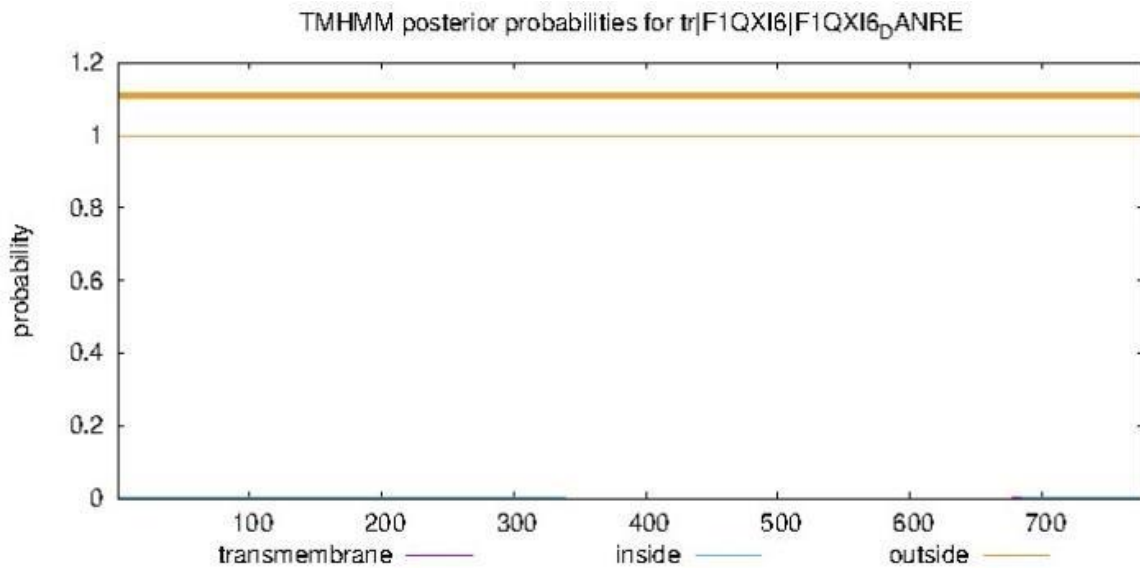


Figura 16. Análisis de posibles dominios transmembrana de Ift80 del pez cebra.

Se representa de manera gráfica los posibles dominios transmembrana de Ift80. En el eje de las abscisas se representan los residuos de la proteína (777), por otra parte, en el eje de las ordenadas se representa la probabilidad de que existan sitios transmembrana. En morado se representan los sitios transmembrana de la proteína, en esta ocasión fueron nulos. Por otra parte, en color morado y celeste, se representan los sitios dentro y fuera de la membrana respectivamente.

Dominios transmembrana de *pnpla2*

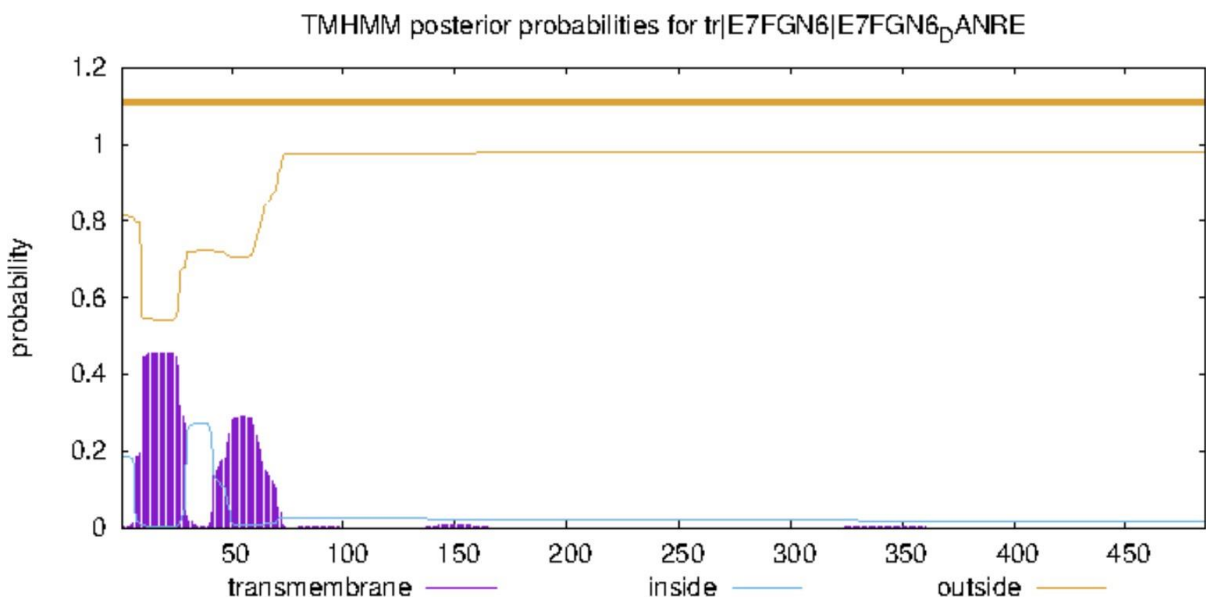


Figura 17. Análisis de posibles dominios transmembrana de Pnpla2 del pez cebra. Representación esquemática de los posibles dominios transmembrana de Pnpla2. En el eje de las abscisas se representan los residuos de la proteína (486). Por otro lado, en el eje de las ordenadas se

representa la probabilidad de que existan sitios transmembrana. Las líneas de color celeste y amarillas del gráfico representan la probabilidad real de que una posición en particular esté dentro, fuera o en el dominio transmembrana, mientras que, por otro lado las líneas continuas representan una probabilidad general de que la posición esté dentro/fuera o en el dominio transmembrana. En el gráfico, la probabilidad de que estas posiciones estén fuera (outside) para los primeros 60 aminoácidos oscila entre 0,8-1, donde 1 es considerado un valor significativo para las tres posiciones, de la misma manera, la probabilidad de que estas posiciones estén dentro (inside) para los primeros 60 aminoácidos oscila entre 0,19-0,28, y para que se encuentre en el dominio transmembrana oscila entre 0,43-0,24. Por lo tanto, se deduce que gran parte de esta proteína no posee dominios transmembranas significativos.

Especies	Dominio PNPLA (residuos 40-50)
	47
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	A R H I Y G A S A G A
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	A T H I Y G A S A G A
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	A T H I Y G A S A G A
Ratón (<i>Mus musculus</i>)	A T H I Y G A S A G A

Figura 18. Análisis de la conservación de la Ser47 en organismos vertebrados. Se muestra de manera esquemática la conservación del residuo serina 47 (Ser47) en diferentes organismos vertebrados. Este residuo se encuentra conservado en las 4 especies analizadas (pez cebra, humano, bovino y ratón). La secuencia alineada abarca desde la posición aminoacídica 40 hasta la posición 50 en las cuatro especies analizadas anteriormente.

LITERATURA CITADA

- ACOSTA-OCHOA, M. 2013. Síndrome de Bardet-Biedl, modelo de ciliopatía e importancia del compromiso renal. *Nefrología*. 33(5):623-868.
- ADLER'S. 2011. *Physiology of the eye*. Saunders/Elsevier, Edingburg. 808 pp.
- AKIYAMA, M., SAKAI, K., OGAWA, M., MCMILLAN, J., SAWAMURA, D. & SHIMIZU, H. 2007. Novel duplication mutation in the patatin domain of adipose triglyceride lipase (PNPLA2) in neutral lipid storage disease with severe myopathy. *Muscle & Nerve*. 36(6):856-859.
- AL-AMRI, A. 2018. Prevalence of Keratoconus in a Refractive Surgery Population. *Journal of Ophthalmology*.1:1-5.

- AVANESOV, A. & MALICKI, J. 2014. Analysis of the Retina in the Zebrafish Model. *Methods Cell Biology*. 100:153-204.
- BAKER, K. & BEALES, P. 2009. Making sense of cilia in disease: The human ciliopathies. *American Journal of Medical Genetics*. 151(4):281-295.
- BALASUBRAMANIAN, S., PYE, D. & WILLCOX, M. 2013. Effects of eye rubbing on the levels of protease, protease activity and cytokines in tears: relevance in keratoconus. *Clinical and Experimental Optometry*. 96(2):214-218. Blackwell Publishing. Hoboken.
- BAULANDE, S. & LANGLOIS, C. 2010. Proteins sharing PNPLA domain, a new family of enzymes regulating lipid metabolism. *Medicine Sciences*. 26(2):177-184.
- BOUBAKRI, M., CHAYA, T., HIRATA, H., MALICKI, J., FURUKAWA, T. & OMORI, Y. 2016. Loss of ift122, a Retrograde Intraflagellar Transport (IFT) Complex Component, Leads to Slow, Progressive Photoreceptor Degeneration Due to Inefficient Opsin Transport. *Journal Of Biological Chemistry*. 291(47):24465-24474.
- BRADFORD, Y., TORO, S., RAMACHANDRAN, S., RUZICKA, L., HOWE, D., EAGLE, A., KALITA, P., MARTIN, R., TAYLOR, S., SCHAPER, K. & WESTERFIELD, M. 2017. Zebrafish Models of Human Disease: Gaining Insight into Human Disease at ZFIN. *ILAR Journal*. 58(1):4-16.
- BRAVO VANEGAS, S. 2009. Una revisión del queratocono. *Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular*. 7(1):95-105.
- BUJAKOWSKA, K., ZHANG, Q., SIEMIATKOWSKA, A., LIU, Q., EMILY, P., FALK, M., CONSUGAR, M., LANCELOT, M., ANTONIO, A., LONJOU, C. ET AL. 2015. Mutations in IFT172 cause isolated retinal degeneration and Bardet-Biedl syndrome. *Human Molecular Genetics*. 24(1):230-242.
- BULLOCK, J., POLATO, F., ABU-ASAB, M., BERNARDO-COLÓN, A., AFLAKI, E., AGBAGA, M. & BECERRA, P. 2021. Degradation of Photoreceptor Outer Segments by the Retinal Pigment Epithelium Requires Pigment Epithelium-Derived Factor Receptor (PEDF-R). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 62(2):1-13.
- BYKHOVSKAYA, Y & RABINOWITZ, Y. 2019. Update on the genetics of keratoconus. *Experimental Eye Research*. 202(1):1-11.
- BYKHOVSKAYA, Y., MARGINES, B. & RABINOWITZ, Y. 2016. Genetics in Keratoconus: where are we?. *Eye and Vision*. 3(1):1-10.
- CASTILLO RUIZ, A. & HERNÁNDEZ QUINTELA, E. 2008. Aberraciones corneales de alto orden, ¿Un método para graduar al queratocono?. *Revista Mexicana de Oftalmología*. 82(6):369-375.
- CERK, I., WECHSELBERGER, L. & OBERER, M. 2018. Adipose Triglyceride Lipase Regulation: An Overview Current Protein & Peptide Science. 19(2):221-233.

- CHEN, JC., HOEY, D., CHUA, M., BELLON, R. & JACOBS, C. 2016. Mechanical signals promote osteogenic fate through a primary cilia-mediated mechanism. *FASEB journal*. 30(4):1504-1511.
- DAWSON, D. & H. EDELHAUSER. 2011. *Adler's Physiology of the Eye*. Elsevier, Amsterdam, 171-253 pp.
- DÍAZ COMÍNCHES, G., CAIÑAS RONDA, A., JIMÉNEZ CEPEDA, R. & NEIRA PELÁEZ, R. 1999. Características epidemiológicas en pacientes portadores de queratocono. *Revista Cubana de Oftalmología*. 12(1):20-26.
- DOUDNA J. & CHARPENTIER, E. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 346:1077.
- DOWNIE, L. & LINDSAY, R. 2015. Contact lens management of keratoconus. *Clinical and Experimental Optometry*. 98(4):299-311.
- EASTER, S. & NICOLA, G. 1997. The development of eye movements in the zebrafish (*Danio rerio*). *Development Psychobiology*. 31(4):267-276.
- ENRÍQUEZ, P. 2016. CRISPR-Mediated epigenome editing, *Yale Journal of Biology and Medicine*. 89(4):471-486.
- FALLER, A. & M. SCHÜNKE. 2006. *Estructura y función del cuerpo humano (Color)*. Editorial Paidotribo, Badalona, 752 pp.
- FERRERUELA, R. 2007. La visión y el ojo. *Apuntes. Educación física y deportes*. 88(2): 8-14.
- FISHER, J., LEFEVRE, C., MORAVA, E., MUSSINI, J., LAFORET, P., NEGRE-SALVAYRE, A., LATHROP, M. & SALVAYRE, R. 2007. The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nature Genetics*. 39(1):28-30.
- FOX, S. I. 2017. Fisiología humana. En: *Fisiología sensorial* (Eds.), pp. 4-10. M Mcgraw-Hill. Madrid.
- FUENTES, R., LETELIER, J., TAJER, B., VALDIVIA, L. & MULLINS, M. 2018. Fishing forward and reverse: Advances in zebrafish phenomics. *Mechanisms of Development*. 154:296-308.
- GEORGIU, T., FUNNELL, C., CASSELS-BROWN, A. & CONOR, R. 2004. Influence of ethnic origin on the incidence of keratoconus and associated atopic disease in Asians and white patients. *Eye*. 18(4):379-383.
- GERDES, J., DAVIS, E. & KATSANIS, N. 2009. The Vertebrate Primary Cilium in Development, Homeostasis, and Disease. *Cell*. 137(1):32-45.
- GESTRI, G., LINK, B. & NEUHAUSS, S. 2011. The visual system of zebrafish and its use to model human ocular Diseases. *Developmental Neurobiology*. 72(3):302-327.

- GIPSON, I. & STEPP, M. 2021. Albert and Jakobiec's Principles and Practice of Ophthalmology. En: Anatomy and Cell Biology of the Cornea, Superficial Limbus, and Conjunctiva (Eds. Gipson, I. & Stepp, M.), pp.1-29. Springer. Cham.
- GOMES, J., TAN, D., RAPUANO, C., BELIN M., AMBRÓSIO, R., GUELL, J., MALECAZE, F., NISHIDA, K., KOHJI, M. & SANGWAN, V. 2015. Global Consensus on Keratoconus and Ectatic Diseases. *Córnea*. 34(4):359-369.
- GORDON-SHAAG, A., MILLODOT, M., ESSA, M., GARTH, J., GHARA, M. & SHNEOR, E. 2013. Is consanguinity a risk factor for keratoconus?. *Optometry and vision science*. 90(5):448-454.
- GORDON-SHAAG, A., MILLODOT, M., SHNEOR, E. & LIU, Y. 2015. The Genetic and Environmental Factors for Keratoconus. *Biomed Research International*. 15:1-19.
- GRABNER, G., XIE, H. & SCHWEIGER, M. 2021. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. *Nature metabolism*. 3:1445-1465
- HALBRITTER, J., BIZET, A., SCHMIDTS, M., PORATH, J., BRAUN, D., GEE, H., MCLNERNEY-LEO, A., KRUG, P., FILHOL, E. ET AL. 2013. Defects in the IFT-B component IFT172 cause Jeune and Mainzer-Saldino syndromes in humans. *American journal of human genetics*. 93(5):915-925.
- HAN, S., QIAN, Y., LIMBU, S., WANG, J., CHEN, L., ZHANG, M. & YU DU, Z. 2021. Lipolysis and lipophagy play individual and interactive roles in regulating triacylglycerol and cholesterol homeostasis and mitochondrial form in zebrafish. *BBA Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1866(9):1-14.
- HAO, X., CHEN, P., CHEN, Z., LI, S. & WANG, Y. 2015. Evaluating the Association between Keratoconus and Reported Genetic Loci in a Han Chinese Population. *Ophthalmic Genetics*. 36 (2): 132-136.
- HIROKAWA, N., TANAKA, Y., OKADA, Y. & TAKEDA, S. 2006. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell*. 125(1):33-45.
- HOWE K., CLARK, M., TORROJA, C., TORRANCE, J., BERTHELOT, C., MUFATO, M., ET AL. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 496(7446):498-503.
- HU, R., XIAO, J., GU, T., XIAOFEN, Y., YANG, Z., CHANG, J., YANG, G. & HE, G. 2018. Genome-wide identification and analysis of WD40 proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC genomics*.19:1-13.
- HUANG, P., XIAO, A., ZHOU, M., ZHU, Z., LIN, S. & ZHANG, B. 2011. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nature Biotechnology*. 29: 699-700.
- HUDACK, L., LUNT, S., CHANG, C., WINKLER, E. FLAMMER, H., LINDSEY, M. & PERKINS, B. 2010. The Intraflagellar Transport Protein Ift80 Is Essential for Photoreceptor Survival in a Zebrafish

Model of Jeune Asphyxiating Thoracic Dystrophy. Invest Ophthalmology Visual Science. 51(7):3792-3799.

ISHIKAWA, H. & MARSHALL, W. 2011. Ciliogenesis: building the cell's antenna. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 12:222-234.

JAH, P., CLAUDEL, T., BAGHDASARYAN, A., MUELLER, M., HALILBASIC, E., DAS, S., LASS, A., ZIMMERMANN, R., ZECHNER, R., HOEFLER, G. & TRAUNER, M. 2013. Role of adipose triglyceride lipase (PNPLA2) in protection from hepatic inflammation in mouse models of steatohepatitis and endotoxemia. Hepatology. 59(3):858-869.

JAIN, B. & PANDEY, S. 2018. WD40 Repeat Proteins: Signalling Scaffold with Diverse Functions. The Protein Journal. 37:391-406.

JANDA, L., TICHÝ, P., SPÍZEK, J. & PETRÍČEK, M. 1996. deduced *Thermomonospora curvata* protein containing serine/threonine protein kinase and WD-repeat domains. Journal of Bacteriology. 178(5):1487-1489.

JONAS, J., NANGIA, V., MATIN, A., KULKARNI, M. & BHOJWANI, K. 2009. Prevalence and associations of keratoconus in rural Maharashtra in central India: the central India eye and medical study. American Journal of Ophthalmology. 148(5):760-765.

KANNAN M., BAYAM, E., WAGNER, C., RINALDI, B., KRETZ, P., TILLY, P., ROOS, M., MCGILLEWIE, L., BAR, S., MINOCHA, S. ET AL. 2017. WD40-repeat 47, a microtubule-associated protein, is essential for brain development and autophagy. PNAS. 144(44):308-397.

KAWAMURA, S. & TACHIBANAKI, S. 2022. Molecular bases of rod and cone differences. Progress in Retinal and Eye Research. 90:10-40.

KEATING A., PINEDA, R. & COLBY, K. 2008. Corneal Cross Linking for Keratoconus. Seminars in Ophthalmology. 25(5-6):249-55.

KENNEY, M. & BROWN, D. 2003. The cascade hypothesis of keratoconus. Contact lens & anterior eye. 26(3):139-146.

KETTLEBOROUGH, R., BUSCH-NENTWICH, E., HARVEY, S., DOOLEY, C., BRUIJN, E., EEDEN, F. ET AL. 2013. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. Nature. 496:494-497.

KHALED, M., BYKHOVSKAYA, Y., GU, C., LIU, A., DREWRY, M., CHEN, Z., MYSONA, B., PARKER, E., MCNABB, R., YU, H., LU, X., WANG, J., LI, X., AL-MUAMMAR, A., ROTTER, J., PORTER, L., ESTES, A., WATSKY, M., SMITH, S., XU, H., ABU-AMERO, K., KUO, A., SHEARS, S., RABINOWITZ, Y. & LIU, Y. 2019. PPIP5K2 and PCSK1 are Candidate Genetic Contributors to Keratoconus. Scientific Reports. 9(1):194-206.

KIENESBERGER, P., OBERER, M., LASS, A & ZECHNER, R. 2009. Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. Journal of lipids research. 50:63-68.

- KLENA, N. & PIGINO, G. 2022. Structural Biology of Cilia and Intraflagellar Transport. *Annual Reviews*. 38:103-123.
- KOHL, S. 2009. Genetische Ursachen erblicher Erkrankungen der Zapfen- Photorezeptoren. *Ophthalmologie*. 106:109-115
- KOPPANG, E. & BJERKÅS, E. 2006. The eye. In *Systemic Pathology of Fish*. Eds. Wilcock, B. & Dukes, T.), pp. 245-265. Scotian Press, London.
- KOZMINSKI, K., JOHNSON, A., FORSCHER, P. & ROSENBAUM, J. 1993. A Motility in the Eukaryotic Flagellum Unrelated to Flagellar Beating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(12): 5519-5523.
- KRISZT, A., LOSONEZY, G., BERTA, A., VEREB, G. & TAKÁCS, L. 2014. Segregation analysis suggests that keratoconus is a complex non-mendelian disease. *Acta Ophthalmologica*. 92(7): 562-568.
- KROCK, B. & PERKINS B. 2008. The intraflagellar transport protein IFT57 is required for cilia maintenance and regulates IFT-particle-kinesin-II dissociation in vertebrate photoreceptors. *Journal of Cell Science*. 121(11):1907-1915.
- LAMB T., COLLIN, S & PUGH, E. Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nature Reviews. Neuroscience*. 8: 960-76.
- LAND, M. & R. FERNALD. 1992. The evolution of eyes. *Annual Reviews* 15:1-29.
- LAND, M. F., & NILSSON, D.E. 2012. *Animal eyes*. Oxford University Press. Oxford. 271 pp.
- LI, D. & ROBERTS, R. 2001. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58: 2085-2097.
- LISKOVA, P., DUDAKOVA, L., KREPELOVA, A., KLEMA, J. & HYSI, P. 2017. Replication of SNP associations with keratoconus in a Czech cohort. *PLoS One*. 36(2):132-136.
- LIU, Z., TU, H., KANG, Y., XUE, Y., MA, D., ZHAO, C., HUIYAN L., WANG, L & LIU, F. 2019. Primary cilia regulate hematopoietic stem and progenitor cell specification through Notch signaling in zebrafish. *Nature Communications*. 10(1839):1-11.
- LUCAS, S., ZHOU, T., BLACKBURN, N., MILLS, R., ELLIS, J., LEO, P., SOUZEAU, E., RIDGE, B., CHARLESWORTH, J., LINDSAY, R., CRAIG J. & BURDON, K. 2018. Rare, potentially pathogenic variants in 21 keratoconus candidate genes are not enriched in cases in a large Australian cohort of European descent. *PLoS ONE*. 13(6): 1-15.
- LUNT, S., HAYNES, T. & PERKINS, B. 2009. Zebrafish *ift57*, *ift88*, and *ift172* intraflagellar transport mutants disrupt cilia but do not affect hedgehog signaling. *Developmental Dynamics*. 238(7):1744-1759.

- MALICKI, J., AVANESOV, A., LI, J., SHIAULOU, Y. & ZHAOXIA, S. 2011. Chapter 3 - Analysis of Cilia Structure and Function in Zebrafish. *Methods in Cell Biology*. 101:39-74.
- MANGRUM, W., DOWLING, J., COHEN, E. 2002. A morphological classification of ganglion cells in the zebrafish retina. *Visual Neuroscience*. 19(6): 767-779.
- MARCOS, S. 2010. Calidad óptica del ojo. *Investigación y ciencia*, 345: 66-74.
- MARRERO, E., SÁNCHEZ, O., BARRERA, B., DÍAZ, S. & SOMOZA, A. 2011. Caracterización de pacientes con queratocono. *Medisan*. 15(12): 1698-1704.
- MARTÍN, J. H. 2013. Neuroanatomía texto y atlas. En: Sistema visual (Eds. Martín, J. H.), pp. 1-26. McGraw Hill. Madrid.
- MARTÍNEZ AFANADOR, A. & URREA-VICTORIA T. 2015. Revisión de Queratocono y su Enfoque como Enfermedad Inflamatoria. *Revista Sociedad Colombiana de Oftalmología*. 48(3):246-255.
- MCCOMISH, B., SAHEBJADA, S., BYKHOVSKAYA, Y., WILLOUGHBY, C., RICHARDSON, A., TENEN, A., CHARLESWORTH, J., MACGREGOR, S., MITCHELL, P., LUCAS, S., MILLS, R., MACKEY, D., LI, X., WANG, J., JENSEN, R., ROTTER, J., TAYLOR, K., HEWITT, A., RABINOWITZ, Y., BAIRD, P., CRAIG, J. & BURDON, K. 2020. Association of Genetic Variation With Keratoconus. *JAMA Ophthalmology*. 138(2): 1-8.
- MICHAEL, J. & HOGAN, M. 1977. Patogenia de la distrofia corneal de Reis-Bücklers. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 37(1-2):109-124.
- MILLODOT, M., SHNEOR, E., ALBOU, S., ATLANI, E. & GORDON-SHAAG, A. 2011. Prevalence and Associated Factors of Keratoconus in Jerusalem: A Cross-sectional Study. *Ophthalmic Epidemiology*. 18(2): 91-97.
- MIRVIS M., STEARBS, T. & NELSON, J. 2018. Cilium structure, assembly, and disassembly regulated by the cytoskeleton. *Biochemical Journal*. 475(14):2329-2353.
- MOCKEL, A., PERDOMO, P., STUTZMANN F., LETSCH J., MARION, V. & DOLLFUS, H. 2011. Retinal dystrophy in Bardet-Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies. *Progress in Retinal and Eye Research*. 30(4):258-274.
- MORA VALENCIA, M., BONILLA ESTÉVEZ, C., VARGAS GARZÓN, O. & GIRALDO VALENCIA, O. & LUCÍA, O. 2007. Queratocono: una revisión y posible situación epidemiológica en Colombia. *Nova*. 5(8):185-196.
- MORA VILLATE, M., J. BERNAL MÉNDEZ & J. PANESO ECHEVERRY. 2016. Anatomía quirúrgica del ojo: Revisión anatómica del ojo humano y comparación con el ojo porcino. *Morfología* 8(3): 21-44.
- MORAN, J., SANDERSON, G., MAYNES, J., VIG, A., BATMANABAME, P., KANNU, E., TAVARES, A. & VICENT, E. 2018. *IFT80* mutations cause a novel complex ciliopathy phenotype with retinal degeneration. *Clinical Genetics*. 94(3-4):368-372.

- NEMUDRYI, A., VALET-DINOVA, K., MEDVEDEV, S. & ZAKIAN, S. 2014. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: Tools of discovery. *Acta Naturae*. 6(3):19-40.
- OU, G., BLACQUE O., SNOW, J., LEROUX, M. & SCHOLEY, J. 2005. Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature*. 436: 583-587.
- PAN, J. & SNELL, W. 2014. Organelle Size: A Cilium Length Signal Regulates IFT Cargo Loading. *Current Biology*. 24(2):75-78.
- PAPALI'I-CURTIN, A., COX, R., MA, T., WOODS, L., COVELLO, A. & HALL, R. 2019. Keratoconus Prevalence Among High School Students in New Zealand. *Córnea*. 38(11):1382-1389.
- PATTON, E & L. ZON. 2001. The art and design of genetic screens: zebrafish, *Nature Reviews Genetics*, 2:956-966.
- PEARSON, A., SONEJI, B., SARVANANTHAN, N. & SANDFORD-SMITH, J. 2000. Does ethnic origin influence the incidence or severity of keratoconus?. *Eye*(4):625-628.
- PEDERSEN, L. & ROSENBAUM, J. 2008. Chapter Two Intraflagellar Transport (IFT): Role in Ciliary Assembly, Resorption and Signalling. *Current Topics in Developmental Biology*. 85:23-61.
- PÉREZ PARRA, Z., ULLOA OLIVA, S., ESCALONA LEYVA, E., CASTILLO PÉREZ, A. & MÁRQUEZ VILLALÓN, S. 2014. Caracterización clínica y epidemiológica del queratocono. *Revista Cubana de Oftalmología*. 27(4):1-15.
- PREVO, B., SCHOLEY J. & PETERMAN, E. INTRAFLAGELLAR TRANSPORT: MECHANISMS OF MOTOR ACTION, COOPERATION, AND CARGO DELIVERY. 2017. *The FEBS Journal*. 284(18):2905-2931.
- PUSSETO, A., ROSSI, M., CIANI, J. & MAGURNO, G. 2011. Alta prevalencia de pacientes con queratocono en la población de la ciudad de Paraná, Entre Ríos. *Oftalmología Clínica y Experimental*. 4(4): 138-140.
- RABINOWITZ, Y. 2003. The genetics of keratoconus. *Ophthalmology Clinics of North America*. 16(4): 607-620.
- RAMAMURTHY. V., CAYOUILLE, M. 2009. Development and disease of the photoreceptor cilium. *Clinical Genetics*. 76 (2): 137-145.
- RAMON Y CAJAL, S. 1915. Contribución al conocimiento de los centros nerviosos de los insectos. *Hijos de Nicolás Moya*. Madrid. 176 pp.
- RAN, J. & ZHOU, J. 2020. Targeting the photoreceptor cilium for the treatment of retinal diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*. 41:410-415.
- REID, B., ABLES, G., OTLIVANCHIK, O., SCHOISWOHL, G., ZECHNER, R., BLANER, W. GOLDBERG, I., SCHWABE, R., CHUA, S. & HUANG, S. 2008. Hepatic Overexpression of Hormone-sensitive

Lipase and Adipose Triglyceride Lipase Promotes Fatty Acid Oxidation, Stimulates Direct Release of Free Fatty Acids, and Ameliorates Steatosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(19):13087-13099.

REITER, J. & LEROUX, M. 2017. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 18: 533-547.

RICHARDSON, R., TRACEY-WHITE, D., WEBSTER, A. & MOOSAJEE, M. 2016. The zebrafish eye: a paradigm for investigating human ocular genetics. *Eye*. 31:68-86.

ROBERTS, R. & ELLIS, A. 2001. The anatomy and physiology of teleosts. En: *The Nervous System* (Eds. Roberts, R. & Ellis, A.), pp. 51-56.

ROCKHILL, R., DALY, F., MACNEIL, M., BROWN, S. & MASLAND, R. 2002. The Diversity of Ganglion Cells in a Mammalian Retina. *The journal of Neuroscience*. 22(9):3831-3843.

RODIECK, R. W. 1973. *The vertebrate retina: Principles of structure and function*. Freeman, San Francisco. 1044 pp.

ROJAS-ÁLVAREZ, E. 2019. Queratocono en edad pediátrica: características clínico-refractivas y evolución. *Revista mexicana de oftalmología*. 93(5):221-232.

RONG, S., MA, S., YU, X., MA, L., CHU, W., CHAN, T., WANG, Y., YOUNG, A., PANG, C., JHANJI, V. & CHEN, L. 2017. Genetic associations for keratoconus: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Report*. 7(1):1-11.

ROSENBAUM, J. & WITMAN, G. 2002. Intraflagellar transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3: 813-825

RUIZ-MORALES, M., VERDIGUEL-SOTELO, K. & HERNÁNDEZ-LÓPEZ, A. 2010. Frecuencia del queratocono y trasplante de córnea. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 48(3): 309-312.

SAARELA, J., JUNG, G., HERMANN, M., NIMPF, J. & SCHNEIDER, W. 2008. The patatin-like lipase family in *Gallus gallus*. *BMC Genomics*. 9(281):1-15.

SÁNCHEZ VILLACÍS, L., ÁLVAREZ MENA, P., BENAVIDES BAUTISTA P., SÁNCHEZ SOLA H. & ZAMBRANO JORDÁN, D. 2018. El queratocono, su diagnóstico y manejo, una revisión bibliográfica. *Enfermería Investiga*. 3(1):1-8.

SATIR, P., & CHRISTENSEN, S. T. 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual Review of Physiology*. 69:377-400.

SCHMITT, E. & DOWLING, J. 1994. Early-eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *The journal of comparative neurology*. 344(4):532-542.

- SCHMITT, E. & DOWLING, J. 1999. Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: Light and electron microscopic analyses. *The journal of comparative neurology*. 404(4):515-536.
- SCHREIBER, R., XIE, H. & SCHWEIGER, M. 2019. Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1864:880-899.
- SCHWAB, I. 2017. The evolution of eyes: major steps. *The Keeler lecture 2017: centenary of Keeler Ltd. Eye*. 32: 302-313.
- SIMUNOVIC, M., MOORE, A. 1998. The cone dystrophies. *Eye* 12: 553-565.
- SONG, M., FANG, Q., SETH, I., BAIRD, P., DANIELL, M. & SAHEBJADA, S. 2022. Non-genetic risk factors for keratoconus. *Clinical and Experimental Optometry*. 3:1-11.
- STIRNIMANN, C., PETSALAKI, E., RUSSELL, R. & MÜLLER, C. 2010. WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in Biochemical Sciences*. 35(10):531-592.
- SUBRAMANIAN, P & BECERRA, P. 2019. Role of the PNPLA2 Gene in the Regulation of Oxidative Stress Damage of RPE. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1185: 377-382.
- TASCHNER, M., LORENTZEN, A., MOURÃO, A., COLLINS, T., FREKE, G., MOULDING, D., BASQUIN, J., JENKINS, D & LORENTZEN, E. 2018. *eLife*. 2018(7):1-27.
- TASCHNER, M., WEBER, K., MOURÃO, A., VETTER, M., AWASTHI, M., STIEGLER, M., BHOGARAJU, S. & LORENTZEN, E. 2016. Intraflagellar transport proteins 172, 80, 57, 54, 38, and 20 form a stable tubulin-binding IFT-B2 complex. *The EMBO Journal*. 35(7):773-790.
- TAXIARCHIS, A., MAHDESSIAN, H., SILVEIRA, A., FISHER, R. & VAN'T HOOFT, F. 2019. PNPLA2 influences secretion of triglyceride-rich lipoproteins by human hepatoma cells. *Journal of Lipid Research*. 60(6):1-21.
- TERAO, M., TAMANO, M., HARA, S., HATO, T., KINOSHITA, M. & TAKADA, S. 2016. Utilization of the CRISPR/Cas9 system for the efficient production of mutant mice using crRNA/tracrRNA with Cas9 nickase and FokI-dCas9. *Exp. Anim*. 65: 275-283.
- TIRADO MARTÍNEZ, O & A. HERNÁNDEZ PÉREZ. 2011. Topógrafos de elevación en el diagnóstico. *Revista Cubana de Oftalmología*. 24(2):364-373.
- TORRES NETTO, E., AL-OTAIBI, W., HAFEZI, N., KLING, S., AL-FARHAN, H., RANDLEMAN, J. & HAFEZI, F. 2018. Prevalence of keratoconus in paediatric patients in Riyadh, Saudi Arabia. *British Journal of Ophthalmology*. 102(10): 1436-1441.
- TURPIN, S., HOY, A., BROWN, R., RUDAZ, C., HONEYMAN, J., MATZARIS, M. & WATT, M. 2011. Adipose triacylglycerol lipase is a major regulator of hepatic lipid metabolism but not insulin sensitivity in mice. *Diabetologia*. 54:146-156.

- VAUGHAN D, & T, ASBURY. 2012. Oftalmología general. En: Retina (Eds. Fletcher E., Chong V., MPhil D., Augsburger C. & Zélia, M), pp. 1-36. Mcgraw-Hill. Ciudad de México.
- VENTURA, J., NOVA, E. & MORENO-MONTAÑES, J. 2008. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 31(3):155-170.
- VILLA COLLAR, C. & GONZÁLEZ-MÉIJOME, J. 2009. El queratocono y su tratamiento. La Gaceta de Optometría y Óptica Oftálmica. 435:16-22.
- WANG, L. & DYNLACHT. B. 2018. The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease. 145(18):1-13.
- WANG, Y., Y. RABINOWITZ, J. ROTTER & H. YANG. 2000. Genetic Epidemiological Study of Keratoconus: Evidence for Major Gene Determination. American Journal of Medical Genetics, 93:403-409.
- WATERS, A. & BEALES, P. 2011. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. Pediatric Nephrology. 26:1039-1056.
- WIECHERS, F & G, MORENO G. 2020. Oftalmología en la práctica de la medicina general. En: Exploración del fondo de ojo (Wiechers G. & G. G. Moreno), pp. 1-11. Mcgraw-Hill. Ciudad de México.
- WOLFRUM, U., SCHMITT. A. 2000. Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. Cell Motility and the Cytoskeleton.46(2):95-107.
- WU, J., WANG, S., ALVAREZ, F., CASAVANT, S., GAUTHIER, N., ABED, L., SONI, K., YANG, G. & MITCHELL, G. 2011. Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis. Hepatology. 54:122-132.
- XIE, S., W. BIAN, C. WANG, M. JUNAID, J, ZOU & D. PEI. 2016. A novel technique based on in vitro oocyte injection to improve CRISPR/Cas9 gene editing in zebrafish. Scientific Reports, 34555:1-10.
- XU, M. & MIN, J. 2011. Structure and function of WD40 domain proteins. Protein Cell. 2(3):202-214.
- YANG, S. & WANG, C. 2012. The intraflagellar transport protein IFT80 is required for cilia formation and osteogenesis. Bone. 51(3):407-417.
- YUAN, X., CAO, X. & YANG, S. 2019. IFT80 is required for stem cell proliferation, differentiation, and odontoblast polarization during tooth development. Cell Death & Disease. 10: 1-11.
- ZALOSZYC, A., SCHAEFER, E. & NOBILI, F. 2021. Ciliopatías. EMC-Pediatría. 56(3):1-8.
- ZECHNER, R., STRAUSS, J., HAMEMERLE, G., GUENTER, L., ZIMMERMANN, R. 2005. Lipolysis: pathway under construction. Current Opinion in Lipidology. 16(3):333-340.

- ZHANG, J., LI, Y., DAI, Y. & XU, J. 2020. Replication of the Association Between Keratoconus and Polymorphisms in PNPLA2 and MAML2 in a Han Chinese Population. *Frontiers in Genetics*. 11: 1-7.
- ZHAO, X., YEE, R., NORCOM, E., BURGESS, H., AVANESOV, A., BARRISH, J. & MALICKI, J. 2006. The Zebrafish Cornea: Structure and Development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 47(10):4341-4348
- ZHU, J., E. ZHANG & K. RIO-TSONIS. 2012. *Eye Anatomy*. eLS 7:1-9.

