



Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Elaboración del proyecto: viabilidad del pez cebra como modelo animal para el estudio del efecto de la asporina en la displasia del desarrollo de cadera en humanos.

Elaboración do proxecto: viabilidade do peixe cebra como modelo animal para o estudo do efecto da asporina na displasia do desenvolvemento da cadeira.

Grant development: viability of zebrafish as an animal model to study the effect of asporin on developmental dysplasia of the hip.

ALEJANDRA ORTELLS AGUIAR

CURSO: 2023-2024

CONVOCATORIA : JUNIO

Director Académico: Dr. Mónica Folgueira Otero

Director Académico: Dr. M^a Carmen de Andrés González

Agradecimientos

A mi madre, por ser mi pilar y mi fuente inagotable de apoyo. Gracias tu cariño, tu fuerza y por hacerme la persona que soy hoy en día. Eres la mejor profesora, no solo para tus alumnos, sino que también para mí. Me has enseñado todo lo que sé. Sin ti no hubiese sido posible.

ÍNDICE

RESUMEN

RESUMO

ABSTRACT

PALABRAS CLAVE

1. Contenido del proyecto: Estado del arte de la investigación propuesta .	5
1.1 La displasia del desarrollo de la cadera (DDC).....	5
1.2 Implicación de aspectos genéticos en la DDC	6
Asporina y DDC	7
1.3 El pez cebra como modelo animal	9
2. Contenido del proyecto: Objetivos del proyecto	11
3. Contenido del proyecto: Interés para el avance de los conocimientos y de la sociedad.	12
4. Contenido del proyecto: Plan de difusión y explotación de los resultados.....	13
5. Viabilidad del proyecto: Metodología	13
5.1 Importación cría y mantenimiento	13
5.2 Genotipado	14
5.3 Obtención de los embriones y posterior cría	15
5.4 Estudio del desarrollo del esqueleto con tinción bicolor	15
5.5 Análisis histológico de las articulaciones de la mandíbula y la aleta pectoral	17
5.6 Visualización de la estructura mandibular mediante Microtomografía Computarizada.....	20
5.7 Inmunofluorescencia.....	20
6. Viabilidad del proyecto: Plan de trabajo.....	21
7. Estimación presupuestaria: destino de la ayuda solicitada	22
8. Implicaciones éticas y/o de bioseguridad	23
9. Conclusiones o hitos que se pretende alcanzar	24
10. Conclusions or milestones to be achieved.	24
Bibliografía.....	25

RESUMEN

La “Displasia del Desarrollo de la Cadera” (DDC) es una patología que se basa en un mal desarrollo de la articulación de la cadera. Estas anomalías en el desarrollo pueden deberse a múltiples factores desde ambientales a genéticos. La falta de diagnóstico de esta enfermedad generalmente conduce al desarrollo de artrosis (*Osteoarthritis*, OA) temprana. Dentro de los factores genéticos que pueden ocasionar la enfermedad se ha empezado a investigar recientemente el papel del gen de la asporina (*ASPN*). Dicho gen se ha relacionado también con otras patologías óseas y articulares por su capacidad de alterar las vías de señalización de la superfamilia de TGF- β . Debido a la poca cantidad de estudios acerca de esta interacción en relación con la DDC, el presente proyecto pretende evaluar el desarrollo del esqueleto y las articulaciones en el pez cebra (*Danio rerio*) y, a su vez, determinar si existen diferencias entre peces cebra que contengan una mutación en el gen de la *aspn* (*aspn*^{sa37439}) y peces cebra con genotipo salvaje. De este modo, se pretende establecer si el pez cebra es viable para realizar estudios acerca del papel de la *ASPN* en esta y otras enfermedades musculoesqueléticas. Por último, se pretende crear una línea de investigación en la búsqueda de un tratamiento para esta enfermedad.

RESUMO

A “Displasia do Desenvolvemento da Cadeira” (DDC) é una patoloxía que se basea nun mal desenvolvemento da articulación da cadeira. Estas anomalías no desenvolvemento poden deberse a múltiples factores, dende ambientais a xenéticos. A falta de diagnóstico desta enfermidade xeralmente conduce ao padecemento de artrose (*Osteoarthritis*, OA) temperá. Dentro dos factores xenéticos que poden ocasionar a enfermidade, comezouse a investigar recentemente o papel do xene da asporina (*ASPN*). Este xene tamén se relacionou con outras patoloxías óseas e articulares pola súa capacidade de alterar as vías de sinalización da superfamilia de TGF- β . Debido a pouca cantidade de estudos sobre dita interacción en relación coa DDC, o presente proxecto pretende avaliar o desenvolvemento do esqueleto e das articulacións no peixe cebra (*Danio rerio*) e, a súa vez, determinar se existen diferenzas entre peixes cebra que conteñen una mutación no xene da *aspn* (*aspn*^{sa37439}) e peixes cebra con xenotipo salvaxe. Deste xeito, preténdese establecer se o peixe cebra é viable para realizar estudos sobre o papel da *ASPN* nesta e noutras enfermidades musculoesqueléticas. Por último, preténdese crear una liña de investigación na busca dun tratamento para novas investigación na busca dun tratamento para esta enfermidade.

ABSTRACT

Developmental Dysplasia of the Hip (DDH) is a condition based on the improper development of the hip joint. These developmental abnormalities can be due to multiple factors ranging from environmental to genetic. A lack of diagnosis of this disease generally leads to the development of early osteoarthritis (OA). Among the genetic factors that can cause the disease, the role of the asporin gene (*ASPN*) has recently begun to be investigated. This gene has also been linked to other bone and joint pathologies due to its ability to alter the signalling pathways of the TGF- β superfamily. Due to the limited number of studies on this interaction in relation to DDH, this project aims to evaluate the development of the skeleton and joints in zebrafish (*Danio rerio*)

and, in turn, determine if there are differences between zebrafish with a mutation in the *ASPN* gene (*aspn*^{sa37439}) and wild-type zebrafish. In this way, it aims to establish whether the zebrafish is a viable model for studying the role of *ASPN* in this and other musculoskeletal diseases. Finally, it aims to create a research line in the search for a treatment for this disease.

Palabras clave: pez cebra, asporina, displasia del desarrollo de la cadera, esqueleto, articulaciones.

Abreviaturas:

DDC: Displasia del desarrollo de la cadera.

OA: artrosis.

ASPN: gen de la asporina en humanos.

ASPN: proteína sintetizada a partir el gen de la asporina en humanos.

SLRP: proteoglicanos pequeños ricos en leucina.

GAGs: glucosaminoglicanos.

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta.

MEC: matriz extracelular.

aspn: gen de la asporina en pez cebra.

PFA: paraformaldehído

PBS: solución salina tamponada con fosfato.

EDTA: ácido edético.

Dpf: días post-fertilización.

1. Contenido del proyecto: Estado del arte de la investigación propuesta

1.1 La displasia del desarrollo de la cadera (DDC)

Dentro de las múltiples enfermedades conocidas que afectan al desarrollo del sistema esquelético está la “Displasia del Desarrollo de la Cadera” (DDC). Es una patología compleja que abarca un amplio espectro de anomalías en tamaño, forma, orientación u organización, en las cuales la cabeza del fémur proximal, el acetábulo (la cavidad en la que la pelvis se encaja en la cabeza del fémur), o ambos, no logran desarrollarse ni articularse anatómicamente (Storer & Skaggs, 2006). Para un desarrollo adecuado de la articulación de la cadera debe existir un buen desarrollo tanto de la cabeza femoral como del acetábulo. La cabeza femoral, debe estar firme y colocarse de manera estable en la cavidad de la cadera para formarse esférica y concéntricamente. Si el desarrollo de estas estructuras es deficiente y su interacción es anormal, el resultado es una incongruencia en la articulación de la cadera (Baghdadi *et al.*, 2019).

Es importante realizar tanto un diagnóstico como una intervención de estas deformidades anatómicas, dado que siguen una progresión que se puede ir agravando. El resultado puede ser desde una simple laxitud capsular, pasando por la subluxación, hasta la dislocación de la cadera. La dislocación supone una pérdida total de la congruencia articular, generando problemas de movimiento, al no existir contacto entre la superficie articular de la cabeza femoral y el acetábulo (Raimann & Aguirre, 2021). La principal causa de artrosis (*Osteoarthritis*, OA) temprana localizada en la cadera entre los individuos jóvenes es la consecuencia de una DDC no detectada (Harsanyi *et al.*, 2020).

La etiología de la DDC no está del todo clara. Es un desorden que tiene un origen multifactorial, implicando tanto factores genéticos como ambientales (Moraleda *et al.*, 2013). Además, el desarrollo de la articulación de la cadera es un proceso complejo, en el que se involucran las interacciones específicas cronometradas de genes y proteínas codificantes. Algunos factores de riesgo en el desarrollo de DDC que se han descrito son el sexo femenino, la presentación fetal podálica, las gestaciones múltiples, la primiparidad (primer parto), un alto peso al nacer y presentar oligohidramnios (bajo nivel de líquido amniótico) (Kenanidis *et al.*, 2020).

Al igual que otras enfermedades multifactoriales y complejas, es muy probable que existan una gran cantidad de genes que contribuyan al desarrollo de esta patología.

Aunque la mayoría de los mecanismos fisiopatológicos primarios no están aclarados completamente, sí que hay una base genética bien aceptada y evidenciada en la DDC, sobre todo a través de la herencia familiar (Feldman *et al.*, 2010). La laxitud hereditaria de los ligamentos, y otros trastornos neurológicos pediátricos con una tensión muscular anormal, son los principales factores para la herencia de la DDC (Wynne-Davies, 1970). Se ha registrado una mayor incidencia de DDC en gemelos idénticos si se compara con los mellizos, al igual que existe mayor incidencia si el recién nacido es del sexo femenino (Noordin *et al.*, 2010). Para finalizar añadir que también se ha visto una asociación de la DDC con la tortícolis muscular congénita (“cuello torcido”), el metatarso aducto o el *talipes equinovarus* o pie zambo (Agarwal & Gupta, 2012).

1.2 Implicación de aspectos genéticos en la DDC

El componente genético juega un papel fundamental en la etiología de la DDC. Hay estudios que demuestran que la probabilidad de desarrollar DDC aumenta un 30% entre hermanos o niños con un antecedente familiar de dicha enfermedad (Wilkinson, 1992). Esta base genética se ha confirmado en un estudio de concordancia entre gemelos, que reveló una mayor incidencia entre gemelos monocigóticos (41%) en comparación con gemelos dicigóticos, y una tasa de recurrencia del 5% para los niños nacidos posteriormente (Zamborsky *et al.*, 2019).

La mayor parte de las investigaciones diseñadas con el fin de asociar distintos genes con la DDC se han realizado en Asia (Shi *et al.*, 2011). Un estudio del genoma completo (*genoma wide association study*, GWAS) consiste en establecer una asociación entre la frecuencia génica o alélica de millones de marcadores de tipo SNP (polimorfismos de un único nucleótido) distribuidos a lo largo de un genoma y un fenotipo o la enfermedad de estudio (Martínez-Gil *et al.*, 2023). En estos estudios se han encontrado varios genes asociados con la DDC (**Tabla I**), tales como *COL1A1* (a partir del que se sintetiza el colágeno tipo I), *IL6* (interleucina 6), *GDF5* (factor de crecimiento/diferenciación 5), *VDR* (receptor de la vitamina D), *HOXB6* (homeobox B6), *ASPN* (asporina) y *HOXD9* (homeobox D9). Se ha descubierto que son genes que ayudan a la formación ósea o a la condrogénesis en casos de estudio en poblaciones tanto asiáticas como caucásicas (**Tabla I**) (Zamborsky *et al.*, 2019).

Tabla I. Genes asociados con la displasia del desarrollo de la cadera recogidos en diferentes estudios.Fuente: Zamborsky *et al.*, 2019.

Diseño genómico	Polimorfismo/ Mutación	Localización cromosómica	Genes	Localización
GWAS	rs6060373	20q11.22	UQCC	China
CGAA	rs143383	20q11.22	GDF-5	China
CGAA	Repeticiones de ácido aspártico	9q22.31	ASPN	China
CGAA	rs711819	2q31.1	HOXD9	China
CGAA	rs3744448	17q23.2	TBX4	China
CGAA	rs276252	20q11.22	PAPPA2	China
CGAA	rs113647555	17q21.33	COL1A1	China
CGAA	rs1800796	7p15.3	IL-6	Croacia
CGAA	rs1800470	19q13.2	TGF B1	Croacia
CGAA	rs3732378	3q22.2	CX3CR1	América
GWLA	Desconocido	17q21.31–17q22	17q21.31–17q22	China, América
GWLA	Desconocido	13q22	13q22	Japón

Abreviaturas: GWAS: Estudio del genoma completo; CGAA: Análisis de asociación de genes candidatos; GWLA: Análisis de ligamiento de genoma completo.

Asporina y DDC

El gen de la asporina (*ASPN*) es uno de los que se han asociado con la DDC (**tabla I**). Codifica para una proteína de la matriz extracelular, miembro de la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (Small leucine-rich proteoglycan, SLRP). La familia de los SLRP está conformada por 18 miembros que se agrupan en cinco clases según sus propiedades estructurales. La asporina (*ASPN*) fue descubierta y nombrada en 2001 por Lorenzo *et al.* y Henry *et al.* Pertenece a la clase I junto a la decorina y el biglicano, con las que comparte un tramo interno de 10 repeticiones en tándem ricas en leucina (**Figura 1**) (Xu *et al.*, 2015). Se caracteriza por ser única entre los SLRP al carecer de un sitio de unión a glucosaminoglicanos (GAGs) y contener una repetición de ácido aspártico (D) en su extremo amino (Henry *et al.*, 2001; Lorenzo *et al.*, 2001).

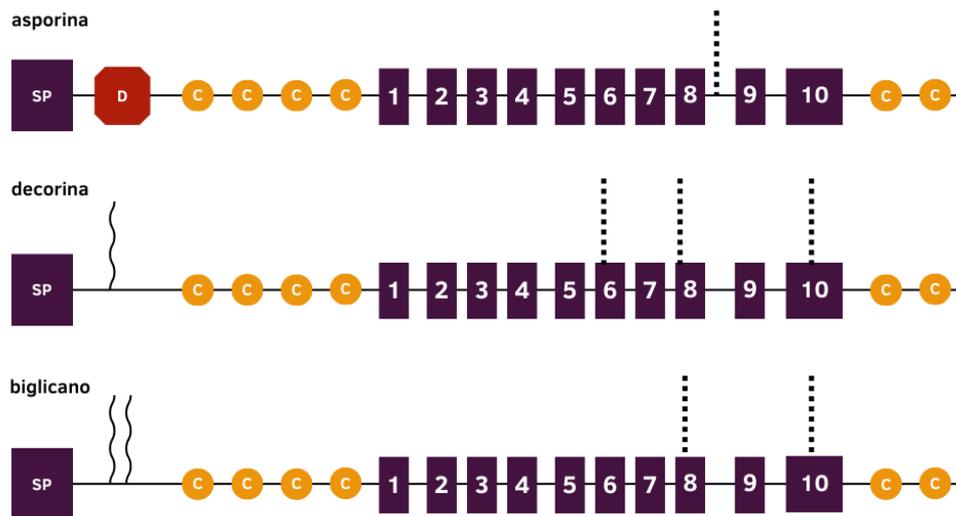


Figura 1. Diagrama de la estructura molecular de la clase I de los SLRP. S: péptido señal; D: repetición de ácido aspártico; C: región de cisteína; Cajas 1-10: repeticiones ricas en leucina repeticiones ricas en leucina; Línea discontinua: sitio de glicosilación (N-glicosilación); Líneas onduladas: sitio de glicosilación (O-glicosilación). Fuente: (Xu *et al.*, 2015).

El papel biológico que desempeña la *ASPN* no está completamente descrito, pero si existen estudios genéticos recientes que demuestran su asociación con diversas patologías óseas y articulares, incluyendo la OA, la artritis reumatoide, la enfermedad del disco lumbar y la DDC. Como proteína extracelular específica de tejido, la *ASPN* representa un objetivo prometedor para obtener enfoques farmacológicos en enfermedades comunes de huesos y articulaciones (Ikegawa, 2008). Nakajima y colaboradores demostraron en el 2007 que existe una asociación genética entre un polimorfismo en la repetición de ácido aspártico (D14) en el gen de la *ASPN* y la OA de rodilla y cadera en una población japonesa. Además, mostraron también la unión directa de la *ASPN* con el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Nakajima *et al.*, 2007). Shi y colaboradores demostraron en 2011, por un lado, la implicación del alelo D14 en la etiología de la DDC, y, por otro, que el gen de la *ASPN* inhibe la condrogénesis por medio de la vía de señalización TGF- β /Smad en líneas celulares de ratón y humanas (Shi *et al.*, 2011).

Se ha comprobado que la unión de la *ASPN* a TGF- β puede alterar su funcionamiento normal llegando incluso a inhibir la formación de colágeno y agregano (**Figura 2**) (Xu *et al.*, 2015). Las alteraciones en las vías de la superfamilia de TGF- β acaban generando, de manera frecuente, enfermedades humanas como trastornos del desarrollo,

enfermedades vasculares o cáncer. La ruta principal de señalización conocida de TGF- β es uniéndose a sus receptores de superficie celular de alta afinidad, receptores de la superfamilia TGF- β tipo I y tipo II (TGF- β RI y RII) y sus efectores intracelulares Smads. TGF- β RI tiene siete subtipos y esto hace que existan dos vías con un impacto opuesto en los condrocitos. La vía Smad 1/5/8 es necesaria para la hipertrofia de los condrocitos, mientras que la vía Smad 2/3 bloquea su diferenciación terminal. Juntas ambas vías actúan como un “interruptor” para controlar la homeostasis de los condrocitos (van der Kraan *et al.*, 2009).

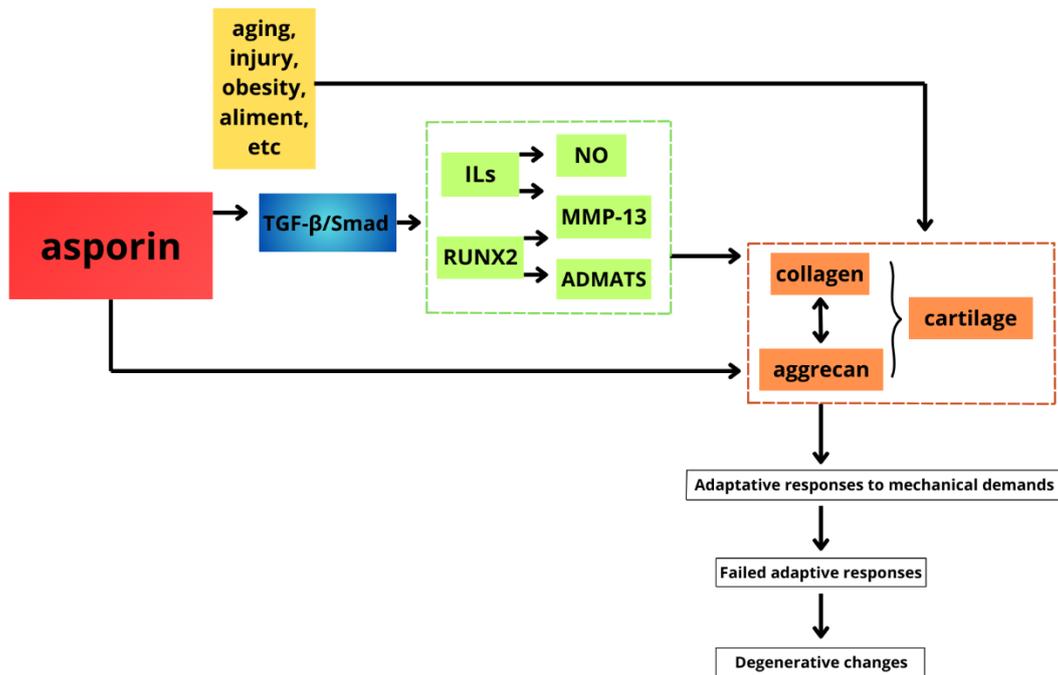


Figura 2. Modelo que muestra como la ASPN junto con otros estímulos (edad, lesiones, obesidad, etc.) puede provocar una degradación del cartilago inhibiendo la formación de colágeno y agregano. Fuente: (Xu *et al.*, 2015).

1.3 El pez cebra como modelo animal.

Dado que el tejido conectivo del ser humano es fisiológicamente comparable al de muchas especies, y que muchas de las enfermedades del sistema musculoesquelético que afectan al hombre también ocurren naturalmente en estos animales, estos últimos se han convertido en modelos ideales para realizar estudios musculoesqueléticos. Los conocidos como “modelos espontáneos” recogen aquellos en los cuales la enfermedad afecta de manera natural al animal de estudio, que posee una fisiopatología y etiología similar en humanos. En el caso de la DDC, el modelo espontáneo más recurrente es el

perro, dado que esta enfermedad afecta normalmente a muchos de estos animales (Rodríguez-Altónaga *et al.*, 1996). El principal inconveniente de estos modelos espontáneos es que el curso de la enfermedad se desarrolla de manera muy lenta y que, al ser mamíferos, su desarrollo requiere de un tiempo elevado.

La idea en este proyecto es utilizar uno de los modelos más comúnmente usado en infinidad de estudios genéticos, sobre cáncer, toxicología o neurología: el pez cebra (*Danio rerio*), un pequeño teleosteo de agua dulce perteneciente a la familia *Cyprinidae* que se distribuye sobre todo por el sur de Asia, Bangladesh e India. Es un organismo modelo ideal para estudios genéticos y sobre el desarrollo, dado su pequeño tamaño, que la embriogénesis ocurre externamente y ,además, el hecho de que los embriones son transparentes. Esto permite realizar un seguimiento de cada uno de los estadios de su desarrollo y, observar con detalle las primeras divisiones celulares, el desarrollo de los órganos o la formación de las capas embrionarias (Maldonado *et al.*, 2003). El conjunto de estas características (**Tabla II**) propician que el pez cebra sea visto como un modelo ideal para el mantenimiento de distintas líneas mutantes, incluyendo mutantes que recapitulan enfermedades humanas.

Hoy en día, al ser un modelo animal tan ampliamente utilizado, se dispone de una base de datos con información sobre líneas transgénicas, mutantes, genoma, etc.: la *Zebrafish Information Network* (ZFIN; <https://zfin.org/>) (Bradford *et al.*, 2022).

Tabla II. Características del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo animal para investigaciones en biología molecular. Fuente: Rocha *et al.*, 2001.

Conceptos	Valores
Mantenimiento	Bajo coste
Espacio	Pequeño (de 30 animales en 20L)
Maduración sexual	A los 4 meses tras la eclosión
Reproducción	Controlable por alimentación y luz
Descendencia	200-400 huevos por hembra cada 2 semanas
Desarrollo embrionario	Documentado a nivel genético
Tiempo de desarrollo del embrión	3-4 días
Características de los embriones	Transparentes
Alimentación	Seco y vivo
Stock de mutantes	Miles

Al tratarse de un animal acuático, existen múltiples diferencias entre su sistema esquelético y el de mamíferos, incluso se pensaba que carecía de articulaciones sinoviales. Sin embargo, en 2016, Askary y colaboradores demostraron que, al contrario de lo que se pensaba hasta el momento, existen este tipo de articulaciones en el pez cebra, concretamente en la mandíbula y las aletas (**Figura 3**). No solo eso, además poseen grandes similitudes histológicas y anatómicas con las articulaciones sinoviales humanas (Askary *et al.*, 2016). Este hallazgo claramente nos conduce a una nueva posibilidad en el estudio de este tipo de enfermedades articulares sinoviales como son la DDC o su posterior degeneración en OA. En el artículo publicado por Waldmann y colaboradores en 2022, se estudió el papel del factor de crecimiento y diferenciación 5 (Gdf5) en el desarrollo del endoesqueleto de la aleta del pez cebra y, comprobaron que el pez cebra es útil en el estudio de estas alteraciones del desarrollo (Waldmann *et al.*, 2022). Por ello en este proyecto se va a utilizar a este organismo para estudiar el papel de la *aspn* en el desarrollo de las articulaciones sinoviales y del esqueleto.

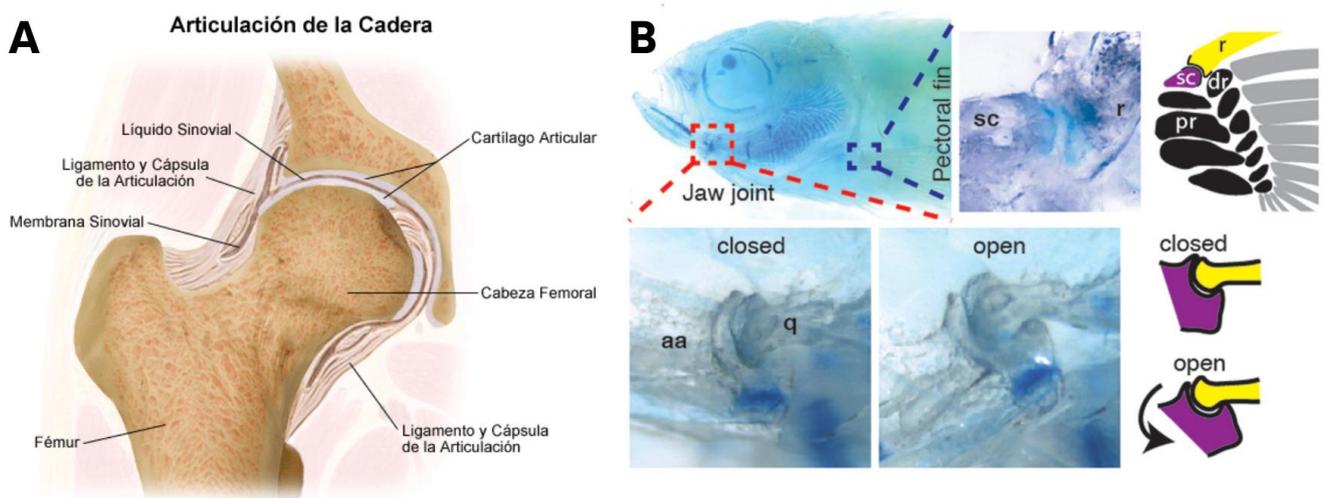


Figura 3. Comparación de la morfología de las articulaciones de la mandíbula y la aleta pectoral del pez cebra con la articulación de la cadera. (A): representación de la articulación sinovial coxofemoral y sus componentes. Fuente: Linaza, 2017; (B): adulto de pez cebra teñido con azul de alcian acompañado de los diagramas correspondientes que muestran las articulaciones de las aletas pectorales y las articulaciones de la mandíbula en posiciones abiertas y cerradas. Fuente: Askary *et al.*, 2016.

2. Contenido del proyecto: Objetivos del proyecto

La ASPN es una proteína de la matriz extracelular que se ha relacionado con la DDC. La DDC es una enfermedad que consiste en malformaciones óseas y articulares en la que resalta la importancia de su tratamiento prematuro, ya que eso puede determinar el

impacto que genera en la persona que la padece. Por esto, es vital conocer totalmente los factores que la ocasionan. La DDC ha sido estudiada en diferentes especies, principalmente mamíferos. El objetivo principal del presente proyecto es analizar la viabilidad del pez cebra como modelo animal para el estudiar el papel de la ASPN en el desarrollo de hueso y cartílago, como primer paso para establecer una relación entre la ASPN y la DDC. Este organismo es considerado como uno de los modelos animales más importantes, pero prácticamente no se ha utilizado en enfermedades articulares. Al poseer tantas características ventajosas como presentar articulaciones sinoviales, gran capacidad reproductora o pequeño tamaño se ha considerado como el organismo más adecuado para este estudio. Con lo cual, este proyecto de investigación presenta los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar el desarrollo esquelético y articular en una línea mutante para el gen de la *aspn* en el pez cebra (**sa37439**) mediante técnicas histológicas y de microtomografía computarizada.
- 2) Analizar el estado de las articulaciones sinoviales mediante tinciones Hematoxilina-Eosina y Safranina-O para determinar si existen diferencias entre los distintos genotipos para gen de la *aspn* en el pez cebra (**sa37439**) .
- 3) Comprobar si el gen de la *aspn* inhibe la osteogénesis en el pez cebra estudiando la expresión de colágeno I, mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas.
- 4) Comparar los resultados obtenidos con los resultados de otros proyectos que estudien la DDC en diferentes organismos modelo para determinar si el pez cebra resulta adecuado como modelo.

3. Contenido del proyecto: Interés para el avance de los conocimientos y de la sociedad.

En la actualidad no se conocen completamente los mecanismos que implican a la ASPN en el desarrollo de la DDC, dado que su descubrimiento es reciente y la información sobre ello es escasa. Conocer más acerca del papel de la ASPN en el desarrollo del sistema esquelético puede abrir muchas posibilidades de tratamiento, tanto para la DDC como para otras patologías como la OA. Además, apenas existen estudios sobre el papel de esta proteína que empleen un modelo tan importante y ventajoso como el pez cebra.

Básicamente, el contenido de este proyecto será sin duda realmente atractivo para distintos grupos de investigación que se dediquen a investigar patologías relacionadas con el desarrollo esquelético y de las articulaciones (como la DDC), que busquen tratamientos y soluciones para dichas enfermedades (reumatólogos, genetistas, etc.), así como para aquellos que estudien el desarrollo del esqueleto en el pez cebra.

4. Contenido del proyecto: Plan de difusión y explotación de los resultados

Una vía importante para la difusión del proyecto surge a partir de la presencia de un estudiante de doctorado, el cual realizará este estudio como parte de su tesis doctoral.

Los resultados obtenidos se publicarán en revistas que serán seleccionadas según su impacto y ranking en el Journal Citation Reports, priorizando aquellas que permitan un acceso gratuito y sin necesidad de suscripción para garantizar un mayor impacto.

Otra vía de difusión será mediante conferencias y congresos como por ejemplo el *European Zebrafish Meeting* o el congreso anual del *American College of Rheumatology*.

Por último, se participará en charlas de divulgación científica en universidades o actividades divulgativas como el Día de la Ciencia en la Calle. Para estas actividades se elaborarán posters o presentaciones que sirvan como apoyo gráfico para poder resumir los resultados de manera sencilla y llamativa.

5. Viabilidad del proyecto: Metodología

La metodología que se va a exponer a continuación tiene como objetivo evaluar el efecto de la *aspn* sobre el desarrollo del esqueleto y las articulaciones sinoviales en el pez cebra.

5.1 Importación cría y mantenimiento

En el presente proyecto de investigación se utilizarán dos líneas de pez cebra: una línea salvaje (wild-type) conocida como AB y la línea mutante *aspn*^{sa37439} que posee una mutación puntual en el gen de la *aspn*. La línea salvaje AB se utilizará para comparar los resultados obtenidos en la línea mutante con los obtenidos en dicha línea AB. Ambas líneas se importarán desde el Centro Europeo de Recursos para el pez cebra (EZRC; <https://www.ezrc.kit.edu/index.php>) situado en Alemania.

Una vez que los embriones lleguen al Centro Interdisciplinar de Química y Biología (CICA), se mantendrán en una placa Petri con agua desclorada y autoclavada en una incubadora a una temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta los 5 días post-fertilización (dpf).

Posteriormente los peces se mantendrán en un sistema de tanques con mecanismos de recirculación del agua, con ciclos diarios de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. La temperatura y pH óptimos para su mantenimiento son $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ y pH entre 6.8-7.4 (Aleström *et al.*, 2020; Zahangir *et al.*, 2015).

La temperatura y pH se medirán diariamente, los valores de nitritos, nitratos y amonio serán revisados semanalmente para asegurar el buen mantenimiento de los peces.

En cuanto a alimentación, se trata de una especie generalista que puede basar su dieta tanto en gusanos y larvas de insectos como en crustáceos (tanto bentónicos como plantónicos). La alimentación de los peces hasta los 12 dpf en el laboratorio será solo por medio de comida seca (MAR- 300 Gemma Micro), ya que la mandíbula todavía es demasiado pequeña para consumir larvas de *Artemia salina*. Después de ese período, la alimentación se realizará 2 veces al día mediante larvas de *Artemia salina* y comida seca (Lawrence, 2007).

5.2 Genotipado

El genotipado de los peces se tendrá que repetir varias veces a lo largo de la realización del proyecto, cuando se obtengan las siguientes generaciones. Los peces que nos enviarán desde el EZRC se considerarán la segunda generación (F2), ya que la primera generación (F1) permanecerá en el EZRC. Por lo tanto, será necesario genotipar la F2 y las generaciones sucesivas que obtengamos, dado que esto nos permitirá distinguir a aquellos individuos que contienen el alelo mutante *sa37439*.

Para obtener el ácido desoxirribonucleico (ADN), necesario para la posterior secuenciación, se utilizarán distintas estrategias. En el caso de las larvas, el genotipado se realizará a partir del tejido fijado y en el caso de los individuos adultos se seguirá el estudio de Breacker y colaboradores, publicado en 2017. En este estudio se propone una alternativa a la técnica convencional dada la presencia de infecciones secundarias potenciales y una respuesta inmune específica elevada. El protocolo propuesto mediante el hisopado no requiere uso de anestesia o de analgésicos y ofrece una alternativa confiable al recorte de aleta. El estudio demostró que el método del hisopo generó

consistentemente suficiente ADN para poder realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de forma exitosa, incluso resaltó la poca diferencia en los productos amplificados finales si se comparan con el ADN obtenido del corte de la atleta. Las muestras se recogerán acariciando suavemente el moco de la piel con un hisopo estéril (Breacker *et al.*, 2017).

La secuenciación del ADN se llevará a cabo por medio de los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) en la Unidad de Biología Molecular (UBM), concretamente haciendo uso de su servicio de secuenciación de ADN (Sanger).

5.3 Obtención de los embriones y posterior cría

Una vez que los peces hayan alcanzado su madurez sexual se realizará el cruce entre individuos heterocigotos para el alelo *aspn*^{sa37439}.

Para dichos cruces se utilizará una pecera concreta, denominada tanque de cría. Es importante que el fondo del tanque posea unas perforaciones que permitan una separación entre los adultos y los huevos, para evitar que los adultos se alimenten de la puesta. Además, se recomienda un mayor número de hembras ya que de lo contrario se podría provocar una agresión entre los machos (por ejemplo: dos hembras/un macho) (Tsang *et al.*, 2020). Las hembras desovan en las primeras horas de luz. Al día siguiente por la mañana se recogerán los huevos y se trasladarán a unas placas Petri con agua desclorada y autoclavada. Se seleccionarán los huevos fecundados bajo un estereomicroscopio y se incubarán en la estufa. Bajo una temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, se producirá la eclosión de las larvas en un intervalo de entre 2,5 y 3 días posteriores a la fertilización (Lawrence, 2007).

Durante el desarrollo del proyecto, se trabajará de acuerdo con la directiva europea (2010/63/UE) y la legislación española (Real Decreto 53/2013) vigentes en referencia a la protección y bienestar animal en investigación.

5.4 Estudio del desarrollo del esqueleto con tinción bicolor

Para la tinción de cartílago y hueso vamos a utilizar el protocolo publicado por Walker & Kimmel que describe como realizar una tinción bicolor libre de ácido en larvas de pez cebra (Walker & Kimmel, 2007). Se utilizarán larvas de 6dpf, 12dpf y 30dpf de cada uno de los genotipos para el gen de la *aspn*, así como de la línea AB.

- *Preparación de la solución de tinción*

- Preparar una solución de tinción a partir de dos soluciones (A y B) que se mezclan justo antes de teñir. La solución A incluye azul alcian 8 GX (C.I. 58005, Sigma, St. Louis, MO) para la tinción del cartílago y la solución B incluye rojo de alizarina S (C.I. 74240, Sigma) para la tinción de hueso.
- Justo antes de la tinción se preparará la solución de tinción doble sin ácido que contiene 10 µL de la solución B y 1 mL de la solución A.

- *Fijación de los tejidos.*

Se realizará la eutanasia mediante sobredosis de anestesia con Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate y se recogerán hasta 100 larvas en un tubo de 1,5 mL. Para fijar los tejidos se añadirá 1 mL de paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Tras agitar durante dos horas a temperatura ambiente se eliminará el fijador y se lavarán las larvas. Por último, se deshidratarán con 1 mL de etanol al 50% agitando a temperatura ambiente durante 10 minutos.

- *Tinción*

Se retirará el etanol 50% y se añadirá a las larvas 1 mL de solución de tinción doble sin ácido y se dejarán agitando a temperatura ambiente durante una noche.

- *Blanqueamiento*

Se preparará una solución de blanqueador mezclando justo antes de su uso volúmenes iguales de H₂O₂ al 3% y KOH al 2% para obtener una concentración final de H₂O₂ al 1,5% y KOH al 1%. Una vez que se ha retirado toda la solución colorante, añadir 1 mL de agua, mezclar por inversión y eliminar. Añadir 1 mL de solución de lejía y dejar los tubos destapados a temperatura ambiente durante 20 minutos.

- *Aclarado*

Una vez retirado el blanqueador, se añadirá 1 mL de una solución de 20% glicerol y 0,25% de KOH. Agitar a temperatura ambiente durante mínimo 30 minutos o toda la noche. Reemplazar la solución con 1 mL de una solución 50% glicerol y 0,25% KOH y agitar a temperatura ambiente mínimo 2 horas o toda la noche.

- *Visualización*

Las larvas se observarán bajo la solución anterior (**Figura 4**) en un microscopio de campo claro (Nikon 90i). Se compararán entre si los resultados entre los distintos genotipos obtenidos en la F3 (*aspn*^{+/+}, *aspn*^{+/sa37439} y *aspn*^{sa37439/sa37439}), así como con los individuos de la línea AB.

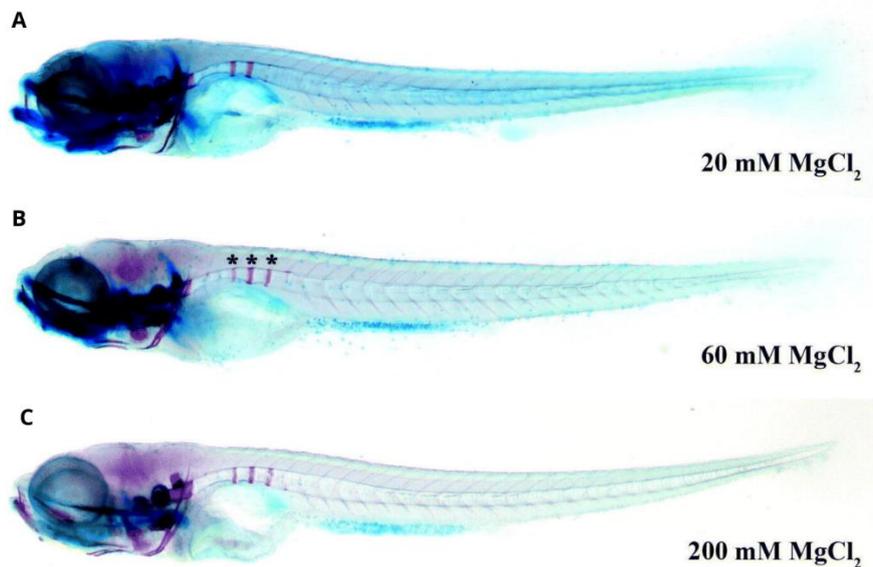


Figura 4. Ejemplo del resultado obtenido con la tinción bicolor doble libre de ácido. El cloruro de magnesio diferencia la tinción con azul alcian en larvas de pez cebra sin impactar negativamente a la tinción de hueso con rojo alizarina. Las concentraciones de MgCl₂ utilizadas comprenden un rango de 20 a 60 mM. Los asteriscos en B marcan vértebras en formación temprana. Fuente: Walker & Kimmel, 2007.

5.5 Análisis histológico de las articulaciones de la mandíbula y la aleta pectoral

El análisis será realizado con individuos mutantes y salvajes adultos en distintos estadios de su desarrollo: 6 meses postfertilización (mpf), 12mpf y 18mpf. Para el análisis de los tejidos se seguirá el procedimiento descrito en el estudio de Askary et al., 2016.

- *Fijación y descalcificación*

La eutanasia se inducirá mediante la sobredosis de anestesia con Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate. Las muestras de pez cebra adulto se fijarán en paraformaldehído al 4% a 4°C durante 7 días. Después de la fijación se cortarán en trozos más pequeños para facilitar la inclusión y la sección de las estructuras deseadas, en nuestro caso se seccionarán la cabeza y la aleta pectoral ya que es donde se sitúan las articulaciones que

pretendemos analizar. Posteriormente se realizará un paso de descalcificación, al tratarse de tejidos mineralizados, para el cual se empleará una solución de EDTA al 20% a temperatura ambiente durante 10 días.

- *Inclusión*

Para la inclusión se deshidratará el tejido mediante una sucesión de baños de etanol (30, 50, 70, 95 y 100%) durante 20 minutos cada uno a temperatura ambiente. A continuación, se remplazará el etanol con Hemo-De (Electron Microscopy Sciences, Hatfield) en una serie de lavados (50, 75 y 100%) de 15 minutos. Tras este procedimiento las muestras se incubarán durante la noche a 65°C utilizando parafina líquida al 100%. A la mañana siguiente se incluirán las muestras en parafina recién fundida y se dejarán reposar a temperatura ambiente hasta su solidificación. El último paso previo necesario a las tinciones será obtener las secciones histológicas realizando secciones (5 µm de grosor) con un microtomo de rotación.

- *Tinciones histológicas.*

Hematoxilina-Eosina (H-E)

La hematoxilina se trata de un compuesto catiónico/básico que presenta afinidad por las estructuras ácidas (basófilas) en el tejido, como los núcleos celulares, produciendo color azul-púrpura. Por otra parte, la eosina es un colorante ácido rosado que presenta afinidad por sustancias básicas (acidófilas), como el citoplasma celular. La combinación de ambos compuestos proporciona un alto contraste entre estructuras celulares y tisulares y permite evaluar la degradación del cartílago en términos de anomalías celulares, además de posibilitar estudiar defectos (Casal Beiroa *et al.*, 2020). El protocolo de tinción es el siguiente (Askary *et al.*, 2016):

- Desparafinar las secciones de parafina de 5 µm con xileno y rehidratarlas con una serie de etanoles de concentraciones decrecientes en agua destilada.
- Teñir las secciones con hematoxilina (VWR) durante dos minutos y enjuagar.
- Depositar las muestras durante dos minutos en una solución de reactivo Blueing Reagent (VWR) y posteriormente realizar dos lavados de 30 segundos en agua seguidos de dos lavados de 30 segundos en etanol al 95%.

- Teñir las secciones con eosina (VWR) durante 30 segundos y, a continuación, realizar tres lavados de un minuto en etanol al 95% y dos lavados de un minuto en etanol al 100%. Finalmente, se realiza un lavado durante dos minutos en Hemo-De.
- Montaje de muestras con Cytoseal (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI) para la obtención de imágenes.

Safranina-O/Verde rápido (SO/VR)

Se utiliza esta tinción dado que la safranina-O se une a los grupos carboxilo y a los grupos sulfato, que poseen carga negativa, de los GAGs, que abundan en la MEC del cartílago articular. Por lo tanto, nos permite identificar procesos degenerativos (Aguirre Sánchez, 2012). El protocolo de tinción es el siguiente (Askary *et al.*, 2016):

- Desparafinar las secciones de parafina de 5 µm con xileno y rehidatarlas con una serie de etanoles de concentraciones decrecientes en agua destilada.
- Teñir las secciones con hematoxilina (VWR) durante cinco minutos y lavar con agua destilada 5 veces. Introducir las secciones en una solución de etanol al 70% durante dos minutos y realizar 3 lavados con agua destilada.
- Teñir durante un minuto con verde rápido (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) al 0,02% y enjuagar unos 30 segundos en ácido acético al 1%. Teñir con Safranina-O al 1% durante 30 minutos y realizar tres lavados con etanol al 95% durante un minuto.
- Realizar 2 lavados de un minuto en etanol al 100% y dos lavados de dos minutos en Hemo-De.
- Montaje de muestras con Cytoseal (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI) para obtener imágenes.

- Procesamiento de las imágenes

En el estudio histológico, las muestras sometidas a las distintas tinciones serán fotografiadas con un microscopio de campo claro (Nikon 90i). Se compararán entre sí los resultados entre los distintos genotipos de la F3 de la línea mutante, así como con los resultados obtenidos en los individuos de la línea AB.

5.6 Visualización de la estructura mandibular mediante Microtomografía Computarizada.

El análisis será realizado en individuos mutantes y salvajes adultos en distintos estadios de su desarrollo: 6mpf, 12mpf y 18mpf. Se prepararán las muestras según el protocolo descrito por Bearce *et al.* (2023), para que de este modo se puedan enviar a la sección de tomografía de la Universidad de Santiago de Compostela donde serán procesadas.

- Fijación del pez cebra

La eutanasia se producirá mediante la sobredosis de anestesia con Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate. En una campana extractora, se transferirá al pez cebra a tubos cónicos de 15 mL Corning™ Falcon™ etiquetados y llenos de fijador (paraformaldehído al 4% en 1 x PBS, pH 7,4).

- Almacenamiento y análisis

Las muestras se almacenarán a 4°C hasta un tiempo máximo de 2 semanas. Una vez preparadas, se enviarán en una nevera de transporte de muestras con refrigeración activa para garantizar que la temperatura de 4°C sea constante.

En la sección de tomografía de la Universidad de Santiago de Compostela se montarán las muestras en agarosa para un análisis con un microtomógrafo de rayos X Bruker Skyscan 1272.

Para la transferencia de archivos se utilizará el software indicado por el fabricante del aparato: Bruker's 3D.SUITE software o, en el caso que se indique, el software recomendado por la sección de tomografía de la Universidad de Santiago de Compostela.

Se compararán entre si los resultados entre los distintos genotipos obtenidos en la F3 y con los individuos de la línea AB.

5.7 Inmunofluorescencia

Se usará la técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar la presencia y cantidad de colágeno tipo I, con la finalidad de comparar su expresión entre los distintos genotipos de la F3 de la línea mutante con los individuos de la línea AB. En concreto se realizará una inmunofluorescencia en los siguientes estadios de desarrollo: 10 dpf, 3

mpf, 6 mpf y 15 mpf. Se utilizará como anticuerpo primario anti-colágeno I generado en conejo (AB_2074625; Rockland) y como anticuerpo secundario anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con Alexa Fluor™ 488 (A-11008; Invitrogen).

- *Fijación del pez cebra*

La eutanasia se producirá mediante sobredosis de anestesia con Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate. Las muestras de pez cebra se fijarán en paraformaldehído al 4%. Únicamente en el caso de los adultos, se cortarán en trozos más pequeños después de la fijación, para facilitar la sección de las estructuras deseadas, en nuestro caso se seccionará la cabeza. Las muestras de larvas se analizarán en bloque debido a su tamaño.

- *Inmunofluorescencia frente a colágeno tipo I*

Se lavarán las secciones con una solución de PBS 0,1 M pH 7,4 durante un tiempo de 10 minutos. Para eliminar posibles restos de autofluorescencia, los tejidos se incubarán durante 45 min los tejidos con borohidruro de sodio al 0,2% en agua destilada. Se lavarán dos veces durante 10 minutos con PBS y, se incubarán con suero normal de cabra disuelto en tampón fosfato con tritón (PBST) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se seguirá con la incubación de las secciones con el anticuerpo primario de conejo. Realizada la incubación se lavarán con PBS y se incubarán con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo unido a la molécula fluorescente Alexa Fluor 488. Se lavarán de nuevo con PBS para preparar el montaje de las muestras con glicerina al 50%.

- *Procesamiento de las imágenes*

Se observarán y fotografiarán las secciones con un microscopio Nikon 90i y con una cámara digital Olympus DP71. Se compararán entre si los resultados entre los distintos genotipos de la F3 y con los individuos de la línea AB.

6. Viabilidad del proyecto: Plan de trabajo

Las distintas tareas que se realizarán a lo largo del desarrollo de este proyecto tendrán lugar en un período de tiempo de 3 años (**Tabla III**) y, se organizarán en parte basándose en los estadios del desarrollo de los animales seleccionados para cada técnica, tal y como se describe en la metodología para cada tarea.

Tabla III. Esquema detallado del plan de trabajo para la realización del proyecto

AÑO	2025				2026				2027			
	MESES	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-24	24-27	27-30	30-33
CRÍA Y MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEA IMPORTADAS DESDE EL EZRC												
CRÍA Y MANTENIMIENTO DE LOS PECES OBTENIDOS DE LOS CRUZAMIENTOS												
TINCIÓN BICOLOR DE CARTÍLAGO Y HUESO												
TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA												
TINCIÓN SAFRANINA-O/VERDE RÁPIDO												
VISUALIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA MANDIBULAR MEDIANTE MICTOCT												
INMUNOFLUORESCENCIA												
PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES DEL MICROCT Y LA INMUNOFLUORESCENCIA												
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS												
DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS												

7. Estimación presupuestaria: destino de la ayuda solicitada

La cuantía total estimada para la realización de este proyecto es de 133.316 €, con la distribución del gasto especificada en la **Tabla IV**.

Tabla IV. Estimación presupuestaria

CONCEPTO	AÑO		
	2025	2026	2027
PERSONAL CONTRATADO Contrato predoctoral	23.800	23.800	23.800
MATERIAL BIBLIOGRÁFICO Acceso a revistas y libros	1.000	1.000	1.000
MATERIAL FUNGIBLE	Dieta de los peces y mantenimiento de los acuarios	1.000	1.000
	Tampones, placas Petri, colorantes...	4.500	5.000
	Anticuerpos	900	-
IMPORTACIÓN DE LOS PECES	1.500	-	-

SECUENCIACIÓN DE ADN Y GENOTIPADO EN LOS SERVICIOS DEL SAI	1.000	1.000	-
MICROCT	-	1.344	672
AYUDAS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTADÍAS DE INVESTIGACIÓN (MÁXIMO 10% DE LA CANTIDAD SOLICITADA)	2.000	2.000	3.000
AYUDAS DE COSTE POR ASISTENCIA A CONGRESOS Viajes nacionales, congresos, conferencias...	-	2.000	2.000
OTROS GASTOS Divulgación científica y pago por publicación en revistas JCR en abierto	-	-	5.500
COSTES INDIRECTOS O GASTOS GENERALES QUE REGLAMENTARIAMENTE EXIGE LA UNIVERSIDAD AL GRUPO SOLICITANTE (MÁXIMO 20%)	6.000	6.000	7.500
TOTAL	41.700	43.144	48.472

8. Implicaciones éticas y/o de bioseguridad

En el transcurso de la realización de este proyecto se seguirán las leyes españolas que hacen referencia a el uso de animales de experimentación (Real Decreto 53/2013) y a la Directiva Europea 2010/63 vigente en referencia a la protección de animales usados con fines científicos.

Siguiendo el artículo 4 del Real Decreto 53/2013 se cumplirá el principio de las 3R: reemplazo, reducción y refinamiento, por el cual se establece que se deberán reducir el número de animales utilizados, se les asegurarán todos los cuidados necesarios, así como que se reducirá al mínimo cualquier posible dolor, sufrimiento, angustia o daño a los animales.

Por último, se asegurará que todos los investigadores y personal científico que estén implicados en el desarrollo de este proyecto tengan todos los permisos requeridos para el trabajo con los animales. En el caso de que algún individuo no posea dichos títulos deberá trabajar siempre supervisado por alguien que sí los posea.

9. Conclusiones o hitos que se pretende alcanzar

La identificación de marcadores genéticos específicos asociados a enfermedades articulares puede ayudar a alcanzar diagnósticos más tempranos y precisos. En una patología como la DDC sería realmente útil para evitar que dicha enfermedad progrese. Lo más común para su estudio es la utilización de mamíferos, pero, con la reciente información acerca de la presencia de articulaciones sinoviales en un modelo tan ventajoso como el pez cebra, este proyecto pretende alcanzar los siguientes hitos:

- 1) Determinar si el pez cebra es un buen modelo para estudiar el papel que tiene la *ASPN* en la etiología de la DDC y otras enfermedades óseas y articulares
- 2) Determinar malformaciones en el desarrollo esquelético y articular producidas por la mutación en el gen de la *aspn* en el pez cebra.
- 3) Determinar si la mutación en el gen de la *aspn* inhibe la osteogénesis en el pez cebra.
- 4) Impulsar el uso del pez cebra como modelo animal en el estudio de enfermedades articulares y del desarrollo del esqueleto.
- 5) En el caso de que el pez cebra resulte un buen modelo se impulsaría su uso para testar fármacos como posible tratamiento para este tipo de patologías.

10. Conclusions or milestones to be achieved.

The identification of specific genetic markers associated with joint diseases can help to achieve an earlier and more accurate diagnoses. In a pathology such as DDH, this would be truly useful to prevent the progression of the disease. The most common approach for studying this is the use of mammals, but with the recent information about the presence of synovial joints in a model as advantageous as the zebrafish, this project aims to achieve the following milestones:

- 1) Identify if the zebrafish is a good model to study the role of *ASPN* in the etiology of DDH and other bone and joint diseases.
- 2) Determine malformations in skeletal and joint development caused by the mutation in the *aspn* gene in zebrafish.
- 3) Determine if the mutation in the *aspn* gene inhibits osteogenesis in zebrafish.
- 4) Promote the use of zebrafish as an animal model in the study of joint diseases and skeletal development.

- 5) If the zebrafish proves to be a good model, it will be promoted for testing drugs with the aim of combating these types of pathologies.

Bibliografía

- Agarwal, A., & Gupta, N. (2012). Risk factors and diagnosis of developmental dysplasia of hip in children. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 3(1), 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2011.11.001>
- Aguirre Sánchez, H. I. (2012). Colorante safranina O. *Investigación en Discapacidad*, 1(2), 83-85.
- Aleström, P., D'Angelo, L., Midtlyng, P. J., Schorderet, D. F., Schulte-Merker, S., Sohm, F., & Warner, S. (2020). Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Laboratory Animals*, 54(3), 213-224. <https://doi.org/10.1177/0023677219869037>
- Askary, A., Smeeton, J., Paul, S., Schindler, S., Braasch, I., Ellis, N. A., Postlethwait, J., Miller, C. T., & Gage Crump, J. (2016). Ancient origin of lubricated joints in bony vertebrates. <https://doi.org/10.7554/eLife.16415.001>
- Baghdadi, T., Nejadhosseinian, M., Shirkoohi, R., Mostafavi Tabatabaee, R., Tamehri, S. S., Saffari, M., & Mortazavi, S. M. J. (2019). DNA hypermethylation of GDF5 in developmental dysplasia of the hip (DDH). *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 7(9). <https://doi.org/10.1002/mgg3.887>
- Bearce, E. A., Ricamona, B. T. B., Fisher, K. H., O'Hara-Smith, J. R., & Grimes, D. T. (2023). Visualization and quantitation of spine deformity in zebrafish models of scoliosis by micro-computed tomography. *STAR Protocols*, 4(4). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102739>
- Bradford, Y. M., Van Slyke, C. E., Ruzicka, L., Singer, A., Eagle, A., Fashena, D., Howe, D. G., Frazer, K., Martin, R., Paddock, H., Pich, C., Ramachandran, S., & Westerfield, M. (2022). Zebrafish information network, the knowledgebase for Danio rerio research. *Genetics*, 220(4). <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac016>
- Breacker, C., Barber, I., Norton, W. H. J., McDearmid, J. R., & Tilley, C. A. (2017). A Low-Cost Method of Skin Swabbing for the Collection of DNA Samples from Small Laboratory Fish. *Zebrafish*, 14(1), 35-41. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1348>
- Casal, P. (2020). Biomarcadores ópticos para el diagnóstico de la osteoartritis utilizando la espectroscopía Raman [Tesis de Doctorado, Universidad de la Coruña]. Repositorio de la Universidad de la Coruña.

- Feldman, G., Dalsey, C., Fertala, K., Azimi, D., Fortina, P., Devoto, M., Pacifici, M., & Parvizi, J. (2010). The otto aufranc award: Identification of a 4 Mb region on chromosome 17q21 linked to developmental dysplasia of the hip in one 18-member, multigeneration family. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 468(2), 337-344. <https://doi.org/10.1007/s11999-009-1073-6>
- Harsanyi, S., Zamborsky, R., Krajciova, L., Kokavec, M., & Danisovic, L. (2020). Developmental dysplasia of the hip: A review of etiopathogenesis, risk factors, and genetic aspects. *Medicina* 56(4), 153. <https://doi.org/10.3390/medicina56040153>
- Henry, S. P., Takanosu, M., Boyd, T. C., Mayne, P. M., Eberspaecher, H., Zhou, W., De Crombrughe, B., Höök, M., & Mayne, R. (2001). Expression pattern and gene characterization of asporin. A newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 12212-12221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011290200>
- Ikegawa, S. (2008). Expression, Regulation and Function of Asporin, A Susceptibility Gene in Common Bone and Joint Diseases. En *Current Medicinal Chemistry*, 15(7), 724-728. <https://doi.org/10.2174/092986708783885237>
- Kenanidis, E., Gkekas, N. K., Karasmani, A., Anagnostis, P., Christofilopoulos, P., & Tsiridis, E. (2020). Genetic Predisposition to Developmental Dysplasia of the Hip. *Journal of Arthroplasty*, 35(1), 291-300. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2019.08.031>
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1-4), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>
- Linaza, V. (2017). Tratamiento fisioterapéutico en lesiones del cartílago articular en la articulación de la cadera y rodilla [Trabajo de investigación, Universidad Inca Garcilaso de la Vega] Repositorio de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.
- Lorenzo, P., Aspberg, A., Önnérjörd, P., Bayliss, M. T., Neame, P. J., & Heinegård, D. (2001). Identification and characterization of asporin. A novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 12201-12211. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010932200>
- Maldonado, E. (2003). Experimentación en el pez-cebra, un modelo de biología del desarrollo. *Mensaje Bioquímico*, 27, 147-156.
- Martínez-Gil, N., Patiño-Salazar, J. D., Rabionet, R., Grinberg, D., & Balcells, S. (2023). Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) versus validación funcional: reto de la era post-GWAS. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 15(1), 29-39. <https://dx.doi.org/10.20960/revosteoporosmetabminer.000008>

- Moraleda, L., Albiñana, J., Salcedo, M., González-Morán, G. (2013). Displasia del desarrollo de la cadera. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 57(1), 67-77.
- Nakajima, M., Kizawa, H., Saitoh, M., Kou, I., Miyazono, K., & Ikegawa, S. (2007). Mechanisms for asporin function and regulation in articular cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 32185-32192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700522200>
- Noordin S, Umer M, Hafeez K, & Nawaz H. (2010). Developmental dysplasia of the hip. *Orthopedic Review*, 2(2). <https://doi.org/10.4081/or.2010.e19>
- Raimann, R., & Aguirre, D. (2021). developmental dysplasia of the hip: screening and management in the infant. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(3), 263-270. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2021.04.003>
- Rocha, A., Ruiz, S., Estepa, A., & Coll, J. M. (2001). Biología molecular de los peces: Interés y aplicaciones. *Revista AquaTIC*.
- Rodríguez-Altónaga, J. A., & Gonzalo-Orden, J. Manuel. (1996). Manual de exploración artroscópica en la rodilla canina. ISBN/ISSN: 847719582X
- Shi, D., Dai, J., Zhu, P., Qin, J., Zhu, L., Zhu, H., Zhao, B., Qiu, X., Xu, Z., Chen, D., Yi, L., Ikegawa, S., & Jiang, Q. (2011). Association of the D repeat polymorphism in the ASPN gene with developmental dysplasia of the hip: A case-control study in Han Chinese. *Arthritis Research and Therapy*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/ar3252>
- Storer, S. K., & Skaggs, D. L. (2006). Developmental Dysplasia of the Hip. *American family physician*, 74(8), 1310-1316.
- Tsang, B., Gerlai, R. T., & Ansari, R. (2020). Maintenance and breeding of zebrafish, with some ethological and ecological considerations in mind. En *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish*, 17-32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817528-6.00002-4>
- van der Kraan, P. M., Blaney Davidson, E. N., Blom, A., & van den Berg, W. B. (2009). TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis. Modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(12), 1539-1545. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.06.008>
- Waldmann, L., Leyhr, J., Zhang, H., Allalou, A., Öhman-Mägi, C., & Haitina, T. (2022). The role of Gdf5 in the development of the zebrafish fin endoskeleton. *Developmental Dynamics*, 251(9), 1535-1549. <https://doi.org/10.1002/dvdy.399>
- Walker, M. B., & Kimmel, C. B. (2007). A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotechnic and Histochemistry*, 82(1), 23-28. <https://doi.org/10.1080/10520290701333558>

- Wilkinson, J. A. (1992). Etiologic Factors in Congenital Displacement of the Hip and Myelodysplasia. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 281, 75-83.
- Wynne-Davies R. (1970). Acetabular dysplasia and familial joint laxity: two etiological factors in congenital dislocation of the hip. A review of 589 patients and their families. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 52(4), 704–716.
- Xu, L., Li, Z., Liu, S. Y., Xu, S. Y., & Ni, G. X. (2015). Asporin and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(6), 933-939. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.02.011>
- Zahangir, M., Haque, F., Mustakim, G., Khatun, H., & Islam, M. (2015). Effect of water pH on the early developmental responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Progressive Agriculture*, 26(1), 85-89. <https://doi.org/10.3329/pa.v26i1.24521>
- Zamborsky, R., Kokavec, M., Harsanyi, S., Attia, D., & Danisovic, L. (2019). Developmental Dysplasia of Hip: Perspectives in Genetic Screening. *Medical sciences*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/medsci7040059>