

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Facultad de Biología

Desarrollo de la técnica de electroporación de embriones para la generación de ratones modificados genéticamente mediante CRISPR/Cas9

*Development of an electroporation procedure for the
generation of genetically modified mice using CRISPR/Cas9*



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Roberto García Vicente

Salamanca, Junio 2019

ABSTRACT

The house mouse (*Mus musculus*) has become the main animal model used in biomedical research, because of its physiological and genetical similarity with the human being. Over the last years, the development of the genomic editing tools has led to the generation of genetically modified (GM) mice, entailing great progress in research work.

Within these tools, the discovery and improvement of the CRISPR/Cas9 system has been particularly revolutionary due to its design's simplicity, efficiency and versatility. Originally described as an adaptive immunity mechanism in bacteria and archaea, it is composed of two elements: the single-read ribonucleic acid (sgRNA) or RNA guide and the endonuclease Cas9. The first one is made up of a 20 nucleotides sequence called CRISPR ribonucleic acid (crRNA), which defines the system's specificity and is linked to a structural sequence named trans-activating crRNA (tracrRNA). When this hybridizes with the target sequences, the nuclease produces a double-strand break (DSB), activating endogenous mechanisms of DNA repair. This involves the gene disruption, leading to knock-out models; or the insertion of homologous molecules, producing knock-in models.

The current strategy to produce GM mice is based on the microinjection of the CRISPR/Cas9 system components into one of the zygote's pronuclei and its subsequent transfer to a female's oviduct. The pronuclear microinjection is a quite slow process that requires expensive and sophisticated equipment and experienced personnel. As an alternative, we propose the use of electroporation to introduce the CRISPR/Cas9 system reagents in embryos and overcome the raised limitations.

Thus, we have checked that the application of high voltage short electrical pulses allows the preservation of zygote's viability. In addition, these create transient cell membrane pores which sgRNA and Cas9 protein access across. Through the *in vitro* genotyping process it has been confirmed that these are capable of performing genomic editing on specific locus.

Finally, a specific sgRNA against tyrosinase gene (*Tyr*), involved in the mouse's coat color, was designed. Therefore, the generation of albino and/or mosaic mice has allowed us to easily determine the editing and knock-out alleles' generation efficiency with both techniques. It has been concluded that electroporation is a method as effective as pronuclear microinjection, so it could become its real substitute.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El ratón como modelo animal en investigación	1
1.2. Herramientas de edición genómica	2
1.3. Generación de ratones modificados genéticamente mediante CRISPR/Cas9	5
1.4. Electroporación.....	6
1.5. El locus <i>Tyr</i>	7
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Diseño experimental.....	10
3.2. Diseño y obtención del sistema CRISPR/Cas9	11
3.3. Obtención de embriones de ratón	12
3.4. Electroporación de embriones	14
3.5. Microinyección pronuclear de embriones	15
3.6. Transferencia embrionaria.....	15
3.7. Genotipado	16
4. RESULTADOS	20
4.1. Determinación de las condiciones de electroporación compatibles con la viabilidad del embrión.....	20
4.2. Los componentes del sistema CRISPR/Cas9 son capaces de introducirse en cigotos por electroporación y realizar edición genómica.....	21
4.3. La electroporación del complejo RNP constituye un método de generación de modelos <i>knock-out</i> , al menos, tan eficaz como la microinyección pronuclear.....	22
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	25
5.1. Determinación de las condiciones de electroporación compatibles con la viabilidad del embrión.....	26
5.2. Los componentes del sistema CRISPR/Cas9 son capaces de introducirse en cigotos por electroporación y realizar edición genómica.....	26
5.3. La electroporación del complejo RNP constituye un método de generación de modelos <i>knock-out</i> , al menos, tan eficaz como la microinyección pronuclear.....	27
6. CONCLUSIÓN	29
7. BIBLIOGRAFÍA	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL RATÓN COMO MODELO ANIMAL EN INVESTIGACIÓN

En el ámbito de la investigación biomédica es habitual recurrir a organismos modelos para comprender *in vivo* diferentes procesos biológicos, y así poder extrapolar este conocimiento a humanos. Estos modelos son usados para dilucidar mecanismos implicados en el desarrollo de enfermedades, así como para desarrollar y mejorar métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento de dichas patologías. El 95 % de los estudios actuales se llevan a cabo en el ratón doméstico (*Mus musculus*)¹ debido a la proximidad filogenética y a la similitud fisiológica con el humano, convirtiéndose en el principal modelo animal usado².

Pese a las claras diferencias morfológicas entre ambas especies, la semejanza a nivel fisiológico ya fue apreciada en 1937³. Hoy en día, tras disponer de la secuencia completa del genoma humano y murino, es posible confirmar que comparten el 99 % de los genes. Por lo tanto, se deduce que también comparten las bases moleculares de enfermedades genéticas, tanto mendelianas como poligenéticas; siendo el caso de diabetes, enfermedades cardíacas, cáncer, anemia, alteraciones neurológicas, etc⁴.

La elección del ratón frente a otras especies más próximas al humano, como perros o primates, radica en cuestiones de tipo económico. Así, se trata de un animal cuyo tamaño es 2.500 veces menor al del humano, lo cual reduce el espacio necesario para su alojamiento, así como la cantidad de recursos necesarios para su mantenimiento. Además, esto facilita el trabajo de los investigadores. Otra de las ventajas que presenta es su rápido ciclo de vida. Las hembras alcanzan la madurez sexual entre 6 u 8 semanas después de su nacimiento, y tras un periodo de gestación de 21 días producen camadas cuyo tamaño varía entre 5 y 8 crías, pudiéndose incrementar mediante diversas técnicas como la inducción de la ovulación. La vida media de los ratones de laboratorio varía entre 2 y 3 años, gestando varias camadas cada año².

Por último, su amplio uso durante las últimas décadas, junto al avance en las técnicas de biología molecular, ha permitido la generación de ratones modificados genéticamente, suponiendo una revolución en la investigación traslacional. El primer ratón transgénico fue desarrollado en 1974 por R. Jaenish y B. Mintz, cuando inyectaron el retrovirus SV40 en el blastocite de embriones de ratón, detectando posteriormente el ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*, DNA) vírico integrado en su genoma⁵. Desde entonces, se han generado numerosos ratones mutantes, entre los que se incluyen los modelos *knock-out* y *knock-in*. En los primeros se ha anulado la funcionalidad

de una proteína mediante la disrupción del gen que la codifica. Estos son útiles, entre otros aspectos, para discernir la función de genes desconocidos. Por su parte, los ratones *knock-in* son aquellos en los que se ha reemplazado una determinada secuencia de nucleótidos por otra distinta, como por ejemplo sustituir un gen murino por un gen humano, o bien por un gen reportero que permita el seguimiento de su expresión^{6,7}.

1.2. HERRAMIENTAS DE EDICIÓN GENÓMICA

La metodología tradicional para la obtención de ratones transgénicos fue descrita hace más de 30 años⁸, cuando se demostró la capacidad de las células de mamíferos de incorporar en su genoma fragmentos de DNA exógeno que contienen secuencias homólogas al sitio donde se desea que se integre. Este proceso es conocido como recombinación homóloga, y supuso la primera aproximación para realizar modificaciones genéticas dirigidas⁹. Para ello, células madre embrionarias (*embryonic stem cells*, *ES cells*) son transfectadas con el DNA donador. Aquellas en las que se haya producido recombinación son microinyectadas en blastocitos de ratón, para ser posteriormente implantadas en hembras pseudogestantes, generando organismos quimera¹⁰. Pese al gran avance que supuso, el proceso de recombinación es muy poco frecuente (en 1 de cada 10^6 - 10^9 células), existe elevada probabilidad de integración aleatoria en otros puntos del genoma y requiere grandes periodos de tiempo: entre 1 y 2 años^{10,11}.

Para superar estas limitaciones, en los últimos años se han desarrollado las nucleasas de edición genómica permitiendo modificaciones genómicas dirigidas y eficaces, las cuales han sido rápidamente aceptadas por la comunidad científica. Entre estas se encuentran las nucleasas de dedos de zinc (*zinc finger nucleases*, *ZFNs*), nucleasas efectoras tipo activador de la transcripción (*transcription activator-like effectors nucleasases*, *TALENs*) y más recientemente el sistema CRISPR/Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein*)⁹.

Estos sistemas se fundamentan en la existencia de dos dominios funcionales: un dominio de unión específico a DNA y una enzima con actividad endonucleasa (FokI en el caso de *ZFNs* y *TALENs* y Cas en los sistemas CRISPR/Cas). Estas generan una rotura de doble cadena (*double-strand break*, *DSB*) en el DNA, ante la cual la célula activa alguno de los mecanismos de reparación endógenos que posee⁹. En una gran parte de las ocasiones la vía activada es la de unión de extremos no homólogos (*non-homologues end joining*, *NHEJ*), un proceso altamente mutagénico (*error-prone*) que provoca pequeñas inserciones y deleciones, denominadas *indels*, para eliminar la rotura creada. Como consecuencia de estas se generan mutaciones de cambio de fase o codones de parada

prematuras, que se traducen en proteínas truncadas o no funcionales. En reducidas ocasiones, la vía activada es la de reparación dirigida por homología (*homology-directed repair*, HDR), la cual tiene lugar en presencia de otra molécula de DNA con homología a la región con el DSB y que actúa como DNA donador o molde en el proceso de HDR. De este modo, se permite la inserción y modificación de genes^{12,13} (Figura 1). Por lo tanto, la vía NHEJ es la usada en la obtención de modelos *knock-out*, mientras que se recurre a HDR en modelos *knock-in*.

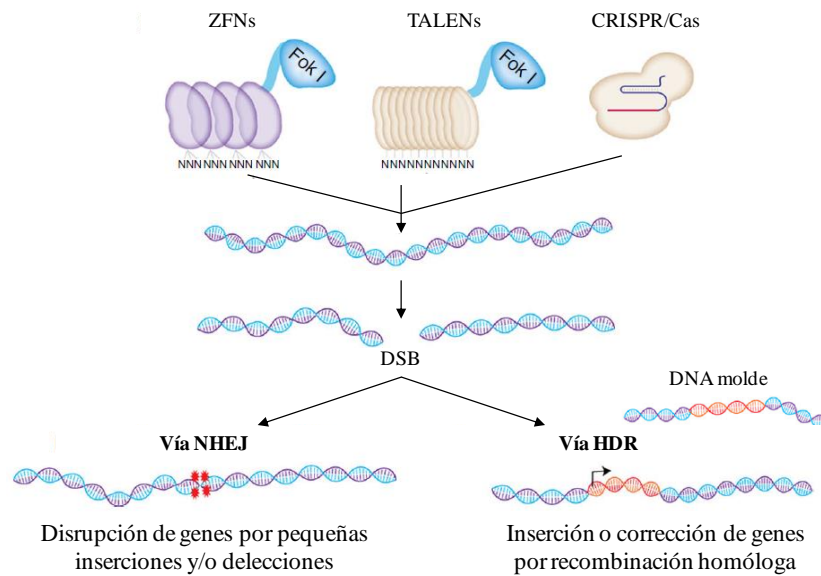


Figura 1. Mecanismo de acción de las nucleasas de edición genómica. Adaptado de Adli, 2018¹¹.

Pese a ser los primeros métodos descritos, la dificultad en el diseño y síntesis de las nucleasas ZFNs y TALENs ha provocado que estas hayan sido desplazadas por los sistemas CRISPR/Cas¹⁴.

1.2.1. EL SISTEMA CRISPR/Cas9

En el año 1987 el grupo de A. Nakata describió la existencia de secuencias de DNA repetidas en tándem y separadas por otras no repetitivas (denominados espaciadores) en el genoma de *Escherichia coli*, recibiendo posteriormente el nombre de “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas” (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, CRISPR). Por ello, esta estructura en su conjunto es llamada *CRISPR array*, el cual fue posteriormente encontrado en el genoma del 50 % de bacterias y 90 % de arqueas. En el año 2005 F. Mójica observó que estos espaciadores correspondían con fragmentos de DNA de virus y plásmidos, sugiriendo que CRISPR constituía un sistema inmune adaptativo en estos organismos; lo cual fue confirmado en 2007 por R. Barrangou en *Streptococcus thermophilus*¹⁵. Próximo al *CRISPR array*, se encuentran múltiples genes altamente conservados, denominados *CRISPR-associated* (Cas), que codifican proteínas con dominios nucleasas y helicasas para llevar a cabo las

distintas fases de la inmunidad. En función de las proteínas Cas implicadas, existen diversos tipos de sistemas CRISPR/Cas. De ellos, el más sencillo es el tipo II, por lo que fue el elegido para las futuras aplicaciones en edición genómica⁹.

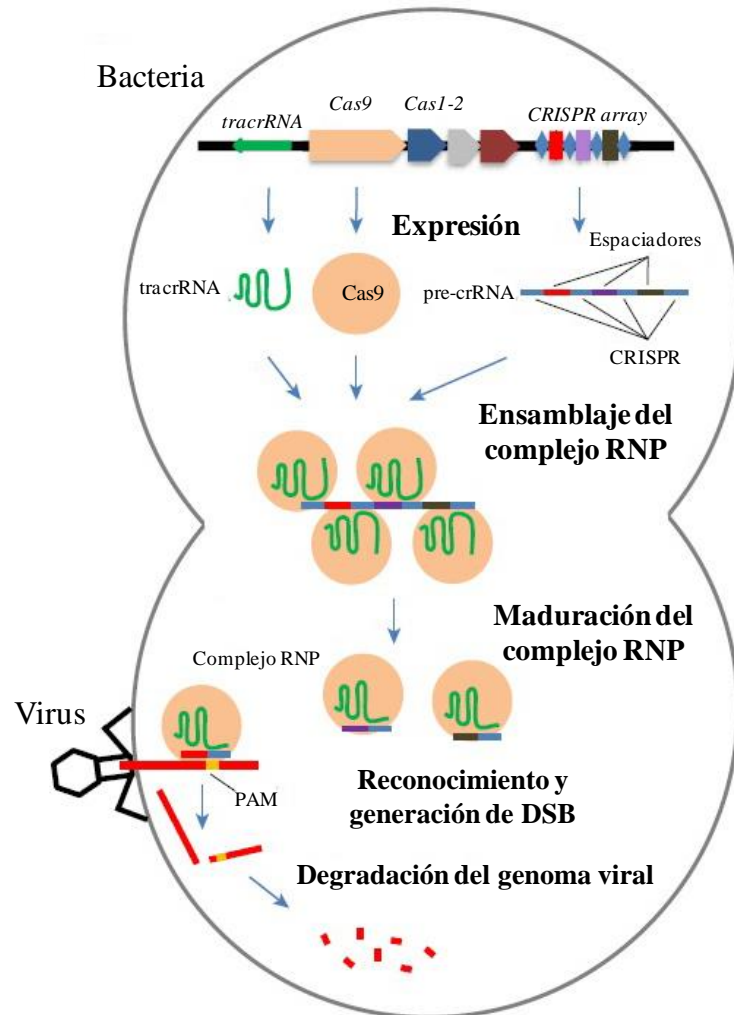


Figura 2. CRISPR tipo II como sistema immune adaptativo bacteriana. Adaptado de Mojica & Montoliu, 2016⁹.

Mediante este sistema, durante una fase previa de adaptación, el complejo Cas1-Cas2 integra fragmentos de patógenos en el *CRISPR array*. En la fase de maduración este es transcrito y unido a la proteína Cas9, para posteriormente ser procesado por la RNAsa III; la cual separa las distintas repeticiones generando el *CRISPR ribonucleic acid* (crRNA) que contiene la secuencia complementaria a la de los ácidos nucleicos exógenos. Este complejo requiere de un tercer elemento para su correcta maduración: el *trans-activating crRNA* (tracrRNA), una pequeña molécula de RNA codificada corriente arriba al locus CRISPR/Cas, es decir, hacia su extremo 5'. Finalmente, durante la tercera fase o de interferencia, el complejo ribonucleoproteico (RNP) formado por estos tres elementos reconoce y se une al motivo adyacente del protoespaciador (*protospacer-adjacency motif*, PAM), una secuencia conservada de 2 a 5 nucleótidos presente en

el genoma del virus. Esta se localiza en el extremo 3' de la secuencia diana, en la cual hibrida el crRNA por complementariedad de bases. Finalmente y gracias a la actividad endonucleasa de la proteína Cas9 se generan DSBs deteniendo la infección^{9,11} (Figura 2).

El uso del sistema CRISPR/Cas9 como nuevo método de edición genómica se trazó en el año 2012 cuando E. Charpentier y J. Doudna reconstituyeron *in vitro* el sistema CRISPR tipo II de *Streptococcus pyogenes*¹⁶. Para ello se fusionó el crRNA y el tracrRNA en una única molécula o RNA guía (*single-read* RNA, sgRNA) (Figura 3). Esta contiene en su extremo 5' la secuencia de 20 nucleótidos complementaria a la región diana del crRNA, y en su extremo 3' la secuencia de unión a Cas9 del tracrRNA. Este complejo puede ser usado para editar cualquier secuencia genómica adyacente a una secuencia PAM, en la cual se genera un DSB reparado por la vía NHEJ o HDR.

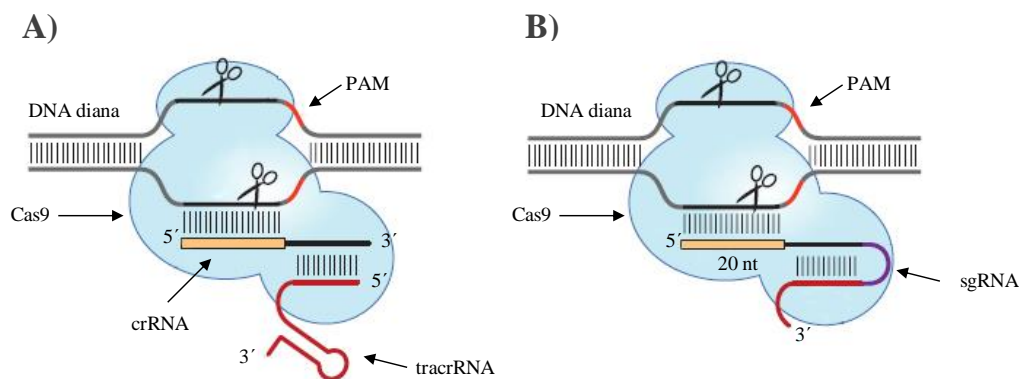


Figura 3. Adaptación del sistema CRISPR/Cas9 para su aplicación en edición genómica. A) CRISPR/Cas tipo II en bacterias. B) CRISPR/Cas9 en células de mamíferos. Adaptado de Jinek *et al.*, 2012¹⁶.

1.3. GENERACIÓN DE RATONES MODIFICADOS GENETICAMENTE MEDIANTE CRISPR/Cas9

La aplicación del sistema CRISPR/Cas9 sobre el ratón ha supuesto una revolución en este ámbito, debido a su simplicidad, versatilidad y eficacia. Esto ha permitido la generación de un gran número de nuevos modelos murinos modificados genéticamente¹⁰. Para obtenerlos es necesario recurrir a alguna técnica de transfección, es decir, procedimientos que permitan la introducción de material genético exógeno en una célula¹⁷.

La metodología usada hasta ahora para ello se ha basado en inyección de los componentes del sistema CRISPR/Cas9 (Cas9 en forma de RNA mensajero (mRNA) o de proteína, sgRNA y, opcionalmente, DNA molde) en uno de los pronúcleos de un cigoto (embrión en estado de una célula) de ratón; lo que es conocido como microinyección pronuclear¹⁸. La técnica requiere de la utilización de una estación de microinyección, constituida por un microscopio de fase invertida, el

cual se ha combinado con un par de micromanipuladores. En el primero se acopla una aguja de sujeción, la cual ejerce vacío e inmoviliza el embrión. El segundo micromanipulador controla una aguja de microinyección, cuyo tamaño es suficientemente pequeño para atravesar la membrana plasmática sin provocar la lisis celular. Esta aguja se introduce en uno de los dos pronúcleos, generalmente en el masculino por ser de mayor tamaño, donde se liberan los componentes del sistema CRISPR/Cas9 (Figura 4). Posteriormente estos embriones son cultivados *in vitro* hasta alcanzar el estado de dos células, momento en el que son transferido a los oviductos de una hembra pseudogestante¹⁹.

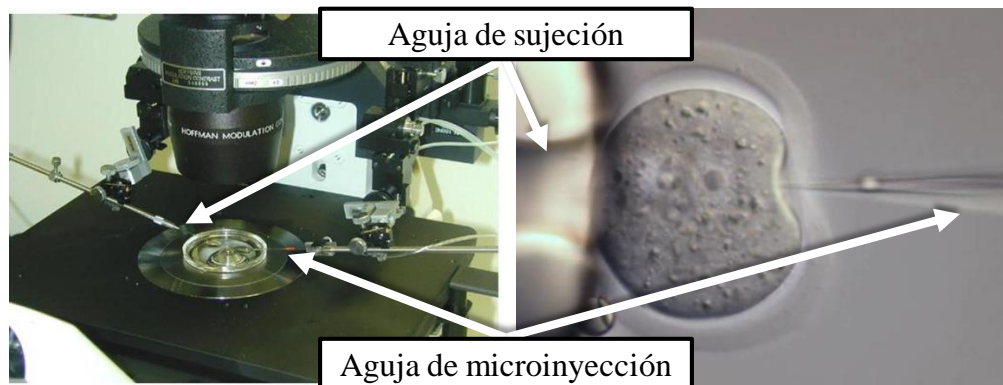


Figura 4. Izda) Equipamiento de una estación de microinyección, dónde se observan los dos brazos unidos a las agujas de sujeción y microinyección. Dcha) Microinyección pronuclear en zigoto. Adaptado de DeMayo *et al.*, 2016²⁰.

Por lo tanto, se trata de una técnica lenta y tediosa, ya que cada embrión debe ser manipulado individualmente; costosa, debido al complejo equipamiento necesario; y además requiere personal altamente especializado²¹. Es por ello que la generación de ratones modificados genéticamente no es, comúnmente, realizada por grupos de investigación, si no que suele ser llevado a cabo en los denominados servicios de transgénesis. Además de estas limitaciones, la microinyección provoca daños físicos en la célula, lo que produce una reducción significativa de la viabilidad del embrión, lo que se traduce en una menor eficiencia de la técnica²². El proceso de microinyección altera la integridad de la membrana plasmática, así como cambios en la organización de estructuras celulares internas como el citoesqueleto, proteínas motoras e interacciones entre proteínas²³. También se ha relacionado con la producción de diversos daños o roturas cromosómicas²⁴.

1.4. ELECTROPORACIÓN

La electroporación es un método físico de transfección puesto a punto en 1982 por Wong y Neumann¹⁸. Consiste en la aplicación externa de un campo eléctrico, mediante cortos pulsos de alto voltaje, generando una serie de poros transitorios de tamaño nanométrico en la membrana plasmática de la célula.



Figura 5. Electroporador GenePulser XCell, BioRad®.

Pese a tratarse de un proceso aún no perfectamente conocido, la hipótesis más aceptada indica que la aplicación de estos pulsos durante un periodo de tiempo comprendido entre microsegundos y milisegundos es capaz de inducir la generación de un potencial transmembrana entre 0,2 y 1 voltio (V). Este aporta la energía libre suficiente para provocar un rápido y localizado reordenamiento de los fosfolípidos que constituyen la membrana plasmática.

El movimiento de los componentes de la membrana conduce a la formación de poros hidrofílicos, los cuales son ocupados por moléculas de agua^{25,26}. Estos aumentan la permeabilidad de la célula en varios órdenes de magnitud, permitiendo la entrada por difusión de diferentes tipos de moléculas presentes en el medio como ácidos nucleicos, proteínas, iones, etc.^{18,27}.

Recientemente, y con el objetivo de solventar las limitaciones que presenta la microinyección pronuclear, varios grupos han planteado el uso de la electroporación para introducir los componentes del sistema CRISPR/Cas9 en embriones de ratón. Sin embargo, la eficacia de edición alcanzada fue menor que la obtenida mediante microinyección pronuclear²⁸⁻³⁰.

1.5. EL LOCUS *Tyr*

El color del pelaje de los mamíferos está determinado por un complejo, y aún no totalmente caracterizado, proceso de interacción entre numerosos genes. En la actualidad se han descrito más de 150 locis relacionados con la síntesis y distribución de la melanina, la cual se acumula en los melanosomas producidos por melanocitos. Este pigmento puede producirse en dos formas: feomelanina (pigmento rojo-amarillo) y eumelanina (pigmento marrón-negro), cuya proporción determinará este rasgo^{31,32}.

En el caso del ratón, este carácter está controlado principalmente por cinco locis: *A*, *B*, *C*, *D* y *S*. El locus *A* o *agouti* (cromosoma 2) determina la alternancia de cúmulos de feomelanina y eumelanina en los folículos pilosos, generando un pelaje marrón/grisáceo. El locus *B* o *black* (cromosoma 4) participa en la síntesis de eumelanina produciendo pelaje oscuro, en función de los alelos del loci³³. Por su parte, el loci *D* controla la intensidad de los pigmentos, así el alelo recesivo los “diluye”. Mientras que el loci *S* influye en la distribución de los pigmentos en el cuerpo, por lo tanto, determina la existencia de pelaje liso o manchas³⁴.

Finalmente, el locus *C*, albino o *Tyr* se localiza en el cromosoma 7 del ratón. Se trata de un gen formado por cinco exones que produce hasta 12 variantes transcripcionales mediante un proceso de corte y empalme del mRNA (*splicing*) alternativo. Los más comunes son *Tyr_1*, generado por los cinco exones; y *Tyr_2*, originado tras la escisión del tercer exón^{35,36}. La traducción de estos transcritos produce una enzima clave en la melanogénesis: la tirosinasa. Se trata de una oxigenasa que cataliza la hidroxilación del aminoácido tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA), así como la oxidación de este a DOPAquinona, precursor de la ruta de síntesis de feomelanina y eumelanina (Figura 6)³².

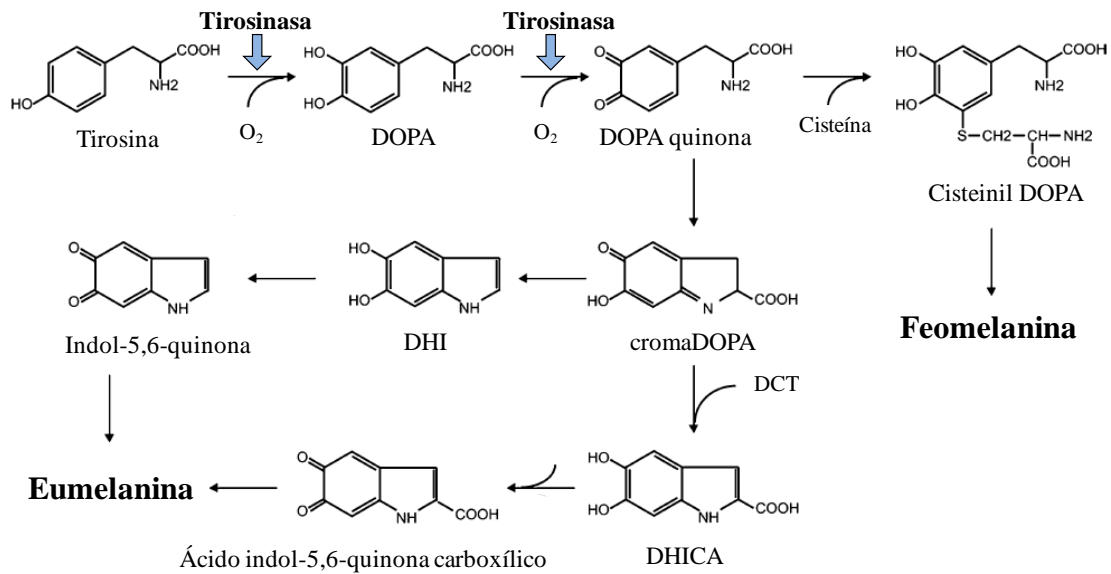


Figura 6. Ruta de síntesis de feomelanina y eumelanina. La flecha azul indica las etapas catalizadas por la enzima tirosinasa, la cual se encuentra codificada por el gen *Tyr*. Adaptado de Wang & Hebert, 2006³².

El alelo dominante *C* permite la síntesis de la enzima, y por tanto, la expresión del color determinado por la combinación de alelos de los locis *A* y *B*; mientras que el alelo recesivo *c* inhibe dicha expresión. Así, la constitución homocigótica recesiva $Tyr^{c/c}$ produce un efecto epistático sobre los otros genes, es decir, enmascara su efecto dando lugar a ratones albinos³⁴.

Debido a esta característica, la mutagénesis del locus *Tyr* constituye un método sencillo y rápido de evaluación de los sistemas de edición genómica actuando por la vía NHEJ, ya que permite una interpretación visual y espacial del resultado³⁷. Así, es posible diseñar un sistema CRISPR/Cas9 que provoque la disrupción de dicho gen en embriones homocigóticos $Tyr^{C/C}$. De este modo se generan ratones pigmentados, debido a la ausencia de edición (ratones *wild-type*, WT) o a la de un solo alelo (ratones heterocigoto); ratones albinos si se truncan ambos alelos en todas las células del embrión; o ratones mosaicos si sólo algunas células han sido modificadas en sus dos alelos (Figura 7).

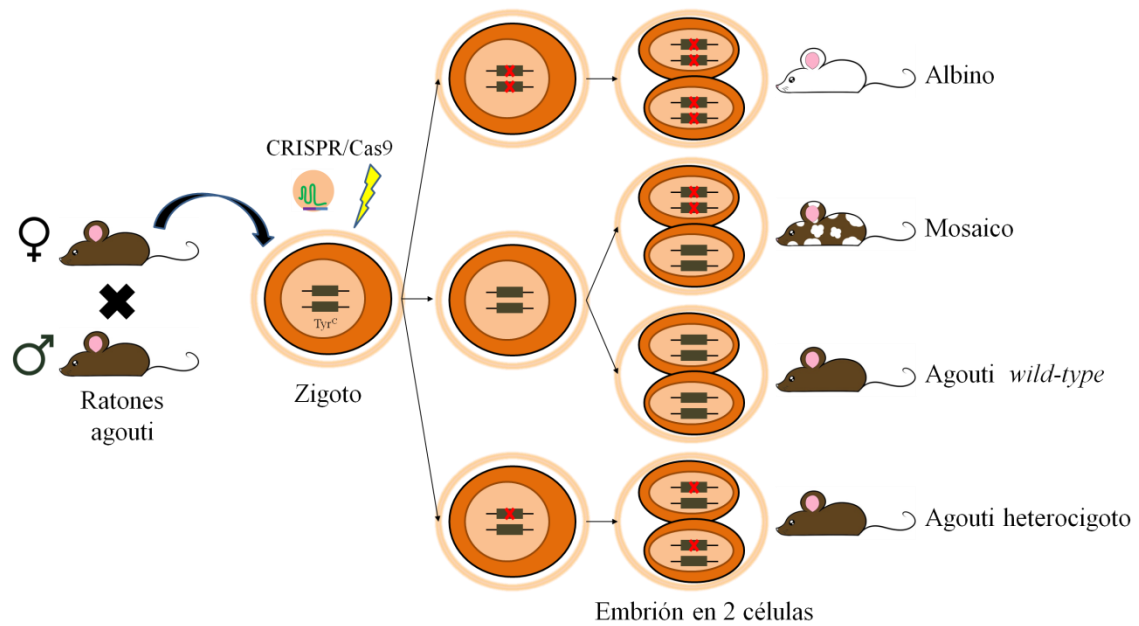


Figura 7. Esquema de experimento de edición genómica del locus *Tyr* mediante CRISPR/Cas9 en línea de ratones de fenotipo agouti ($Tyr^{C/C}$). La cruz roja representa DSBs generados por la nucleasa Cas9 y reparados por la vía NHEJ.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se sugiere que la electroporación de embriones para obtener ratones modificados genéticamente mediante el sistema CRISPR/Cas9 constituye una alternativa a la tradicional técnica de microinyección pronuclear. De este modo, se trataría de un método más rápido, ya que se pueden electroporar numerosos embriones simultáneamente; más sencillo y que requiere materiales y aparatos más baratos.

El objetivo principal de este TFG es implementar esta técnica en el Servicio de Transgénesis de la Universidad de Salamanca (USAL) y comparar los resultados con la técnica clásica de microinyección. Por otra parte, se añadirán una serie de variaciones en la misma con el objeto de mejorar los resultados descritos en la literatura. En este sentido nuestra hipótesis propone que **la electroporación de los componentes del sistema CRISPR/Cas9 en forma de ribonucleoproteína pre-ensamblada, es decir, la proteína Cas9 unida al sgRNA, podría constituir un sustituto más efectivo a la microinyección pronuclear.**

Para corroborar esto, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. **Comprobar que la electroporación del complejo ribonucleoproteico (RNP) del sistema CRISPR/Cas9 es compatible con el mantenimiento de la viabilidad del embrión.** Esto se

determinará electroporando cigotos de ratón en distintas condiciones, los cuales serán posteriormente cultivados *in vitro*.

2. **Demostrar *in vitro* la capacidad de esta técnica para obtener embriones de ratón editados por la vía NHEJ.** Para ello se usan reactivos del sistema CRISPR previamente diseñados y cuya capacidad para provocar la disrupción de genes, como *Acox2* o *Prph2*, ya ha sido comprobada mediante microinyección pronuclear.
3. **Evaluar *in vivo* su eficacia para obtener ratones *knock-out*.** Así, se diseñan RNA guías específicos del gen *Tyr*, dónde la proteína Cas9 provocará un DSB y la posterior activación de la vía NHEJ. Este complejo se electroporará y se microinyectará en embriones de ratón, los cuales serán transferidos a oviductos de una hembra pseudogestante. De este modo, el nacimiento de ratones albinos y/o mosaicos permitirá fácilmente comparar ambas técnicas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

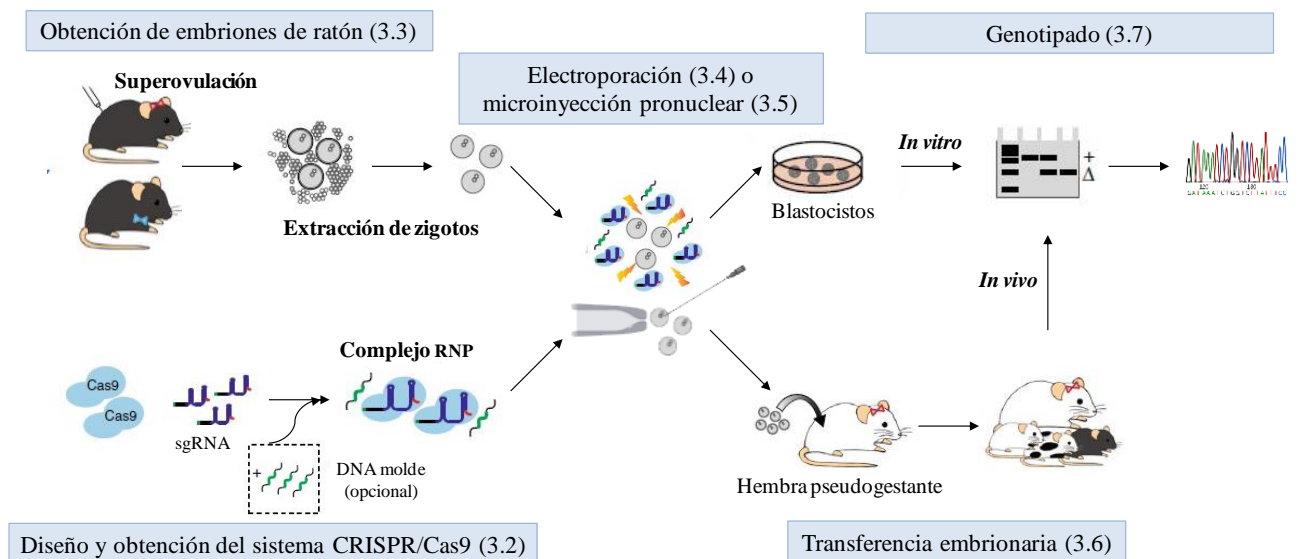


Figura 8. Esquema del diseño experimental planteado.

Para cumplir los objetivos planteados se lleva a cabo la siguiente metodología (Figura 8). Inicialmente se diseña y genera el sistema CRISPR/Cas9 en forma de complejo ribonucleoproteico (RNP) (apartado 3.2). Paralelamente se obtienen los embriones de ratón (3.3), los cuales son electroporados (3.4) o microinyectados (3.5) con el complejo anteriormente ensamblado.

Para determinar o comprobar la generación de modificaciones genéticas y la eficacia del método se recurre al proceso de genotipado (3.7), es decir, la determinación de la secuencia genómica

presuntamente editada. Para ello es necesario realizar la extracción de DNA genómico (gDNA), existiendo dos posibilidades:

- *in vitro*: Los embriones electroporados se cultivan hasta alcanzar el estado de blastocisto, momento en el cual se extrae el gDNA.
- *in vivo*: Los embriones son transferidos a los oviductos de una hembra pseudogestante (3.6) para generar una camada de ratones, de cuya cola se obtiene el gDNA.

Finalmente, se procede a la amplificación de la región diana mediante reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) y su secuenciación por el método de Sanger.

3.2. DISEÑO Y OBTENCIÓN DEL SISTEMA CRISPR/Cas9

3.2.1. OBTENCIÓN DEL sgRNA

Para llevar a cabo la edición del gen *Tyr*, se diseñó la secuencia que determina la especificidad del sistema, o crRNA, mediante la aplicación bioinformática BreakingCast (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/index.php>) desarrollada por el Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Mediante esta se localizan secuencias de 20 nucleótidos con un motivo PAM, reconocible por la nucleasa Cas9, en su extremo 3' y el grado en que estas hibridan en otras regiones del genoma (*off-targets*), asignando una puntuación entre 0 y 100³⁸. Para ello se introdujo una secuencia de 990 pares de bases (pb) del gen *Tyr* de la cepa de ratón C57BL/6.

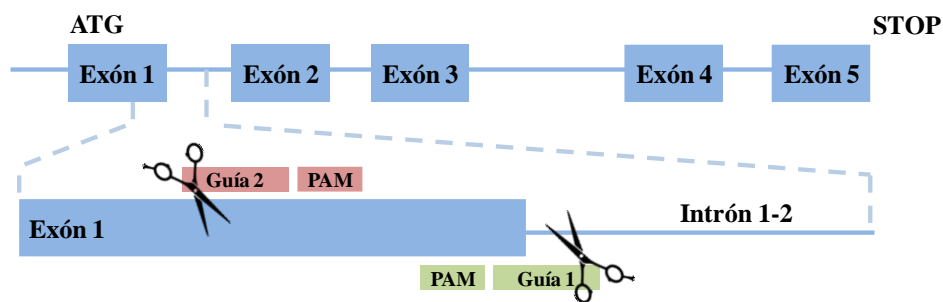


Figura 9. Esquema del diseño de las secuencias guías TYR1 y TYR2 usadas en la edición del locus *Tyr*.

Así se seleccionó una secuencia (TYR1) correspondiente a los últimos 5 nucleótidos del exón 1 y los primeros 15 del intrón contiguo, la cual posee un *score* de 81.1. Esta fue elegida debido a que incluye una región de procesamiento intrónico y recientemente se ha confirmado que la edición genómica en estos puntos aumenta la eficacia del sistema para generar alelos *knock-out*. Esto es debido a que la mutación de estas secuencias afecta al proceso de corte y empalme del mRNA (*splicing*), lo que en la mayoría de los casos conlleva a la pérdida de función de la proteína.^{39,40}

Adicionalmente, se seleccionó otra secuencia (TYR2) dirigida al interior del exón 1, la cual recibió un score de 79.6 (Figura 9). Todas las secuencias usadas como crRNA se recogen en la Tabla 1, las cuales fueron sintetizadas químicamente por *Integrated DNA Technologies* (<https://eu.idtdna.com>).

Tabla 1. Secuencias de crRNAs usadas en el diseño de las guías (sgRNA) de los sistemas CRISPR/Cas9 para la edición de los genes *Acox2*, *Prph2* y *Tyr*. El motivo PAM se encuentra subrayado en el extremo 3´.

Nombre de la guía	Secuencia crRNA (5´→3´)
ACOX2	GTGGTCCTCTAGGCTCCGGATGG
PRPH2	CACGTTGCTCTTGATGCGACTGG
TYR1	TATAGTGCATCTTACCTGCCAGG
TYR2	AATAGGACCTGCCAGTGCTCAGG

Posteriormente se obtiene el sgRNA o RNA guía. Para ello se mezcla 2,2 µl de crRNA 200 µM, 2,2 µl de tracrRNA 200 µM (IDT®, cat. nº 1072534) y agua libre de nucleasas (*Nuclease Free-Water*, NFW; Thermo Scientific®, cat. nº AM9914G) hasta 10 µl. Se incuba a 95°C durante 5 minutos seguido de una disminución de 5°C por minuto hasta alcanzar 25°C.

3.2.2. FORMACIÓN DEL COMPLEJO RNP

A continuación se obtiene el complejo RNP que incluye todos los componentes del sistema CRISPR/Cas9, dependiendo del tipo de método de transfección que vaya a aplicarse.

- **Microinyección pronuclear:** Se realiza una dilución 1:150 del sgRNA obtenido en el apartado 3.2.1 del cual se toman 2 µl. Estos son mezclados con 2 µl de dilución 0,61 µM de proteína Cas9 (IDT®, cat. nº 1081059). Opcionalmente, si se quiere actuar por la vía HDR, además se añade 1 µl de disolución 250 ng/µl de DNA molde. Finalmente, se completa con buffer de inyección EmbryoMax (Millipore®, cat. nº MR095-10) hasta 10 µl.
- **Electroporación:** Se incuban 4 µl de sgRNA obtenido en el apartado 3.2.1 y 2 µl de dilución 61 µM de proteína Cas9 a 37°C durante 10 minutos. A continuación, se adiciona NFW si se procede a editar por vía NHEJ, o la dilución de DNA molde si se realiza por vía HDR, hasta 10 µl.

3.3. OBTENCIÓN DE EMBRIONES DE RATÓN

3.3.1. SUPEROVULACIÓN DE HEMBRAS

Inicialmente son seleccionadas seis hembras de 4 semanas de edad, las cuales serán sometidas a tratamiento hormonal para inducir la sobreproducción de ovocitos maduros. Para ello se administra a cada hembra, por vía intraperitoneal, 5 unidades internacionales (U.I.) de hormona PMSG

(*pregnant mare serum gonadotropin*; Foligon®) disuelta en suero fisiológico, la cual induce el crecimiento y maduración folicular. 48 horas después se administra del mismo modo 5 U.I. de hCG (*human chorionic gonadotropin*; Sigma-Aldrich®, cat. n° CG5-1VL), estimulando la ovulación y el mantenimiento del cuerpo lúteo.

Posteriormente se ponen en cruce con un macho reproductor, y al día siguiente es posible determinar en cuales se ha producido la cópula gracias a la aparición del tapón vaginal (Figura 10B) en las hembras, resultado de la coagulación de proteínas seminales del macho. Así, las hembras que lo presenten son sacrificadas por dislocación cervical para proceder a la extracción de zigotos.

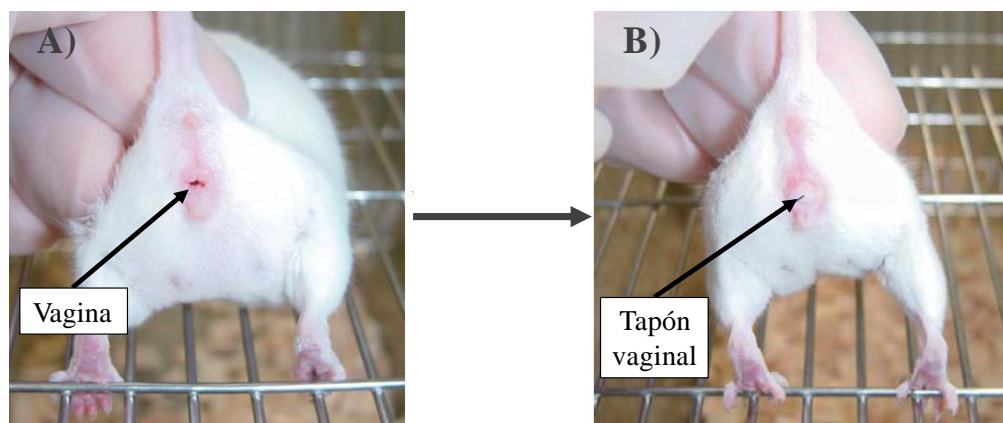


Figura 10. A) Estado de la vagina en fase estro del ciclo estral murino. B) Aparición del tapón vaginal tras el apareamiento. Adaptado de Nakagata, 2015⁴¹.

3.3.2. EXTRACCIÓN DE ZIGOTOS

Los oviductos de las hembras son extraídos mediante una incisión transversal en la cavidad peritoneal y colocados en una placa petri de 35 mm con medio de lavado M2 [HEPES 4,969 g/l; $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,252 g/l; NaCl 5,533 g/l; KCl 0,356 g/l; KH_2PO_4 0,162 g/l; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,293 g/l; NaHCO_3 0,3465 g/l; Na-Piruvato 0,036 g/l; glucosa 1 g/l; rojo fenol 0,01 g/l; penicilina G 0,062 g/l; estreptomycin sulfato 0,05 g/l; albúmina sérica 8 g/l y ácido láctico al 60 % 3,77 ml/l]. Estos son visualizados en un estereomicroscopio (Olympus®-SZX12) para localizar el ámpula, una zona ensanchada del cuerno uterino donde se encuentran los zigotos. Esta es rasgada con ayuda de pinzas favoreciendo la salida al medio de cúmulos de los mismos junto a células foliculares. Estos son traspasados, con una pipeta de vidrio alargada a la llama y conectada a un sistema de succión, a una nueva placa con 2 ml de medio M2, en el cual se adiciona 500 μl de enzima hialuronidasa 2 mg/ml (Sigma Aldrich®, cat. n° H-3506) para provocar su separación (Figura 11). Tras 5 minutos de reacción, los zigotos que presenten un estado óptimo y hayan sido fecundados, es decir, posean pronúcleo masculino y femenino, son lavados sucesivamente en medio M2.

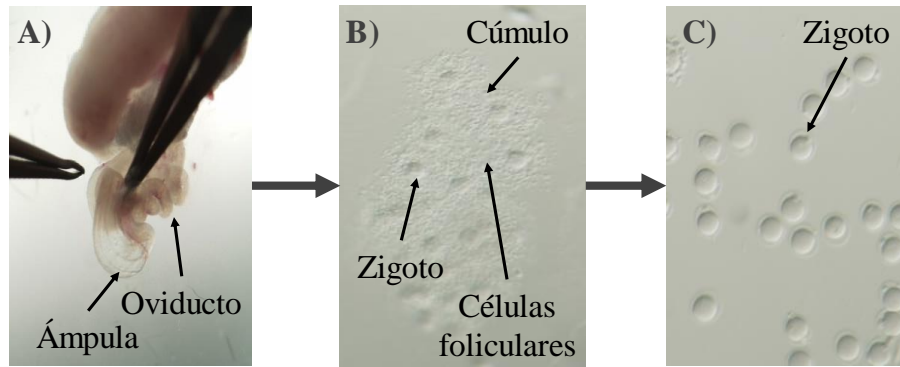


Figura 11. Proceso de obtención de embriones de ratón. A) Localización del ámpula en el oviducto. B) Cúmulo de cigotos y células foliculares extraído del ámpula. C) Cigotos obtenidos tras la adición de enzima hialuronidasa.

Finalmente, 25-30 embriones son colocados en una gota de 25 μ l de medio de cultivo embrionario KSOM enriquecido con aminoácidos y D-glucosa (MerkMillipore®, cat. n° MR-106-D) y recubierto con aceite mineral (Nidacon®, cat. n° NO-400K), para prevenir su evaporación. Estos son incubados hasta el momento de la electroporación o microinyección a 37°C y 5 % de CO₂.

3.4. ELECTROPORACIÓN DE EMBRIONES

Los embriones se encuentran cubiertos por una capa de glucoproteínas, denominada zona pelúcida, que dificulta el acceso de los componentes del sistema CRISPR/Cas9 al embrión. Con el objetivo de reducir la resistencia que ejerce, se seleccionan hasta 60 embriones y se transfieren a una placa con solución de ácido Tyrode pH 2,5 (Sigma-Aldrich®, cat. n° T1788); hasta que esta sea digerida un 30 % (~30-40 segundos) (Figura 12).

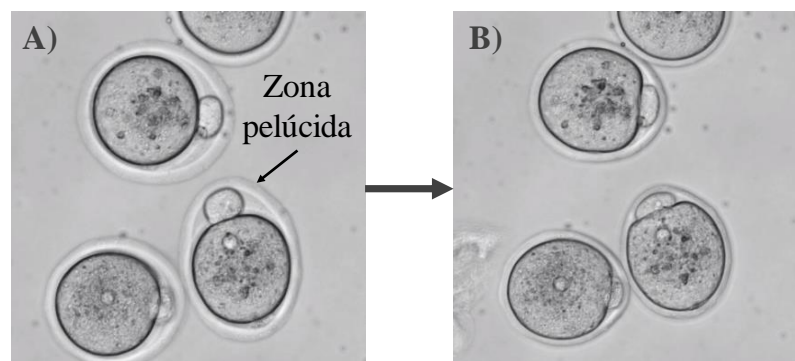


Figura 12. Aspecto y grosor de la zona pelúcida antes (A) y después (B) del tratamiento de cigotos con ácido Tyrode⁴².

Posteriormente son lavados en medio M2 para detener la reacción y transferidos a un placa con 2 ml de medio Opti-MEM (Thermo Scientific®, cat. n° 31985062). Estos son aspirados con una pipeta de vidrio alargada a la llama en el menor volumen posible (~2 μ l) y colocados sobre una nueva gota de 8 μ l de Opti-MEM. Sobre esta se añaden los 10 μ l del complejo RNP (3.2.2) y se procede a la electroporación, dependiendo de cuál sea el dispositivo usado para ello:

- Neon Transfection System (Thermo Scientific®, cat. n° MPK5000): Se toman 10 µl con la pipeta del equipo, la cual es introducida en el electroporador. En él se seleccionan los parámetros: voltaje, duración de pulso y número de pulsos. Finalmente, se electropora y se libera el contenido de la pipeta en medio KSOM, repitiendo el proceso con los otros 10 µl.
- Gene Pulser XCell (Bio-Rad®, cat. n° 1652660; Figura 5): Todo el volumen es colocado en el interior de una cubeta de electroporación de 0,1 cm de ranura (Gene Pulser® Cuvette; Bio-Rad, cat. n° 1652089) y se ajustan los siguientes parámetros: tipo de pulso, voltaje, duración de pulso, número de pulsos e intervalo entre pulsos. Tras la electroporación, el contenido de la cubeta es tomado con una pipeta y lavado en medio KSOM.

Finalmente, los embriones se transfieren a una nueva gota de 25 µl de KSOM cubierta de aceite mineral y se incuban a 37°C y 5 % de CO₂.

3.5. MICROINYECCIÓN PRONUCLEAR DE EMBRIONES

Este procedimiento se lleva a cabo en una estación de microinyección (Olympus®-IX70; Figura 4). Inicialmente se preparan las agujas necesarias para el proceso. La aguja de microinyección se obtiene introduciendo un capilar de borosilicato (World Precision Instrument®, cat. n° MTW100-4) en un estirador de pipetas (Sutter Instruments®; cat. n° P-97). En su interior se adicionan los 10 µl del complejo RNP (3.2.2) y se une al brazo derecho de la estación, quedando conectada a un émbolo. Por su parte, la aguja de sujeción (BioMedical Instruments®) queda unida al brazo izquierdo del equipo y acoplada al sistema de vacío.

Sobre la platina se coloca un portaobjetos excavado con una gota de 2 ml medio M2 cubierta de aceite mineral, en la cual se introducen los embriones extraídos. Mediante los micromanipuladores de la estación se sostiene un embrión con la aguja de sujeción, mientras que la otra es introducida en el citoplasma hasta llegar a uno de los pronúcleos. Allí se comprime ligeramente el émbolo hasta visualizar un leve aumento del tamaño del pronúcleo, señal de que parte del contenido de la aguja se ha liberado. Este proceso se repite con el resto de embriones.

Finalmente, aquellos que hayan sobrevivido se transfieren a una nueva gota de 25 µl de KSOM cubierta de aceite mineral y se incuban a 37°C y 5 % de CO₂.

3.6. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Para generar ratones, estos embriones deben ser transferidos a los oviductos de una hembra pseudogestante. Esta se encuentra en estado de pseudopreñez tras haber sido cruzada con un macho

vasectomizado, por lo que no se produce la fecundación y no se generan cigotos. Sin embargo, la cópula ha iniciado una serie de cambios fisiológicos y hormonales que conducen a la remodelación de la decidua uterina y a la secreción de diversas sustancias, con el objetivo de prepararla para la implantación del embrión⁴³.

3.6.1. VASECTOMIZACIÓN DE MACHOS

Se toma un macho de linaje CD1 y 3 meses de edad, el cual es anestesiado con isoflurano. Mediante una incisión abdominal se accede a los testículos, dónde se cauterizan ambos conductos deferentes. Finalmente, se cierra la herida quirúrgica con hilo de sutura y grapas.

3.6.2. TRANSFERENCIA A OVIDUCTO DE HEMBRA PSEUDOGESTANTE

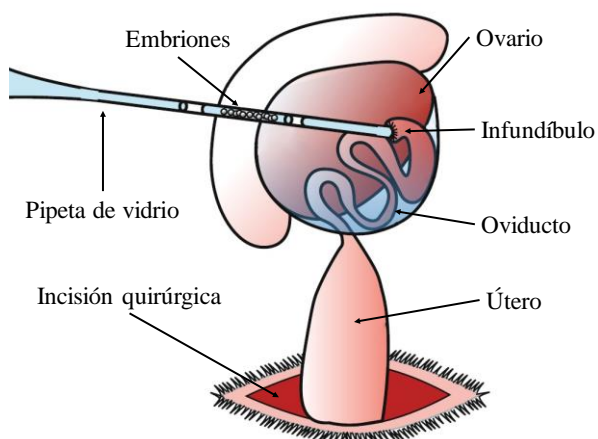


Figura 13. Procedimiento de transferencia de embriones a oviducto a través del infundíbulo. Adaptado de Modzelewski *et al.*, 2018⁴².

Inicialmente se selecciona una hembra de linaje CD1 de 8 semanas de edad, la cual se debe encontrar en fase “estro” del ciclo estral murino. Este es fácilmente identificable, ya que la vagina presenta una amplia abertura y aspecto rojizo y húmedo (Figura 10A). Esta es cruzada, y comprobada por la aparición de tapón vaginal, con el macho estéril para adquirir el estado de pseudopreñez. 24 horas después de la transfección, estas hembras se anestesian con isoflurano, se realiza un corte lateral en el nacimiento de la pata y

se accede al oviducto. Se seleccionan 25-30 embriones que se encuentren en estado de dos células y se introducen en el mismo a través del infundíbulo (Figura 13).

3.7. GENOTIPADO

3.7.1. EXTRACCIÓN DE gDNA DE BLASTOCISTOS

Para realizar genotipado *in vitro*, los embriones electroporados se mantienen en cultivo durante 72-96 horas, en las condiciones anteriormente descritas, hasta que alcancen el estado de blastocisto. Estos son colocados individualmente en un tubo eppendorf de 0,2 ml con 10 µl de buffer de lisis de embriones [KCl 50 mM; Tris HCl pH 8 10 mM; Triton X-100 0,1 %; Proteinasa K (AppliChem®, cat. n° A3830) 4 mg/ml]. Estos se incuban a 55°C toda la noche (*overnight*, O.N.). Al día siguiente se aplican 94°C durante 10 minutos para inactivar la enzima.

3.7.2. EXTRACCIÓN DE gDNA DE COLA DE RATÓN

Para llevar a cabo genotipado *in vivo*, los embriones fueron transferidos a hembras pseudopreñadas (3.6). Tras 20 días de gestación nace la camada correspondiente, la cual debe mantenerse en la misma jaula que la madre durante los primeros 21 días de vida. Tras este tiempo, los nuevos ratones son identificados y se realiza una biopsia, o corte, de su cola (~1-2 mm) introduciéndose en un tubo eppendorf de 1,5 ml.

A continuación se realiza la digestión de dichas colas. Para ello se prepara la disolución de digestión de colas [Fornace (Sacarosa 0,25 M; Tris pH 7,5 50 mM; KCl 27 mM; MgCl₂ 5 mM) 90 % v/v; SDS 1X 9 % v/v; EDTA 0,5 M; Proteinasa K 0,04 mg/ml] y se calienta a 55°C durante 10 minutos. Posteriormente se adicionan 500 µl de la disolución a cada uno de los eppendorf donde se han depositado las biopsias de colas, las cuales se trituran con tijeras previamente lavadas en HCl y agua destilada (dH₂O). Estos se incuban a 55°C O.N.

Al día siguiente extrae el gDNA por el método fenol/cloroformo/alcohol isoamílico:

1. Se añaden 450 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1; AppliChem®, cat. n° A2279) a las digestiones, se homogeniza por agitación y se centrifuga 10 minutos a 12.000 revoluciones por minuto (rpm).
2. Se extrae la fase acuosa, se introduce en 500 µl de cloroformo, se homogeniza por agitación y se centrifuga 10 minutos a 12.000 rpm.
3. Se extrae la fase acuosa, se introduce en 1 ml de etanol 100 %, se homogeniza por agitación y se centrifuga 10 minutos a 12.000 rpm.
4. Se decanta por inversión eliminando el sobrenadante, se adiciona 500 µl de etanol 70 %, se homogeniza por agitación y se centrifuga 10 minutos a 12.000 rpm.
5. Se decanta por inversión eliminando el sobrenadante, se da un *spin* y se elimina con una micropipeta los restos de sobrenadante. El tubo se mantiene 10 minutos a temperatura ambiente (*room temperature*, RT) con la tapa abierta.
6. Se añaden 30-50 µl de MilliPore® Water (MPW) y se mantiene 30 minutos a RT.
7. Se cuantifica la concentración de gDNA mediante Nanodrop® y se almacena a -20°C.

3.7.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Posteriormente se amplifica la región de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello se diseñan y solicitan a Invitrogen® (<https://www.thermofisher.com/order/custom->

standard-oligo) oligonucleótidos específicos (o *primers*) que flanqueen el fragmento de gen a modificar (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos *forward* (F) y *reverse* (R) usados en el proceso de genotipado y sus características (secuencia, temperatura de anillamiento o *annealing* y tamaño del fragmento amplificado o amplicón).

Guía	Primer	Secuencia (5'→3')	T _a (°C)	Amplicón (pb)
ACOX2	F	AACCTAAACCCAGCAGACAGG	57	399
	R	GTGACTCAGGCATCAGTAAGC		
PRPH2	F	ACTGCCTCCACCTTCTAGAAC	55	488
	R	ACCATGTAAACCCAAGTCTGG		
TYR1	F	CATCTACGACCTCTTTGTATGG	58	560
	R	AATCAGTCCTTGTTTATAGCAGC		
TYR2	F	GGAGTTTCCAGATCTCTGATGG	58	496
	R	AGAGGTCGTAGATGTTGATATC		

A fin de llevar a cabo la amplificación, para cada muestra se añaden 45 µl de la mezcla de reacción (Tabla 3) y el DNA extraído (1 µl si procede de cola de ratón o 2 µl si se ha extraído de blastocitos) en un tubo eppendorf de 0,2 ml.

Tabla 3. Mezcla de reacción de PCR por muestra.

Reactivo	Cantidad (µl)
MPW	-
MPW	34,5
Buffer Phusion HF 5X (con MgCl₂ 7,5 mM)	Thermo Scientific®, cat. n° F-518
Buffer Phusion HF 5X (con MgCl₂ 7,5 mM)	10
Dimetil sulfóxido (DMSO)	MerckMillipore®, cat. n° 8.02912.1000
Dimetil sulfóxido (DMSO)	2
dNTPs 10 mM	Bitools®, cat. n° 20.031-4179
dNTPs 10 mM	2
Primer forward (F) 10 mM	Invitrogen®
Primer forward (F) 10 mM	0,3
Primer reverse (R) 10 mM	Invitrogen®
Primer reverse (R) 10 mM	0,3
Taq Polimerasa 2 U/µl (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase)	Thermo Scientific®, cat. n° F-530L
Taq Polimerasa 2 U/µl (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase)	0,5

Este se introduce en el termociclador (Thermo Scientific®, cat. n° 4375786) y se aplica un programa adecuado, siguiendo los siguientes criterios:

- Fase de desnaturalización: 3 minutos a 98°C.
- Fase de anillamiento y extensión: se repite 35 ciclos.
 - 3 minutos a 98°C.
 - 30 segundos a la temperatura de anillamiento (T_a) de la pareja de oligonucleótidos.
 - 1 minutos por cada 1.000 pb del amplicón a 72°C.
- Fase de elongación final: 5 minutos a 72°C.

En el caso del genotipado *in vitro* será necesario realizar una segunda PCR consecutiva o *nested-PCR*. Para ello se añade 1 µl del producto de la PCR anterior a 45 µl de mezcla de reacción (Tabla 3) y se selecciona el mismo programa, pero realizando únicamente 20 ciclos en la fase de anillamiento y extensión.

3.7.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

A continuación se realiza una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el tamaño de los productos de PCR es el adecuado. Para ello se prepara una solución de agarosa (NzyTech®, cat. n° MB14403) al 2 % w/v en TBE (tampón Tris, borato, EDTA) y se deja solidificar en una cubeta de electroforesis. Se cargan pocillos del gel con 5 µl de productos de PCR junto a 4 µl de tampón de carga o *loading buffer* (Thermo Scientific®, cat. n° R0611). También, en otro pocillo se cargan 3 µl de un marcador de peso molecular adecuado y se aplica 140 V durante 20 minutos. Finalmente se visualiza en un transiluminador UV (BioRad®, cat. n° 1708195) para comprobar que el tamaño del amplicón generado se corresponde con el teórico (Tabla 2).

3.7.5. PURIFICACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS

Si el tamaño es el esperado, el producto de PCR se purifica con el kit comercial NZYGelPure (NzyTech®, cat. n° MB01102). Estos fragmentos son secuenciados mediante el método de Sanger con el analizador ABI-3130xl (Thermo Scientific®, cat. n° 3130XLR). Para ello, previamente se mezcla 1 µl de producto de PCR, 1 µl de *primer* (Tabla 2) 1 mM y 6 µl de MPW.

Una vez obtenidas las secuencias, estas serán alineadas con la de referencia, para determinar la existencia de pequeños *indels* (vía NHEJ) mediante los programas bioinformáticos SnapGene y Benchling.

Finalmente, se calculan los datos correspondientes a la eficacia y al mantenimiento de la viabilidad logrados con las técnicas de microinyección pronuclear y de electroporación. Con ellos se recurre al programa GraphPad Prism 8 para determinar la significación estadística, es decir, si existen diferencias significativas entre una y otra metodología. Si los datos se ajustan a una distribución normal se seguirá un análisis t de Student. Por el contrario, datos no paramétricos serán estudiados mediante la prueba U de Mann-Whitney. En todos los casos el nivel de confianza para el contraste de hipótesis se fija en 95 %, de manera que resultados con p-valor menor que 0,05 se consideran estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

En este proyecto se ha perseguido demostrar que la electroporación de embriones es una técnica más sencilla y eficiente que la microinyección pronuclear usada actualmente para la edición genómica de ratones. Para ello, inicialmente se determinaron los parámetros de electroporación que afectan mínimamente al desarrollo del embrión. Con estos se demostró la capacidad del complejo RNP del sistema CRISPR/Cas9 de atravesar la membrana plasmática de la célula y generar DSBs en su genoma; de modo que estas son reparados por la vía NHEJ provocando la pérdida de función de los genes diana. Finalmente, se aprovechó esta capacidad para generar ratones *knock-out* y comprobar que la eficacia no disminuye con respecto a la microinyección pronuclear.

4.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ELECTROPORACIÓN COMPATIBLES CON LA VIABILIDAD DEL EMBRIÓN

Con el fin de determinar las condiciones de electroporación que el embrión puede resistir, que no provoquen su lisis y permitan el posterior desarrollo embrionario, se realizaron varios ensayos en los distintos tipos de electroporadores y variando los parámetros seleccionables en cada uno.

Mediante el dispositivo Neon Transfection System 30 cigotos fueron sometidos a 2 pulsos eléctricos al menor voltaje permitido por el mismo, 750 V, durante 5 milisegundos (ms) cada uno. Durante la prueba se produjo la lisis celular de un elevado número de embriones, mientras que el resto presentan una morfología muy desfavorable con respecto a la habitual. A las 24 horas de cultivo, ninguno de los embriones había proseguido su desarrollo. Teniendo en cuenta lo obtenido, podemos descartar este dispositivo para llevar a cabo la electroporación de cigotos.

Por otra parte, 25 cigotos fueron electroporados con el sistema Gene Pulser XCell en las siguientes condiciones:

- Tipo de pulso: *Square-wave*.
- Voltaje: 30 V.
- Duración de pulso: 3 ms.
- Número de pulsos: 4.
- Intervalo entre pulsos: 100 ms.

Tras esto, los embriones fueron recuperados, observando la lisis de 2 de ellos. Los otros 23 fueron cultivados, y al día siguiente 21 se encontraban en estado de dos células. 48 horas después de la electroporación fueron 20 los que se desarrollaron hasta estado de 4 células y posteriormente

mórula. Tras 96 horas de cultivo 17 alcanzaron el estado de blastocisto, siendo este el último estadio cultivable *in vitro* (Figura 14).

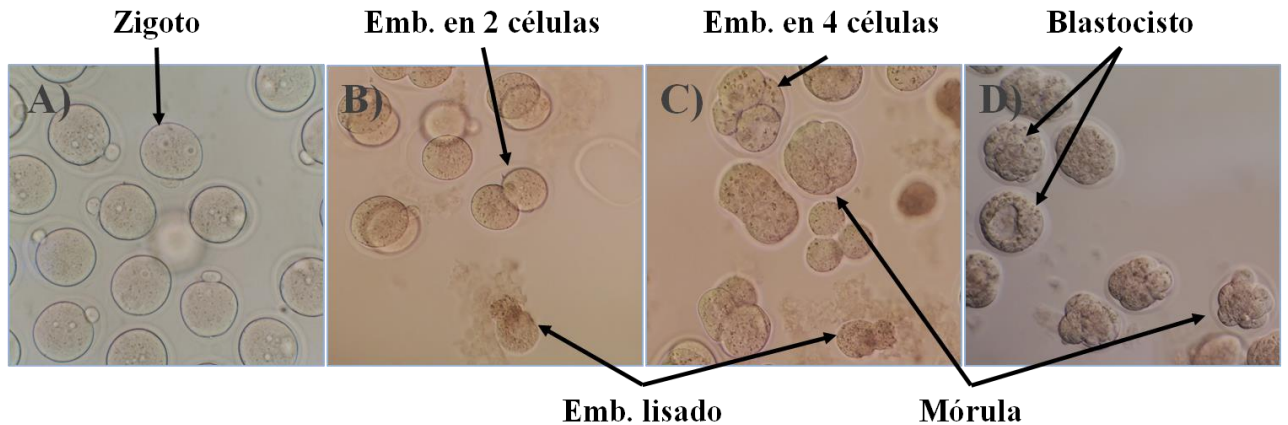


Figura 14. Imagen al microscopio de fase invertida de embriones (emb.) electroporados con 4 pulsos de 30 V y 3 ms de duración después de: A) 0 horas; B) 24 horas; C) 48 horas; D) 72 horas.

En vista al resultado obtenido, las condiciones anteriormente descritas son las que se aplicarán para transfectar embriones con el complejo RNP mediante electroporación.

4.2. LOS COMPONENTES DEL SISTEMA CRISPR/Cas9 SON CAPACES DE INTRODUCIRSE EN ZIGOTOS POR ELECTROPORACIÓN Y REALIZAR EDICIÓN GENÓMICA.

El uso de la guía específica frente al gen *Acox2* aportó la primera evidencia del éxito de esta técnica. Con el complejo RNP formado con esta guía se electroporaron inicialmente 14 zigotos, produciéndose la lisis de uno de ellos durante la transfección. Del resto, 6 alcanzaron el estado de blastocisto y se procedió a la amplificación de la zona diana de la guía. Tras la electroforesis, en 3 de ellos se observó una banda correspondiente al tamaño del amplicón (Figura 15).

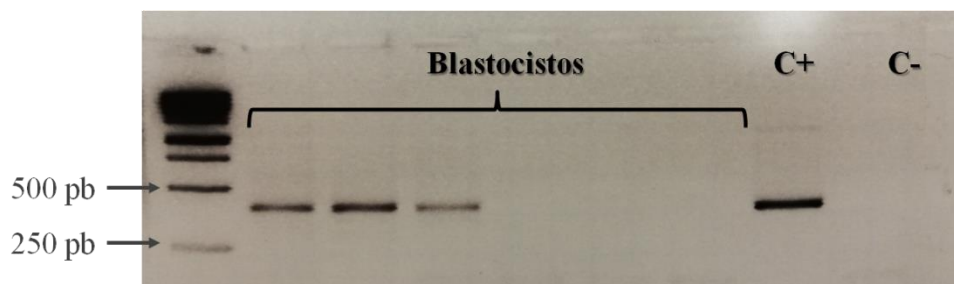


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de gDNA extraído de blastocistos obtenidos tras la electroporación del complejo RNP del sistema CRISPR/Cas9 para la edición de locus *Acox2*. El tamaño teórico del amplicón es 399 pb, lo que coincide con las bandas obtenidas. C+: control positivo; C-: control negativo.

Los productos de PCR fueron purificados, secuenciados y alineados con el genoma de referencia. Las secuencias se visualizan mediante un cromatograma, el cual muestran una elevada calidad de

lectura, es decir, la probabilidad de que la base nitrogenada secuenciada sea la que realmente ocupa esa posición. Este índice de calidad disminuye notablemente cuando la lectura alcanza la secuencia de corte del sistema CRISPR/Cas9. Esto indica que a partir de ese punto existen diversas secuencias mutadas, fruto de la aparición de *indels* (Figura 16).

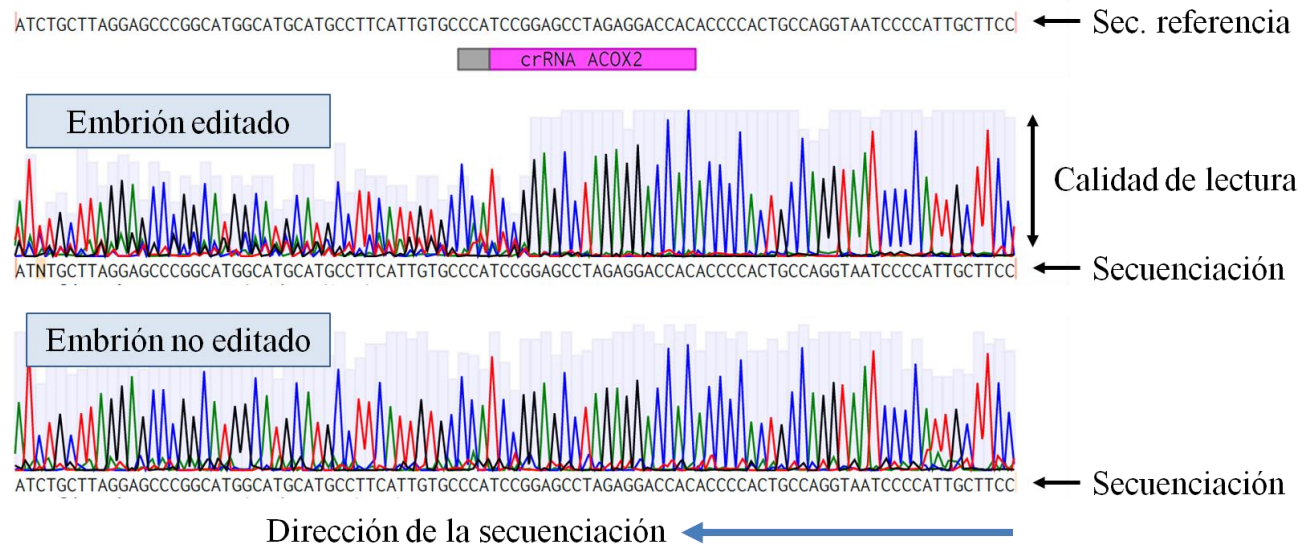


Figura 16. Análisis de la secuenciación de blastocisto editado con CRISPR/Cas9 por electroporación (superior) y no editado (inferior) en el locus *Acox2*. Bajo la secuencia (sec.) de referencia se indica en gris el motivo PAM y en rosa el crRNA que aporta la especificidad del sistema. En el embrión editado, la lectura (de izquierda a derecha) presenta una elevada calidad hasta alcanzar la secuencia guía, donde disminuye. En el no editado, esta no presenta variación.

El ensayo se repitió aumentando el número de cigotos iniciales hasta 50, manteniéndose viables 46 durante el proceso, De estos, 33 llegaron a completar el desarrollo *in vitro*. Del mismo modo que el anterior, se pudo proceder al genotipado de 27 embriones, lo que demostró la existencia de edición genómica por la vía NHEJ en 18 de ellos.

En una tercera experiencia 42 embriones fueron electroporados con la proteína Cas9 conjugada a la guía de un loci diferente: *Prph2*. 23 fueron recuperados de la cubeta de electroporación, siendo 10 los que llegaron a la fase de blastocisto. Mediante un análisis similar al anterior, se determinó que 3 de ellos habían sufrido modificaciones en la región correspondiente a la guía.

4.3. LA ELECTROPORACIÓN DEL COMPLEJO RNP CONSTITUYE UN MÉTODO DE GENERACIÓN DE MODELOS *KNOCK-OUT*, AL MENOS, TAN EFICAZ COMO LA MICROINYECCIÓN PRONUCLEAR.

Posteriormente se procedió a realizar varios ensayos de electroporación y microinyección pronuclear de embriones con el sistema CRISPR/Cas9 diseñado frente al locus *Tyr*, para posteriormente ser implantados en oviductos y obtener camadas de ratones *knock-out*.

En lo referente a la electroporación de embriones se obtuvieron 2 capas correspondientes a cigotos modificados con la guía TYR1 y 2 con la guía TYR2. En una de ellas se obtuvieron únicamente 7 ratones pigmentados. En las otras tres capas apareció, al menos, un ratón mosaico fruto de la edición de ambos alelos en algunas células. Por último, se ensayó la electroporación del sistema TYR2 sobre embriones en estado de dos células, generando una capa en la que un ratón resultó mosaico y dos albinos.

Posteriormente se realizaron biopsias de las colas de todas las crías y extracción de gDNA de las mismas. Se amplificó por PCR el fragmento del gen a modificar, obteniendo en todos los casos amplicones del tamaño teórico (Figura 17).

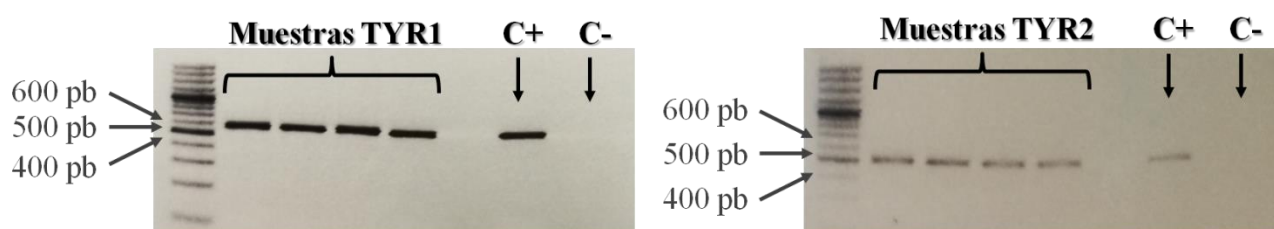


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de gDNA extraído de colas de ratón obtenidos tras la electroporación con las guías TYR1 (560 pb) y TYR2 (496 pb). C+: control positivo; C-: control negativo.

La posterior secuenciación de los mismos permitió discernir entre aquellos ratones pigmentados que no habían sufrido edición alguna (ratones *wild-type* o WT), y aquellos que sí pero esta no se había producido en ambos alelos (ratones heterocigotos). Por otra parte, las secuencias de los ratones mosaicos mostraron una mezcla de secuencias a partir del punto de corte, fruto de la edición de ambos alelos sólo en algunas células. Por último, el alineamiento de la secuencia de ratones albinos con la de referencia demostraba la ausencia de una región de 6 pares de bases en la secuencia guía, fruto de la delección de las mismas en estado de homocigosis (ambos alelos). Por lo tanto, estos dos últimos constituyen los modelos *knock-out* (KO) perseguidos (Figura 18). El resultado del genotipado de estas capas se recoge en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultado del genotipado *in vivo* de capas de ratón obtenidas tras la electroporación (EP) de cigotos y embriones en estado de dos células con el complejo RNP del sistema CRISPR/Cas9 dirigido al locus *Tyr*.

sgRNA	EP	Nº de crías totales	Pigmentados <i>wild-type</i>	Pigmentados heterocigotos	Mosaicos	Albinos
TYR1	Zigoto	7	7	0	0	0
TYR1	Zigoto	4	1	2	1	0
TYR2	Zigoto	4	3	0	1	0
TYR2	Zigoto	20	15	4	1	0
TYR2	2 células	7	4	0	1	2

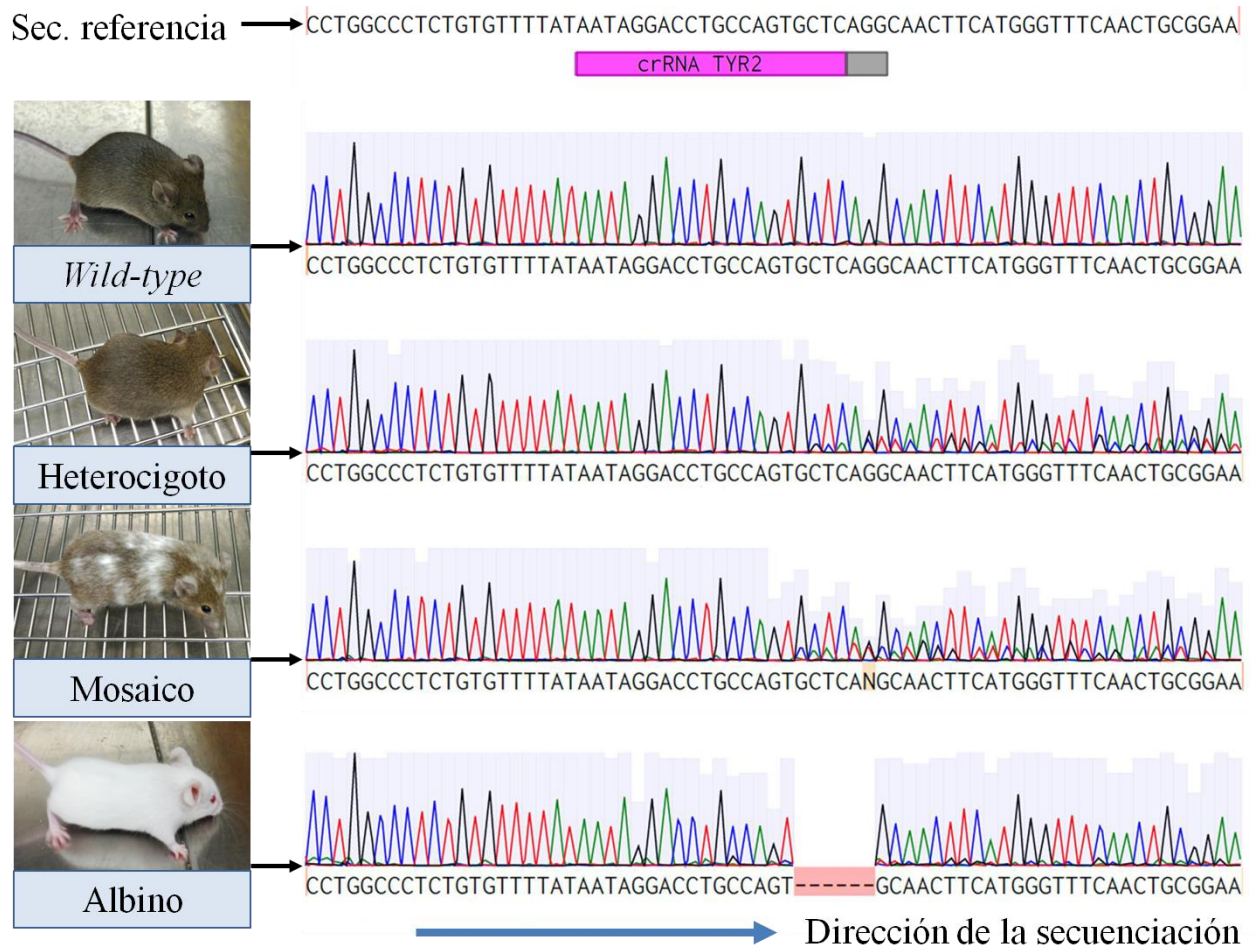


Figura 18. Análisis de la secuenciación (derecha) de gDNA extraído de colas de distintos tipos de ratón (izquierda) obtenidos tras la electroporación del complejo RNP del sistema CRISPR/Cas9 con la guía TYR2. Bajo la secuencia (sec.) de referencia se indica en gris el motivo PAM y en rosa el crRNA que aporta la especificidad del sistema.

Por su parte, mediante microinyección pronuclear se realizaron 5 repeticiones con la guía TYR1 y 7 con TYR2 en las cuales la hembra receptora resultó preñada y dio a luz ratones que fueron genotipados. En cuatro de esas camadas, la aparición de ratones albinos o mosaicos evidenció la existencia de edición en homocigosis. En las ocho restantes solamente se obtuvieron crías con fenotipo pigmentado, sin embargo el análisis posterior por secuenciación reveló la existencia de alelos modificados en heterocigosis.

A continuación se procede al estudio de eficacia de los dos métodos. Con los datos registrados, se obtuvo el porcentaje de crías editadas (“% edición”) y de crías *knock-out* (“% KO”) en las camadas obtenidas tanto por microinyección pronuclear, como por electroporación. Así, se entiende como editadas aquellas en las que, al menos, un alelo haya sido modificado (pigmentados heterocigotos, mosaicos y albinos); mientras que hablamos de KO cuando los dos alelos han sido editados en alguna o todas las células (mosaicos y albinos). A continuación, se calcula la media aritmética de los porcentajes (Tabla 5) y la desviación estándar para cada método de transfección.

El resultado del estudio estadístico inferencial de estos datos (Figura 19) concluyó que tanto el “% edición” (p-valor = 0,8191) como el “% KO” (p-valor = 0,1690) no presentan diferencias significativas entre los resultados de ambas técnicas.

Tabla 5. Resultado del análisis comparativo entre la técnica de microinyección pronuclear (MP) y electroporación (EP). Se recoge el porcentaje medio de eficacia para generar ratones editados y KO en el locus *Tyr*; así como el porcentaje medio de mantenimiento de viabilidad durante el proceso.

Técnica	Numero de camadas	% edición	% KO	% viabilidad
MP	n = 12	29,29 %	11,73 %	75,94 %
EP	n = 5	33,57 %	19,57 %	85,40 %

Otro aspecto analizado entre ambas metodologías fue el mantenimiento de la viabilidad del embrión después de cada proceso (“% viabilidad”). Este fue determinado como la relación entre el número de embriones que son transferidos a los oviductos maternos y el número de embriones transformados inicialmente. Es decir, cuantificamos cuantos sobreviven en cultivo 24 horas después de la manipulación. (Tabla 5). Nuevamente, esto no supuso diferencias significativas entre las técnicas (p-valor = 0,1481) (Figura 19).

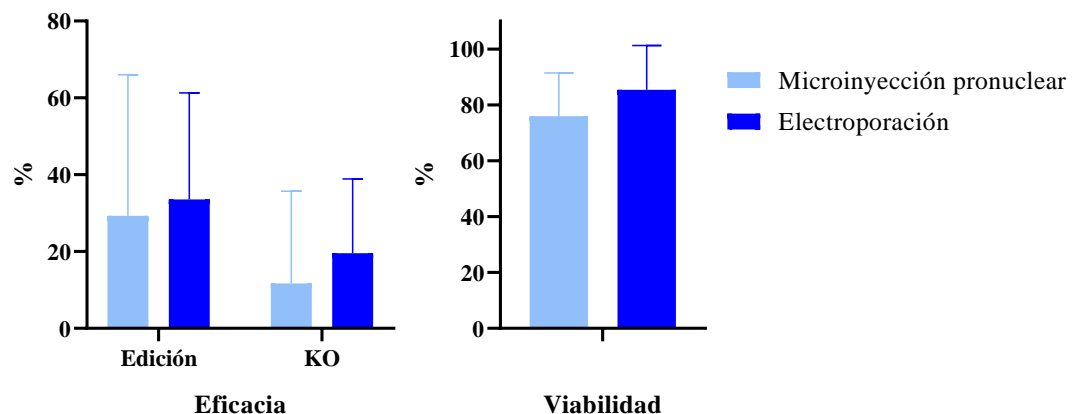


Figura 19. Comparación de la eficacia (izda) y mantenimiento de la viabilidad (dcha) entre las técnicas microinyección pronuclear y electroporación. Se representa mediante un gráfico de barras de medias con desviación estándar.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Desde su puesta a punto como herramienta de edición genómica, el sistema CRISPR/Cas9 ha supuesto una auténtica revolución en el proceso de generación de ratones modificados genéticamente, los cuales pueden ser usados como modelos de investigación en el ámbito biomédico. En la actualidad, este proceso se basa en la inyección de los componentes del sistema en un pronúcleo de embriones, en cuyo genoma tendrá lugar la modificación, y que serán transferidos a los oviductos de una hembra para generar ratones.

Los principales inconvenientes de este procedimiento son el elevado tiempo requerido en ello y precio del equipamiento usado. Además, se trata de una técnica que necesita personal experimentado y que haya adquirido gran pericia en el manejo de la estación de microinyección. Sin embargo, los resultados obtenidos hacen pensar que recurrir a la electroporación de embriones para ello supone una serie de ventajas que la convertirán en el nuevo método de referencia.

5.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ELECTROPORACIÓN COMPATIBLES CON LA VIABILIDAD DEL EMBRIÓN

A la vista de los resultados logrados se puede determinar que las condiciones aplicadas con el dispositivo GenePulser XCell son aceptables para el mantenimiento de embriones viables tras la electroporación, permitiendo así su posterior genotipado *in vitro* o transferencia a oviductos.

Estos parámetros de electroporación definen la exposición de las células al campo eléctrico externo, generando poros transitorios que permite la entrada de moléculas en el citoplasma. Sin embargo, una exposición excesiva puede conllevar un incremento irreversible de la permeabilidad celular, lo que implicaría la muerte celular. Los dos valores críticos en este aspecto son el voltaje aplicado y la duración de los pulsos⁴⁴. Por consiguiente, hemos descrito que el valor óptimo de los mismos para electroporar cigotos es de 30 V y 3 ms, lo que dista mucho de las condiciones óptimas para electroporar células de ratón adultas como la línea celular Boff-p210 (1700 V y 20 ms); o células ES murinas (1400 V y 10 ms). Por lo tanto, el aumento de estos dos números supondría la lisis de los embriones. Por ello, se propone el estudio de la aplicación progresiva de un mayor número de pulsos, lo que podría generar más poros o de mayor tamaño, mejorando la eficacia del protocolo.

Esto podría llegar a suponer una limitación a la implementación de esta técnica, ya que el rango de voltaje que permiten aplicar algunos electroporadores, como Neon Transfection System, no incluyen valores tan bajos. Pese a esto, es conveniente destacar que el precio que supondría a un laboratorio adquirir un electroporador compatible con la técnica (~8.500 €), es considerablemente menor que el de una estación de microinyección completa (~120.000 €).

5.2. LOS COMPONENTES DEL SISTEMA CRISPR/Cas9 SON CAPACES DE INTRODUCIRSE EN ZIGOTOS POR ELECTROPORACIÓN Y REALIZAR EDICIÓN GENÓMICA

Los *indels* observados en el 74,08 % de las secuencias analizadas indican que el complejo RNP ha difundido a través los poros transitorios generados en la membrana y que la nucleasa Cas9 ha realizado DSBs en las secuencias diana, seguido de su reparación por la vía NHEJ. Por lo tanto, ha permitido demostrar el segundo objetivo planteado.

Sin embargo, uno de los principales problemas del genotipado *in vitro*, y que ha podido sesgar los resultados, es la dificultad del proceso de extracción y amplificación del gDNA. En estos casos, la cantidad de la que se parte es muy baja, por lo que es común que la PCR no genere ningún producto, impidiendo realizar el posterior análisis. Por ello, no ha sido posible genotipar todos los blastocistos obtenidos, reduciendo el número de muestra. Por otra parte, la realización de *nested-PCR* va a favorecer la también amplificación de amplicones inespecíficos y posibles contaminantes, dificultando la lectura de las secuencias. Por esto, la calidad de estas lecturas (Figura 16) es inferior a las obtenidas en el genotipado a partir de biopsias en animales vivos (Figura 18).

En consecuencia, se decide no incluir estos datos en el posterior análisis de eficacia de la técnica.

5.3. LA ELECTROPORACIÓN DEL COMPLEJO RNP CONSTITUYE UN MÉTODO DE GENERACIÓN DE MODELOS *KNOCK-OUT*, AL MENOS, TAN EFICAZ COMO LA MICROINYECCIÓN PRONUCLEAR.

Los ensayos *in vivo* también fueron útiles para confirmar lo anteriormente planteado. La obtención de ratones mosaicos y completamente albinos en algunas de las diferentes camadas permitió, sin necesidad de genotipar, identificar modelos KO para el gen *Tyr*. Adicionalmente, la secuenciación de gDNA extraído de las colas posibilita discernir entre aquellos ratones pigmentados que no han sufrido edición genómica (WT) y aquellos en la que sí ha ocurrido pero solamente en un alelo (heterocigotos).

Los resultados de eficacia de la técnica, tanto de edición como de generación de alelos KO, muestran que esta no se ve comprometida al modificar la técnica de transfección. Es decir, la tasa de éxito conseguida con la electroporación de embriones no es menor que la obtenida con la microinyección pronuclear, y por tanto, la alcanzada hoy en día en el proceso de generación de modelos murinos.

Esto constituye una mejora sustancial con respecto a los primeros trabajos publicados sobre este procedimiento²⁸⁻³⁰, dónde la electroporación presentaba menor eficacia. Mientras que en esos ensayos los embriones fueron electroporados con una mezcla de mRNA de Cas9, que se traducirá en el interior de la célula, y de sgRNA; nosotros lo hemos realizado en forma de ribonucleoproteína pre-ensamblada. Esta modificación es el fundamento de la obtención de mejores resultados ya que no tendrá que transcurrir el tiempo necesario para la traducción del mRNA, por lo que el sistema actuará más rápidamente, aumentando así la eficacia de edición⁴⁵.

Si bien es cierto que el resultado medio de eficacia obtenido mediante electroporación es mayor, la elevada variabilidad de datos no permite afirmar, de momento, que este sea significativamente mejor que el logrado con microinyección pronuclear. Esto es debido a la existencia de un gran número de factores no controlados. Así, hemos aplicado por primera vez una metodología que ha sido comparada con otra practicada anteriormente en numerosas ocasiones, por lo que se presentaron dificultades en el desarrollo de las primeras electroporaciones. Otra limitación del análisis es el bajo número muestral (número de camadas analizadas), debido a que algunas transferencias embrionarias no resultaron exitosas: los embriones no se implantaron en el útero de la hembra pseudogestante y no se produjo embarazo.

Todo esto hace indicar que futuras correcciones en la técnica, así como una mayor práctica, podrían aumentar significativamente la eficacia de la electroporación. Entre otras cosas, esto permitiría reducir el número de animales usados para obtener un ratón modificado genéticamente; ya que se requerirían menor número de embriones iniciales, y por tanto, menos hembras donadoras.

Por su parte, la observación de los datos de mantenimiento de la viabilidad, nos llevan a una conclusión similar: esta no disminuye con el nuevo procedimiento. Ya era conocido que la principal limitación a la introducción de material genético y proteínas en los embriones por esta técnica es la presencia de la zona pelúcida²⁸, una capa glucoproteica que rodea la membrana plasmática del ovocito. Es por ello que esta fue parcialmente digerida con ácido Tyrode. Entre las funciones de la zona pelúcida se encuentra la inhibición de la poliespermia, la protección del embrión y su transporte a través del oviducto; lo que nos lleva a pensar que su reducción haya podido afectar negativamente al posterior desarrollo embrionario *in vivo*, reduciendo este parámetro.

Además, los resultados obtenidos permiten concluir que la electroporación también puede realizarse en estadios posteriores del desarrollo embrionario. Por ejemplo, se ha electroporado y editado embriones en estado de dos células, con las posibles ventajas que eso podría conllevar.

En definitiva, todos estos datos sugieren que la electroporación del complejo RNP del sistema CRISPR/Cas9 es una alternativa real a la microinyección pronuclear para la obtención de ratones KO, lo que implica una serie de ventajas. Principalmente debemos destacar la reducción del tiempo usado en una y otra para obtener el mismo resultado: mientras que la microinyección requiere aproximadamente un minuto por cada embrión manipulado, en ese tiempo ha sido posible realizar el proceso completo de electroporación de hasta 60 embriones.

6. CONCLUSIÓN

En los últimos años, la generación de modelos murinos se ha visto intensificada debido a la aplicación de la herramienta de edición genómica CRISPR/Cas9. Frente a la técnica tradicional de microinyección pronuclear, hemos comprobado que la electroporación es otro método de transfección que permite la entrada de los componentes de este sistema en embriones de ratón para dicho fin.

Su ensayo frente al locus *Tyr* ha permitido, fácilmente, determinar que la electroporación es un procedimiento tan eficaz como la microinyección pronuclear; además de mantener el mismo porcentaje de embriones viables que podrán ser transferidos posteriormente. Sin embargo, esta es llevado a cabo con una gran reducción de tiempo, coste y de la dificultad técnica implícita. Por todo ello, se concluye que la electroporación de embriones es una estrategia que supondrá un gran avance en este ámbito.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Vandamme, T. Use of rodents as models of human diseases. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 6, 2 (2014).
- Perlman, R. L. Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective. *Evol. Med. Public Heal.* 1, 170-6 (2016).
- Little, C. US Science Wars Against Unknown Enemy: Cancer. *Life* 2, 11–17 (1937).
- Peters, L. L. *et al.* The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat. Rev. Genet.* 8, 58–69 (2007).
- Jaenisch, R. & Mintz, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 1250–4 (1974).
- Lamprecht Tratar, U., Horvat, S. & Cemazar, M. Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Front. Oncol.* 8, 268 (2018).
- Devoy, A., Bunton-Stasyshyn, R. K. A., Tybulewicz, V. L. J., Smith, A. J. H. & Fisher, E. M. C. Genomically humanized mice: technologies and promises. *Nat. Rev. Genet.* 13, 14–20 (2012).
- Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503–12 (1987).
- Mojica, F. J. M. & Montoliu, L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol.* 24, 811–820 (2016).
- Burgio, G. Redefining mouse transgenesis with CRISPR/Cas9 genome editing technology. *Genome Biol.* 19, 27 (2018).
- Adli, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* 9, 1911 (2018).
- Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P. & Boutros, M. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Semin. Cancer Biol.* 55, 106–119 (2019).
- Wang, H., La Russa, M. & Qi, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 227–264 (2016).
- Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 346, 1258096 (2014).
- Hille, F. *et al.* The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell* 172, 1239–1259 (2018).
- Jinek, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816–821 (2012).
- Kim, T. K. & Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3173 (2010).

18. Primrose, S. B. & Twyman, R. M. *Principles of Gene Manipulation and Genomics*. 7^a ed. Hong Kong: Blackwell Publishing (2006).
19. Pu, X., Young, A. P. & Kubisch, H. M. Production of Transgenic Mice by Pronuclear Microinjection. En: Liu C., Du Y. *Microinjection. Methods in molecular biology* 1874, 17–41 (2019).
20. DeMayo, J. L., Wang, J., Liang, D., Zhang, R. & DeMayo, F. J. Genetically Engineered Mice by Pronuclear DNA microinjection. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2, 245–262 (2012).
21. Doe, B. *et al.* Generating CRISPR/Cas9-Derived Mutant Mice by Zygote Cytoplasmic Injection Using an Automatic Microinjector. *Methods Protoc.* 1, 5 (2018).
22. Chen, S., Lee, B., Lee, A. Y.-F., Modzelewski, A. J. & He, L. Highly Efficient Mouse Genome Editing by CRISPR Ribonucleoprotein Electroporation of Zygotes. *J. Biol. Chem.* 291, 14457–14467 (2016).
23. Liu, F., Wu, D., Wu, X. & Chen, K. Analyses of the cell mechanical damage during microinjection. *Soft Matter* 11, 1434–42 (2015).
24. Rüllicke, T. & Hübscher, U. Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Exp. Physiol.* 85, 589–601 (2000).
25. Kanduđer, M., Miklavčič, D., Kanduđer, M., Vorobiev, E. & Lebovka, N. Electroporation in Biological Cell and Tissue: An Overview. En: *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*. New York: Springer (2009).
26. Chen, C., Smye, A. S. W., Robinson, A. M. P. & Evans, J. A. Membrane electroporation theories: a review. *Med. Bio. Eng. Comput.* 44, 5 (2006).
27. Gehl, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol. Scand.* 177, 437–447 (2003).
28. Kaneko, T., Sakuma, T., Yamamoto, T. & Mashimo, T. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci. Rep.* 4, 6382 (2015).
29. Hashimoto, M. & Takemoto, T. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci. Rep.* 5, 11315 (2015).
30. Qin, W. *et al.* Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Mice by Zygote Electroporation of Nuclease. *Genetics* 200, 423–430 (2015).
31. Cieslak, M., Reissmann, M., Hofreiter, M. & Ludwig, A. Colours of domestication. *Biol. Rev.* 86, 885–899 (2011).
32. Wang, N. & Hebert, D. N. Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. *Pigment Cell Res.* 19, 3–18 (2006).
33. Silvers, W. K. *The Coat Colors of Mice. A Model for Mammalian Gene Action and Interaction*. 1^a ed. New York: Springer (1979).
34. Griffiths, A. F., Miller, J. H. & Suzuki, D. T. *An Introduction to Genetic Analysis*. 7^a ed. New York: W. H. Freeman (2000).
35. Porter, S. & Mintz, B. Multiple alternatively spliced transcripts of the mouse tyrosinase-encoding gene. *Gene* 97, 277–82 (1991).
36. Kim, Y. H. *et al.* Identification and characterization of the tyrosinase gene (TYR) and its transcript variants (TYR_1 and TYR_2) in the crab-eating macaque (*Macaca fascicularis*). *Gene* 630, 21–27 (2017).
37. Yen, S. T. *et al.* Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Dev. Biol.* 393, 3–9 (2014).
38. Oliveros, J. C. *et al.* Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Res.* 44, 267–71 (2016).
39. García-Tuñón, I. *et al.* Splice donor site sgRNAs enhance CRISPR/Cas9-mediated knockout efficiency. *PLoS One* 14, 5 (2019).
40. Vuelta Ramos, E. *Evaluación de la eficiencia en la generación de alelos KO mediante edición genómica dirigida a los sitios de proesamiento intrónico*. Trabajo Fin de Máster en Biología Celular y Molecular. Universidad de Salamanca (2018).
41. Nakagata, N. *Técnicas de Ingeniería Reproductiva del Ratón. Manual Técnico*. 3^a ed. Tokyo: Cosmo Bio Co (2015).
42. Modzelewski, A. J. *et al.* Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. *Nat. Protoc.* 13, 1253–1274 (2018).
43. Mamrot, J., Pangestu, M., Walker, D., Gardner, D. K. & Dickinson, H. Confirmed dioestrus in pseudopregnant mice using vaginal exfoliative cytology improves embryo transfer implantation rate. *Reprod. Biomed. Online* 31, 538–543 (2015).
44. Potter, H. & Heller, R. Transfection by electroporation. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 92, 9-3 (2010).
45. Ménoret, S. *et al.* Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Sci. Rep.* 7, 14410 (2015).