



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

“Rol de Tgfbr3 en el desarrollo del pez cebra y la mineralización de la notocorda”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

**Tonatiuh Molina Villa**

TUTOR PRINCIPAL

**Fernando López Casillas**

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Diana Escalante Alcalde**

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**José Vázquez Prado**

Departamento de Farmacología, CINVESTAV

Ciudad de México. Septiembre, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos Académicos**

Al Dr. Fernando López Casillas por la oportunidad de realizar esta investigación en su laboratorio bajo su tutoría. Por su apoyo, consejos y guía durante todo el doctorado. Este proyecto fue apoyado por los donativos de CONACYT (No. 131226) y PAEP.

A mi comité tutorial, Dra. Diana Escalante Alcalde y Dr. José Vázquez Prado, por las observaciones y consejos para la mejora de mi proyecto.

A mi jurado de examen por sus observaciones y correcciones a mi tesis.

Al Médico Valentín Mendoza Rodríguez, por sus enseñanzas, consejos y ayuda brindada en la realización de todos mis experimentos.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado, a través del Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. Número de CVU y Beca 443511/270250

A PAEP por el apoyo otorgado para la asistencia a congresos.

A los miembros de la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por los servicios y equipo prestados: Dra. Laura Ongay Larios, Biól. Ma. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera

A los miembros de la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM: Dra. Ruth Rincón Heredia y Dr. Abraham Rosas Arellano por sus consejos y ayuda en la toma y análisis de imágenes.

A la M. C. Sandra Daniela Rodríguez Montaña de la Unidad de Histología del IFC, UNAM por el apoyo en la obtención y tinción de muestras para histología.

## Resumen

La familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) controla diversos procesos celulares como la muerte celular, la proliferación y la migración. Los ligandos de TGF $\beta$  señalizan a través de dos tipos distintos de receptores, y para las isoformas de TGF $\beta$  existen dos co-receptores, Endogлина y Betaglicano (TGFBR3). TGFBR3 es un proteoglicano membranal con una secuencia intracelular corta que carece de un dominio de señalización funcional y una gran porción extracelular con dos dominios de unión a ligando capaces de unirse a las tres isoformas de TGF $\beta$ , inhibina A y BMP2/4. TGFBR3 tiene dos sitios de unión para cadenas de Glicosaminoglicanos (GAGs) de heparán y condroitin sulfato, que no son esenciales para la señalización del TGF $\beta$  pero que pueden unir y modular las vías de bFGF y Wnt. La presencia de TGFBR3 en las células aumenta la unión de los ligandos de TGF $\beta$  a su receptor de tipo II, un efecto especialmente notable para la isoforma TGF $\beta$ 2. La eliminación de TGFBR3 en ratones resulta en un fenotipo letal durante el estadio embrionario a causa de defectos en el corazón, el hígado, el riñón, el paladar y la pituitaria; y la eliminación de Tgfbr3 mediada por morfolino (KD) en el pez cebra causa defectos en la migración de los vasos intersegmentarios (ISV).

Con el objetivo de investigar más a fondo el papel de Tgfbr3 durante el desarrollo del pez cebra, describimos extensamente el patrón de expresión de Tgfbr3 durante el desarrollo embrionario del pez cebra. Mediante inmunodetección, observamos la expresión de Tgfbr3 en el mesodermo paraxial y células de la cresta neural antes de las 24 horas post fecundación, y más tarde en el desarrollo observamos su expresión en la vesícula ótica, el corazón, células de la capa interna y externa de la notocorda, las fibras musculares de las somitas, las aletas pectorales, el pronefros, la glándula interrenal y las células mesenquimales que rodean el intestino y el cerebro. Usando el sistema CRISPR-Cas9 generamos una línea de peces cebra carentes de Tgfbr3, la cual no presentó un fenotipo letal ni defectos evidentes. Mediante qPCR y AFLIP, descartamos una compensación genética desencadenada por la degradación del mRNA mutante. Haciendo uso de

la línea transgénica *Tg(fli1:EGFP)* mostramos que el desarrollo de los vasos intersegmentales (ISV) y los vasos coronarios del corazón no se afectó en el fondo mutante de *tgfbr3*, lo que sugiere que la función de *Tgfbr3* no es necesaria para la angiogénesis durante el desarrollo del pez cebra.

Anteriormente se describió la reducción en el tamaño de la cabeza de los embriones de la línea de ratones carentes de TGFBR3 (*Tgfbr3<sup>tm1Stv</sup>*), y defectos craneofaciales en embriones de las líneas carentes de TGFB2 (*Tgfb2<sup>tm1Doe</sup>*) y TGFB3 (*Tgfb3<sup>tm2(Tgfb1)Vk</sup>*). En experimentos de tinción de cartílago y hueso no encontramos diferencias craneofaciales entre los embriones de pez cebra carentes de *Tgfbr3* y los embriones silvestres, pero observamos un número menor de segmentos mineralizados en la notocorda de los embriones mutantes. La fuente inicial de la mineralización de la notocorda son los segmentos llamados cordocentra, conformados por células de la capa exterior de la notocorda, las cuales expresan al *Tgfbr3*. Para estudiar el papel de TGF $\beta$  y *Tgfbr3* en la mineralización de la notocorda, realizamos experimentos de Western blot, inmunodetección, qPCR e inhibición farmacológica de la vía del TGF $\beta$ . Los experimentos mostraron que la señalización del TGF $\beta$  (pSmad3) se activa en los segmentos mineralizados pero no en los segmentos intercalados y que los embriones carentes del *Tgfbr3* tienen una señalización del TGF $\beta$  alterada. Mecanísticamente, descubrimos que *Tgfbr3* regula al alza la señalización canónica de TGF $\beta$  en el cordocentra, la cual se requiere para la mineralización de la cordocentra, lo que contribuye positivamente a la morfogénesis de las vértebras.

## Summary

The Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) family controls multiple cellular processes such as cell death, proliferation, and migration. The ligands of TGF $\beta$  signal through two distinct types of receptors, but for TGF $\beta$  isoforms exist two co-receptors, Endoglin and Betaglycan (TGFBR3). TGFBR3 is a bound-membrane proteoglycan with a short intracellular sequence lacking a functional signaling domain and a large extracellular portion with two independent ligand binding domains capable of binding the three isoforms of TGF $\beta$ , Inhibin A, and BMP2/4. TGFBR3 has two attachment sites to Glycosaminoglycan heparan sulfate and chondroitin sulfate, which are not essential to TGF $\beta$  signaling but can bind and modulate bFGF and Wnt pathways. The presence of TGFBR3 in cells increased the binding of TGF $\beta$  ligands to its type II receptor, an effect especially noticeable for the TGF $\beta$ 2 isoform. TGFBR3 knockout in mice exhibited an embryonic lethal phenotype owing to heart, liver, nephron, palate, and pituitary defects, and morpholino-mediated *Tgfb3* knockdown (KD) in zebrafish caused defects in intersegmental vessels (ISV) migration.

To further investigate the role of *Tgfb3* during zebrafish development we carried out an extensive description of the *Tgfb3* expression pattern in zebrafish's early development. By immunostaining, we described *Tgfb3* expression in paraxial mesoderm and neural crest cells before 24 hours post fertilization, to later be expressed in the otic vesicle, heart's myocardial wall, the notochord's inner and outer sheath layer cells, somite's muscle fibers, pectoral fin, pronephros, interrenal gland, and mesenchymal cells surrounding the intestine and the brain. We generated by CRISPR-Cas9 a *tgfb3*-null zebrafish that did not present a lethal phenotype or evident defects. By qPCR and AFLIP we showed no genetic compensation triggered by mRNA nonsense decay or haploinsufficiency in mutant embryos. We used a *Tg(fli1:EGFP)* line to show that the ISV development and the coronary vasculature array in the ventricle were unaffected in the *tgfb3*-null mutant background, as our mutant did not phenocopy morphant angiogenic defects,

indicating that *Tgfbr3* function is not necessary for angiogenesis in zebrafish development.

Head size reduction in *Tgfbr3*<sup>tm1Stv</sup> mouse embryos and craniofacial defects in *Tgfb2*<sup>tm1Doe</sup> and *Tgfb3*<sup>tm2(Tgfb1)Vk</sup> mouse mutants have been described before. We did not find craniofacial differences between wild-type and mutant embryos in cartilage and bone staining experiments, but we observed a lesser number of mineralized notochordal segments in *tgfbr3*-null embryos. The initial source of bone mineralized matrix are notochordal segments called chordacentra, which are calcified rings formed by its outer sheath layer cells, where *Tgfbr3* is highly expressed. To further study the role of TGFβ and *Tgfbr3* in notochord mineralization, we performed Western blot experiments, immunostaining, qPCR, and pharmacological inhibition of TGFβ signaling. We found TGFβ signaling (pSmad3) is activated in mineralized segments but not in the intercalated segments and *tgfbr3*-mutant embryos have altered TGFβ signaling. Mechanistically, we found *Tgfbr3* upregulates TGFβ canonical signaling in the chordacentra, which is required for the correct timing of chordacentra mineralization, thereby positively contributing to vertebrae notochord morphogenesis.

## Índice.

Índice de Figuras	I
Abreviaturas	II
1. Introducción	1
1.1. La Familia del TGF- $\beta$	1
1.2. Receptor tipo III de TGF- $\beta$ (TGFBR3) o Betaglicano (BG)	4
1.3. Expresión y función de TGFBR3 durante el desarrollo embrionario	7
2. Antecedentes Específicos	11
3. Hipótesis	14
4. Objetivo General	14
5. Objetivos Particulares	14
6. Métodos	15
6.1. Generación de la línea mutante de <i>tgfbr3</i>	15
6.2. Genotipificación	16
6.3. Inmunohistoquímica	18
6.4. Inmunofluorescencia	18
6.5. Tinción de Cartílago y Hueso	19
6.6. Tratamiento Farmacológico	20
6.7. RT-PCR cuantitativa	21
6.8. Western blot	22
6.9. Microinyección de morfolidos	22
6.10. Imagen y microscopía	22
6.11. AFLIP	23
6.12. Infarto al miocardio por criolesión	23
6.13. Estadística	23
7. Resultados	25
7.1. <i>Tgfbr3</i> se expresa en células derivadas del mesodermo y la cresta neural	25
7.2. <i>Tgfbr3</i> no es esencial para el desarrollo del pez cebra	33

7.3. Los embriones mutantes de pez cebra no fenocopia los defectos de embriones morfantes de pez cebra o de embriones mutantes de ratón	36
7.4. <i>Tgfbr3</i> participa en el desarrollo de la notocorda	40
7.5. La vía de TGF $\beta$ está alterada en las larvas mutantes de <i>tgfbr3</i>	41
8. Discusión	47
9. Conclusiones	52
10. Perspectivas	53
11. Bibliografía	54
12. Anexos	64

## Índice de Figuras

**Figura 1. Ligandos, Receptores y Señalización de la superfamilia de TGF- $\beta$ .**

**Figura 2. Esquema de la estructura y homología de los co-receptores del TGF- $\beta$ .**

**Figura 3. Mecanismo de presentación de ligando del TGFBR3**

**Figura 4. Expresión del ARNm de betaglicano en ratón y pollo**

**Figura 5. El receptor Tgfb3 en el pez cebra**

**Figura 6. Esquema de la creación y segregación de los alelos nulos para Tgfb3**

**Figura 7. Métodos de genotipificación para las líneas mutantes**

**Figura 8. Expresión general de Tgfb3 durante el desarrollo embrionario del pez cebra**

**Figura 9. Tgfb3 se expresa fuertemente en el tronco del embrión**

**Figura 10. Tgfb3 se expresa en el corazón**

**Figura 11. Expresión de Tgfb3 en el pronefros, la vesícula ótica y las aletas pectorales**

**Figura 12. Expresión de Tgfb3 en la cabeza del embrión**

**Figura 13. Las líneas mutantes nulas de zebrafish para *tgfb3* sobreviven hasta la adultez**

**Figura 14. Embriones mutantes nulos para Tgfb3 no muestran defectos angiogénicos**

**Figura 15. Los corazones adultos de peces mutantes no presentan defectos en los vasos coronarios o su capacidad de regeneración**

**Figura 16. Los embriones nulos para Tgfb $\beta$ 3 presentan un retraso en la mineralización de la notocorda**

**Figura 17. TGF $\beta$  participa en la mineralización de la cordocentra**

## Abreviaturas

°C - Grados Centígrados

aa. - Aminoácidos

AFLIP - Affinity Labeling and Immunoprecipitation

mRNA - Ácido ribonucleico mensajero

BG - Betaglicano

C-terminal - Carboxilo terminal

cDNA - Ácido desoxiribonucleico complementario

cm - Centímetro

GAG – Glicosaminoglicanos

Gbp - Giga pares de bases

h - Horas

hpf - Horas post-fertilización

kDa - Kilodaltons

L - Litros

mg - Miligramos

min – Minutos

ml - Mililitros

mM - Milimolar

N-terminal - Amino terminal

ng - nanogramos

ON - overnight

pb - Pares de bases

PCR - Reacción de la cadena de la polimerasa

qRT-PCR- Reacción de la cadena de la polimerasa con Transcripción reversa cuantitativa

RT-PCR - Reacción de la cadena de la polimerasa con Transcripción reversa

TA - Temperatura ambiente

TGF-  $\beta$  - Transforming Growth Factor  $\beta$

Tgfr3 - Transforming Growth Factor  $\beta$  receptor type 3

V - Volts

WB - Western blot

WT - Wildtype

$\mu\text{g}$  - Microgramos

$\mu\text{l}$  - Microlitros

## 1. Introducción.

### 1.1 La familia de TGF- $\beta$ .

La familia del TGF- $\beta$  (del inglés: **T**ransforming **G**rowth **F**actor  **$\beta$** ) es un grupo de factores de crecimiento relacionados estructuralmente, que incluye a los factores de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ 's), Activinas, Inhibinas, Proteínas Morfogenéticas del Hueso (BMP's) y los Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDF's). La familia del TGF- $\beta$  fue identificada principalmente, a través de sus roles en el desarrollo embrionario, donde regulan el establecimiento del plano corporal y la diferenciación tisular <sup>1</sup>. Los miembros de la familia controlan múltiples procesos como la proliferación celular, migración, diferenciación, la respuesta inmune y la embriogénesis <sup>2,3</sup>.

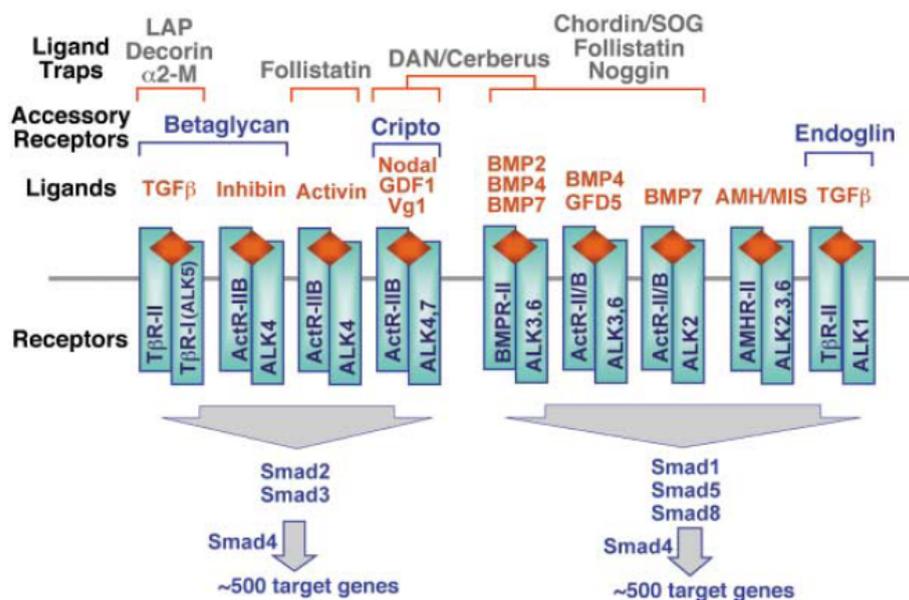
La familia del TGF- $\beta$  se divide en tres subfamilias; TGF- $\beta$ , Activina y la BMP/GDF; agrupadas por su filogenia y las vías de señalización específicas que activan <sup>4,5</sup>. La familia del TGF- $\beta$  está conformada por 33 miembros en humanos, 7 en *Drosophila melanogaster* y 5 en *Caenorhabditis elegans* <sup>5</sup>. Los diferentes miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  son inicialmente sintetizados como largas moléculas precursoras con una secuencia señal amino-terminal que dirige a la molécula precursora a la vía secretoria y un pro-dominio variable que quizás asista en el plegamiento, dimerización y regulación de la actividad del factor. La proteína precursora es usualmente cortada en un sitio dibásico o RXXR para liberar un segmento carboxilo-terminal de 110-140 aminoácidos con siete residuos de cisteína característicos de esta región casi invariantes en varios miembros de la superfamilia <sup>6</sup>.

La molécula de señalización activa está compuesta de homodímeros o heterodímeros de segmentos carboxilos terminal <sup>6</sup>, y en la mayoría de los casos, éstos dímeros están estabilizados por interacciones hidrofóbicas, que se ven reforzadas por un puente disulfuro entre las dos subunidades <sup>7</sup>.

La subfamilia de TGF- $\beta$  está formada por 3 isoformas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, las cuales tienen una identidad en la estructura primaria de sus monómeros maduros del 70-80% <sup>8</sup>. Los precursores de las isoformas del TGF- $\beta$  constan de una

señal precursora en el extremo amino, un pre segmento LAP (Latency-associated polypeptide) y un polipéptido de 112 a.a. en el extremo carboxilo terminal que constituye el monómero maduro. Un corte proteolítico por la proteasa furina libera al monómero maduro del LAP.

El polipéptido maduro de las isoformas del TGF- $\beta$  cuenta con nueve cisteínas, ocho de las cuales están apareadas. Las ocho cisteínas forman puentes disulfuro intramoleculares que en conjunto constituyen un nudo de cisteínas, mientras que la novena restante forma parte del enlace de cisteína intermolecular que media la dimerización; a su vez, cada monómero contiene cuatro láminas  $\beta$  antiparalelas y una hélice  $\alpha$  larga separada <sup>9</sup>. La secuencia de aminoácidos entre la cisteína cinco y seis, la más divergente entre las isoformas de TGF- $\beta$ , queda expuesta en la superficie de la proteína y puede tener un papel importante en la determinación de la especificidad del reconocimiento ligando-receptor.



**Figura 1. Ligandos, Receptores y Señalización de la superfamilia de TGF- $\beta$ .** Relación esquemática de los diferentes ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$  con atrapa ligandos, receptores accesorios y sus receptores tipo I y tipo II en vertebrados (Tomado de: Shi and Massague, 2003).

Las citocinas de TGF- $\beta$  son liberadas de las células como dímeros unidos a sus pre segmentos de forma no covalente, lo que impide que TGF- $\beta$  active a sus receptores,

por lo que se dice que lo mantienen en un estado inactivo o “latente”. Estos complejos “latentes” están normalmente unidos a alguna de las proteínas asociadas a TGF- $\beta$ , como la proteína LTBP-1 (Latent TGF- $\beta$  binding protein) <sup>10</sup>. La activación de TGF- $\beta$  ocurre a través de actividad proteolítica, principalmente por la acción de la trombospondina 1 y secundariamente por la acción de la integrina  $\alpha_v\beta_6$  <sup>11,12</sup>, aunque también proteasas como la plasmina, las catepsinas y las metaloproteasas de matriz 9 y 2 participan en el proceso de activación de TGF- $\beta$ .

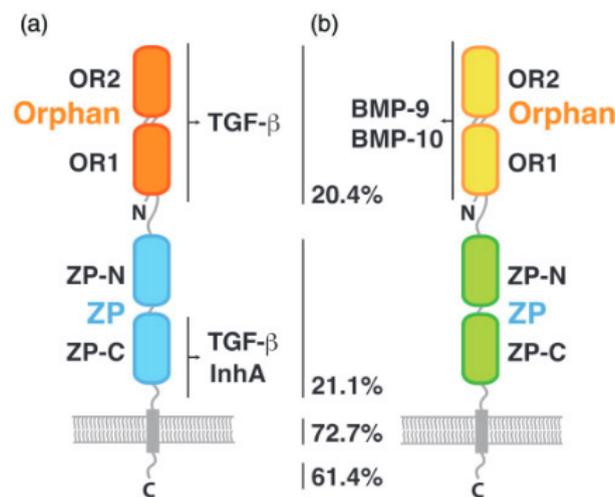
TGF- $\beta$  y en general todos los miembros de la superfamilia, inician la cascada de señalización a través de su unión a los receptores serin/treonin cinasas tipo I y tipo II. La familia de receptores serin/treonin quinasa comprende 12 miembros dentro del genoma humano; 7 para el tipo I y 5 para el tipo II, todos ellos involucrados en la señalización de la familia de TGF- $\beta$ . Ambos tipos de receptores consisten en general de aproximadamente 500 aminoácidos, organizados secuencialmente en un N-terminal extracelular, que a su vez es el dominio de unión al ligando; una región transmembranal y un dominio C-terminal serin/treonin quinasa <sup>4</sup>.

El ligando de TGF- $\beta$  presente de forma homodimérica, unido por un puente disulfuro, se ensambla al receptor tipo II promoviendo su asociación con el receptor tipo I en un complejo receptor hetero-tetramérico. Esto permite al receptor tipo II, constitutivamente activo, fosforilar y activar el dominio cinasa del receptor I, el cual propaga la señal a través de la fosforilación de las proteínas Smad. Existen 8 diferentes proteínas Smad, constituyendo tres clases funcionales: las Smad reguladas por receptor (R-Smad), las Smad Co-mediadoras (Co-Smad) y las Smad inhibitoras (I-Smad). Las R-Smad (1,2,3,5,8) son directamente fosforiladas y activadas por el receptor tipo I, formando homodímeros y posteriormente heterotrímeros con la Co-Smad (Smad 4) <sup>1,4</sup>. Los complejos Smad son translocados al núcleo y al unirse con co-activadores o co-represores, regulan la transcripción de sus genes blanco (Figura 1). Las proteínas Smads se unen directamente al ADN a través de su dominio MH2, aunque débilmente, por lo que dependen de los co-activadores o co-represores para ejercer sus efectos transcripcionales. Estos acoplamientos junto con sus variaciones de una célula a otra determinan la función celular y contexto-dependiente característica de las señales de los ligandos de la familia <sup>13,14</sup>.

Las I-Smad, Smad 6 y 7, regulan negativamente la señal de TGF- $\beta$  al competir con las R-Smad por el receptor o la Co-Smad y por unión al receptor para dirigirlo a su degradación <sup>1</sup>.

### 1.2 Receptor tipo III de TGF- $\beta$ (TGFB3) o Betaglicano (BG).

Contrario al gran número de ligandos de la familia del TGF $\beta$  en humanos, existen pocos receptores tipo I que solo se unen y activan dos clases de R-Smads 1,5 y 8 o 2 y 3. La mayoría de los ligandos de la subfamilia BMP/GDF se unen a receptores tipo I que activan Smads 1, 5 y 8 mientras que los ligandos de Activina y TGF- $\beta$  se unen a receptores que activan Smads 2 y 3. Esto dificulta explicar la diversidad de funciones de los 33 ligandos de la familia del TGF- $\beta$ , por lo que existen diversos mecanismos que diferencian sus funciones *in vivo*. Entre los más importantes está la presencia de proteínas solubles o ancladas de membrana que unen ligandos específicos para antagonizar o potenciar el ensamblaje del complejo receptor y su señalización <sup>15</sup>.



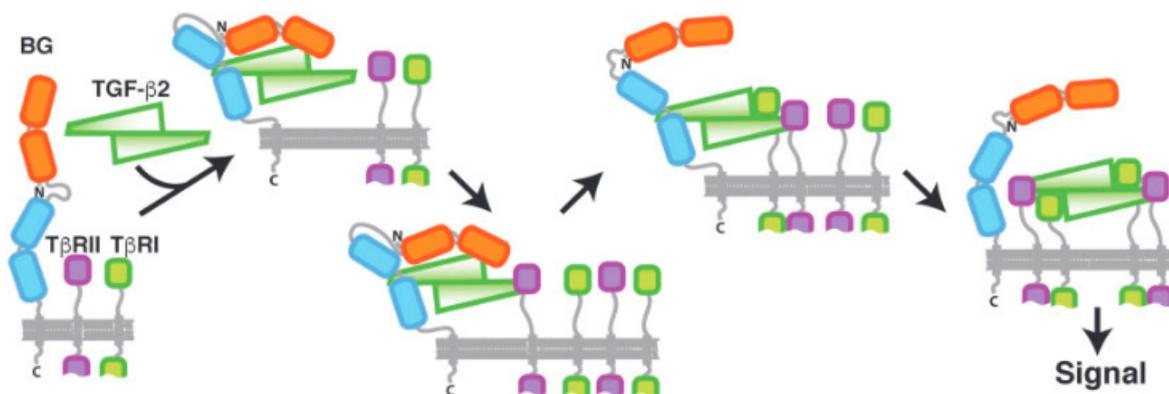
**Figura 2. Esquema de la estructura y homología de los co-receptores del TGF- $\beta$ .** (a) Receptor tipo III o Betaglicano (b) Endogлина. Ambos receptores tienen una estructura altamente homóloga, tienen un dominio intracelular corto, un único pase transmembranal y un ectodominio que se conforma por un dominio huérfano (Orphan) y un dominio ZP. En la figura se muestran los porcentajes de homología entre cada dominio de los receptores y se indica el dominio de unión para sus ligandos. (Tomado de Kim, S.K. *et al.* 2019)

En la subfamilia de TGF- $\beta$  existen dos glicoproteínas transmembranales que funcionan como co-receptores, Betaglicano y Endogлина. Ambos fueron descubiertos por su afinidad a TGF- $\beta$ 1, pero al contrario de Endogлина que es un dímero y se expresa casi exclusivamente en células endoteliales vasculares, Betaglicano se encuentra como monómero y se expresa en una gran variedad de células. Ambos receptores tienen la misma estructura general, un péptido señal, un ectodominio, una única hélice transmembranal y una cola citoplasmática corta (Figura 2). La comparación de la secuencia de aminoácidos de estas glicoproteínas muestra una alta homología en toda la secuencia, con la mayor identidad en sus dominios transmembranales (73%) y citoplasmático (61%) y la más baja en las porciones N-terminal y C-terminal de ectodominio (20-21%). Ambos receptores pueden ser sujetos a corte proteolítico, por lo que pueden estar en forma soluble o unidos a la membrana plasmática <sup>16,17</sup>.

Betaglicano, también conocido como Receptor tipo III de TGF- $\beta$  (TGFBR3), está codificado por un gen único en el cromosoma 1 de humanos, expresado como un mRNA de 7000 nucleótidos que traduce una proteína de 851 aminoácidos <sup>18</sup>. TGFBR3 une las 3 isoformas de TGF- $\beta$  con alta afinidad, con una preferencia por la isoforma TGF- $\beta$ 2, que se une al receptor tipo II con una afinidad 200-500 veces menor a la de las isoformas 1 y 2 <sup>19,20</sup>. Debido a la gran afinidad de TGFBR3 por las isoformas de TGF- $\beta$  y porque potencia la respuesta celular a TGF- $\beta$ 2 de 100-500 veces comparado con células que no lo expresan, se le atribuye el rol de co-receptor, el cual es un receptor de superficie celular que potencia el ensamblaje del complejo de señalización pero no participa directamente en la transducción de la señal <sup>16,21</sup> (Figura 3).

TGFBR3 también es capaz de unir la subunidad  $\alpha$  del heterodímero de inhibina A, potenciando su habilidad para antagonizar la señal de activina A y con esto la producción de la hormona folículo estimulante  $\beta$  <sup>22-24</sup>. El antagonismo de TGFBR3 deriva de su habilidad de potenciar la unión del receptor tipo II o IIB de activina a la subunidad  $\beta$  de inhibina A, de esta forma secuestrando el receptor tipo II de activina en un complejo incapaz de reclutar al receptor tipo I <sup>24</sup>. También se ha demostrado que TGFBR3 une varios ligandos de BMP y GDF, incluyendo BMP-2, BMP-4 y GDF-5, e influye en su señalización aunque solo se ha estudiado en cultivos celulares <sup>25</sup>.

El ectodominio del TGFBR3 cuenta con dos sitios de unión de glicosaminoglicanos (GAG), heparan y condroitin sulfato, localizadas en Ser 535 y Ser 546. Estas cadenas de GAG no son esenciales para la unión de TGF- $\beta$  pero podrían mediar la unión de otra clase de ligandos como el Factor de Crecimiento Fibroblástico, Wnt o Lactoferrina, y contribuir así a las funciones de TGFBR3<sup>26,27,28</sup>. Por otro lado su ectodominio puede ser liberado de la membrana por corte proteolítico cerca del dominio transmembranal, lo que genera un forma soluble del receptor de 120 kDa, que se encuentra en la leche, suero y la matriz extracelular. La forma soluble puede secuestrar a los ligandos de su receptor, antagonizando su señalización <sup>26</sup>.



**Figura 3. Mecanismo de presentación de ligando del TGFBR3.** Con base en experimentos bioquímicos se ha propuesto que TGFBR3 potencia la señalización del TGF- $\beta$  a través de un mecanismo de traspaso. Primero el ligando se une a TGFBR3 (BG) con gran afinidad potenciando el reclutamiento de T $\beta$ RII. La unión del receptor tipo II promueve el reclutamiento y la unión de T $\beta$ RI, el desplazamiento del receptor TGFBR3 y el ensamblado del complejo de señalización heterotetramérico. (Tomado de Kim, S.K. *et al.* 2019)

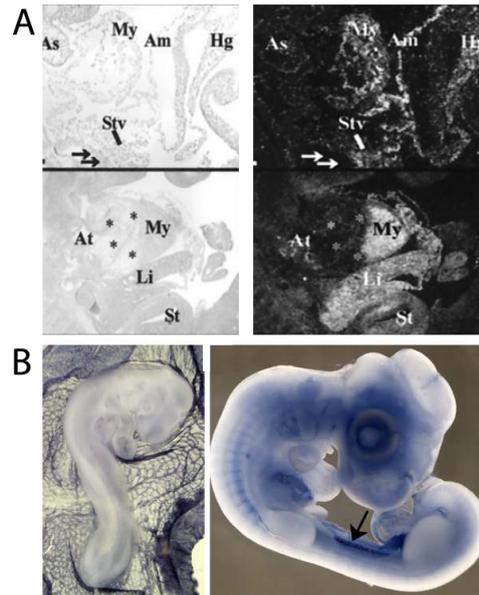
La región citoplasmática de TGFBR3 es corta y no exhibe una actividad de cinasa ni es requerida para la unión de los ligandos al ectodominio <sup>16</sup>, sin embargo, la secuencia de esta región está altamente conservada entre especies. Dentro de la secuencia de este dominio se han identificado sitios que permiten la asociación con proteínas adaptadoras. Las arrestinas fueron originalmente identificadas como reguladoras de los receptores acoplados a proteínas G a través de fomentar su internalización y desensibilización <sup>29</sup>.  $\beta$ -arrestina 2 se une a TGFBR3 en una

secuencia rica en serinas y treoninas de su dominio intracelular y requiere de la fosforilación de la treonina 841 por el receptor tipo II <sup>30,31</sup>. La interacción entre  $\beta$ -arrestina 2 y TGFBR3 es independiente de ligando y como resultado de esta asociación el complejo TGFBR3-TGF $\beta$ 2 es internalizado provocando la disminución de la señalización de la vía del TGF $\beta$  <sup>30,31</sup>. Además, los últimos 3 aminoácidos (aa) del carboxilo terminal de TGFBR3 forman un motivo de unión PDZ clase I y se ha demostrado que une a la proteína GIPC (GAIP-interacting protein C-terminus) provocando la estabilización del receptor en la membrana y así incrementando la sensibilidad de las células a TGF $\beta$  <sup>32</sup>.

### **1.3 Expresión y función de TGFBR3 durante el desarrollo embrionario.**

Para estudiar la función de una proteína durante el proceso de desarrollo de los organismos, es importante determinar su expresión espacio-temporal. Estudios en el ratón, muestran que *Tgfbr3* se expresa homogeneamente en todo el embrión al inicio de la gestación, y a partir del estadio E8.5 se detecta una expresión localizada de *Tgfbr3* en los cardiomiocitos trabeculares del ventrículo en desarrollo y no en aquellos subepicardiales. Para el estadio E9.5, *Tgfbr3* se expresa en el *septum transversum* que rodea el endodermo hepático presuntivo, y para los estadios E10.5 y E11.5 *Tgfbr3* aumenta sus niveles de expresión en la mayoría de los tipos celulares del hígado <sup>33</sup>. Otro estudio describe que *Tgfbr3* se expresa también en células cardíacas que sufren una transformación epitelio-mesenquimal <sup>34</sup>.

Estudios en embriones de pollo muestran que *Tgfbr3* se expresa débilmente a partir de los estadios 4-6 en el mesodermo extraembrionario, y a inicios de los estadios 5-6 el transcrito de *Tgfbr3* se detecta en células endodermales del vitelo extraembrionario. Entre los estadios 8-12 la expresión de BG es evidente en las células embrionarias y extraembrionarias laterales, y en el endodermo extraembrionario, así como, en el piso del intestino anterior a inicios del estadio 9. En estadios más tardíos (15-26) *Tgfbr3* se detecta en niveles moderados en el endocardio y robustamente en células endoteliales de la vasculatura extraembrionaria, el hígado y el mesonefros <sup>35</sup>.



**Figura 4. Expresión del ARNm de betaglicano en ratón y pollo.** **A:** Expresión del RNAm de betaglicano en el corazón de ratón durante los estadios E.9.5 (panel superior) y E11.5 (panel inferior). Se observa la expresión del transcrito principalmente en el miocardio (My), hígado (Li), estómago (St) **B:** Expresión del mRNA de betaglicano en embriones de pollo en los estadios 14 (panel izquierdo) y 26 (panel derecho). La señal se observa en el tejido extraembrionario y el pronefros (flecha). (Modificado de: Stenvers *et al.*, 2003; Cooley *et al.*, 2014).

Otro estudio en pollo muestra que TGFBR3 se expresa en el riñón, principalmente en el mesodermo mesonefrogénico, glomérulos presuntivos y células epiteliales parietales de las nefronas. A partir del estadio 16, en el sistema nervioso, TGFBR3 se expresa en la parte torácica del tubo neural, en las células que rodean las fibras nerviosas de las neuronas motoras y en los pares craneales. Entre los estadios 14 y 26 TGFBR3 se expresa en el mesodermo lateral, intermedio y paraxial, células mesenquimales y en el endodermo presuntivo de pulmón <sup>36</sup>.

En las gónadas de ratón *Tgfb3* se expresa en poblaciones celulares somáticas, y actúa en conjunto con inhibina para controlar la producción de la hormona folículo estimulante  $\beta$  (FSH) <sup>37,38</sup>. Similar al ovario, *Tgfb3* se expresa en células de Sertoli y de Leydig donde participa con activinas y TGF $\beta$ s para la disminución en la producción de andrógenos. Así también, se ha descrito que *Tgfb3* es esencial para

el desarrollo normal de testículos en el humano y en el ratón, principalmente en células somáticas durante la gonadogénesis temprana <sup>39</sup>.

En el humano *Tgfb3* se expresa en etapa adulta en gónadas, glándulas suprarrenales, algunas regiones del cerebro (glándula pituitaria) y hasta en sincitiotrofoblastos <sup>39</sup>. Existe evidencia de que betaglicano es requerido por inhibina para actuar en células gonadotróficas. Inhibina antagoniza la producción de FSH por la glándula pituitaria y la ausencia de TGFBR3 demuestra su importancia dentro de la regulación del eje hormonal reproductivo <sup>40</sup>.

Un paso importante para el estudio de TGFBR3 *in vivo* fue el desarrollo de ratones carentes de este receptor. Stenvers y colaboradores demostraron que al contrario de lo que se pensaba sobre la función de TGFBR3 como receptor accesorio, y no fundamental para la fisiología celular, los embriones carentes del receptor presentaban un fenotipo letal al estadio 16.5 del desarrollo embrionario. Los embriones nulos para TGFBR3 (*Tgfb3<sup>tm1Stv</sup>*) tienen defectos en la proliferación cardíaca y apoptosis del hígado; con disrupción de la eritropoyesis como efecto secundario de la apoptosis hepática, paredes miocárdicas delgadas y defectos en el septum <sup>33</sup>. Otro estudio mostró que el ratón carente de TGFBR3 también presenta una disrupción en la diferenciación de las células de Leydig, con una reducción en la expresión de múltiples genes involucrados en el desarrollo de células somáticas y la esteroidogénesis <sup>38</sup>.

Experimentos *in vitro* con fibroblastos cardíacos derivados del ratón knockout mostraron que estas células presentaban una sensibilidad reducida a TGFβ2 en términos de inhibición del crecimiento, activación de genes reporteros y localización nuclear de Smad2 <sup>33</sup>. Sin embargo, al comparar los fenotipos del ratón carente de TGFBR3 y ratón carente de TGFβ2 los fenotipos no se sobrelapan como se pensaría, considerando que el betaglicano es el potenciador del TGFβ2. El ratón knock out para TGFβ2 presenta defectos craneofaciales, esqueléticos, en el desarrollo de los ojos, oídos y el tracto urinario, sin defectos en el hígado <sup>41</sup> (Ver tabla 1). Los dos fenotipos sólo coinciden en la presencia de defectos cardíacos, lo que sugiere que la función de betaglicano no se limita a la señal de TGFβ2, y podría estar participando en otros procesos del desarrollo embrionario.

Especie	Gene	Fenotipo	Defectos	Referencia
Ratón	TGF-β1	Letalidad posnatal (4 semanas)	Inflamación multifocal, defectos en hematopoyesis y vasculogénesis del saco vitelino.	(Shull et al., 1992; Kulkarni et al., 1993; Dickson et al., 1995)
	TGF-β2	Letalidad embrionaria	Cianosis. Malformaciones en ojo, columna espinal, oído interno, corazón, pulmón, extremidades, urogenitales y craneofaciales.	(Sanford et al., 1997)
	TGF-β3	Letalidad posnatal (24h)	Defectos en palatogenesis y retraso en desarrollo y maduración de los pulmones	(Kaartinen et al., 1995)
	TGFβR-II	Letal (E10.5)	Defectos en hematopoyesis y vasculogénesis del saco vitelino.	(Oshima et al., 1996)
	TGFβR-III	Letal (E13.5)	Defectos de proliferación en corazón y apoptosis en hígado	(Stenvers et al., 2003; Compton et al., 2007)
Pez cebra	TGF-β3	No letal	Defectos en la condrogénesis craneofacial. Malformaciones en los cartílagos del arco faríngeo y neurocraneal.	(Cheah et al., 2010)

**Tabla 1. Fenotipos de los modelos deficientes en ligandos y receptores de la subfamilia de TGFβ.** Modificado de: (Dunker and Krieglstein, 2000)

La obtención del ratón *Tgfb3<sup>tm1Stv</sup>* demostró la importancia de TGFBR3 en etapas tempranas del desarrollo; y se ha determinado su función relativa a ciertas clases de ligandos. Sin embargo, debido a su unión a múltiples ligandos y su complejo modo de acción, el mecanismo exacto por el cual el TGFBR3 actúa en situaciones fisiológicas, sus implicaciones en la biología de TGFβ y principalmente en el desarrollo embrionario son todavía poco entendidas.

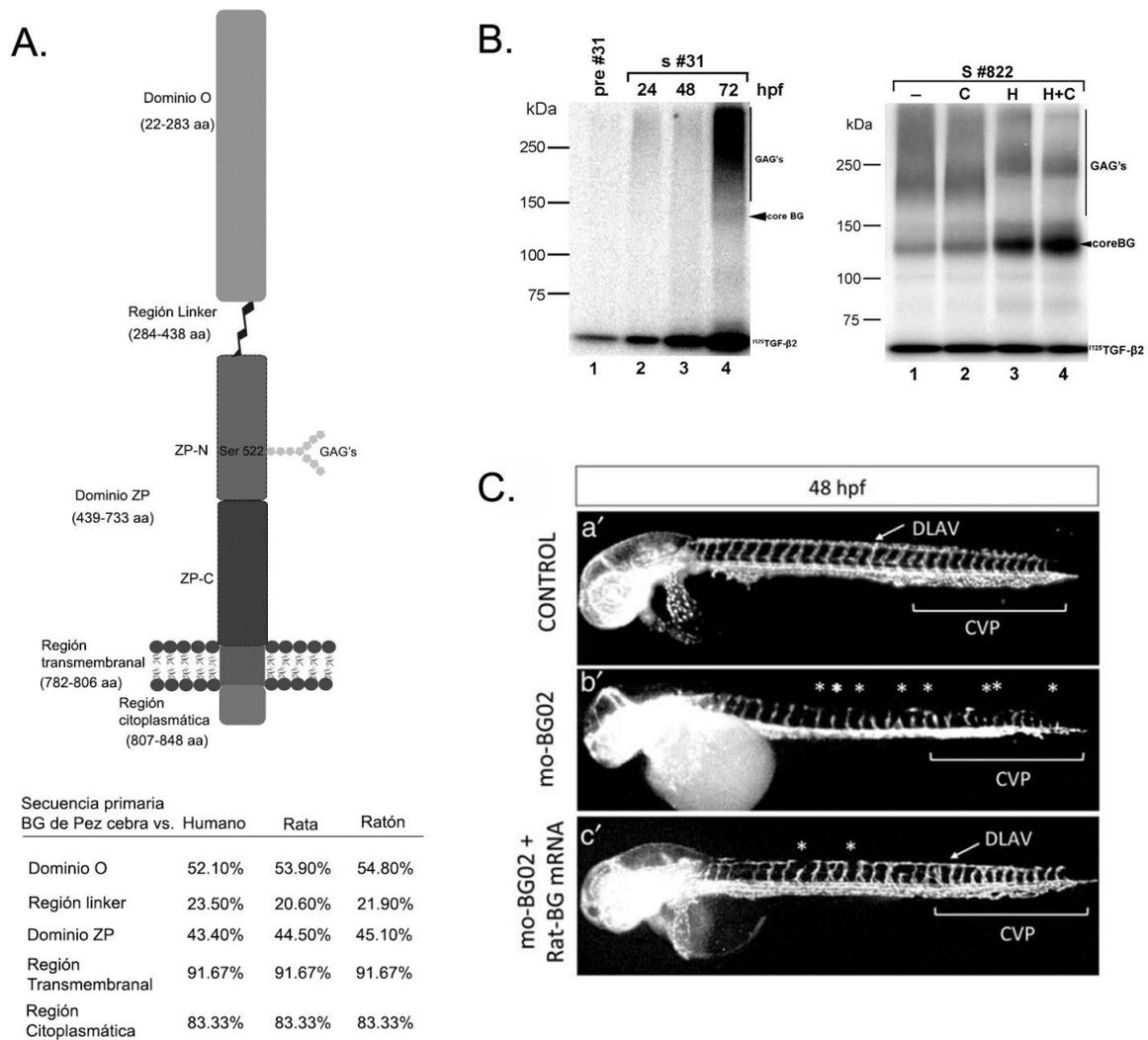
## 2. Antecedentes específicos

Estudios del receptor tipo 3 de TGF $\beta$  usando el pez cebra como modelo.

El pez cebra es un animal de agua dulce que fue introducido como modelo de estudio en la década de los 70s. El pez cebra es un organismo diploide ( $1n= 25$  cromosomas) que presenta diversas características que lo convierten en un excelente modelo de estudio, entre ellas su fácil crianza en el laboratorio, el gran número de embriones obtenidos (~200 huevos fertilizados por cruce), y la fertilización y desarrollo embrionario de forma externa. Pero la principal ventaja que ofrece el pez cebra es que sus embriones son transparentes las primeras 24 horas y puede hacerse uso de químicos para mantener su transparencia o afectar su desarrollo, haciendo factible la detección y visualización directa e *in vivo* de fenotipos específicos durante su desarrollo <sup>42</sup>.

En el pez cebra el gen ortólogo de mamíferos del receptor tipo III para TGF $\beta$  (*tgfbr3*) está codificado en el cromosoma 6, con una única copia en el genoma. El marco de lectura abierto de *tgfbr3* tiene un tamaño total de 199.85 kb y la secuencia codificante para Tgfbr3 se distribuye en 16 exones, a diferencia de los 17 exones con los que cuenta su ortólogo en mamíferos. La alineación de la secuencia de cDNA de *tgfbr3* de diferentes especies muestra que la secuencia correspondiente a los exones 13 y 14 de mamíferos se encuentra en un solo exón en el pez cebra, pero más allá de esta diferencia, la distancia y el tamaño de los exones se encuentran conservados entre especies. El cDNA de *tgfbr3* se tiene una longitud de 2544 pb y codifica para una proteína de 848 aminoácidos <sup>43</sup>. El análisis de la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína de BG en pez cebra, y la organización de sus módulos funcionales y estructurales muestra una alta similitud con la de otras especies. La proteína de Tgfbr3 contiene en el amino terminal un péptido señal de 21 aa, seguido de una porción extracelular de 711 aa, un dominio transmembranal de 24 aa, y una pequeña porción citoplasmática de 41 aa en el carboxilo terminal. El dominio extracelular de Tgfbr3 de pez cebra conserva las características de su versión en mamíferos; contiene un dominio Orphan en el amino terminal con una similitud del 54.8% con el de ratón, una región linker no estructurada con una alta variabilidad en la secuencia de aa, un dominio ZP

próximo a la región transmembranal con un 45.1% de similitud con su versión murina y los dominios transmembranal y citoplasmático cuentan con la mayor similitud con otras especies, 85,1% (Figura 5A). Otras características de Tgfbr3 de pez cebra es que conserva 16 de las cisteínas presentes en el TGFBR3 de mamíferos, conserva uno de los dos sitios de unión a cadenas GAGs de su versión en mamíferos (Ser 522) y la treonina 841 de la versión murina, la cual es fosforilada por el receptor TGF $\beta$ RII e interactúa con  $\beta$ -arrestina, para la internalización del complejo de señalización <sup>30</sup>.



**Figura 5. El receptor Tgfbr3 en el pez cebra.** A. Esquema de la estructura predicha para la versión de Tgfbr3 del pez cebra y el tamaño de cada dominio. Se esquematiza la Serina (Ser 522) aceptora para la unión de las cadenas de Glicosaminoglicanos (GAGs). Se muestra la tabla de homología de la secuencia primaria de aa de los diversos dominios de Tgfbr3 del pez cebra en comparación con las versiones en mamíferos de humano, rata y

ratón. B. Experimentos de Affinity Labeling and Immunoprecipitation (AFLIP) demuestran que Tgfbr3 es capaz de unir con alta afinidad TGFβ2 de humano y sus niveles de expresión durante los primeros 3 días de desarrollo del pez cebra. En la imagen a la izquierda: Carril 1- Control con suero preinmune, Proteína total de embriones de 24 hpf (2), 48 hpf (3) y 72 hpf (4). Por igual se demostró que el receptor endógeno presenta una gran cantidad de GAGs unidas al núcleo de la proteína y que estas pueden ser liberadas a través de tratamientos enzimáticos con Condroitinasa (C) y Heparitinasa (H). En la imagen a la derecha: Carril 1- Control sin tratamiento, 2- Condroitinasa, 3- Heparitinasa y 4- Condroitinasa + Heparitinasa. C. La administración de morfolinós que bloquean el splicing del exón 2 de *tgfbr3* producen defectos en la migración de los vasos intersegmentales(\*) y el plexo venoso caudal (CVP), los cuales pueden ser rescatados por la co-inyección del mRNA maduro de la versión de rata de *tgfbr3*. Imágenes tomadas de Kamaid, A. *et al.* 2016 y Molina-Villa, T. 2016 .

Experimentos bioquímicos determinaron que el Tgfbr3 del pez cebra une con alta afinidad TGFβ2 y la principal composición de sus cadenas GAGs son cadenas de heparán sulfato, al igual que su versión en mamíferos (Figura 5B). La disminución de los niveles de Tgfbr3, usando morfolinós antisentido, durante el desarrollo embrionario del pez cebra provocaron defectos en la formación de los vasos intersegmentales y el desarrollo de las somitas <sup>43</sup> y estos defectos son rescatados parcialmente por la versión de rata de Tgfbr3 (Figura 5C). Estos experimentos demuestran que existe una alta conservación de las funciones bioquímicas de Tgfbr3 en los vertebrados. Sin embargo, aunque los experimentos sugieren que el efecto vascular en los embriones morfantes es por un mecanismo no celular autónomo existe también evidencia que sugiere que el desarrollo de los vasos intersegmentales es particularmente sensible a los efectos “off-target” de los morfolinós <sup>44</sup>. Por esta razón es de gran importancia obtener alelos mutantes del gen de *tgfbr3* para continuar disectando sus funciones *in vivo* durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

### **3. Hipótesis**

La eliminación del receptor tipo III de TGF $\beta$  en el pez cebra afectará al desarrollo embrionario.

### **4. Objetivo General**

Estudiar el papel de Tgfbr3 en el desarrollo del pez cebra y las consecuencias de su eliminación.

### **5. Objetivos particulares**

1. Identificar el patrón de expresión de Tgfbr3 durante el desarrollo del pez cebra.
2. Generar alelos nulos del gen de *tgfbr3* usando el sistema CRISPR-Cas9.
3. Generar peces homocigotos para alelos nulos de Tgfbr3.
4. Analizar los tejidos donde se expresa Tgfbr3 para detectar defectos causados por la falta del receptor.

## 6. Métodos

### 6.1 Generación de la línea mutante de *tgfbr3*

Para la generación de los alelos nulos de *tgfbr3* se decidió utilizar el sistema CRISPR-Cas9<sup>45,46</sup>. El sitio blanco para el corte de la endonucleasa Cas-9 de *S. pyogenes* se seleccionó a través del sitio Chop chop (<https://chopchop.cbu.uib.no>) y la secuencia blanco se confirmó experimentalmente secuenciando el cDNA del exón 2 de *tgfbr3* de peces adultos Tab14/Wik. El oligonucleótido con la secuencia blanco 5'- TAGGTCAATAGCAGGATGGCGG-3' se clonó en el sitio BsmBI del vector pT7cas9sgRNA2 (Addgene), el cual se utilizó para la síntesis de la sgRNA contra *tgfbr3*. El RNAm de Cas9 (pST1374-nls-flag-linker-Cas9 Addgene) y la sgRNA se sintetizaron utilizando el kit MEGAscript T7 Transcription (Ambion).

Los embriones de pez cebra en estadio de 1 o 2 células se microinyectaron con 1 nl de la mezcla de microinyección para *tgfbr3* o *tyr* (control):

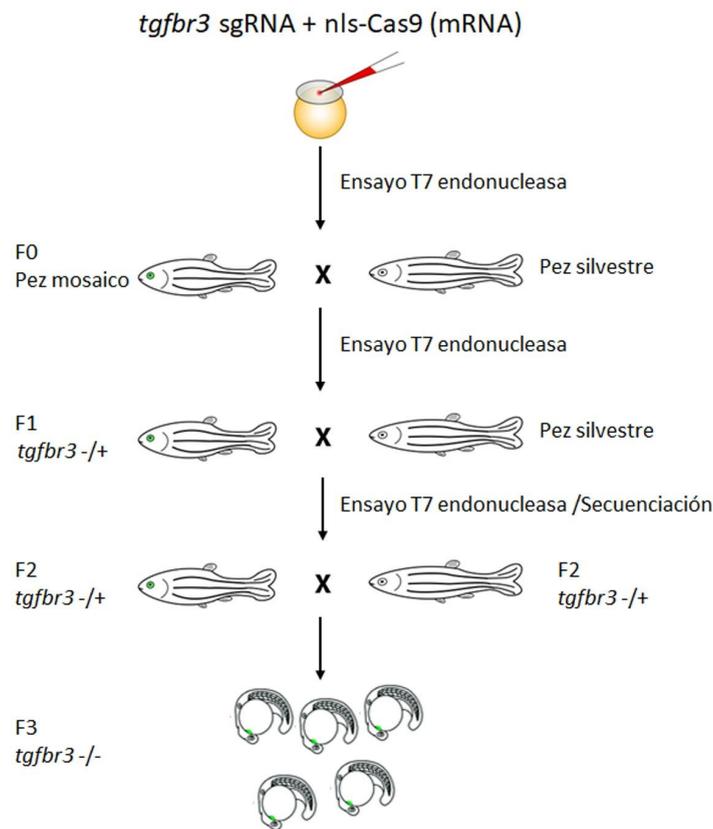
Mezcla de microinyección del sistema CRISPR-Cas9

- Cas9 mRNA 150 pg/nl
- sgRNA *tgfbr3* (60, 100 o 200 pg/nl) o *tyr* (100 pg/nl)
- KCl 10X 0.4 µl concentración final 200 mM
- Rojo de Fenol (2.5%) 0.4 µl concentración final 0.05%
- Agua MQ cbp 4 µl

Del lote de embriones microinyectados con la mezcla para *tgfbr3* se seleccionaron embriones individuales para detectar la presencia de mutaciones en el sitio blanco por ensayos de endonuclease T7 (Ver sección 6.2) y el resto de los embriones se criaron hasta la adultez (Figura 6)

A partir de los 3 meses post fertilización (mpf) los peces mosaico se cruzaron con peces silvestres y 50 embriones de cada cruce en grupos de 10 se seleccionaron para detectar nuevamente mutaciones en el exón 2 de *tgfbr3*. Los embriones resultantes de las cruces positivas para mutaciones en *tgfbr3* fueron nuevamente criados hasta la adultez. A partir de los 2 mpf los peces fueron genotipificados individualmente para seleccionar a los peces acarreadores de un alelo mutante y la

secuencia del exón 2 de cada pez positivo se clonó y se secuenció. Se seleccionaron 4 alelos mutantes a partir de los cuales se obtuvieron las líneas heterocigotas y nulas para *Tgfb3*.



**Figura 6. Esquema de la creación y segregación de los alelos nulos para *Tgfb3*.** Una vez que los embriones fueron microinyectados la efectividad del sistema CRISPR-Cas fue evaluado por el ensayo de T7. Los peces adultos F0 fueron cruzados con peces silvestres para seleccionar los peces fundadores F0 capaces de transmitir mutaciones en *tgfb3*. Estos embriones F1 se criaron y la mutación portada por cada individuo una vez alcanzada la adultez fue secuenciada. Cuatro peces F1 fueron seleccionados para dar origen a las 4 líneas mutantes para *Tgfb3*.

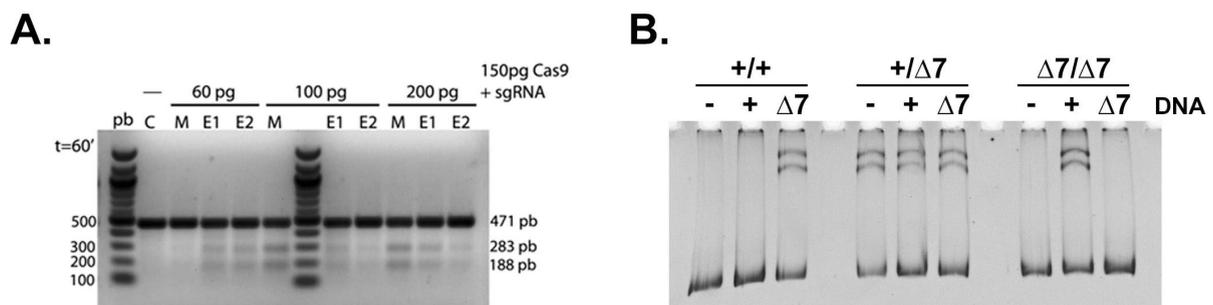
## 6.2 Genotipificación

Para obtener DNA genómico los embriones y/o aletas caudales se incubaron con NaOH 50 mM a 95°C por 20 min, se vortexearon, se enfrió rápidamente en hielo y se añadió 1/10 del volumen inicial de Tris-HCl 1M pH 8 para neutralizar la reacción. Se centrifugó y 1 µl del sobrenadante se usó para la reacción de PCR. La región de

interés del genoma se amplificó usando los oligos BG002 3'-CCCTATTCCCACCATTTACGTTAG-5' y BG003 5'-CCCCATAACTCTTCCTTCATCTTC-3' los cuales flanquean el exón 2 y amplifican un producto de 471 pares de bases, el cual se purificó posteriormente a partir de un gel de agarosa.

Para detectar la actividad de Cas9 y los cortes en el genoma, así como seleccionar los embriones y peces portadores de alelos mutantes para *tgfbr3*, los amplicones fueron re-alineados (95°C por 2 min y enfriados lentamente 2° cada 30 seg) e incubados con la endonucleasa T7 por 1 h a 37°C. La reacción se detuvo con 50 mM de EDTA y se corrió en un gel de agarosa al 2% para visualizar las bandas resultantes por el corte de la enzima T7<sup>46,47</sup> (Figura 7A).

Una vez identificados y secuenciados los alelos mutantes la genotipificación de los peces se realizó a través de la visualización de heteroduplex de DNA en gels de poliacrilamida <sup>48</sup>. 50 ng del amplicón del pez o embrión a genotipificar ó 25 ng de este mismo mezclados con 25 ng del amplicón mutante o silvestre (previamente clonados y amplificado por PCR) se re-alinearon y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15% (en TBE 0.5%) y se corrieron por 2 horas a 150 V. Los heteroduplex se visualizaron tiñendo el gel con Bromuro de etidio (Figura 7B).



**Figura 7. Métodos de genotipificación para las líneas mutantes.** **A.** La endonucleasa T7 se utilizó para secuenciar los embriones F0 y F1. Se observa un gel representativo de la evaluación realizada para la efectividad del sistema CRISPR-Cas utilizando diversas concentraciones del sgRNA tanto en embriones individuales (E) como mezcla de 15 embriones (M). **B.** Imagen representativa del genotipo de 3 peces adultos de la línea  $\Delta 7$  usando el método de heteroduplex de DNA. Los fragmentos de DNA obtenidos de cada pez (-) se mezclaron con la secuencia silvestres (+) o mutante ( $\Delta 7$ ) del exón 2 de *tgfbr3*, se

relinearon y se analizaron en un gel de poliacrilamida. Se observan las bandas de heteroduplex solo en los carriles donde existe la mezcla de las versiones silvestres y mutantes.

### **6.3 Inmunohistoquímica.**

El método fue descrito anteriormente y se realizaron algunas modificaciones <sup>49</sup>. Los embriones fueron tratados con Feniltiourea (PTU) 0.003% (Sigma) a partir de las 24 hpf para evitar la pigmentación. Los embriones se recolectaron, se anestesiaron con triclaína 0.02% (Sigma) y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma) toda la noche (ON) a 4°C. Se lavaron 3 veces 5 min con PBST (PBS 1X + 0.1% Tween 20) a temperatura ambiente (TA), se permeabilizaron con acetona fría (-20°C) por 8 min a -20°C, se lavaron 3 veces con PBST y se bloquearon por 2h a TA con PBST+10% suero de caballo. La peroxidasa endógena se inactivó con PBST +0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 4°C ON. El suero anti Tgfb3 (#31) o el suero pre-inmune (1:3000) se incubaron 24 h en PBST-10% suero de caballo a 4°C. El sistema de amplificación de señal Elite ABC reagent (Vector Laboratories) se usó para detectar el anticuerpo primario y la reacción de la peroxidasa se llevó a cabo con DAB Peroxidase substrate (Vector laboratorios) siguiendo las instrucciones de los kits. Los embriones se examinaron bajo un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ 1500) equipado con una cámara DS-Fil (Nikon) y la adquisición de las imágenes se realizó con el Software Nis-Elements 4.3 (Nikon).

Para los cortes histológicos los embriones se embebieron en Sacarosa al 30% en PBS ON 4°C para posteriormente pasarlos a PBS 1X-15% sacarosa-7.5% gelatina, se montaron, se congelaron en acetona a -80°C y se almacenaron al menos 24h antes de los cortes. Usando un criostato (Leica) se obtuvieron secciones de 20 µm de grosor. Las secciones se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (25%-50%-75%-100%) 5min cada una, se lavaron 2 veces 2 min en Xileno y se montaron con Permount (Fisher).

### **6.4 Inmunofluorescencia**

Embriones completos <sup>50</sup>: Los embriones se fijaron ON a 4°C con PFA 4%, se lavaron 3 veces con PBST y se permeabilizaron/bloquearon con PBST+0.5% Triton X-100+1% BSA+5% suero de cabra+50 mM Glicina por 3h a TA y el anticuerpo anti

Tgfr3 (1:1000) se incubó en PBST+0.1% Triton X-100 +10 mM Glicina+1% DMSO ON 4°C. Se lavaron 4 veces con PBST 10 min cada uno y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 594 o 647 (Invitrogen) en PBST On a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBST, se incubaron 30 min con DAPI (Invitrogen) y se lavaron 2 veces con PBST. Los embriones se montaron en agarosa de bajo punto de fusión (LPM) (SIGMA) al 1.5% para microscopía confocal. Los corazones de embriones de 72 y 96 hpf se extrajeron antes de ser montados en LPM. Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal LSM 800 (Zeiss)

Secciones histológicas<sup>50,51</sup>: Los embriones se trataron con PTU, se fijaron ON a 4°C con PFA 4%, se embebieron en sacarosa al 30% ON a 4°C para después montarlos en 15% sacarosa+7.5% gelatina y se cortaron en criostato (15 µm) y las secciones se montaron en laminillas electrocargadas. Las laminillas se re hidrataron 10 min con dH<sub>2</sub>O, se lavaron 3x en PBST, se permeabilizaron con PBST+0.5% Triton X-100+1% BSA 1 h a TA, se bloquearon con PBST+0.1% Triton X-100+ 1% BSA + 5% suero de cabra + 50 mM Glicina 1h a RT y se incubaron ON a 4°C con el suero anti-Tgfr3 (1:1000) en PBST + 10 mM Glicina. Las laminillas usadas para detección de pSmad3 después de la rehidratación y lavado con PBST fueron incubadas con 2X SSC a 65°C por 1h, se dejaron enfriar a TA y se lavaron 3x con PBST, se incubaron con PBST+0.5% Triton X-100+ 1% BSA + 5% suero de cabra + 50 mM Glicina por 1h a TA y se incubaron a 4°C ON con anti-pSmad3 1:250 (Abcam).

El anticuerpo secundario anti conejo Alexa 594 o 647 se incubó en PBST 1:500 ON a 4°C. Las laminillas se lavaron 4x con PBST, se tiñeron con DAPI y se montaron con Vectashield mounting médium (Vector Laboratories). La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal Zeiss LSM800.

## **6.5 Tinción de Cartílago y hueso.**

Tinción *in vivo*<sup>52</sup>: Los embriones se incubaron con 0.05% de rojo de alizarina en agua para embriones durante 15 min a TA y se lavaron varias veces. La cuenta de los segmentos mineralizados se realizó en los embriones vivos inmovilizados en agarosa de bajo punto de fusión bajo un microscopio estereoscópico de epifluorescencia (Nikon)

Embriones menores a 5dpf<sup>53</sup>: los embriones se fijaron con PFA 4% 2h a TA. Se deshidrataron con 50% etanol y se incubaron ON a TA con la solución 0.005% rojo de alizarina + 0.02% azul de Alcian. La pigmentación se removió con 1.5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1% KOH y se aclararon con cambios sucesivos de una solución de 20% glicerol + 0.25% KOH por 30 min, seguido de 50% glicerol + 0.25% KOH 2h y almacenados en 50% glicerol + 0.1% KOH.

Larvas de 5 dpf hasta 40 dpf <sup>54</sup>: Los embriones se fijaron en formaldehído al 3.5% 1h, lavados en 70% metanol 30 min, 50% metanol 5 min, 80% etanol 5 min, se incubaron en 0.02% de Azul de Alcian 1h, 50% etanol 5 min, 2 lavados de 0.2% Triton X-100 en agua miliQ, se despigmentaron en 0.8% KOH+ 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se lavaron 2x en 0.2% Triton X-100, se incubaron 10 min en 100% Bórax, se permeabilizaron con tripsina 1 mg/ml en 60% Bórax, se incubaron ON en 0.003% de rojo de alizarina y almacenaron en glicerol al 70%.

Peces adultos <sup>54</sup>: Los peces se fijaron a 4°C ON en 80% etanol, se lavaron con 100% etanol 30 min y se dejó en acetona por 48h a TA para remover la grasa. Se lavaron en diluciones de etanol 30 min cada una (100%-75%-50%), 15 min en agua miliQ + 0.02% Triton X-100, 1h en agua miliQ + 0.02% Triton X-100, se despigmentaron por 2h en 0.8% KOH+ 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se lavaron 2x en agua miliQ + 0.02% Triton X-100, 30 min en una solución de bórax saturada, se permeabilizaron con tripsina 10 mg/ml en 60% Bórax, se tiñeron por 7h con 0.02% de rojo de alizarina en 1%KOH, se lavaron ON con 20% glicerol+0.8% KOH+ 0.2% Triton, 30% glicerol 1h y se almacenaron a 4°C.

## **6.6 Tratamiento Farmacológico**

La inhibición farmacológica de la vía de TGFβ en pez cebra fue descrita previamente <sup>55,56</sup>. Embriones de 72 hpf fueron puestos a una densidad de 15 embriones/5 ml en placas de 12 pozos. El inhibidor de TGFβR1 (Alk5) SB431542 (Tocris) se diluyó a la concentración deseada en 5 ml de agua para embriones. Los embriones fueron incubados en la presencia del inhibidor por 72h a 28.5°C, el agua con el inhibidor se cambió diariamente y a los 6 dpf los embriones fueron sometidos a una tinción de hueso *in vivo* (Sección 6.5).

## 6.7 RT-PCR cuantitativa

El ARN total de embriones de 7 dpf o de 20-25 colas de embriones de 6 dpf se aisló con Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. 1 µg de ARN total se utilizó para la síntesis de ADN complementario (cDNA) con oligonucleótidos random usando la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). La reacción de qPCR se realizó con el Master mix SYBR-Green (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de amplificación: 95°C por 5 min seguida de 40 ciclos de: 94°C 30s, 58°C 1 min y 60° 1 min. El templado se diluyó 1:20, se incluyeron para todos los casos controles sin templado y reacciones de RT sin la enzima M-MLV como control de contaminación de ADN genómico. Todos las reacciones se realizaron por triplicado y la expresión de los genes se calculó usando el método  $E^{-\Delta\Delta Ct}$  a partir de 3 experimentos independientes <sup>57</sup>. La expresión de los genes se normalizó con β-actina.

Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')			
Gen	Delantero	Reverso	Referencia
<i>tgfb1a</i>	GGTCCTGCACCTA CATCTGG	CAAGGATTGCGGGTACACAG	58
<i>tgfb2</i>	GATGCTGCTGCCATCATACC	AGAGCGAGCGTAAACAGCAG	57
<i>tgfb3</i>	GCAGTGCTGACACCACACAC	GGC TCCAGGTCTTGAGGAAC	57
<i>tgfbr2b</i>	TTGTCTCTGTGACTTCGGGC	CCGATGGCGTTACATCTGGA	Este estudio
<i>eng</i>	GCCGGAGATCCACAGCTTCAGA	GTTATCGAAAAGCATGGCGTGCC	59
<i>bmp2b</i>	CAGCAGAGCAAACACGATAC	TACTGGCATCTCCGAGAACT	60
<i>tgfbr3</i>	CACAAGGAGCCAGAGAGAAAACG	GGGAGTTCAGGATAAAAACCAGTG	Este estudio
<i>actin</i>	CGAGCAGGAGATGGGAACC	CAACGGAAACGCTCATTGC	Este estudio

## 6.8 Western blot

La obtención de la proteína total se obtuvo siguiendo un protocolo previamente descrito<sup>61</sup> con algunas modificaciones. Las colas de 25 embriones de 96 hpf y 6 dpf silvestres y mutantes se lisaron con buffer RIPA (NaCl 150 mM, Nonidet-P40 1%, DOC 0.5%, SDS 0.1%, Tris pH7.4 50 mM) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa, el total de la proteína obtenida se separó en un gel de SDS-PAGE y se transfirió a una membrana PVDF. La membrana se bloqueó con 5% de leche en TBST durante 1 h, y los anticuerpos se incubaron ON a 4°C en TBST. Anti-p-Smad2 1:200 (Cell signaling), anti-total Smad2/3 1:2000 (Cell signaling). Anti-NICD 1:1000 (Abcam) y anti tubulina 1:2000 (Genetex). La membrana se lavó 4x con TBST 5min cada uno y se incubó con el anticuerpo secundario anti ratón (1:20000) o anti conejo (1:20000) por 1 h a TA y se reveló usando luminol (Roche).

## 6.9 Microinyección de morfolidos

Los oligómeros de morfolidos se adquirieron de Gene Tools. El morfolino contra *tgfr3* fue publicado anteriormente<sup>43</sup> BG02 5'-GAATAACAGCGCTTACCTGCAGAGG-3' y se usó para bloquear el splicing del exón 2 de *tgfr3*. Embriones mutantes y silvestres en estadio de 1 célula se microinyectaron con 7ng o 2ng del morfolino BG02, se incubaron en condiciones estándares y el fenotipo morfante y los defectos vasculares en las vasos intersegmentales se analizaron a las 48 hpf.

## 6.10 Imagen y microscopía

Los embriones analizados para medir el diámetro de la aorta y los vasos intersegmentales se anestesiaron con Tricaina al 0.02% y se montaron en LPM 1% suplementada con tricaina. Los corazones de peces adultos transgénicos (*fli1:EGFP*) se incubaron en 4% PFA por 30 seg después de su extracción y se lavaron 2 veces con PBST antes de ser montados en 1% LPM. En ambos casos la observación y obtención de las imágenes en z-stack se adquirieron inmediatamente después de montar los especímenes con un microscopio confocal LSM 800. Los embriones teñidos para cartílago y hueso, los embriones completos para inmunohistoquímicas y los embriones morfantes fueron fotografiados con un microscopio estereoscópico SMZ 1500 (Nikon). Los peces adultos teñidos para

hueso y las secciones histológicas de inmunohistoquímica se fotografiaron con el microscopio Axio zoom V16 con ApoTome (Zeiss).

Todas las imágenes se analizaron y editaron usando los software Zen Blue y/o Fiji <sup>62</sup>.

### **6.11 AFLIP**

El protocolo se realizó como se describió anteriormente <sup>63</sup>. Brevemente, 500 µg de proteína total de embriones de 72 hpf en un volumen total de 500 µl de buffer de lisis se incubaron con 150 pM de TGFβ2-I<sup>125</sup> por 2 h a 4°C, después de este tiempo se añadieron 5 µl del anticuerpo anti-Tgfr3 para una dilución de 1:50 y se incubó ON a 4°C. Se añadieron 50 µl de proteína G y se incubó por 50 min a 4°C, se centrifugó a máxima velocidad 30 seg y la pastilla se lavó 3 veces con PBS+0.1% Triton+0.02% SDS. El complejo inmunoprecipitado se entrecruza con DSS por 15 min TA, se detuvo la reacción con 25 mM de Tris pH 7.4 y las muestras se analizaron en un contador gamma antes de correrlas en un gel SDS-PAGE. El gel se secó, se expuso en una pantalla blanca y esta se escaneo en un Typhoon Phosphorimager.

### **6.12 Infarto de miocardio por criolesión.**

Las criolesiones en corazones del pez cebra se realizaron siguiendo protocolos previamente descritos <sup>64,65</sup>. Los peces adultos de 3 a 12 mpf se anestesiaron con Tricafina 0.04%, los peces se colocaron bajo un estereoscopio de forma dorsal, se realizó una pequeña incisión en la región del corazón, se cortó el pericardio para exponerlo y el corazón se tocó por 50 segundos con una criopruera de acero inoxidable previamente incubada en nitrógeno líquido. Los peces se retornaron a un tanque de agua sin anestesia para su recuperación y se mantuvieron en observación por 24 horas. En el estadio deseado, los peces se sometieron a eutanasia en Tricafina al 0.4% para extraer el corazón, el cual se lavó en PBS 1x, se fijó en PFA 4% ON 4°C, se lavó 3X con PBST y se crioprotejió con Sacarosa 30% antes de ser procesado para histología.

### **6.13 Estadística**

Todos los resultados se obtuvieron de al menos 3 experimentos independientes. El análisis estadístico y las gráficas se obtuvieron usando el software GraphPad Prism

v8. Se usaron análisis paramétricos usando la prueba estadística Two-tailed Student's  $t$ -test para comparar 2 muestras. El valor exacto de  $P$  está indicado en cada figura.

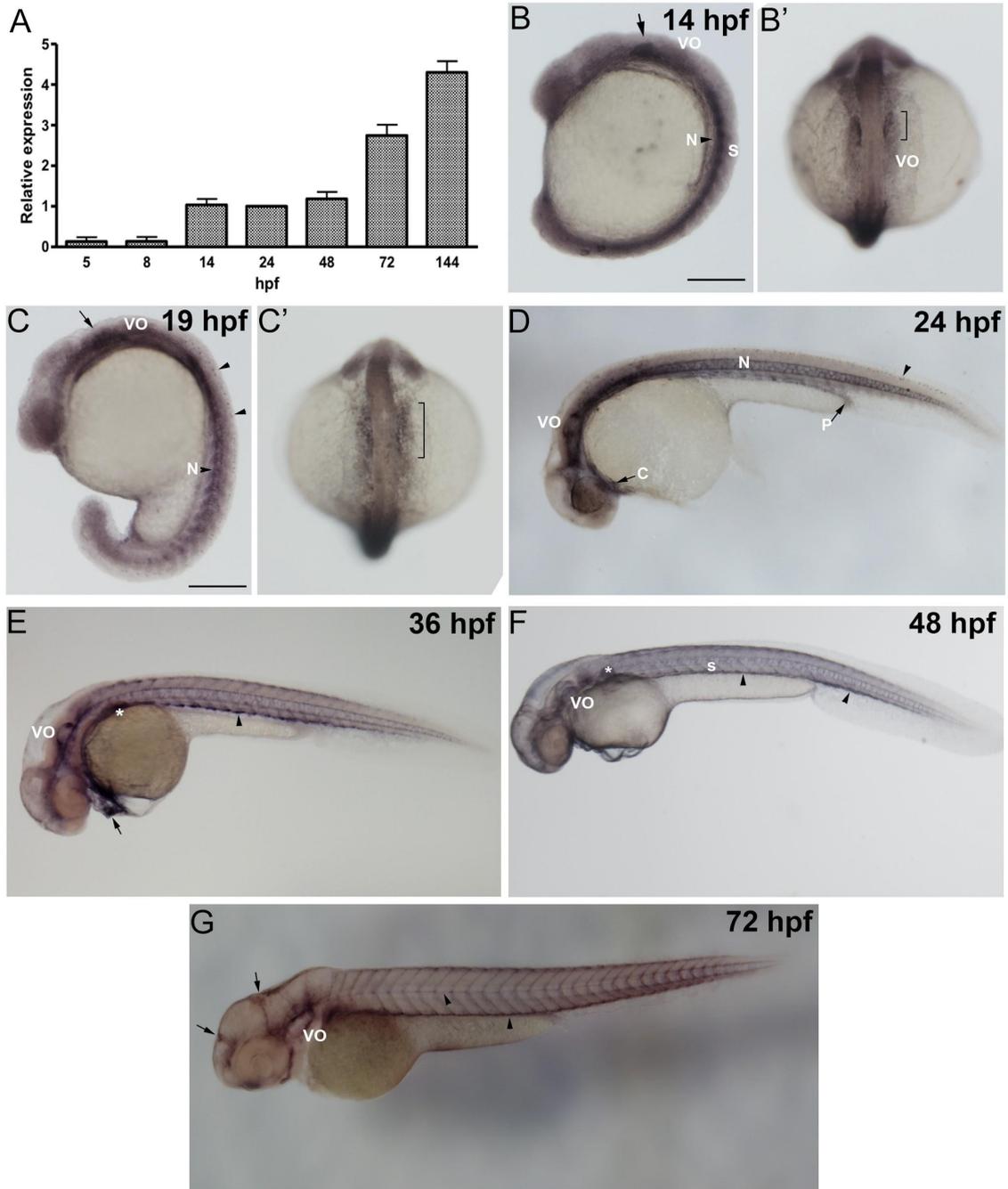
## 7. Resultados

### 7.1 Tgfb3 se expresa en células derivadas del mesodermo y la cresta neural

En trabajos anteriormente publicados usando RT-PCR semi cuantitativa <sup>43</sup> y secuenciación <sup>66</sup> de célula única se demostró que el transcrito de *tgfb3* es de origen cigótico y que su expresión incrementa con el inicio de la somitogenesis. Para conocer más sobre las posibles funciones de una proteína en el contexto del desarrollo embrionario es importante conocer su expresión espacial y temporal, por lo que como objetivo inicial nos propusimos describir el patrón de expresión de Tgfb3. Anteriormente, mediante experimentos de “Knock down” usando oligonucleótidos morfolinicos en pez cebra se atribuyó a Tgfb3 una función durante el desarrollo de los vasos intersegmentales <sup>43</sup>. Sin embargo, no existe evidencia de la expresión de Tgfb3 en células endoteliales en otros organismos por lo que un detallado patrón de expresión del receptor nos ayudaría a entender este fenotipo.

Haciendo uso de PCR cuantitativa corroboramos el origen cigótico del transcrito de *tgfb3* y su baja expresión durante las primeras horas de desarrollo antes del inicio de la somitogenesis. Observamos que su expresión se mantiene constante desde el estadio de 10 somitas (14 hpf) hasta las primeras 48 hpf para después tener un incremento de sus niveles desde las 72 hpf hasta las 144 hpf (Figura 8A).

Para la expresión espacial de Tgfb3 hicimos uso del anticuerpo policlonal específico para Tgfb3 de pez cebra; que cubre toda la secuencia del dominio extracelular del receptor y el cual ha sido caracterizado y validado anteriormente <sup>43</sup>. En experimentos de Inmunofluorescencia (IF) e Inmunohistoquímica (IHC) pudimos detectar a partir de las 12 hpf la expresión de Tgfb3 en todo el embrión con una mayor expresión en el mesodermo axial y las somitas emergentes. Conforme el desarrollo avanzó la expresión del receptor se restringió a tejidos y órganos más específicos, entre los cuales se encuentra el corazón, la notocorda, la vesícula ótica (VO) y las aletas pectorales (Figura 8B-G).

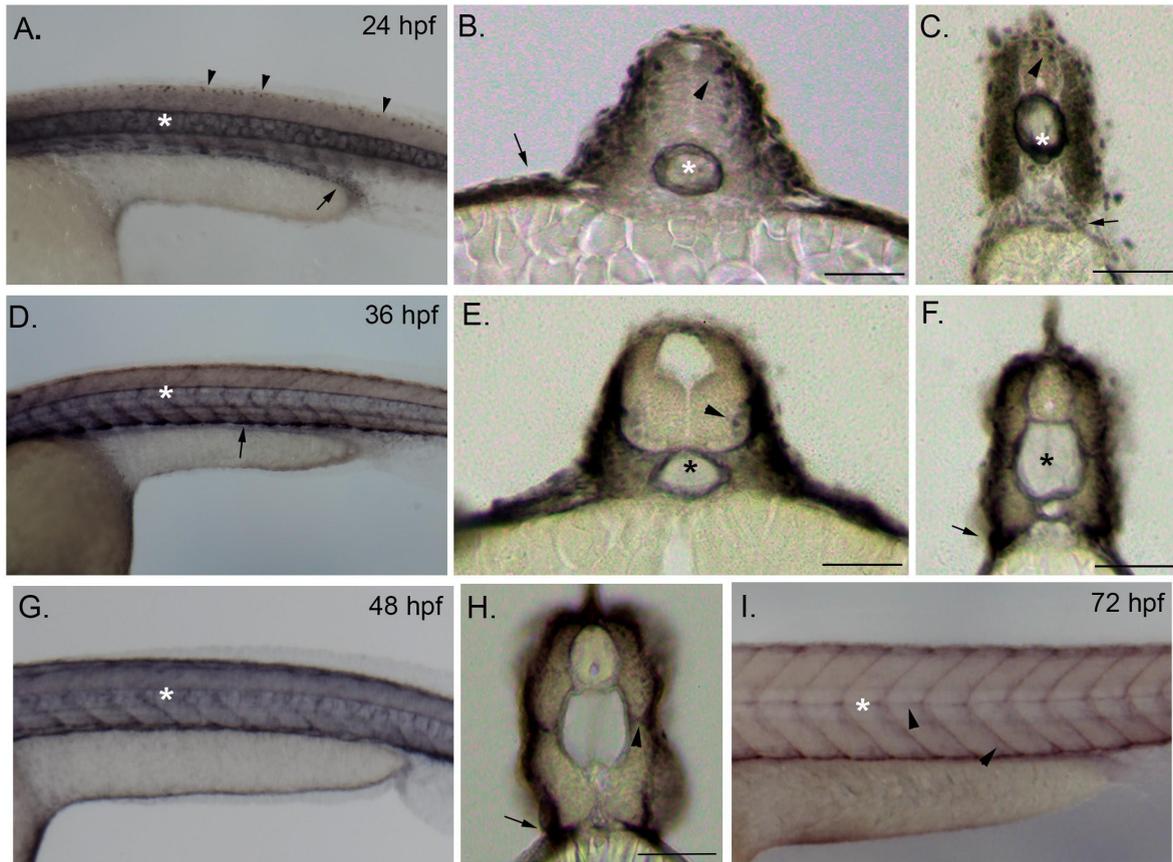


**Figura 8. Expresión general de Tgfb3 durante el desarrollo embrionario del pez cebra.** **A.** Niveles bajos del transcrito de *tgfb3* se detectaron en estadios previos a las 14 hpf, dónde se observa un primer aumento significativo en los niveles del transcrito, para posteriormente incrementar nuevamente a las 72 hpf y 144 hpf. **B-G** IHC de embriones completos para Tgfb3. Vistas laterales (**B**, **C**, **D-G**) y vistas dorsales (**B'** y **C'**). A las 14 hpf Tgfb3 se expresa en todo el embrión, pero en mayor nivel en la notocorda (**N**), las somitas (**S**) y las células migratorias del dominio epibranchial (brackets **B'** - **C'**). A las 19 hpf (**C** y **C'**) Tgfb3 se observa en la notocorda (**N**), las somitas(**S**) y las células neuronales migratorias

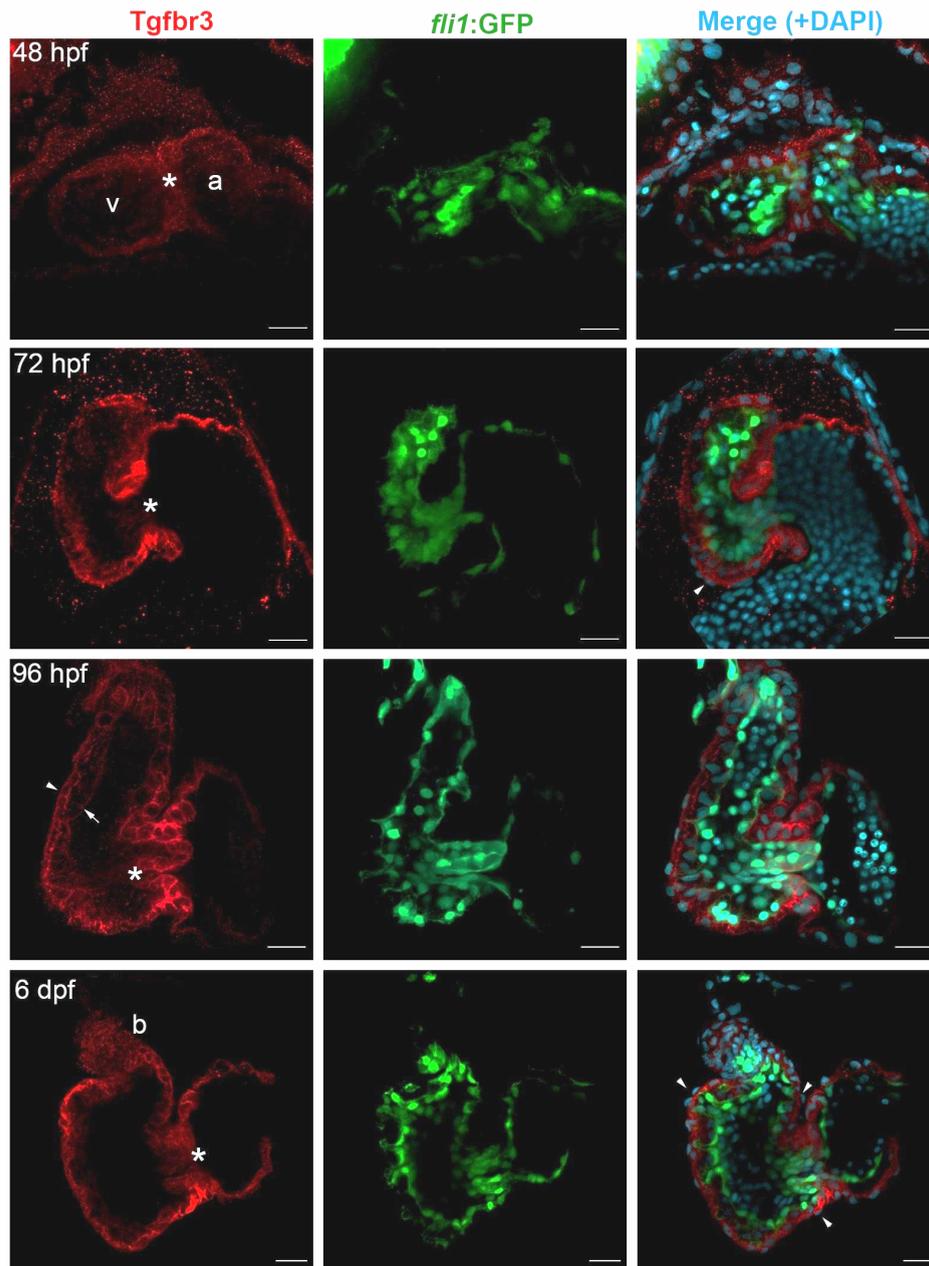
en la región dorsal del embrión (cabeza de flecha). A partir de la 24 hpf hasta las 72 hpf la expresión de Tgfb3 se restringe y se observa en tejidos y órganos como las somitas (E-G cabeza de flecha), la notocorda (N), la vesícula ótica (VO), el corazón (D,E flecha), pronefros (D asterisco), aletas pectorales (F asterisco), células mesenquimales que rodean el sistema nervioso (G flechas) y los límites de las somitas (G cabezas de flecha). Barra de escala: 100µm.

Del mesodermo axial emerge la notocorda, un órgano que da soporte al desarrollo embrionario <sup>67</sup>, y desde su formación Tgfb3 muestra una fuerte expresión en sus células de la capa interna para a partir de las 36 hpf expresarse principalmente en las células de la capa externa (Figuras 8B, 9A-C,E,F,H). Junto con el desarrollo de la notocorda y la extensión del embrión las somitas emergen en sentido antero-posterior en un proceso denominado somitogenesis el cual empieza a las 10.5 hpf y dura hasta las 72 hpf <sup>68</sup>. Durante el inicio de este proceso y hasta las 24 hpf Tgfb3 se detectó en todas las células del paquete somítico y su expresión se restringe conforme el desarrollo continuó para ser más fuerte su expresión en la capa muscular externa y los límites de las somitas a las 72 hpf (Figuras 8C,G; 9C,D,F-I).

De los órganos derivados del mesodermo el corazón es donde Tgfb3 se ha estudiado principalmente. Entre las 24 y 36 hpf el receptor mostró una fuerte expresión en todo el tubo cardiaco (Figura 8 D,E). A partir de las 48 hpf fue posible distinguir que el receptor se expresa en las células del miocardio de la aurícula y el ventrículo, incluso a las 96 hpf se pudo observar una señal débil en las células del miocardio que se delaminan para formar las trabéculas del ventrículo (Figura 10G). La mayor señal del receptor en el corazón proviene del canal atrioventricular, una región definida molecularmente por la expresión de Bmp4, Versican y Notch1b <sup>69</sup>, dónde se forman las válvulas atrioventriculares y que expresan fuertemente a Tgfb3 desde el inicio de su desarrollo a las 96 hpf. Además Tgfb3 también se detectó en el bulbo arterioso (Figura 10 J).



**Figura 9. Tgfbr3 se expresa fuertemente en el tronco del embrión.** Vistas laterales de embriones completos (A, D, G,I) y secciones coronales (B,C, E, F, H). Tgfbr3 se expresa en todas las células de las somitas (A,C) a las 24 hpf para posteriormente restringirse a la capa superficial del músculo (F,H), el septum (I cabeza de flecha) y la región ventral de la somita (D, F, H flechas). Algunas neuronas en la región dorsal y lateral del tubo neural (A-C, E cabezas de flecha) expresan Tgfbr3. La mayor expresión de Tgfbr3 se observa en la notocorda, tanto en las células de la capa interna (A-C asterisco) como de la capa externa a las 24 hpf, para posteriormente observar su expresión en las células de la capa externa (E, F, H). También se puede observar en la porción terminal del pronefros a las 24 hpf (A,C flecha). En todas las imágenes \* marca la notocorda. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

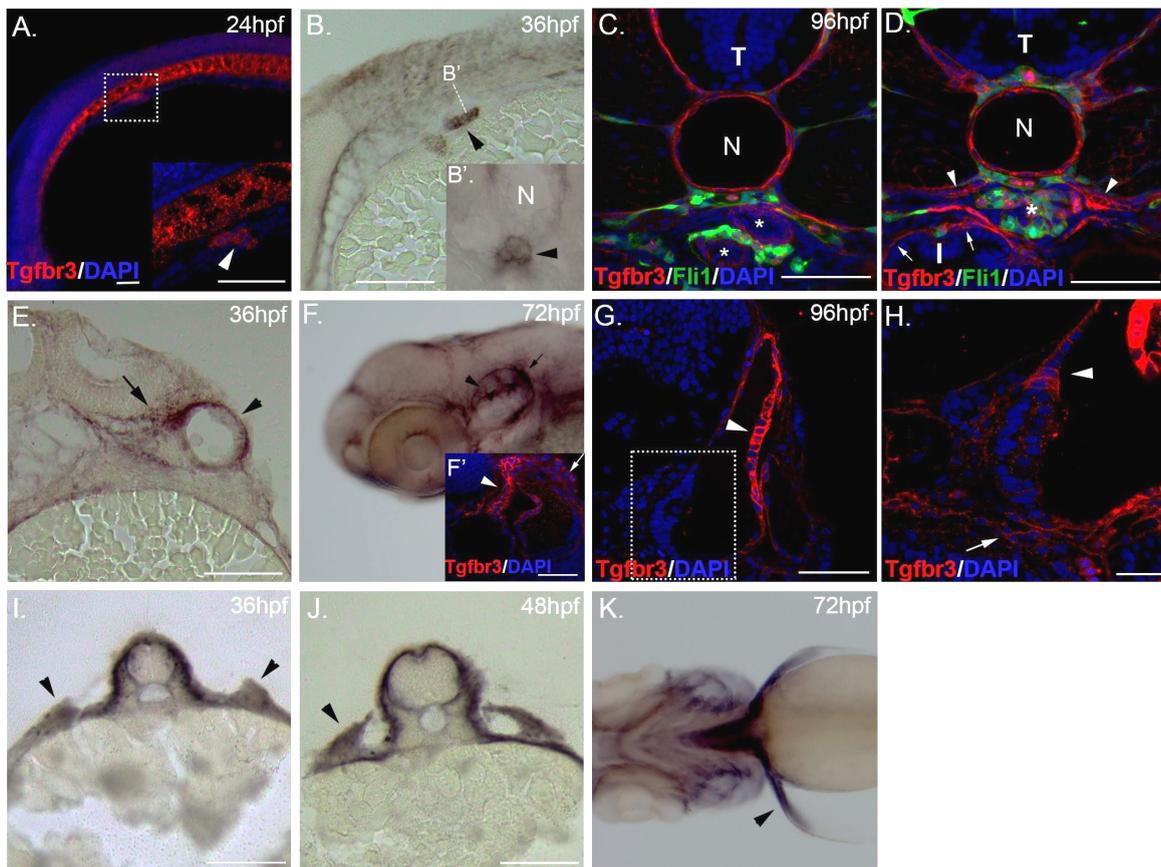


**Figura 10. Tgfbr3 se expresa en el corazón.** Inmunofluorescencia contra Tgfbr3 en corazones de 48 hpf (A-C), 72 hpf (D-F), 96 hpf (G-I) y 6dpf (J-L). De las tres capas que conforman el corazón, Tgfbr3 se expresa en las células musculares del miocardio del ventrículo y la aurícula (A,D,G,J) y no en el endocardio (B,E,H,K) o epicardio (L flechas), principalmente en el canal atrioventricular donde se forman las válvulas atrioventriculares (Asteriscos), en donde Tgfbr3 se puede observar a partir de las 72 hpf (D). Tgfbr3 se expresa en menor nivel en el miocardio trabecular (G flecha) en comparación a la capa compacta del miocardio (G cabeza de flecha). Tgfbr3 se expresa en el bulbo arterioso (b) (J). Barra de escala 20  $\mu$ m.

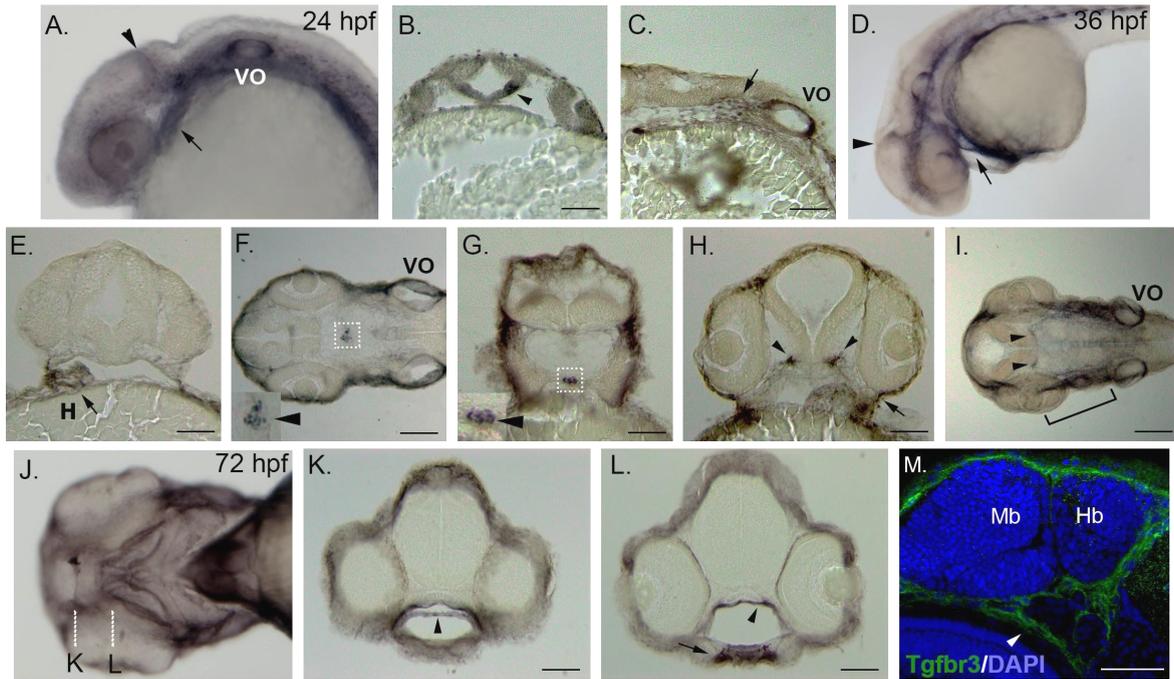
A partir de las 24 hpf Tgfb3 se detectó en un discreto grupo de células localizadas entre la segunda y tercera somita en la parte ventral de la notocorda que concuerdan con la glándula interrenal, glándula homóloga a la glándula adrenal en los mamíferos (Figura 11 A,B). Tgfb3 se observó también a las 24 hpf en células de la porción distal del pronefros y la cloaca (Figura 9 A,C) y en las células que rodean a los podocitos glomerulares, el pronefros y las células mesenquimales de la porción basal del epitelio intestinal a las 96 hpf (Figura 11C,D). A partir de las 36 hpf Tgfb3 se observó claramente en las células de la vesícula ótica (VO) y para las 72 y 96 hpf se observó en las células de soporte de los canales del oído interno y células mesenquimales adyacentes pero no en las células ciliadas de la mácula (Figura 11 E-H). Por igual Tgfb3 se detectó en células del primordio de las aletas pectorales a las 24 hpf, restringiendo su expresión a las células mesenquimales y musculares de la aleta para las 72 hpf (Figura 11 I-K). En la región de la cabeza Tgfb3 se detectó en la pituitaria, los músculos de la mandíbula, células mesenquimales que rodean el cerebro y células que cubren la parte dorsal de la cavidad oral en una estructura análoga al paladar en mamíferos (Figura 12). Tgfb3 se detectó también en células de la región dorsal y ventral del tubo neural a las 24 hpf (Figura 9 A-C,E; 12B) y para las 36 hpf en la misma región su expresión se restringió a un área de células que muestran un fenotipo migratorio (Figura 11B, 12C,H,I).

Durante la somitogenesis fue posible detectar a Tgfb3 en un grupo de células localizadas anteriormente a la VO, conforme avanzó el desarrollo las células que expresaban al receptor y el área que estas abarcaban incrementó en longitud en dirección anterior (Figura 9B,C). Este patrón de expresión corresponde a los dominios de células de la cresta neural, caracterizadas por su capacidad migratoria. Para las 24 hpf fue evidente que el origen de las células migratorias se encuentra anterior a la VO (Figura 11E, 12C) y para las 36 hpf fue posible identificar las vías migratorias que siguen estas células (Figura 12). Las células anteriores a la VO viajan a través de la línea media de la cabeza lateral al sistema nervioso hasta la parte más anterior de la cabeza (Figura 12 I), algunas células cubren el límite entre el cerebro medio y posterior y para este estadio (36 hpf) fue evidente que otro grupo importante de células migran al tubo cardiaco en desarrollo (Figura 12D). Se han descrito anteriormente en pez cebra dos poblaciones de la cresta neural que contribuyen directamente a la población de células del miocardio, una que se integra

al tubo cardiaco y adopta un destino muscular y otro que invade el bulbo arterioso<sup>70-72</sup>. En concordancia con la expresión en células de la cresta neural, a partir de las 19 hpf y hasta las 36 hpf se detectó la expresión de Tgfr3 en algunas células de la región dorsal del embrión localizadas en el techo del tubo neural así como en la región lateral y dorsal (Figura 9A-E).



**Figura 11. Expresión de Tgfr3 en el pronefros, la vesícula ótica y las aletas pectorales.** IHC e IFC contra Tgfr3 en embriones completos (A,F,J), secciones laterales (B,E) y secciones coronales (C,D,G-J). La glándula interrenal (A,B flecha) expresa fuertemente Tgfr3 al igual que el pronefros (C asterisco) y las células mesenquimales que rodean el glomérulo (D cabeza de flecha) y el intestino (I) (D flechas). En la vesícula ótica Tgfr3 se expresa en las células epiteliales (E cabeza de flecha) y las células epiteliales de los canales semicirculares (F,G,H cabezas de flecha), células mesenquimales (H flecha) pero no en las células sensoras ciliadas (H asterisco). Durante el desarrollo de las aletas pectorales Tgfr3 se expresa fuertemente en los primordios (I,J flechas) y su expresión se restringe a las células musculares de las aletas a las 72 hpf (K, cabeza de flecha). N: notocorda, T: tubo neural. Barra de escala : 50  $\mu$ m.



**Figura 12. Expresión de Tgfb3 en la cabeza del embrión.** IHC e IFC contra Tgfb3 en embriones completos (A,D,J), secciones laterales (C,M), secciones coronales (B,E,G,H,K,L) y secciones transversales (F,I). 24 hpf (A-C), 36 hpf (D-I) y 72 hpf (J-M). Tgfb3 se expresa en el tubo cardíaco (A,E flecha) y la vesícula ótica (C,F,I). A las 24 hpf una población de células neuronales expresan Tgfb3 (B cabeza de flecha) pero como avanza el desarrollo su expresión se restringe a células mesenquimales que rodean el sistema nervioso central (A,D,M cabeza de flecha) y células migratorias como en C (flecha) y H-I ( cabeza de flecha y corchete). Las células de la pituitaria expresan Tgfb3 desde las 36 hpf (F,cabeza de flecha). Tgfb3 también se expresa en las células musculares de la mandíbula (J) y el epitelio de la boca (K,L cabeza de flecha). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

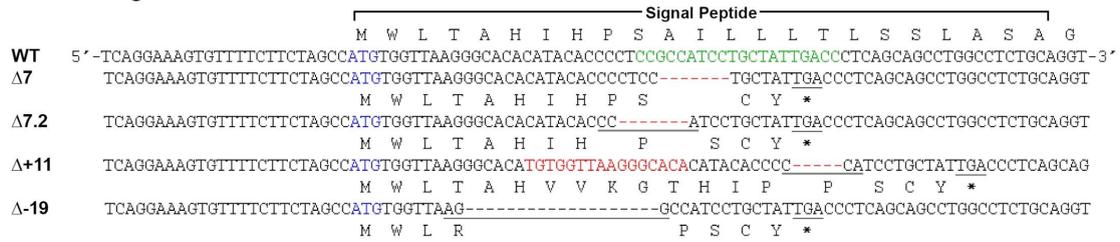
## 7.2 El Tgfbr3 no es esencial para el desarrollo del pez cebra.

Con el fin de ahondar más en la importancia de Tgfbr3 durante el desarrollo embrionario de los vertebrados nos propusimos generar una línea de peces nulos para el receptor. Para lograr este objetivo decidimos crear mutaciones en el exón 2 de *tgfbr3* que codifica para el sitio de inicio de la traducción y el péptido señal usando el sistema CRISPR-Cas9. Como primer paso se realizó la secuenciación del exón 2 de *tgfbr3* de nuestra población de peces Tab14/Wik en búsqueda de polimorfismos que pudieran afectar la efectividad de corte de Cas9, donde se encontró un único polimorfismo fuera de la secuencia blanco utilizada para el diseño de la guía de RNA.

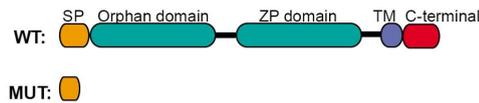
Después de la generación y segregación de alelos con mutaciones en la secuencia del exón 2 se obtuvieron 4 diferentes líneas de alelos nulos para *tgfbr3*. En 3 alelos el corte de Cas9 generó la delección de 7 pares de bases (pb) en dos alelos ( $\Delta$ -7 y  $\Delta$ -7.2) y de 19 pb en el tercero ( $\Delta$ -19), mientras que en un cuarto alelo se detectó tanto una delección de 5 pb como una inserción de 16 pb en la secuencia del exón 2 ( $\Delta$ +11). En los 4 casos el cambio en la secuencia modificó el marco de lectura y la aparición de un codón de paro prematuro después de 12 ( $\Delta$ -7 y  $\Delta$ -7.2), 8 ( $\Delta$ -19) o 18 ( $\Delta$ +11) codones (Figura 13A). Todos los codones de paro se localizaron dentro del exón 2, por lo que cualquier inicio de la traducción alterno dentro del marco de lectura del gen o eliminación del exón 2 por un mecanismo de splicing alternativo darían como resultado una proteína sin péptido señal incapaz de alcanzar la membrana celular y ejercer su función receptora (Figura 13B).

Para demostrar que los alelos mutantes generaban peces nulos para Tgfbr3 se tomaron embriones de cruces de peces heterocigotos (*tgfbr3*<sup>+/ $\Delta$</sup> ) para cada uno de los alelos y se realizaron experimentos de IHC usando el suero anti-Tgfbr3 (Figura 13D). La detección del receptor reveló embriones que carecían de señal cuya genotipificación reveló en todos los casos que se trataba de embriones homocigotos (*tgfbr3* <sup>$\Delta/\Delta$</sup> ) para cada uno de los alelos mutantes, lo que demostró la obtención de embriones carentes de Tgfbr3 (Figura 13E).

### A. Exon 2 de *tgfbr3*



### B.



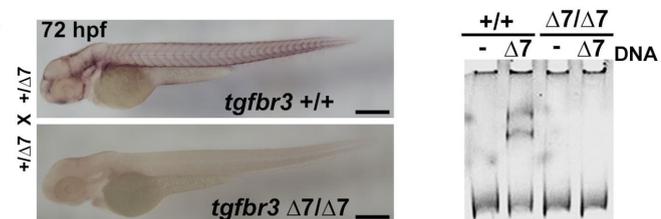
### C.



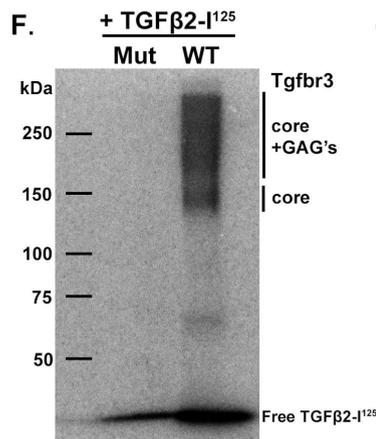
### D.



### E.



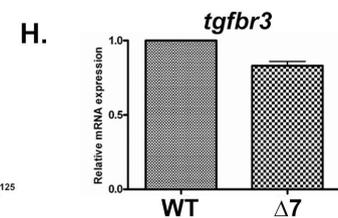
### F.



### G.



### H.



**Figura 13. Las líneas mutantes nulas de zebrafish para *tgfbr3* sobreviven hasta la adultez.** A. Secuencia del exón 2 del alelo silvestre y los alelos de mutantes de Tgfbr3 (WT,  $\Delta 7$ ,  $\Delta 7.2$ ,  $\Delta +11$ ,  $\Delta -19$ ). Resaltados están el codón de inicio de la traducción (azul), la secuencia blanco de Cas9 (verde), las pb eliminadas o insertadas en los alelos mutantes (rojo) y el nuevo codón de paro (subrayado, \*). B. Esquema de los dominios estructurales codificados por el alelo silvestre de Tgfbr3 versus los alelos mutantes. C. Cuantificación de embriones con defectos en el desarrollo provenientes de padres mutantes homocigotos de los alelos nulos para *tgfb3*, solos o combinados, a las 72 hpf. D. IHC contra Tgfbr3 en embriones obtenidos de padres heterocigotos para los alelos  $\Delta 7$ ,  $\Delta 7.2$ ,  $\Delta +11$ . Embriones sin señal (\*) y con señal (#) para el receptor. E. Embriones con y sin tinción para Tgfbr3 fueron genotipificados para corroborar la presencia del alelo nulo de *tgfbr3*. F. Embriones

silvestres (WT) y mutantes homocigotos  $\Delta 7$  (Mut) fueron analizados por AFLIP para revelar la presencia endógena de *Tgfbr3*. G. Imagen de peces adultos silvestre (+/+) y mutante ( $\Delta 7/\Delta 7$ ) de 6 mpf donde se observa que no existen diferencias morfológicas evidentes. H. Expresión relativa del mRNA de *tgfbr3* por RT-qPCR en embriones de 7 dpf silvestres (WT) y mutantes ( $\Delta 7$ ).

Los embriones resultantes de las cruzas de peces heterocigotos se criaron hasta la adultez y durante su desarrollo se analizaron en busca de defectos. Para nuestra sorpresa solo 1 alelo presentó defectos evidentes a las 72 hpf ( $\Delta$ -19), sin embargo, la genotipificación de los embriones con el fenotipo en la reducción del tamaño de los ojos resultó en embriones heterocigotos para el alelo mutante de *tgfbr3* (datos no mostrados) lo que sugirió un efecto “off-target” de la guía contra la secuencia blanco, por lo que el alelo se eliminó. Para los alelos restantes, todos los embriones homocigotos para la mutación presentaron un ligero retraso en el desarrollo que no impidió su llegada a la adultez, donde no presentaron diferencias en tamaño en comparación con los peces heterocigotos y silvestres (Figura 13C,G). Aún más importante, los peces mutantes de los tres alelos restantes (*tgfbr3* <sup>$\Delta\Delta$</sup> ) fueron organismos fértiles. Para descartar cualquier mecanismo de compensación que estuviera presente en nuestras líneas mutantes, el RNA mensajero de los peces adultos fue secuenciado para corroborar la presencia del exón 2 mutante, lo que descartó en primer lugar un mecanismo de eliminación del exón. A partir de este momento se seleccionó la mutante  $\Delta$ -7 para todos los análisis posteriores realizados.

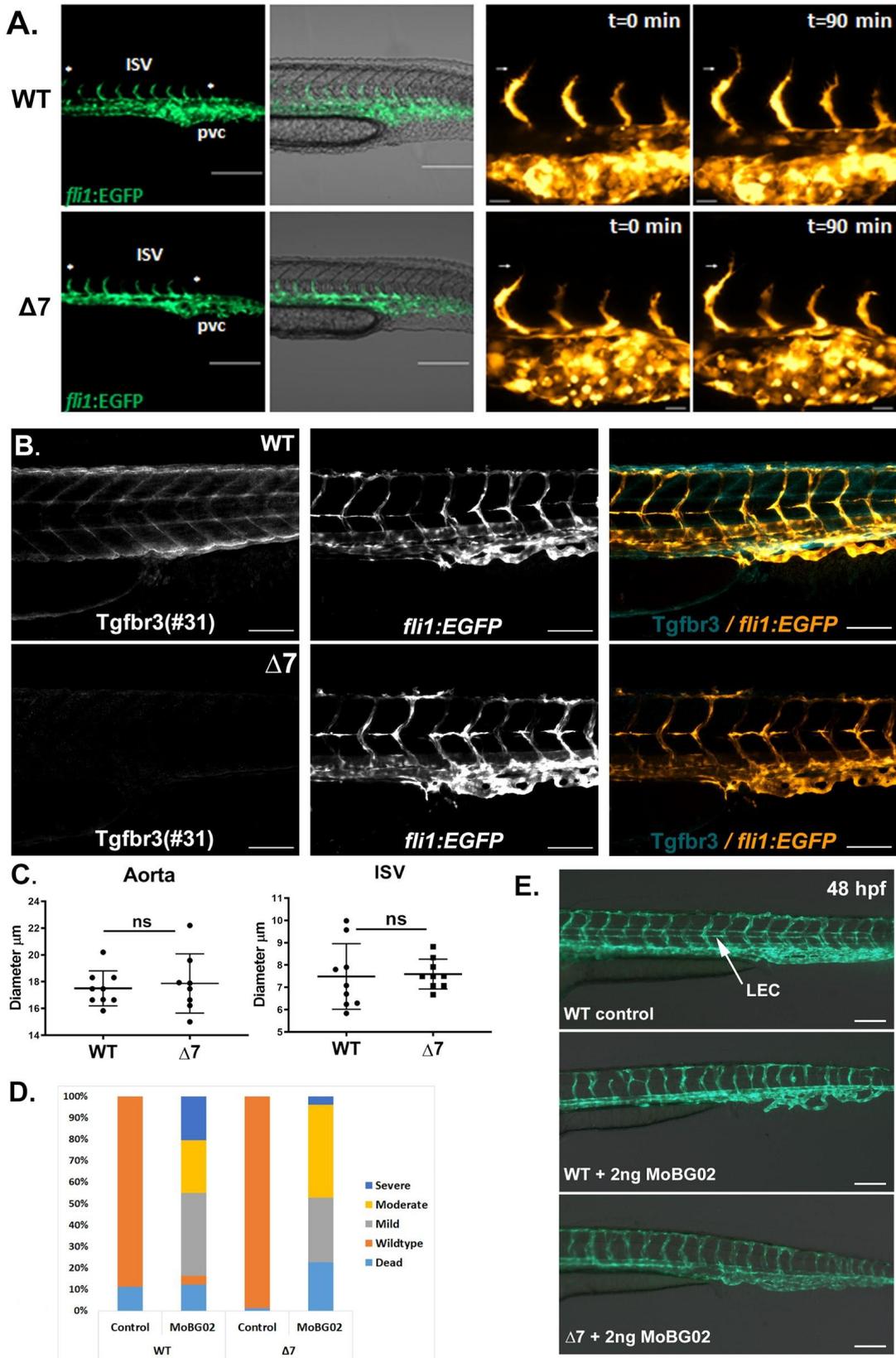
Así también los niveles del transcrito fueron analizados por RT-PCR cuantitativa en búsqueda de un mecanismo de adaptación transcripcional mediada por degradación del RNA que ha sido descrita en pez cebra<sup>73</sup>. Los resultados no arrojaron una diferencia significativa en los niveles del transcrito mutante en comparación con los niveles del transcrito silvestres, por lo que se descartó la presencia de este mecanismo de adaptación en nuestros alelos (Figura 13H). En conjunto estos datos sugieren que *Tgfbr3* no es necesario para el desarrollo del pez cebra y que un mecanismo de compensación genética, como el activado por el mecanismo de mRNA nonsense decay, no está presente en los alelos mutantes de *tgfbr3*.

### **7.3 Los embriones mutantes de *tgfbr3* no tienen defectos similares a los de embriones morfantes de pez cebra o de embriones mutantes de ratón.**

Experimentos de “knock down” en embriones de pez cebra usando morfolinós que afectan el splicing del exón 2 revelaron defectos en la migración y anastomosis de los vasos intersegmentales<sup>43</sup>. Por otro lado, los embriones de ratón mutantes para TGFBR3 (*Tgfbr3<sup>tm1Stv</sup>*) presentan defectos en el desarrollo del corazón, los vasos coronarios y anomalías en la distribución de vasos en el paladar<sup>33,74,75</sup>.

Para analizar con mayor detalle los embriones de pez cebra nulos para *Tgfbr3* en búsqueda de algún defecto vascular se usó la línea transgénica *Tg(fli1:EGFP)* que marca las células endoteliales. El análisis de embriones a las 28 hpf demostró que los embriones mutantes tenían un retraso en el surgimiento de los brotes angiogénicos (Figura 14A), debido quizás al retraso en el desarrollo, pero los vasos no presentaron defectos en su migración o en el proceso de anastomosis (Figura 14B). Aún más el medir el diámetro de los vasos intersegmentales y la aorta a las 48 hpf no se encontró ninguna diferencia significativa entre los embriones mutantes y los silvestres (Figura 14C) lo que sugiere que no existe un defecto en el correcto flujo sanguíneo.

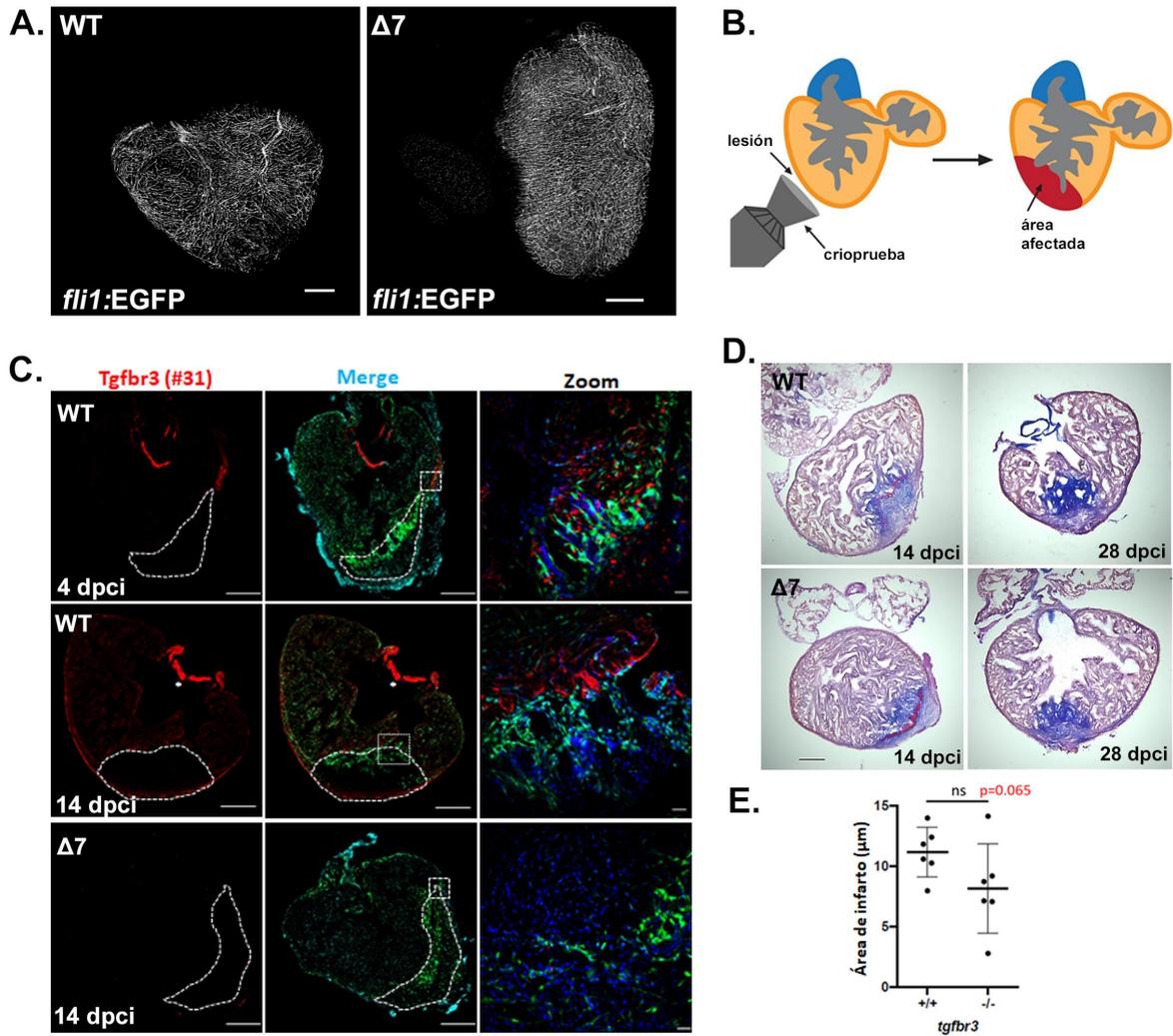
En búsqueda de una explicación para la diferencia en el fenotipo vascular entre los embriones mutantes y morfantes se decidió replicar los experimentos con morfolinós en el fondo mutante. Al microinyectar el morfolino en los embriones nulos para *Tgfbr3* se espera que no exista ningún efecto en el desarrollo vascular, ya que carecen de la función del receptor desde el inicio del desarrollo. Tanto en embriones mutantes como silvestres microinyectados con 7 ng del morfolino presentaron los mismos defectos vasculares con una proporción comparable de severidad a las 48 hpf (Figura 14D). Para descartar efectos tóxicos por la concentración del morfolino se disminuyó la dosis a 2ng y los embriones se analizaron nuevamente a las 48 hpf. En ambos fondos genéticos se observó que la migración de las células endoteliales es correcta pero presentan un retraso en la aparición de las células endoteliales linfáticas paracordales (Figura 14E). En conjunto, estos datos indican que la función de *Tgfbr3* no es necesaria durante el proceso de angiogénesis en el pez cebra y sugieren que el fenotipo angiogénico observado en los embriones morfantes es resultado de efectos “off-target”.



**Figura 14.** Los embriones mutantes nulos para *Tgfr3* no muestran defectos angiogénicos. A. Embriones silvestres y mutantes de 27 hpf en el fondo genético

Tg(*fli1*:EGFP) fueron analizados para identificar los brotes angiogénicos de la cola posterior y el comportamiento de las células endoteliales fue evaluado por 90 min. B. Los embriones silvestres (WT) y mutantes ( $\Delta 7$ ) de 48 hpf fueron sometidos a IF para detectar la presencia de Tgfr3 y analizar la correcta formación de los vasos intersegmentales. C. Se midió el diámetro de la aorta y los vasos intersegmentales (ISV) en embriones WT y  $\Delta 7$  de 48 hpf. Análisis estadísticos de *t*-student no muestran diferencias significativas. Se muestra el valor de *P*. D. Embriones provenientes de cruces de padres silvestres (WT) y de homocigotos para el alelo  $\Delta 7$  se microinyectaron en el estadio de 1 célula con un morfolino contra el splicing del exón 2 de *tgfr3* (MoBG02) o su control mismatched (control). Las malformaciones se evaluaron y agruparon por su severidad a las 48 hpf. Los embriones mutantes no mostraron una resistencia a los efectos del morfolino. E. Imágenes de embriones Tg(*fli1*:EGFP) de 48 hpf WT y  $\Delta 7$  microinyectados con 2ng de morfolino. Se observan defectos vasculares sutiles en la formación del vaso linfático paracordal (LEC) en ambos genotipos. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

Los ratones mutantes Tgfr3<sup>tm1Stv</sup> presentan defectos embrionarios en diversos tejidos, pero su fenotipo letal intrauterino se le atribuye a los defectos cardiovasculares que presenta<sup>33,74</sup>. Al igual que en el ratón, Tgfr3 se expresa fuertemente en las células del miocardio y las válvulas cardíacas del corazón durante todo el desarrollo temprano del pez cebra (Figura 10). No obstante, los embriones mutantes de pez cebra no presentan ningún signo de disfunción del sistema cardiovascular como edema pericárdico y su desarrollo es normal hasta la edad adulta (Figura 13C). En ratón se describió el papel de Tgfr3 en el surgimiento de los vasos coronarios<sup>74</sup>, pero a diferencia del ratón los vasos coronarios se desarrollan tardíamente en el pez cebra (2 mpf) aunque comparten los mismos mecanismos moleculares<sup>76</sup>. Haciendo uso del mismo fondo transgénico para marcar las células endoteliales Tg(*fli1*:EGFP), se analizaron corazones de peces adultos silvestres y mutantes en búsqueda de defectos en estos vasos. A groso modo no se observó la ausencia de vasos coronarios en los corazones de peces mutantes (Figura 15A), y se observó la misma densidad de vasos coronarios en la superficie ventricular al compararlos con los corazones silvestres, sugiriendo una vez más que Tgfr3 no se requiere para procesos de angiogénesis en pez cebra.



**Figura 15. Los corazones de peces adultos mutantes no presentan defectos en los vasos coronarios o su capacidad de regeneración.** A. Imágenes confocales de ventrículos de corazones de peces adultos WT y  $\Delta 7$  muestran una distribución normal de vasos coronarios en los corazones mutantes. B. Esquema ilustrativo del procedimiento de infarto por criolesión. El procedimiento provoca una muerte celular masiva en el tejido, lo que simula un infarto. C. IF en cortes histológicos de corazones Tg(*fli1:EGFP*) silvestres (WT) y mutantes ( $\Delta 7$ ) a los 4 y 14 dpci para detectar la expresión de Tgfb3. D. Tinción de AFOG (Acid Fuchsin Orange G) en cortes histológicos de corazones infartados WT y  $\Delta 7$  para detectar la acumulación de Fibrina (rojo) y colágeno (Azul) durante el proceso de regeneración a los 14 y 28 dpci. Se contratiñó con Hematoxilina. E. Cuantificación del área de infarto a los 28 dpci en corazones silvestres (+/+) y mutantes (-/-). El valor de *P* se muestra en rojo. Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

A diferencia de los mamíferos, el pez cebra es capaz de regenerar el tejido cardíaco y recuperar su función tras una muerte celular masiva <sup>77</sup>. Tgfb3 no se detectó en el tejido cardíaco de peces cebra adultos silvestres, pero tras un daño por congelamiento que simula la muerte celular masiva causada por un infarto (Figura 15B), Tgfb3 se comenzó a re-exresar a los 3 días post infarto (dpi) en células del borde del área afectada (Figura 15C) para posteriormente (7 dpi) ser detectado en todas las células del miocardio (Figura 15C), lo que concuerda con la proliferación y re-diferenciación de las células del miocardio a un estado similar al del desarrollo <sup>78</sup>. Por esta razón hipotetizamos que los peces nulos para Tgfb3 tendrían un defecto en el proceso de regeneración.

Para comprobar nuestra hipótesis los peces mutantes fueron sometidos al mismo tipo de daño y el proceso de regeneración se analizó a los 28 dpi. Al cuantificar el tamaño del infarto entre peces mutantes y silvestres no se encontró una diferencia significativa en el tamaño del infarto, pero los peces mutantes mostraron una tendencia a tener un área de infarto reducida (Figura 15D,E). Aunque se necesitan más experimentos, estos datos sugieren que el receptor no juega un papel indispensable en el proceso de regeneración del corazón en el pez cebra.

#### **7.4 Tgfb3 participa en el desarrollo de la notocorda**

Los ratones mutantes para Tgfb3 presentan una reducción en el tamaño de la cabeza mientras que los ratones doble mutantes para Tgfb2 y Tgfb3 presentan defectos craneofaciales <sup>33,41,79</sup>. Basándonos en estos datos decidimos buscar anomalías craneofaciales en los embriones de pez cebra nulos para Tgfb3. Para lograr este objetivo se decidió realizar tinciones de cartílago y hueso a los 6 y 13 dpf (Figura 16A). A los 6 dpf las larvas mutantes no presentaron diferencias significativas en el largo o ancho de la cabeza pero a los 13 dpf las larvas mutantes presentaron una disminución significativa en ambas medidas (Figura 16 C,D), que podría deberse al retraso general en el desarrollo que se observa en los embriones mutantes.

Sin embargo al analizar el tronco de las larvas teñidas con esta técnica observamos un fenotipo reproducible entre las larvas mutantes, que fue una reducción en el

número de segmentos mineralizados de la notocorda. Este fenómeno se documentó inicialmente a las 6 y 13 dpf (Figura 16B) pero análisis a los 34 dpf (Figura 16E) mostraron que el fenotipo perdura hasta el estadio de larva, pero los peces adultos no presentan defectos en su esqueleto o número de vértebras, lo que sugiere que este fenómeno es transitorio y propio del desarrollo.

En experimentos de IF e IHC en embrión completo que se realizaron al inicio del proyecto observamos la expresión del receptor en el mesodermo axial (Figura 16G) que da origen de la notocorda, y en las células de la notocorda durante los primeros 4 días del desarrollo del pez cebra (Figura 9 y 16H). Para establecer una mejor correlación entre la expresión del receptor y el fenotipo observado se realizaron experimentos de IF a los 6 dpf. Como se observó anteriormente, la expresión de Tgfb $\beta$ 3 a las 24 hpf se localizó en las células internas de la notocorda (Figura 16 H,I) mientras que a las 6 y 13 hpf Tgfb $\beta$ 3 se encontró altamente expresado en las células de la capa externa (Figura 16 J-M) las cuales son responsables de la secreción de los componentes para la mineralización de la notocorda. De manera importante, a diferencia de la segmentación observada en el proceso de mineralización, Tgfb $\beta$ 3 se expresa uniformemente a lo largo de la notocorda. Estos datos en conjunto sugieren que Tgfb $\beta$ 3 es necesario para el proceso de mineralización de la notocorda.

### **7.5 La vía de TGF $\beta$ está alterada en las larvas mutantes de *tgfb $\beta$ 3***

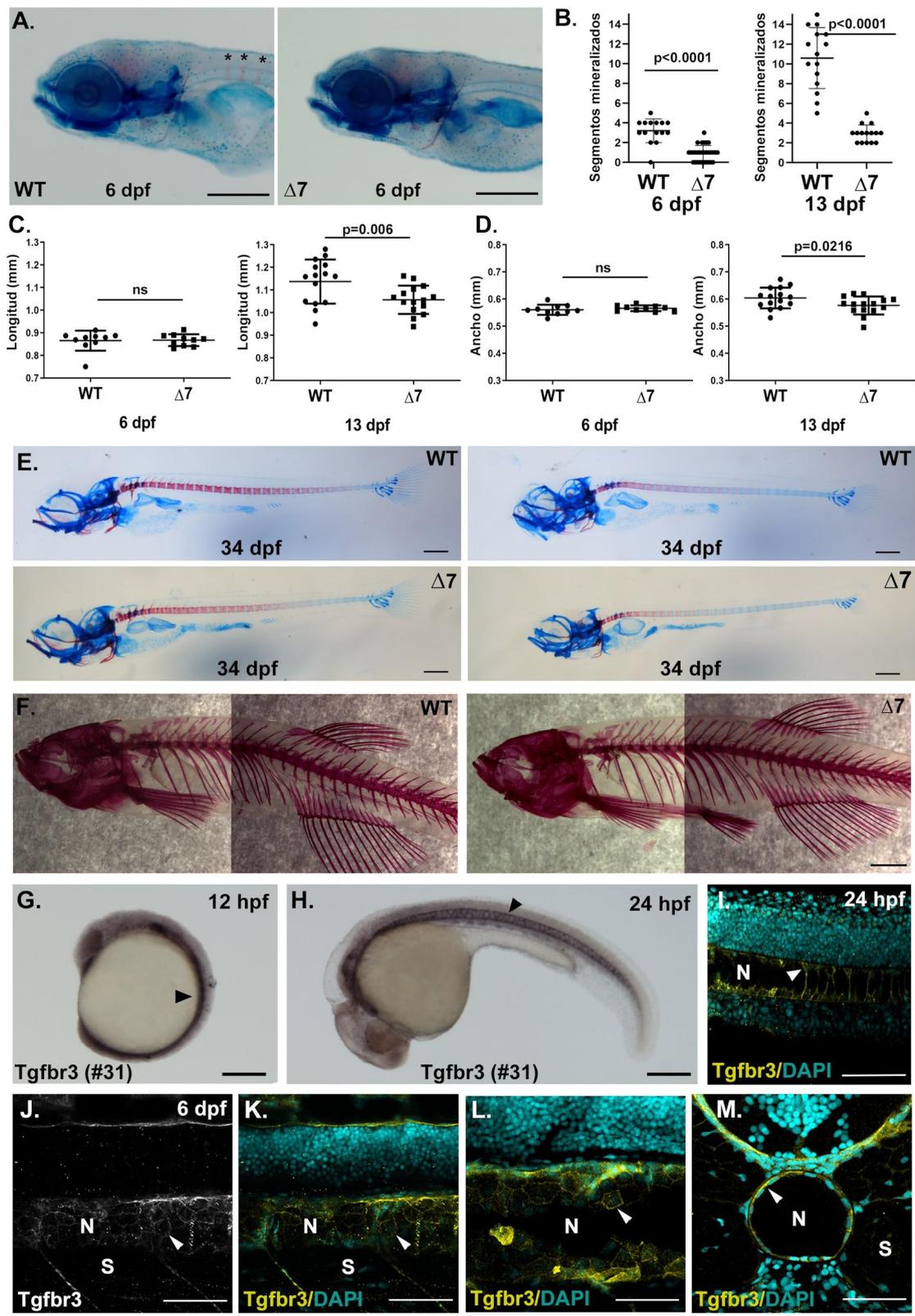
La función de presentación de ligando del Tgfb $\beta$ 3 es necesaria para el incremento de la señalización de la vía del TGF $\beta$ , por lo que hipotetizamos que las larvas carentes del receptor tenían una disminución en los niveles de activación de la vía.

Para detectar cambios en la activación de la vía de TGF $\beta$ , analizamos los niveles de fosforilación de Smad2 en experimentos de Western blot (WB) usando la parte posterior de los embriones que comprende la notocorda. Para este experimento se analizaron larvas de 96 hpf donde el proceso de mineralización aún no inicia y larvas de 6 dpf donde el fenotipo era evidente pero no existía una diferencia significativa en el desarrollo craneofacial. Aunque en embriones de 96 hpf (silvestres y mutantes) no observamos una diferencia en los niveles de fosforilación de Smad2, a los 6 dpf sorpresivamente detectamos un aumento significativo en los niveles de

fosforilación de Smad2 en los embriones mutantes (Figura 17A), pero importantemente no detectamos cambios en los niveles de activación de la vía de Notch, analizada por los niveles de NICD, la cual controla la especificación y el tiempo de la mineralización de los segmentos de la notocorda<sup>80,81</sup>.

Para distinguir espacialmente en el tronco de las larvas las células con la vía de TGF $\beta$  activa, realizamos un experimento de IF para detectar pSmad3 en larvas silvestres. Este enfoque reveló que la vía de TGF $\beta$  se activa principalmente en las células de las somitas y en células de la capa externa de la notocorda de forma segmentada (Figura 17B). Debido a que este patrón de segmentación recapitula al observado en la especificación de la cordocentra, donde ocurre la mineralización, decidimos realizar co-tinciones con rojo de alizarina. Este experimento reveló que los núcleos positivos para pSmad3 en la notocorda se encontraban dentro de los segmentos marcados por la tinción de rojo de alizarina lo que sirvió para confirmar la identidad de la cordocentra, localizada en el límite de las somitas (Figura 17C). Esta observación sugirió un papel directo de TGF $\beta$  en el proceso de mineralización de la cordocentra, por lo que para confirmarlo decidimos analizar las larvas carentes de Tgfb3. El experimento que realizamos mostró que el patrón segmentado se mantiene y demostró claramente una disminución en la activación de la vía de TGF $\beta$  en las células de la cordocentra en las larvas mutantes (Figura 17D), sugiriendo que la expresión de Tgfb3 es necesaria para la correcta activación de la vía canónica de TGF $\beta$ .

Para confirmar que la vía canónica del TGF $\beta$  es necesaria para la correcta mineralización de la notocorda decidimos utilizar el inhibidor SB431542 que bloquea la función del receptor tipo I (ALK5). Larvas silvestres y mutantes fueron tratados desde las 72 hpf, antes de que inicie el proceso de mineralización, hasta los 6 dpf con diferentes concentraciones del inhibidor, al finalizar el tratamiento el número de segmentos mineralizados se contabilizaron. Este experimento nos permitió observar una reducción de los segmentos mineralizados en una forma dosis-dependiente en las larvas silvestres, mientras que en las larvas mutantes el número de segmentos mineralizados se mantuvo reducido en presencia de las dosis más bajas del inhibidor para reducirse aún más con las concentraciones más altas del inhibidor (Figura 17E).

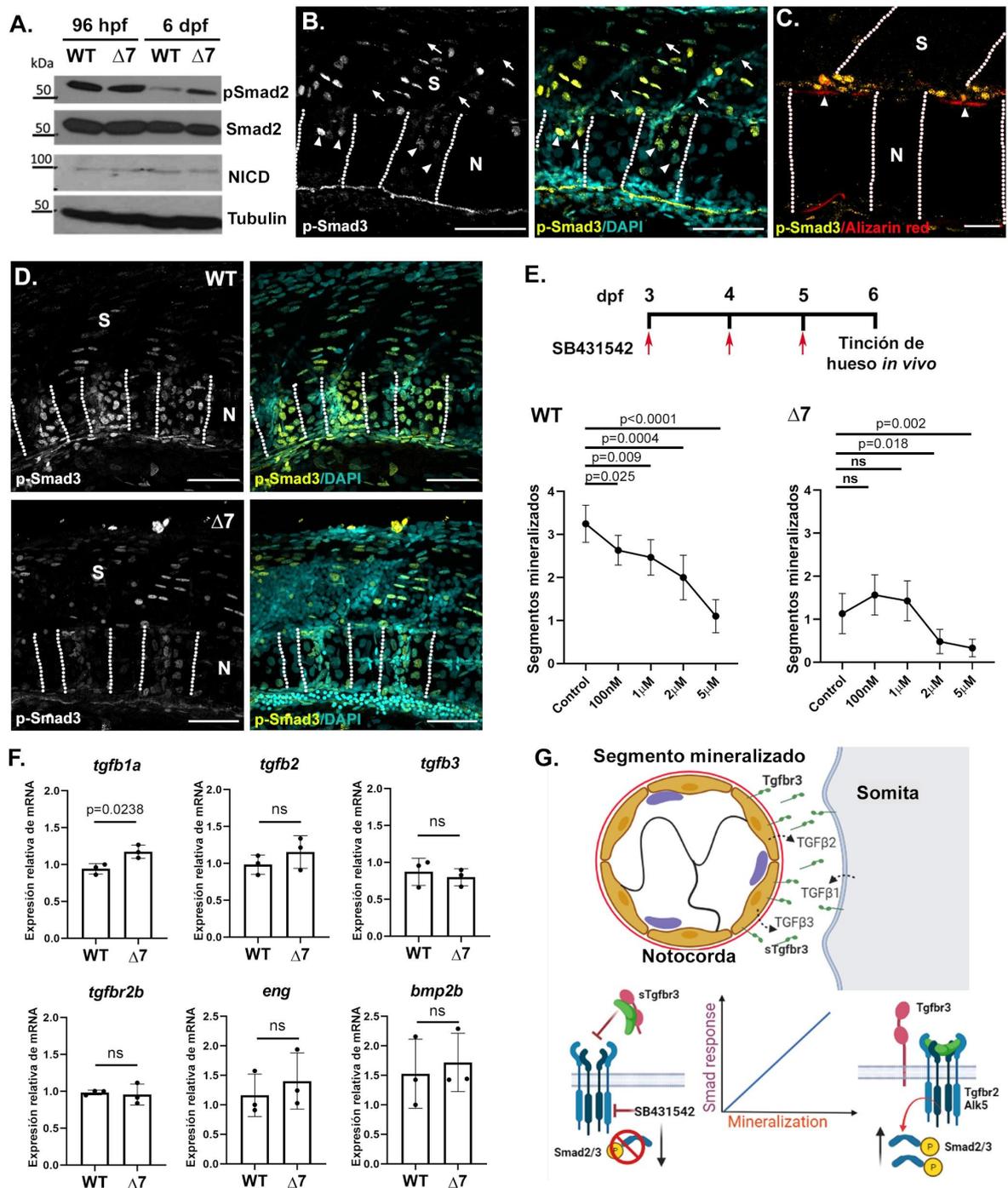


**Figura 16.** Los embriones nulos para Tgfr3 presentan un retraso en la mineralización de la notocorda. A. Embriones WT y  $\Delta 7$  de 6 dpf fueron teñidos con rojo de alizarina y azul de alcian para marcar el hueso y el cartílago. Los asteriscos marcan los segmentos

mineralizados de la notocorda (bandas rojas). Los segmentos mineralizados (B), el largo de la cabeza (C) y el ancho de la cabeza (D) fueron cuantificados en larvas WT y  $\Delta 7$  a los 6 y 13 dpf. Se muestra el valor de *P. E.* Tinción de hueso y cartílago en peces juveniles de 34 dpf. Dos imágenes representativas de larvas de diferentes longitudes WT y  $\Delta 7$  muestran un retraso en la mineralización de la notocorda en las larvas mutantes. F. Tinción con Rojo de Alizarina de peces de un año, WT y  $\Delta 7$ , muestran un esqueleto normal. G-M. Expresión de Tgfb3 durante el desarrollo de la notocorda en larvas silvestres. IHC en embrión completo a las 12 hpf (G) y 24 hpf (H) muestran la expresión del receptor en el mesodermo axial y la notocorda (cabeza de flecha). IF en criosecciones a las 24 hpf (I) y 6 dpf (J-M) revelan la expresión de Tgfb3 en la membrana de las células vacuoladas internas y en la membrana de las células de la capa externa (Cabezas de flecha). Somita (S), Notocorda (N). Barra de escala en A,F,G,H: 200  $\mu\text{m}$ , en E, I-M: 100  $\mu\text{m}$ .

En un esfuerzo para explicar el aumento global en la señal de pSmad2 vista por WB, analizamos los genes de la familia de TGF $\beta$  por qRT-PCR en búsqueda de alteraciones en los niveles de expresión. De los miembros analizados el único miembro de la familia que presentó una alteración fue *tgfb1a*, el cual mostró un aumento significativo en el tronco de las larvas mutantes (Figura 17F), sugiriendo que este aumento en el ligando podría ser la causa del fenómeno observado por WB.

En conjunto todos los datos sugieren un papel preponderante de la vía de TGF $\beta$  y Tgfb3 en la mineralización de los segmentos de la cordocentra y la formación de las vértebras en el pez cebra (Figura 17G).



**Figura 17. TGF $\beta$  participa en la mineralización de la cordocentra.** A. Western blots contra Smad2 fosforilada (pSmad2), Smad2 total y NICD para determinar la activación de TGF $\beta$  y Notch. Se utilizó proteína total de colas de embriones WT y  $\Delta 7$  de 96 hpf y 6 dpf. Se usó Smad2 y tubulina como controles de carga. B. IF contra pSmad3 en secciones longitudinales de larvas WT de 6 dpf. Núcleos positivos a pSmad3 (cabeza de flecha) y el límite de las somitas (flecha) están indicados. La imagen muestra la región entre la somita 4 y 6. C. Colocalización de núcleos positivos para pSmad3 y segmentos mineralizados marcados con rojo de alizarina (cabeza de flecha). Las líneas punteadas marcan el límite de

las somitas y los segmentos mineralizados. D. IF contra pSmad3 en larvas WT y  $\Delta 7$  de 6 dpf que muestra un decremento en la señalización de TGF $\beta$  en células de la notocorda de larvas nulas para Tgfbr3. E. Inhibición farmacológica de la vía del TGF $\beta$  con SB431542 por 72 horas. Las gráficas muestran el promedio de segmentos mineralizados de 30 embriones por cada dosis. El valor de *P* se muestra. F. Expresión cuantitativa del mRNA de ligandos y receptores de TGF $\beta$  en la cola de embriones WT y  $\Delta 7$ . El valor de *P* fue calculado a partir de 3 experimentos independientes. G. Modelo propuesto para la función del TGF $\beta$  en la cordocentra. A través de su función de presentación de ligando, Tgfbr3 asiste a los ligando del TGF $\beta$  en su función. La eliminación del receptor lleva al decremento en la señalización de la vía del TGF $\beta$ , la cual es requerida para la correcta mineralización de la cordocentra. Notocorda (N), somita (S). Barras de escala: B, 200 $\mu$ m; C, 50 $\mu$ m, y D, 100 $\mu$ m.

## 8. Discusión

Un estudio previo de nuestro grupo de investigación reportó la clonación del gen homólogo de *tgfb3* en pez cebra y describió una nueva función angiogénica para Tgfb3 usando experimentos de Knock-down mediada por morfolidos <sup>43</sup> por lo que un patrón de expresión detallado era esencial para este proyecto.

Tgfb3 es fuertemente expresado durante el proceso de somitogenesis, lo que recapitula lo reportado anteriormente en mamíferos <sup>82</sup>. En ratón se mostró que la expresión de Tgfb3 aumenta durante la diferenciación del músculo esquelético <sup>82</sup> y datos recientes de nuestro laboratorio (Ramírez-Vidal, L 2022) muestran que *tgfb3* es activado transcripcionalmente durante la miogénesis, con una fuerte expresión en las células adaxiales, las cuales son un grupo de células inducidas por la señalización de Hedgehog proveniente de la notocorda y que migran radialmente a través de las somitas para posicionarse lateralmente y formar una monocapa de fibras musculares de acción lenta <sup>83,84</sup>, lo que también concuerda con la expresión de Tgfb3 a partir de las 72 hpf (Figura 8G, 9I).

Durante el proceso de somitogenesis se observó una fuerte expresión de Tgfb3 en células anteriores a la VO. Estas células se encuentran en el dominio correspondiente a células de la cresta neural, las cuales son una población de células multipotentes caracterizadas por una alta capacidad migratoria <sup>85</sup>. Las células de la cresta neural (NCC) son especificadas por señales de FGF, BMP y WNT, durante la somitogenesis sufren un proceso de transición epitelio-mesenquimal (TEM) y comienzan su migración alrededor de las 13 hpf <sup>85,86</sup>, lo que concuerda con lo observado en la expansión del dominio de estas células que expresan Tgfb3 (Figura 8 B,C). A las 36 hpf cuando fue más evidente la vía de migración que siguen estas células se observó que un grupo de NCC se dirigen al tubo cardiaco en desarrollo. Anteriormente se ha descrito en pez cebra que dos poblaciones de NCC contribuyen directamente a la población de células del miocardio, una que se integra directamente al tubo cardiaco y adopta un destino miocárdico y otra que invade el bulbo arterioso <sup>70-72</sup>, dónde también se observa expresión de Tgfb3 (Figura 10 J). Aún más, en el ratón se ha descrito que Tgfb3 se requiere para el proceso de TEM inducido por TGFB2 y BMP2 de células del epicardio y endocardio <sup>87-89</sup>.

En concordancia con la expresión de Tgfr3 en NCC de la cabeza, se observó la expresión del receptor a las 24 hpf en la región correspondiente al borde dorsal del tubo neural al igual que en la región lateral (Figura 9B,C). Se ha demostrado anteriormente que el borde dorsal del tubo neural en la región de la cola es el origen de neuronas sensoras dorsales <sup>85</sup>, por lo que hipotetizamos que las células dorsales que expresan fuertemente Tgfr3 entre las 19 y 24 hpf (Figura 8C, 9A) podrían ser células Rohon-Bear (RB). Estas células son una población de neuronas sensoriales dorsales que entran en apoptosis a las 24 hpf, y aunque la mayoría de las neuronas sensoriales se localizan en el sistema nervioso periférico, las células RB se encuentran en la región dorsal de la espina cordal <sup>90,91</sup>. Interesantemente también se sabe que el roof plate es la fuente de señalización de BMP que genera un gradiente dorsoventral, importante para la especificación de las células adaxiales <sup>90-92</sup>. Incluso se observó que Tgfr3 se expresa en células mesenquimales que rodean el tubo neural, que junto con su expresión en las células de las somitas y la notocorda se asemeja al patrón de expresión de cadenas de heparán sulfato, las cuales se ha descrito que restringen la difusión de BMP y es importante en la formación del miotomo <sup>93,94</sup>.

Además de su expresión en NCC, Tgfr3 se detectó en otras regiones de la cabeza de los embriones. A las 24 hpf se observaron células de la parte dorsal del tubo neural que cubren la cabeza del embrión, lo que podrían ser células epidermales las cuales se ha observado que expresan Tgfb1a. Por otro lado Tgfr3 se detectó expresado en la pituitaria (Figura 12 F,G), lo que sugiere que no solo tiene un rol importante en el eje pituitaria-hipófisis-gónada durante la adultez como receptor de Inhibina A <sup>24,95,96</sup>, si no también durante su desarrollo. También a las 72 hpf Tgfr3 se detectó en los músculos de la mandíbula, que derivan del mesodermo <sup>97</sup>, y en la cavidad oral análoga al paladar de mamíferos donde se ha descrito que Tgfr3 se localiza en el epitelio del borde medial <sup>98,99</sup>.

El “knock out” de Tgfr3 en ratón produce defectos cardíacos que se han descrito como la principal causa del fenotipo letal embrionario. La detección de Tgfr3 en el corazón en desarrollo del pez cebra demostró ser altamente conservada con mamíferos dónde se ha demostrado que Tgfr3 participa en el proceso de trabeculación y formación de las válvulas cardíacas a través de la señalización de

TGFB2 y BMP2<sup>33,100</sup>. A diferencia del ratón donde las válvulas se desarrollan a partir de células endocárdicas que cambian morfológicamente para convertirse en células mesenquimales e invadir la matrix extracelular<sup>34,87,89,101</sup>, en el pez cebra las válvulas no presentan este paso intermedio si no que directamente las células forman las válvulas por un proceso de invaginación, sin embargo se ha demostrado que la inhibición de la vía de TGFB afecta la forma de las células de las válvulas<sup>102</sup> lo que sugiere una función conservada.

Nuestro trabajo en el laboratorio demostró que el “knock down” de *Tgfb3* por morfolidos resulta en defectos angiogénicos, sin embargo los datos de expresión del receptor no demuestran una expresión del receptor en células endoteliales, lo que puede sugerir un papel celular no autónomo del receptor en el proceso de angiogénesis<sup>43</sup>. Por otro lado, en recientes años se ha reportado una discrepancia entre los fenotipos morfantes y mutantes en pez cebra por lo que nos propusimos inicialmente corroborar el fenotipo morfante en peces nulos para *tgfb3*.

En este trabajo se obtuvieron 4 diferentes líneas de alelos mutantes ( $\Delta 7$ ,  $\Delta 7.2$ ,  $\Delta +11$ ,  $\Delta 19$ ) que codifican mRNA con codones de paro en la secuencia correspondiente al péptido señal haciendo imposible la expresión de *Tgfb3*, demostrado por IHC y AFLIP (Figura 13D,F). De los cuatro alelos, uno mostró un fenotipo en el desarrollo de los ojos, sin embargo el fenotipo no estaba asociado a la homocigosis del alelo  $\Delta 19$  lo que sugiere que se trató de un fenotipo asociado a otro gen que pudo ser mutado como resultado de un corte “off target” de Cas9.

Contrario a nuestras expectativas, las restantes 3 líneas nulas para *Tgfb3* no mostraron letalidad o algún fenotipo evidente. Sin embargo, embriones mosaico obtenidos por la inyección de la guía de RNA y Cas-9, que contienen células con mutaciones en *tgfb3*, mostraron defectos en tejidos que expresan a *Tgfb3* como el corazón, las somitas o el pronefros (resultados no mostrados). Una posible explicación para la discrepancia entre el fenotipo de embriones nulos y embriones mosaico es la activación de mecanismos de compensación genética. El mejor mecanismo de compensación genética descrito es el activado por degradación del mRNA mutante<sup>73,103</sup>, sin embargo en nuestros embriones mutantes no encontramos una disminución significativa de los niveles del mRNA mutante de *tgfb3* en comparación con el mRNA silvestres (Figura 13H). Esto sugiere que este

mecanismo no está activado en nuestros embriones mutantes, sin embargo no podemos descartar por completo algún otro mecanismo de compensación.

Uno de los argumentos en contra del uso de morfolinos son sus efectos “off target”, especialmente cuando se usa en grandes concentraciones <sup>104</sup>. Por esta razón, con el objetivo de descartar efectos adversos decidimos usarlos en embriones mutantes a la misma dosis usada anteriormente. Encontramos que la proporción de los embriones con malformaciones fue comparable a la de los embriones silvestres (Figura 14D). Aún cuando la dosis se disminuyó se encontraron defectos similares en ambos genotipos, sugiriendo que el fenotipo angiogénico descrito en embriones morfantes para *tgfbr3* son causa de efectos “off target”, sin embargo para llegar a una conclusión definitiva se deberá ensayar el morfolino en un pez que carezca de la secuencia blanco del morfolino en el exón 2 de *tgfbr3* (full locus deletion), como se ha sugerido en una reciente publicación <sup>104</sup>.

Aunque se ha descrito ampliamente el papel de *Tgfbr3* en el desarrollo del corazón en etapas embrionarias en ratón y pollo <sup>34,87–89,101</sup>, y los experimentos de expresión demuestran que su expresión en este órgano se conserva en pez cebra; nuestras mutantes no presentan ningún defecto evidente en la morfogénesis cardíaca. Aún más los peces nulos para *Tgfbr3* no mostraron defectos en el proceso de regeneración cardíaca, a pesar de que existe evidencia de que otros proteoglicanos como Agrina <sup>105</sup> o las cadenas de glicosaminoglicanos <sup>106</sup> son necesarios para procesos de regeneración en mamíferos o que la correcta función de la vía del TGF $\beta$  es necesaria para la regeneración cardíaca en el pez cebra <sup>56,107</sup>. Estos datos sugieren que al igual que en el tronco de los embriones podría existir un aumento en la expresión de ligandos del TGF $\beta$  que esté compensando la falta de *Tgfbr3*.

En amniotas, la expresión o función de *Tgfbr3* en el proceso de morfogénesis de la notocorda no se ha descrito <sup>33,35,96</sup>. En este trabajo describimos que *Tgfbr3* se expresa en el mesodermo axial y a lo largo de la notocorda, tanto en las células internas como en las células de la capa externa, durante el desarrollo del pez cebra. La notocorda es una estructura común en todos los cordados cuyas funciones incluyen el soporte y moldeado de los tejidos que le rodean <sup>108,109</sup>. Nuestros datos demuestran que los embriones nulos para *Tgfbr3* presentan un retraso en la aparición de los primordios de las vértebras, un proceso que en

teleósteos es controlado por la notocorda <sup>108,110</sup>. La fuente inicial de mineralización son los segmentos de la notocorda llamados cordacentra, que son anillos calcificados formados por células de la capa externa y que se alternan con anillos no mineralizados tipo cartílago en una dirección anteroposterior <sup>110</sup>. Este proceso es especificado por Notch <sup>80</sup> y controlado por un grupo de factores transcripcionales conocidos como “somitic segmentation clock”. Alteraciones en este reloj de segmentación resultan en alteraciones en el tiempo de aparición de los anillos pero no afecta el desarrollo de las vértebras, un hecho que se ha propuesto como evidencia de la existencia de un oscilador en la notocorda que es independiente del somítico <sup>111</sup>. El hecho de que los peces mutantes para *tgfbr3*, a pesar del retraso en la aparición de la cordacentra, desarrollen segmentos calcificados y posteriormente vértebras sugiere que *Tgfbr3* y  $TGF\beta$  participan en este oscilador notocordal. La células de la cordacentra expresa el gen *entpd5* que inicialmente fue identificado en pez cebra a través de la mutante *no bone (nob)*<sup>112</sup>, la cual falla en la mineralización de los huesos. *entpd5* es un gen blanco de la vía de Notch que se requiere para la formación de la cordocentra <sup>80</sup>. Interesantemente nuestra observación de la activación de la vía de  $TGF\beta$  (pSmad3) en células de la cordocentra concuerdan con los datos reportados anteriormente que indican que los genes de la vía de  $TGF\beta$  son expresados por las células positivas para *entpd5* pero no en los segmentos intercalados <sup>80</sup>. Todos estos datos apoyan la idea de la función de  $TGF\beta$  y *Tgfbr3* en el proceso de mineralización de la notocorda.

## **9. Conclusiones**

- 1. Tgfbr3 se expresa en órganos derivados del mesodermo y en células migratorias de la cresta neural.**
- 2. Tgfbr3 no es indispensable para el desarrollo embrionario del pez cebra o el proceso de regeneración.**
- 3. Tgfbr3 participa en el desarrollo de la notocorda y es necesario para la correcta activación de la vía canónica de TGF $\beta$  en células de la cordocentra.**
- 4. La vía de TGF $\beta$  controla la mineralización de los segmentos de la cordocentra y la formación de las vértebras en el pez cebra.**

## 10. Perspectivas

1. Fusionar una proteína fluorescente a la proteína endógena de *Tgfbr3* para permitir visualizar en tiempo real la expresión del receptor.
2. Obtener una mutante con una deleción completa del marco de lectura de *tgfbr3* o del promotor (promotor-less) para eliminar la posibilidad de compensación genética.
3. Generar las herramientas genéticas necesarias que permitan controlar de forma temporal y espacial la expresión de *Tgfbr3*. De esta forma se podrá estudiar la función del receptor de forma tejido-específica y/o en diversas etapas del desarrollo o procesos como la regeneración en peces adultos.
4. Realizar experimentos de RNA seq de embrión completo o células únicas (células de la capa externa de la notocorda) en embriones nulos para *Tgfbr3* versus embriones silvestres para disectar el mecanismo por el que *Tgfbr3* controla la mineralización de la notocorda.

## 11. Bibliografia

1. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577–584 (2003).
2. Massagué, J. How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 169–178 (2000).
3. Mythreye, K. & Blobe, G. C. The type III TGFbeta receptor regulates directional migration: new tricks for an old dog. *Cell Cycle* **8**, 3069–3070 (2009).
4. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700 (2003).
5. Hinck, A. P., Mueller, T. D. & Springer, T. A. Structural Biology and Evolution of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).
6. Kingsley, D. M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development* vol. 8 133–146 (1994).
7. Groppe, J. *et al.* Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol. Cell* **29**, 157–168 (2008).
8. Derynck, R. *et al.* A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J.* **7**, 3737–3743 (1988).
9. Daopin, S. & Davies, D. R. CRYSTAL STRUCTURE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA2: AN UNUSUAL FOLD FOR THE SUPERFAMILY. (1994)  
doi:10.2210/pdb2tgi/pdb.
10. Öklü, R. & Hesketh, R. The latent transforming growth factor  $\beta$  binding protein (LTBP) family. *Biochemical Journal* vol. 352 601–610 (2000).
11. Munger, J. S. *et al.* The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* **96**, 319–328

- (1999).
12. Daniel, C. *et al.* Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo. *Kidney Int.* **65**, 459–468 (2004).
  13. Hill, C. S. Transcriptional Control by the SMADs. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).
  14. Massague, J. NEW EMBO MEMBERS REVIEW: Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *The EMBO Journal* vol. 19 1745–1754 (2000).
  15. Kim, S. K., Henen, M. A. & Hinck, A. P. Structural biology of betaglycan and endoglin, membrane-bound co-receptors of the TGF-beta family. *Exp. Biol. Med.* **244**, 1547–1558 (2019).
  16. López-Casillas, F. *et al.* Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* **67**, 785–795 (1991).
  17. Hawinkels, L. J. A. C. *et al.* Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **70**, 4141–4150 (2010).
  18. Wang, X. F. *et al.* Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell* **67**, 797–805 (1991).
  19. Mendoza, V. *et al.* Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF-beta binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. *Biochemistry* **48**, 11755–11765 (2009).
  20. De Crescenzo, G. *et al.* Three key residues underlie the differential affinity of the TGFbeta isoforms for the TGFbeta type II receptor. *J. Mol. Biol.* **355**, 47–62 (2006).
  21. López-Casillas, F., Wrana, J. L. & Massagué, J. Betaglycan presents ligand to the TGFβ signaling receptor. *Cell* vol. 73 1435–1444 (1993).
  22. Lewis, K. A. *et al.* Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* vol. 404 411–414 (2000).
  23. Wiater, E., Harrison, C. A., Lewis, K. A., Gray, P. C. & Vale, W. W. Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan: functional separation of betaglycan co-receptor actions. *J. Biol. Chem.* **281**,

- 17011–17022 (2006).
24. Li, Y. *et al.* Betaglycan (TGFBR3) Functions as an Inhibin A, but Not Inhibin B, Coreceptor in Pituitary Gonadotrope Cells in Mice. *Endocrinology* vol. 159 4077–4091 (2018).
  25. Kirkbride, K. C., Townsend, T. A., Bruinsma, M. W., Barnett, J. V. & Blobe, G. C. Bone Morphogenetic Proteins Signal through the Transforming Growth Factor- $\beta$  Type III Receptor. *Journal of Biological Chemistry* vol. 283 7628–7637 (2008).
  26. López-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L. & Massagué, J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- $\beta$  access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *Journal of Cell Biology* vol. 124 557–568 (1994).
  27. Jenkins, L. M. *et al.* Altering the Proteoglycan State of Transforming Growth Factor  $\beta$  Type III Receptor (T $\beta$ RIII)/Betaglycan Modulates Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *J. Biol. Chem.* **291**, 25716–25728 (2016).
  28. Jang, Y.-S. *et al.* Lactoferrin causes IgA and IgG2b isotype switching through betaglycan binding and activation of canonical TGF- $\beta$  signaling. *Mucosal Immunol.* **8**, 906–917 (2015).
  29. Kovacs, J. J., Hara, M. R., Davenport, C. L., Kim, J. & Lefkowitz, R. J. Arrestin development: emerging roles for beta-arrestins in developmental signaling pathways. *Dev. Cell* **17**, 443–458 (2009).
  30. Chen, W. *et al.*  $\beta$ -Arrestin 2 Mediates Endocytosis of Type III TGF- $\beta$  Receptor and Down-Regulation of Its Signaling. *Science* vol. 301 1394–1397 (2003).
  31. Finger, E. C. *et al.* T $\beta$ RIII suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity. *Carcinogenesis* vol. 29 528–535 (2008).
  32. Blobe, G. C., Liu, X., Fang, S. J., How, T. & Lodish, H. F. A Novel Mechanism for Regulating Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Signaling. *Journal of Biological Chemistry* vol. 276 39608–39617 (2001).
  33. Stenvers, K. L. *et al.* Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos.

- Mol. Cell. Biol.* **23**, 4371–4385 (2003).
34. Brown, C. B., Boyer, A. S., Runyan, R. B. & Barnett, J. V. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* **283**, 2080–2082 (1999).
  35. Cooley, J. R., Yatskievych, T. A. & Antin, P. B. Embryonic expression of the transforming growth factor beta ligand and receptor genes in chicken. *Dev. Dyn.* **243**, 497–508 (2014).
  36. Olivey, H. E., Barnett, J. V. & Ridley, B. D. Expression of the type III TGFbeta receptor during chick organogenesis. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **272**, 383–387 (2003).
  37. Sarraj, M. A. *et al.* Differential expression of TGFBR3 (betaglycan) in mouse ovary and testis during gonadogenesis. *Growth Factors* **25**, 334–345 (2007).
  38. Sarraj, M. A. *et al.* Fetal testis dysgenesis and compromised Leydig cell function in Tgfr3 (betaglycan) knockout mice. *Biol. Reprod.* **82**, 153–162 (2010).
  39. Bilandzic, M. & Stenvers, K. L. Betaglycan: a multifunctional accessory. *Mol. Cell. Endocrinol.* **339**, 180–189 (2011).
  40. Makanji, Y. *et al.* Suppression of inhibin A biological activity by alterations in the binding site for betaglycan. *J. Biol. Chem.* **283**, 16743–16751 (2008).
  41. Sanford, L. P. *et al.* TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* **124**, 2659–2670 (1997).
  42. Grunwald, D. J. & Eisen, J. S. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 717–724 (2002).
  43. Kamaid, A. *et al.* Betaglycan knock-down causes embryonic angiogenesis defects in zebrafish. *Genesis* **53**, 583–603 (2015).
  44. Kok, F. O. *et al.* Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev. Cell* **32**, 97–108 (2015).
  45. Jao, L.-E., Wente, S. R. & Chen, W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing

- using a CRISPR nuclease system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 13904–13909 (2013).
46. Hwang, W. Y. *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* vol. 31 227–229 (2013).
  47. Ehrke-Schulz, E. *et al.* Quantification of designer nuclease induced mutation rates: a direct comparison of different methods. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* vol. 3 16047 (2016).
  48. Zhu, X. *et al.* An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* **4**, 6420 (2014).
  49. Macdonald, R. Zebrafish Immunohistochemistry. *Molecular Methods in Developmental Biology* 77–88 doi:10.1385/1-59259-678-9:77.
  50. Rosas-Arellano, A. *et al.* A simple solution for antibody signal enhancement in immunofluorescence and triple immunogold assays. *Histochem. Cell Biol.* **146**, 421–430 (2016).
  51. Perner, B. & Englert, C. Immunofluorescence Staining of Wt1 on Sections of Zebrafish Embryos and Larvae. *Methods Mol. Biol.* **1467**, 129–132 (2016).
  52. Bensimon-Brito, A. *et al.* Revisiting in vivo staining with alizarin red S--a valuable approach to analyze zebrafish skeletal mineralization during development and regeneration. *BMC Dev. Biol.* **16**, 2 (2016).
  53. Walker, M. B. & Kimmel, C. B. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotech. Histochem.* **82**, 23–28 (2007).
  54. Spoorendonk, K. M. *et al.* Retinoic acid and Cyp26b1 are critical regulators of osteogenesis in the axial skeleton. *Development* **135**, 3765–3774 (2008).
  55. Dogra, D. *et al.* Opposite effects of Activin type 2 receptor ligands on cardiomyocyte proliferation during development and repair. *Nat. Commun.* **8**, 1902 (2017).
  56. Chablais, F. & Jazwinska, A. The regenerative capacity of the zebrafish heart is dependent on TGF $\beta$  signaling. *Development* **139**, 1921–1930 (2012).
  57. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time

- quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
58. Jaźwińska, A., Badakov, R. & Keating, M. T. Activin-betaA signaling is required for zebrafish fin regeneration. *Curr. Biol.* **17**, 1390–1395 (2007).
  59. Sugden, W. W. *et al.* Endoglin controls blood vessel diameter through endothelial cell shape changes in response to haemodynamic cues. *Nat. Cell Biol.* **19**, 653–665 (2017).
  60. Ke, Z., Kondrichin, I., Gong, Z. & Korzh, V. Combined activity of the two Gli2 genes of zebrafish play a major role in Hedgehog signaling during zebrafish neurodevelopment. *Molecular and Cellular Neuroscience* vol. 37 388–401 (2008).
  61. Link, V., Shevchenko, A. & Heisenberg, C.-P. Proteomics of early zebrafish embryos. *BMC Developmental Biology* vol. 6 (2006).
  62. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* vol. 9 676–682 (2012).
  63. Molina-Villa, T., Mendoza, V. & López-Casillas, F. Affinity Labeling Detection of Endogenous Receptors from Zebrafish Embryos. *J. Vis. Exp.* (2016) doi:10.3791/54405.
  64. Chablais, F., Veit, J., Rainer, G. & Jaźwińska, A. The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev. Biol.* **11**, 21 (2011).
  65. González-Rosa, J. M. & Mercader, N. Cryoinjury as a myocardial infarction model for the study of cardiac regeneration in the zebrafish. *Nature Protocols* vol. 7 782–788 (2012).
  66. White, R. J. *et al.* A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *Elife* **6**, (2017).
  67. Glickman, N. S., Kimmel, C. B., Jones, M. A. & Adams, R. J. Shaping the zebrafish notochord. *Development* **130**, 873–887 (2003).
  68. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* vol. 203 253–310 (1995).
  69. Walsh, E. C. & Stainier, D. Y. UDP-glucose dehydrogenase required for cardiac valve formation in zebrafish. *Science* **293**, 1670–1673 (2001).
  70. Cavanaugh, A. M., Huang, J. & Chen, J.-N. Two developmentally distinct populations of

- neural crest cells contribute to the zebrafish heart. *Developmental Biology* vol. 404 103–112 (2015).
71. Li, Y.-X. *et al.* Cardiac neural crest in zebrafish embryos contributes to myocardial cell lineage and early heart function. *Developmental Dynamics* vol. 226 540–550 (2003).
  72. Sato, M. & Joseph Yost, H. Cardiac neural crest contributes to cardiomyogenesis in zebrafish. *Developmental Biology* vol. 257 127–139 (2003).
  73. El-Brolosy, M. A. *et al.* Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* **568**, 193–197 (2019).
  74. Compton, L. A., Potash, D. A., Brown, C. B. & Barnett, J. V. Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor. *Circ. Res.* **101**, 784–791 (2007).
  75. Hill, C. R., Jacobs, B. H., Brown, C. B., Barnett, J. V. & Goudy, S. L. Type III transforming growth factor beta receptor regulates vascular and osteoblast development during palatogenesis. *Dev. Dyn.* **244**, 122–133 (2015).
  76. Harrison, M. R. M. *et al.* Chemokine-guided angiogenesis directs coronary vasculature formation in zebrafish. *Dev. Cell* **33**, 442–454 (2015).
  77. Tzahor, E. & Poss, K. D. Cardiac regeneration strategies: Staying young at heart. *Science* **356**, 1035–1039 (2017).
  78. Jopling, C. *et al.* Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* **464**, 606–609 (2010).
  79. Kaartinen, V. *et al.* Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat. Genet.* **11**, 415–421 (1995).
  80. Wopat, S. *et al.* Spine Patterning Is Guided by Segmentation of the Notochord Sheath. *Cell Rep.* **22**, 2026–2038 (2018).
  81. Yamamoto, M. *et al.* Mib-Jag1-Notch signalling regulates patterning and structural roles of the notochord by controlling cell-fate decisions. *Development* **137**, 2527–2537 (2010).
  82. Lopez-Casillas, F. *et al.* Betaglycan expression is transcriptionally up-regulated during

- skeletal muscle differentiation. Cloning of murine betaglycan gene promoter and its modulation by MyoD, retinoic acid, and transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **278**, 382–390 (2003).
83. Devoto, S. H., Melançon, E., Eisen, J. S. & Westerfield, M. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development* **122**, 3371–3380 (1996).
  84. Keenan, S. R. & Currie, P. D. The Developmental Phases of Zebrafish Myogenesis. *J Dev Biol* **7**, (2019).
  85. Rocha, M., Singh, N., Ahsan, K., Beiriger, A. & Prince, V. E. Neural crest development: insights from the zebrafish. *Dev. Dyn.* **249**, 88–111 (2020).
  86. Litsiou, A., Hanson, S. & Streit, A. A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development* **132**, 4051–4062 (2005).
  87. Clark, C. R. *et al.* Common pathways regulate Type III TGF $\beta$  receptor-dependent cell invasion in epicardial and endocardial cells. *Cell. Signal.* **28**, 688–698 (2016).
  88. Hill, C. R. *et al.* BMP2 signals loss of epithelial character in epicardial cells but requires the Type III TGF $\beta$  receptor to promote invasion. *Cell. Signal.* **24**, 1012–1022 (2012).
  89. Townsend, T. A. *et al.* Endocardial cell epithelial-mesenchymal transformation requires Type III TGF $\beta$  receptor interaction with GIPC. *Cell. Signal.* **24**, 247–256 (2012).
  90. Reyes, R., Haendel, M., Grant, D., Melancon, E. & Eisen, J. S. Slow degeneration of zebrafish Rohon-Beard neurons during programmed cell death. *Dev. Dyn.* **229**, 30–41 (2004).
  91. Rossi, C. C., Kaji, T. & Artinger, K. B. Transcriptional control of Rohon-Beard sensory neuron development at the neural plate border. *Dev. Dyn.* **238**, 931–943 (2009).
  92. Nguyen-Chi, M. E. *et al.* Morphogenesis and cell fate determination within the adaxial cell equivalence group of the zebrafish myotome. *PLoS Genet.* **8**, e1003014 (2012).
  93. Dolez, M., Nicolas, J.-F. & Hirsinger, E. Laminins, via heparan sulfate proteoglycans, participate in zebrafish myotome morphogenesis by modulating the pattern of Bmp responsiveness. *Development* **138**, 97–106 (2011).

94. Maurya, A. K. *et al.* Integration of Hedgehog and BMP signalling by the engrailed2a gene in the zebrafish myotome. *Development* **138**, 755–765 (2011).
95. Chapman, S. C. & Woodruff, T. K. Betaglycan localization in the female rat pituitary: implications for the regulation of follicle-stimulating hormone by inhibin. *Endocrinology* **144**, 5640–5649 (2003).
96. MacConell, L. A., Leal, A. M. O. & Vale, W. W. The distribution of betaglycan protein and mRNA in rat brain, pituitary, and gonads: implications for a role for betaglycan in inhibin-mediated reproductive functions. *Endocrinology* **143**, 1066–1075 (2002).
97. Schilling, T. F. & Kimmel, C. B. Musculoskeletal patterning in the pharyngeal segments of the zebrafish embryo. *Development* **124**, 2945–2960 (1997).
98. Cheah, F. S. H., Winkler, C., Jabs, E. W. & Chong, S. S. Tgfbeta3 regulation of chondrogenesis and osteogenesis in zebrafish is mediated through formation and survival of a subpopulation of the cranial neural crest. *Mech. Dev.* **127**, 329–344 (2010).
99. Cui, X. M. & Shuler, C. F. The TGF-beta type III receptor is localized to the medial edge epithelium during palatal fusion. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 397–402 (2000).
100. Kruithof, B. P. T. *et al.* Remodeling of the myocardium in early trabeculation and cardiac valve formation; a role for TGFβ2. *Int. J. Dev. Biol.* **57**, 853–863 (2013).
101. Boyer, A. S. & Runyan, R. B. TGF? Type III and TGF? Type II receptors have distinct activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Developmental Dynamics* vol. 221 454–459 (2001).
102. Scherz, P. J., Huisken, J., Sahai-Hernandez, P. & Stainier, D. Y. R. High-speed imaging of developing heart valves reveals interplay of morphogenesis and function. *Development* **135**, 1179–1187 (2008).
103. Rossi, A. *et al.* Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* **524**, 230–233 (2015).
104. Stainier, D. Y. R. *et al.* Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genet.* **13**, e1007000 (2017).
105. Bassat, E. *et al.* The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in

- mice. *Nature* **547**, 179–184 (2017).
106. Nogueira-Rodrigues, J. *et al.* Rewired glycosylation activity promotes scarless regeneration and functional recovery in spiny mice after complete spinal cord transection. *Dev. Cell* **57**, 440–450.e7 (2022).
107. Bensimon-Brito, A. *et al.* TGF- $\beta$  Signaling Promotes Tissue Formation during Cardiac Valve Regeneration in Adult Zebrafish. *Dev. Cell* **52**, 9–20.e7 (2020).
108. Trapani, V., Bonaldo, P. & Corallo, D. Role of the ECM in notochord formation, function and disease. *J. Cell Sci.* **130**, 3203–3211 (2017).
109. Fleming, A., Keynes, R. J. & Tannahill, D. The role of the notochord in vertebral column formation. *Journal of Anatomy* vol. 199 177–180 (2001).
110. Fleming, A., Keynes, R. & Tannahill, D. A central role for the notochord in vertebral patterning. *Development* vol. 131 873–880 (2004).
111. Lleras Forero, L. *et al.* Segmentation of the zebrafish axial skeleton relies on notochord sheath cells and not on the segmentation clock. *Elife* **7**, (2018).
112. Huitema, L. F. A. *et al.* Entpd5 is essential for skeletal mineralization and regulates phosphate homeostasis in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 21372–21377 (2012).