



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Compensación genética en pez cebra (*Danio rerio*) nulo para Betaglicano

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Elena Morales Ramírez

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Fernando López Casillas
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Diana María Escalante Alcalde
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Denhi Schnabel Peraza
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México. Abril, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Abreviaturas	4
Resumen	5
Introducción	6
Los receptores	7
Los co-receptores	7
Endogлина	8
Betaglicano	9
Compensación genética	11
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivo principal	20
Objetivos secundarios	20
Método	20
Modelo experimental	20
Cruzas de peces para obtener el doble mutante	21
Extracción de DNA genómico	23
Peces adultos	24
Larvas	24
Genotipificación	24
Sobrevivencia	28
Observaciones en el microscopio	28
Observaciones fenotípicas en el microscopio óptico	28
Frecuencia cardíaca	28
Talla de peces adultos	29
Microscopio confocal	29
Ensayos de qRT-PCR	29
Extracción de RNAm	29
Síntesis del cDNA	29
Oligonucleótidos	30
PCR cuantitativo en tiempo real	30
Análisis estadístico	31
Resultados	31
Obtención de organismos dobles mutantes	31

Sobrevivencia	35
Observaciones fenotípicas en microscopio óptico	41
Frecuencia cardíaca	43
Talla de peces adultos	44
Observaciones en un microscopio confocal	45
Expresión de componentes de la vía de TGF- β en mutantes nulos de BG y de ENG	49
Discusión	52
Conclusión	57
Perspectivas	58
Referencias	59

Abreviaturas

aa – Aminoácidos
ALK1 - Activin receptor-like kinase
aISV – vasos intersegmentarios de arteria
BMP – Bone morphogenic protein
BG – Betaglicano
B – alelo de betaglicano WT
b – alelo de betaglicano mutante
C-terminal – carboxilo terminal
cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementario
CRISPR – Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas
DA – Arteria dorsal
dpf – días post fecundación
ENG - Endogлина
E – alelo de endogлина WT
e – alelo de endogлина mutante
ENG^{mu130} – mutante nulo de endogлина
GAG – Glicosaminoglicanos
Het – heterócigo
hpf – horas post fecundación
ISV – vasos intersegmentarios
Mut - mutante
mRNA – Ácido ribonucleico mensajero
NMD – Decaimiento mediado sin-sentido
N-terminal – Amino terminal
ng – nano gramos
O - orphan
PVC – Vena caudal posterior
pb- pares de bases
qRT-PCR – Reacción de la cadena de la polimerasa con Transcripción reversa cuantitativa
THH - telangiectasia hemorrágica hereditaria
TMP – transcriptos por millón
tgfbr3^{una201} – mutante nulo de betaglicano
TGF-β - Transforming growth factor β
vISV – vasos intersegmentarios de vena
WT – wild-type (silvestre)
ZP – Zona pellucida
μl – micro litros
μg – micro gramos

Resumen

La vía de TGF- β tiene varios factores que intervienen en la regulación de actividades celulares importantes en el desarrollo embrionario, dos componentes que regulan la vía de TGF- β son los co-receptores: endogлина (ENG) y betaglicano (BG) que promueven la unión del ligando con su receptor. En modelos murinos se ha reportado que las mutaciones nulas de tanto ENG como de BG están relacionados a defectos angiogénicos y cardiacos, mientras que para el pez cebra se reportó que la disminución de BG por morfolinós (knock down) provoca que los brotes de vasos intersegmentales no logren desarrollarse; sin embargo, al generar una mutación nula de BG (knock out) no se encontró ningún cambio en la vasculatura del pez cebra. Se esperaría que el knock down de BG también presentara un fenotipo con problemas vasculares, pero eso no ocurre, por lo tanto hay discrepancia entre el fenotipo morfante y el fenotipo mutante.

En pez cebra se han reportado éste tipo de discrepancia previamente y una de las propuestas que explican esta discrepancia ha sido la compensación genética, se ha propuesto que cuando se genera la mutación nula de una proteína puede promoverse la expresión de una proteína homóloga y compensar la función de la proteína mutada, evitando cambios fenotípicos. Se propuso que en el caso del mutante de BG pueda tener un proceso de compensación genética y que ENG sea la proteína que compensa la pérdida de BG.

Para comprobar si hay ENG pueda compensar a BG en los peces mutantes nulos de BG se obtuvieron peces que tuvieran las dos mutaciones nulas, ENG y BG. Al observar a los organismos dobles mutantes no se notan cambios fenotípicos en la vasculatura, lo cual nos lleva a concluir que no hay un proceso de compensación genética entre el BG y la ENG. Sin embargo al evaluar la sobrevivencia de los peces desde la fecundación hasta la adultes (4 meses post fecundación) se detectó que los peces dobles mutantes tienen menor sobrevivencia, especialmente entre los 8 y 20 días post fecundación,

sugiriendo que durante el desarrollo embrionario puede existir algún proceso biológico que involucre tanto al BG como a la ENG que afecta la sobrevivencia.

Introducción

Desde el descubrimiento de los factores de TGF- β , éstos se establecieron como reguladores de sistemas biológicos, desde el desarrollo embrionario hasta en los procesos biológicos del envejecimiento (Moustakas, 2013). Los factores de TGF- β están involucrados en diversas enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades inmunológicas (Moustakas, 2013).

Al estar involucrados en procesos biológicos tan diversos es de suponer que utilizan una vía con múltiples ligandos (superfamilia de TGF- β), receptores, coreceptores, co-factores y moléculas accesorias. Las interacciones entre ellos o las mutaciones de algunos de estos factores han sido ampliamente estudiados pero aún existe mucho por conocer. En ese contexto, esta tesis es un esfuerzo para contribuir a dichos estudios y profundizar en el conocimiento de estas vías.

En este trabajo se estudia la posibilidad de una relación entre BG y ENG mediante la obtención de un organismo que no expresa ninguno de éstos coreceptores y evaluando el fenotipo de un organismo doble mutante. Tomando como referencia antecedentes la discrepancia entre el fenotipo morfante y mutante de BG y la alta similitud estructural entre BG y ENG propongo que la ENG puede participar en un proceso de compensación genética ante la pérdida de BG. Se plantea que si obtenemos un organismo con una mutación nula de BG y la mutación nula de ENG (doble mutante) el efecto compensatorio se perdería y por lo tanto observaremos defectos vasculares similares a los del morfante de BG.

Mi hipótesis central es que la ENG puede compensar la pérdida de BG en mutantes nulos durante el proceso de angiogénesis en embriones del pez cebra (*Danio rerio*).

Los receptores

El TGF- β es una citocina con tres isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, que pertenecen a una amplia familia de proteínas conservadas evolutivamente y que activan la señalización de complejos de proteínas Smad a través de receptores con actividad de cinasas de serina-treonina. Otros miembros de la superfamilia de TGF- β son: proteínas morfogénicas óseas (BMPs), activinas e inhibinas.

En la vía de señalización del TGF- β , los receptores se han dividido en dos subfamilias, que son los receptores tipo I, como el TGF β RI, y los receptores tipo II, como el TGF β RII, los cuales son glicoproteínas de aproximadamente 50-60 y 75-85 kDa, respectivamente (Altman 2002). Al unirse a un ligando los receptores forman un complejo heterotetramérico que consiste en dos receptores tipo 2 y dos receptores tipo 1 (Altman 2002), los receptores tipo 2 fosforilan al dominio GS (secuencia rica en serina y glicina) de los receptores tipo 1, activándolos (Dijke y Hill 2004). Subsecuentemente la señalización continúa río abajo con la fosforilación de las proteínas R-Smad, en sus últimas dos serinas del carboxilo terminal, induciendo su disociación del receptor, permitiéndole unirse a Smad4 para formar un complejo tetramérico que es traslocado al núcleo, donde las Smads pueden unirse al DNA por su dominio MH1 y regular respuestas transcripcionales. Así mismo, las Smads pueden unirse a otros factores de transcripción para regular la expresión de genes blanco específicos (Wrana 2013).

Los co-receptores

Otros elementos de la vía de señalización del TGF- β que son menos conocidos son los co-receptores, cómo ENG y BG. Estos co-receptores son proteínas membranales integrales tipo I que poseen un dominio extracelular largo y un dominio

intracelular corto (Walton y Harrison 2019); son glicoproteínas que se expresan de manera independientemente (la expresión de ENG no está relacionada con la expresión de BG y viceversa) y se unen a los ligandos y receptores que pertenecen a la vía de TGF- β . A pesar de que no tienen actividad catalítica directa su presencia aumentan la afinidad del ligando por el receptor al formar un complejo heteromérico co-receptor/ligando/receptor (Yamashita et al. 1994). Siendo así reguladores importantes de la activación de la vía del TGF- β .

Endoglina

La ENG, se expresa principalmente en células endoteliales, es una proteína glicosilada homodimérica de 180kDa con un característico enlace disulfuro característico (Bernabeu et al. 2009). Su región extracelular consiste de 561 residuos de aminoácidos, mientras que su dominio intracelular consiste de 47 residuos de aminoácidos (Gougos y Letarte 1990). Específicamente el ectodominio de ENG tiene un dominio *orphan* (O) y un dominio ZP, el subdominio ZP-N tiene una secuencia arginina-glicina ácido aspártico (RGD) que reconoce y une a integrinas. La ENG tiene alta afinidad específica por TGF β 1, TGF β 3, BMP9 y BMP10 (Gallardo-Vara et al. 2019). Para formar el complejo heterotetramérico, la ENG en su dominio extracelular interactúa con TGFBR1 y TGFBR2 por la Arg⁴³⁷-Gly⁵⁵⁸ que se encuentran en el subdominio ZP-C (García-Pozo et al. 2008).

En diversos modelos se ha observado que la participación de ENG en procesos celulares como proliferación, por ejemplo en células endoteliales murinas la mutación de ENG genera mayor proliferación (Pece-Barbara et al. 2005). En ratones con mutación nula de ENG presentan un fenotipo con problemas vasculares, que es consistente con el fenotipo reportado durante la enfermedad de Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (THH) tipo 1 (Bourdeau 2000). La THH es una enfermedad autosómica dominante, caracterizada por malformaciones en arterias y venas. Según la mutación se presenta, la THH se ha clasificado dos tipos: la THH1 tiene el gen de ENG mutado y la THH2 tiene mutados los genes *ACVRL1* y *ALK1* (Ruiz-Llorente, et al., 2017). La THH es una enfermedad directamente ligada a la vía del TGF- β .

Se ha encontrado sobreexpresión de ENG en células endoteliales de tejidos que están pasando procesos angiogénicos, como tumores (Duff et al. 2003); es importante anotar que la alta expresión de ENG está asociado a mal pronóstico de distintos tipos de cáncer (Duff et al. 2003). En células endoteliales se ha determinado que la ENG puede activar la señalización de TGF- β /ALK1 e inhibir indirectamente a TGF- β /ALK5, promoviendo la fase de activación de la angiogénesis (Goumans, Lebrin, y Valdimarsdottir 2003). Los ratones nulos de ENG mueren a partir de los 11.5 días post-fecundación, mostrando diversos defectos angiogénicos y cardiacos (Li et al. 1999), incluyendo deformaciones vasculares y deficiencia en la migración de las células endoteliales (Li et al. 1999).

En el caso del pez cebra, existe un mutante de ENG obtenido por la técnica de edición genética TALEN) (del inglés Transcription Activator-like Effector Nuclease) que presenta un fenotipo interesante con algunas alteraciones vasculares. Se observa incremento de flujo sanguíneo en la arteria dorsal y la vena cardinal posterior, provocando un incremento en el diámetro de éstos vasos, ocasionando también un menor flujo sanguíneo hacia los vasos intersegmentales y como consecuencia un decremento en su diámetro (Sugden, et al. 2017). No se ha descrito o reportado que los mutantes de ENG tengan menor sobrevivencia a los peces WT.

Ratones knock-out de TGF β RI y TGF β RII presentan problemas similares a los knock-out de ENG, tienen defectos angiogénicos y no son viables después de alrededor de los 10 dpf (Goumans, Liu, y ten Dijke 2009). Curiosamente, se ha observado que las células endoteliales de microvasculatura de humanos también se expresa BG (Wong et al. 2000), sugiriendo que ambos co-receptores de la vía del TGF- β podrían estar involucrados en la angiogénesis.

Betaglicano

El BG es un proteoglicano integral de membrana con un masa entre 280-330 KDa (Ciarmela et al. 2003), compuesto de un dominio extracelular grande, con un solo

cruce transmembranal y un dominio intracelular corto de 42 residuos de aminoácidos (López-Casillas et al., 1991; Bilandzic and Stenvers 2011). Notoriamente, el dominio intracelular no tiene actividad cinasa ni interviene en la presentación de ligando-receptor, pero es un dominio que se ha conservado en diversas especies y cerca del carboxilo terminal tiene un motivo de unión conocido como PDZ que puede alterar la función del BG (López-Casillas et al., 1991; Bilandzic and Stenvers 2011; Bernabeu, et al., 2009).

El dominio extracelular del BG tiene una zona de unión de cadenas de glicosaminoglicanos (cadenas GAG) formados por heparan y condroitin sulfato, en las Serina 535 y Serina 546 (Lopez-Casillas et al., 1994). Adicionalmente el dominio extracelular tiene un dominio ZP (zona pelucida) de 260 residuos de aminoácidos, que se divide en subdominios: ZP-N (N-terminal) y ZP-C (C-terminal) (Bernabeu et al., 2009). El subdominio ZP-C, es necesario para la interacción con la mayoría de los ligandos (Kim, Henen, y Hinck 2019). Las tres isoformas del TGF- β , las inhibinas y las BMPs se unen al BG con estequiometría 1:1, por su parte los FGFs se unen al BG por las cadenas GAG (Kim, Whitley, et al. 2019). El BG se une a las 3 isoformas del TGF- β y a ciertos BMPs a través de su dominio extracelular, aunque es conocido por su alta afinidad por el TGF- β 2 (Esparza-Lopez et al., 2001), el BG también se une a las inhibinas A y B a través del dominio cercano a la membrana (Heldin & Moustakas, 2016).

Durante la señalización de la vía del TGF- β , el BG es un regulador importante por el proceso de 'presentación de ligando' (López-Casillas, Wrana, y Massague 1993) que describe la unión de TGF- β a BG y posteriormente la formación del complejo TGF- β /BG/TGF β RII, incrementando la afinidad del receptor por su ligando, este proceso es especialmente importante para la isoforma 2 de TGF- β que sin BG tiene baja afinidad por el receptor II (Lopez-Casillas et al. 1993).

En modelos murinos la mutación del BG es letal a los 13.5 días post-fecundación, los embriones muestran defectos en la proliferación de células cardiacas,

en el 50% de los embriones, la pared ventricular no se engrosa resultando en un miocardio débil. Otros embriones presentan ausencia de arterias coronarias y la reducción de tamaño y osificación del esqueleto craneofacial (Stenvers et al. 2003).

En el caso del pez cebra se tienen dos importantes antecedentes de deficiencia de BG, se realizó un knock-down de BG usando morfolinós en pez cebra. El resultado fue muy interesante pues los organismos morfantes presentaban deficiencias en el sistema vascular, específicamente se observó que los vasos intersegmentales presentaban malformaciones, los brotes se forman incompletos y las células endoteliales no logran migrar hacia la zona dorsal (Kamaid et al. 2015). Este fue el primer reporte que relacionaba al BG con el proceso de angiogénesis; posteriormente, se realizó por medio de CRISPR-Cas un organismo knockout. En el fenotipo mutante se reportó un retraso en la mineralización de la cordocentra (Molina-Villa et al. 2021). Sin embargo, el desarrollo angiogénico no presenta defectos y el fenotipo es similar al organismo *wild-type* (silvestres). Estos resultados indican discrepancias entre los fenotipos del organismo morfante y el organismo mutante (Molina-Villa et al. 2021). Este tipo de discrepancias entre morfante y mutante han sido observadas previamente en el pez cebra para distintas proteínas, como la proteína EGFL7 (Rossi et al. 2015). En esos casos se llegó a la conclusión de que la discrepancia estaba relacionada a un proceso llamado **Compensación Genética** (Rossi et al. 2015).

Compensación genética

Los estudios genéticos en pez cebra han sido muy populares para estudiar la función específica de genes en el desarrollo embrionario, mediante la eliminación parcial o total de un gen. Al tener embriones transparentes, el pez cebra facilita la observación del proceso embrionario, así como permite relacionar fenotipos con defectos genéticos inducidos en el laboratorio (Kok et al. 2015).

Además, se han observado interesantes fenómenos relacionados a la regulación genética de estos organismos, como la discrepancia entre morfantes y mutantes,

donde el fenotipo observado en los mutantes es menos severo que el observado en los morfantes (Stainier, Kontarakis, y Rossi 2015). Un claro ejemplo es la discrepancia entre morfante y mutantes del gen *egfl7* en pez cebra, los morfantes de *egfl7* muestran malformaciones angiogénicas mientras que los organismos mutantes tienen un fenotipo significativamente menos severo y similar al WT (Rossi et al. 2015). Sin embargo, después de comprobar que el fenotipo morfante no está relacionado a efectos *off-target* se propuso que existía un mecanismo de adaptación transcripcional que provocaba cambios en la expresión de genes relacionados a *egfl7*, como la *emilina a* y la *emilina b* (Rossi et al. 2015). Éste tipo de adaptación transcripcional está relacionada al concepto de compensación genética que propone la sobreexpresión de un gen para compensar la pérdida de otro (El-Brolosy y Stainier 2017), lo cual podría explicar la falta de fenotipo en diversos mutantes nulos.

Si bien, la pérdida de una proteína puede inducir cambios en la expresión de alguna otra proteína, en la compensación genética se propone que esos cambios no se promueven por la pérdida de la proteína, más bien se promueven directamente por las lesiones al DNA que provocan una mutación o por el mRNA de un gen mutado (El-Brolosy & Stainier, 2017). Se ha sugerido que el daño al DNA propicia la aparición de diRNAs (RNAs cortos no codificantes inducidos por daño a DNA) que a su vez pueden actuar como promotores de factores de transcripción y de proteínas que remodelan la cromatina en regiones de genes homólogos al gen mutado (Stuckenholz, et al. 1999).

Otra propuesta para la inducción de la compensación genética sugiere que el mRNA del gen mutado puede actuar como promotor de adaptación transcripcional. Cuando el RNA de un gen mutado no se degrada en fragmentos cortos puede actuar similarmente a un lncRNA (RNA largo no codificante, por sus siglas en inglés) y ser una especie de guía para factores de transcripción o remodeladores de cromatina (El-Brolosy & Stainier, 2017; Vance & Ponting, 2014; Statello, et al. 2021). También se ha sugerido que las proteínas de unión a RNA (RBPs, por sus siglas en inglés) pueden actuar como reguladores genéticos, al unirse a mRNA y estabilizarlos incrementan la expresión genética (Keene, 2007), éstos RBPs se usualmente se relacionan a varios

mRNAs que codifican para proteínas homólogas, si un RBP está relacionado al mRNA de una proteína mutada es posible que también esté relacionada al mRNA de su proteína compensatoria y pueden promover la expresión de la proteína compensatoria (El-Brolosy & Stainier, 2017; Keene, 2007).

Sin embargo, el modelo de inducción de compensación genética que se ha estudiado más profundamente considera la degradación de mRNA del gen mutado. Basándose en que la transcripción de un gen con mutación sin sentido que tiene un codón de paro prematuro, genera fragmentos de mRNA incompleto que son degradados en el sistema de degradación mediada por secuencias sin sentido (Non-sense Mediated Decay o por sus siglas en inglés NMD) (Lykke-Andersen y Jensen 2015). El sistema NMD es un mecanismo celular donde complejos de proteínas y RNA inducen a enzimas que degradan al RNA incompleto, generando pequeños fragmentos de RNA que pueden ser reciclados o en algunas ocasiones actuar como reguladores de transcripción.

Tanto en líneas celulares humanas como en el pez cebra se encontró una asociación entre la adaptación transcripcional y la presencia de mRNA que codifica una secuencia con codones de paro prematuros, que son degradados por el sistema NMD (El-Brolosy et al., 2019). Para probar el involucramiento del sistema NMD en la adaptación transcripcional se generaron organismos dobles mutantes donde se mutaba algún gen que ya era conocido por tener respuesta compensatoria (aumento de mRNA del gen homólogo y la expresión de esas proteínas) y también se mutaba al gen *upf1*, inactivando al sistema NMD (El-Brolosy et al. 2019). Esos dobles mutantes pierden la respuesta compensatoria, indicando que para la adaptación transcripcional propuesta por El-Brolosy et al. 2019, es necesario el sistema NMD. Ese experimento se realizó con los genes *hbegfa*, *vcla*, *hif1ab*, *vegfaa*, *egfl7* y *alcama*, donde se observaba la respuesta compensatoria de sus genes homólogos: *hbegfab*, *vclb*, *epas1a*, *vegfab*, *emilina3a* y *alcamb*, respectivamente, y en todos se observó el mismo resultado (El-Brolosy et al. 2019).

Posteriormente para apoyar la hipótesis de que la degradación de un mRNA por el sistema NMD promueve el proceso de adaptación transcripcional, inyectaron mRNA sin CAP5' a embriones silvestres, ya que se sabe que los mRNA sin CAP5' son dirigidos a degradación por el sistema NMD y por lo tanto inyectarlos en células es una forma de activar al sistema. Los embriones inyectados tuvieron aumento de expresión de genes homólogos (El-Brolosy et al. 2019).

Herramientas modernas de modificación genética han permitido continuar estudiando el mecanismo de adaptación transcripcional y la compensación genética, el CRISPR de interferencia (CRISPRi) es un método que permite regular la transcripción y reprimir la expresión de genes, al actuar a nivel transcripcional no hay modificación en la secuencia del gen regulado. En organismos KD que usan éste método no presentan adaptación transcripcional (Sztal y Stainier 2020). Otros casos en los que no se observa adaptación transcripcional es cuándo se elimina el promotor del gen o el gen completo (Sztal y Stainier 2020).

Las observaciones llevan a la conclusión de que los mRNA con codón de paro prematuro son los posibles activadores de la adaptación transcripcional, pero pueden existir otros tipos de mRNAs dañados o modificados que podrían provocar la activación de sistemas que induzcan expresión de genes homólogos y por lo tanto tener una compensación genética (Kontarakis y Stainier 2020). En general el proceso de compensación genética aún tiene muchas incógnitas y para dilucidar si este proceso está involucrado en el fenotipo de algún organismo mutante se ha propuesto principalmente evaluar la expresión de genes homólogos al gen mutado e incluso en este trabajo se propone evaluar el fenotipo de un organismo mutante nulo para un gen de interés y un mutante nulo para el gen que podría compensarlo.

En el caso de nuestro mutante nulo de BG ($tgfbr3^{una201}$), si suponemos que la discrepancia entre morfante y mutante pueda ser causada por compensación genética tendríamos como posible gen compensatorio a la ENG. Ambos son co-receptores de la vía del TGF- β , comparten ligandos y tienen similitud de secuencia, especialmente en la

zona intramembranal, donde tienen similitud de un 72% (figura 1) (Kim, Henen, et al. 2019). El BG y la ENG comparten en general los mismos dominios estructurales, consistiendo de un largo ectodominio con dominios *Orphan* y ZP, una sola hélice transmembranal de alrededor de 40 residuos de aminoácidos y un dominio citoplasmático corto (Figura 1) (Kim, et al. 2019). Tanto el BG como la ENG pueden pasar por un proceso de proteólisis y pueden encontrarse de forma soluble.

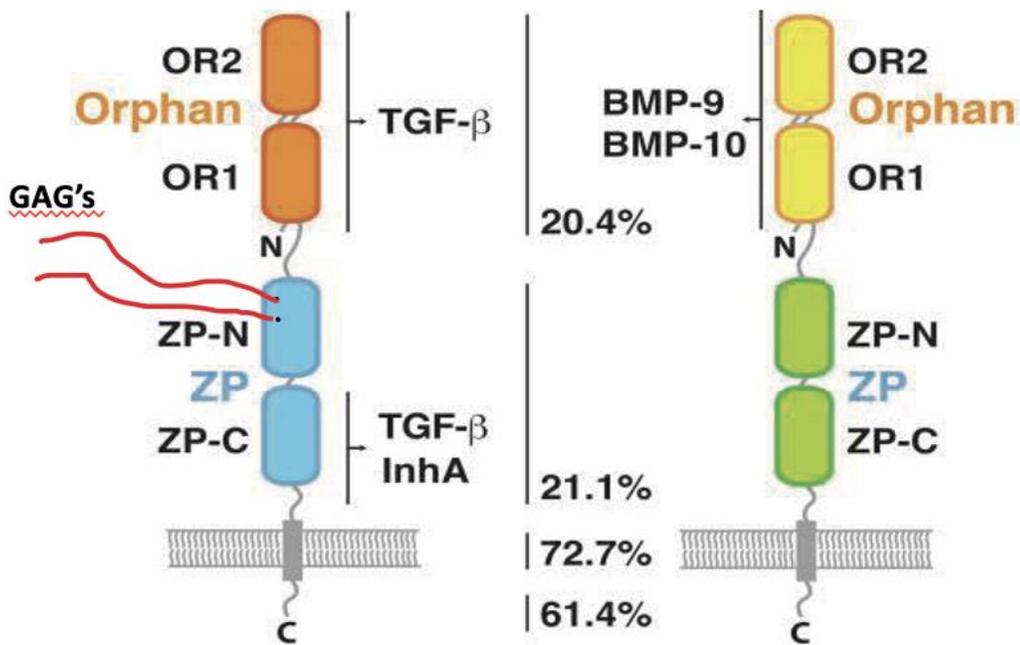


Figura 1. Ilustración de la estructura de BG (derecha) y ENG (izquierda), comparando las similitudes estructurales y similitudes en la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas. ZP se refiere al dominio zona pellucida y GAGs a las cadenas de glicosaminoglicanos. Imagen modificada de Kim, Henen, et al. 2019.

Además de tener una alta similitud en secuencia, el dominio intracelular de ambas proteínas puede ser fosforilado por cinasas de serina/treonina, ambas tienen afinidad por las isoformas de TGF- β y por los receptores T β RI y T β RII (Bernabeu, et al., 2009). Ambas proteínas se pueden encontrar de manera soluble o unidas a la membrana plasmática (Vilchis-Landeros, et al., 2001; Margioulas-Siarkou, et al., 2022).

En cuanto a los ligandos, tanto el BG como la ENG comparten ligando; sin embargo, la ENG es conocida por una alta afinidad por BMP9/10 (Jonker, 2013), mientras que el BG tiene mayor afinidad por el TGF- β 2. El dominio ZP-C es un dominio de unión a ligando importante tanto para BG como para ENG (figuras 2 y 3) (Kim, et al. 2019). La figura 2 ilustra un modelo propuesto para el proceso de presentación de ligando, donde la unión de BG con el ligando, en este caso TGF- β 2, aumenta la afinidad de TGF- β 2 por el receptor T β RII, consecuentemente, la unión de TGF- β 2 y T β RII induce el reclutamiento del receptor de T β RI, así el BG se separa y se queda el heterotetrámero de señalización (TGF- β 2, T β RI, T β RII) (Kim, et al. 2019).

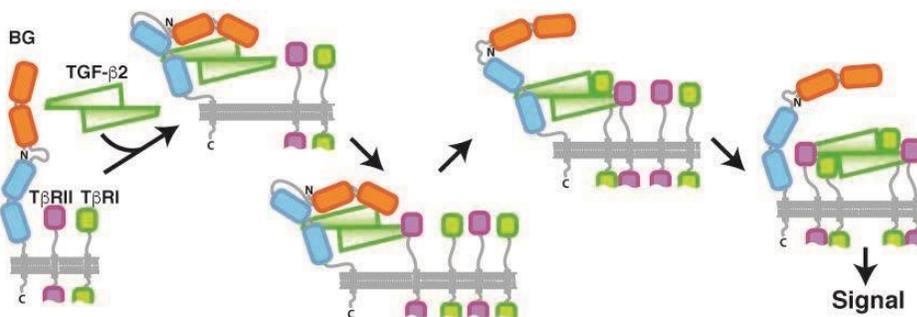


Figura 2. Modelo propuesto para unión de BG a su ligando y al receptor. Obtenido de Kim, et al. 2019.

Por su parte, cuando la ENG está insertada en la membrana celular se encuentra en forma de dímero, que está unido por un enlace disulfuro, cada dímero tiene zonas de unión a ligando. La figura 3 ilustra el mecanismo descrito por Kim, et al. 2019 para la unión del ligando y el receptor, utilizando como ligando a BMP9 o BMP10. ENG se une a BMP9 o BMP10, promoviendo la unión del receptor tipo I, en este caso ALK I, lo cual provoca un cambio estructural que promueve la unión de un receptor tipo 2, que podría ser un receptor de activinas tipo 2 (ACTRII) o un receptor de proteínas morfogénicas óseas tipo II (BMPRII), se libera a la ENG para formar el heterotetrámero (ligando, receptor 1 y receptor 2) y continúa el proceso de señalización (Kim, et al. 2019). Notablemente el modelo descrito para ENG muestra similitudes con el modelo descrito para la unión de BG con su ligando y al receptor..

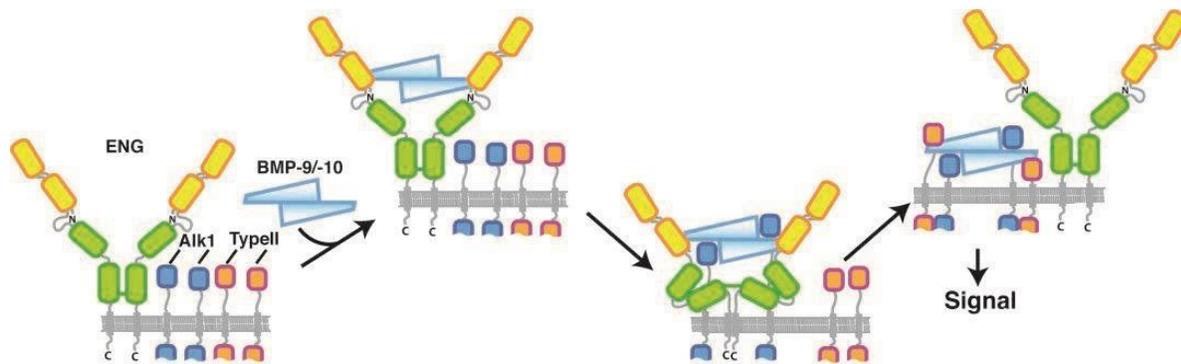


Figura 3. Modelo propuesto para unión de ENG a su ligando y al receptor. Obtenido de Kim, et al. 2019.

El BG y la ENG son proteínas que comparten similitudes de secuencia, estructurales y de funcionamiento, sin embargo, no conocemos si existe una relación a nivel proteína o a nivel genético entre ambas. Ya que éstas dos proteínas participan como reguladores de la vía de TGF- β , la relación entre éstas dos proteínas podría tener implicaciones en el funcionamiento de la vía y de los procesos en los que la vía de TGF- β está implicado, como puede ser el desarrollo embrionario. Considerando la participación de ENG en vasculogénesis y angiogénesis y el antecedente del morfante de BG con problemas angiogénicos (malformación de ISVs), podríamos pensar en evaluar a un organismo que no exprese BG ni ENG para conocer las consecuencias en la vía de TGF- β ante la pérdida de sus dos co-receptores y las posibles consecuencias en la sobrevivencia y en procesos como la angiogénesis.

El desarrollo vascular en pez cebra se ha descrito como un proceso de pasos secuenciales, iniciando por la vasculogénesis, seguido de angiogénesis (angiogénesis primaria), lifangiogénesis (angiogénesis secundaria), remodelación de vasos y maduración (Okuda & Hogan, 2020).

La vasculogénesis es la formación de los primeros vasos, inicia a las 12 hpf cuando los precursores endoteliales derivados del mesodermo migran y se unen para construir la estructura de los vasos, ésta etapa termina a las 22 hpf con la formación de los vasos centrales: la aorta dorsal (DA), la vena posterior cardinal (PCV) y la vasculatura craneal (Okuda & Hogan, 2020). Posteriormente, inicia la angiogénesis

primaria, que consiste en que se formen brotes de células endoteliales en la DA que van a migrar con dirección dorsal y formar a los vasos intersegmentales (ISV) y el vaso anastomótico longitudinal dorsal (Dorsal Longitudinal Anastomotic Vessel, DLAV por sus siglas en inglés) (Gore, et al., 2012), alrededor de las 32 hpf se observa una nueva formación de brotes de células endoteliales pero ahora en el PCV (Okuda & Hogan, 2020), ésta es la angiogénesis secundaria, las células endoteliales migran en dirección dorsal para formar a las venas intersegmentales (vISV), durante ésta etapa también se forman brotes que forman la vasculatura linfática (Gore, et al., 2012).

Durante la remodelación continúa la migración de células endoteliales para corregir y asegurar las conexión entre vasos y también se observa la formación del lumen vascular (Betz, et al., 2016; Okuda & Hogan, 2020), finalmente la maduración de la vasculatura se considera que ocurre entre los 2 y 3 días post-fecundación (dpf) en éste proceso el fluido de sangre promueve la modificación de la estructura de células endoteliales y se modifica el diámetro de los vasos centrales como la DA y PCV (Sugden, et al., 2017; Okuda & Hogan, 2020).

Este trabajo propone que la ENG participa en un proceso de compensación genética ante la pérdida de BG, se plantea que si obtenemos un organismo con una mutación nula de BG y la mutación nula de ENG (doble mutante) el efecto compensatorio se perdería y por lo tanto observaremos defectos vasculares similares a los del morfante de BG.

Justificación

De acuerdo con reportes de aumento en la expresión de genes homólogos después de una mutación, el fenómeno de la compensación genética en pez cebra es más común de lo que se piensa, este trabajo busca verificar la posibilidad de que exista compensación genética entre BG y ENG en el pez cebra. El estudio de la compensación genética como una respuesta a la discrepancia entre fenotipos *knockdown* y *knockout* nos permite tener una nueva perspectiva respecto a los efectos de las mutaciones en el fenotipo e ilustrar la importancia de procesos de plasticidad genética en el desarrollo embrionario, pero particularmente en este trabajo podremos comprender con mayor profundidad el posible ajuste entre las proteínas involucradas en la regulación de la angiogénesis.

En esta investigación también se pretende avanzar en el conocimiento de las interacciones entre el BG y la ENG, que son proteínas estructuralmente similares que pertenecen y regulan la señalización del TGF- β , además de las implicaciones que tienen para que toda una vía de señalización pueda mantenerse después de perder uno de sus co-receptores reguladores importantes.

Hipótesis

La ENG puede compensar la pérdida de BG en mutantes nulos durante el proceso de angiogénesis en embriones de pez cebra (*Danio rerio*).

Objetivo principal

Evaluar si la mutación nula de BG en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) promueve el proceso de compensación genética por ENG durante la angiogénesis.

Objetivos secundarios

1. Evaluar la expresión de ENG en mutantes nulos de BG
2. Obtener organismos dobles mutantes de BG y ENG.
3. Describir el fenotipo del pez cebra doble mutante
4. Evaluar la viabilidad de organismos dobles mutantes.
5. Evaluar la expresión de BG en mutantes nulos de ENG.
6. Analizar cambios en la expresión de las 3 isoformas de TGF- β .
7. Analizar el desarrollo de vasos intersegmentales, vena dorsal y caudal en los organismos dobles mutantes.

Método

Modelo experimental

Se utilizaron cepas de pez cebra transgénicas que expresan a la proteína verde fluorescente (Green fluorescent protein o GFP por sus siglas en inglés) por medio del promotor *fli1* *tg(fli1:EGFP)*, bajo condiciones estándar. La proteína *fli1* en pez cebra se expresa desde etapas tempranas del desarrollo embrionario en células precursoras hematopoyéticas y en células precursoras endoteliales, las cuales posteriormente se desarrollan como vasos vasculares (Delov, et al., 2014). La GFP unida al promotor de *fli 1* nos permite visualizar la vasculatura del pez cebra en todas las etapas del desarrollo por medio de la activación de fluorescencia de la GFP.

Los peces cebra se clasificaron en 3 grupos según su genotipo: peces WT, peces mutantes nulos de BG (*tgfbr3^{una201}*) generados por CRISPR-Cas9 (Figura 4) y peces mutantes nulos de ENG (*ENG^{mu130}*) generados por TALEN (Figura 5).

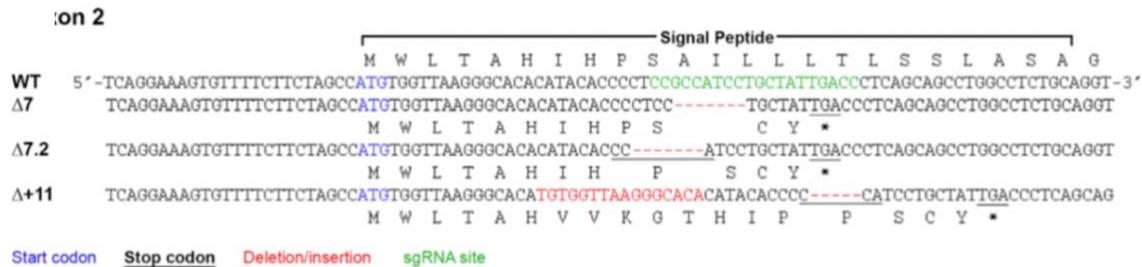


Figura 4. Secuencia de exón 2 del pez cebra WT y del pez cebra con pérdida de BG ($\Delta 7$, $\Delta 7.2$ y $\Delta +11$), de las secuencias generadas, el $\Delta 7$ fue el seleccionado para hacer la mutación y se llama *tgfbr3^{una201}*. Imagen obtenida de Molina-Villa et al. 2021.

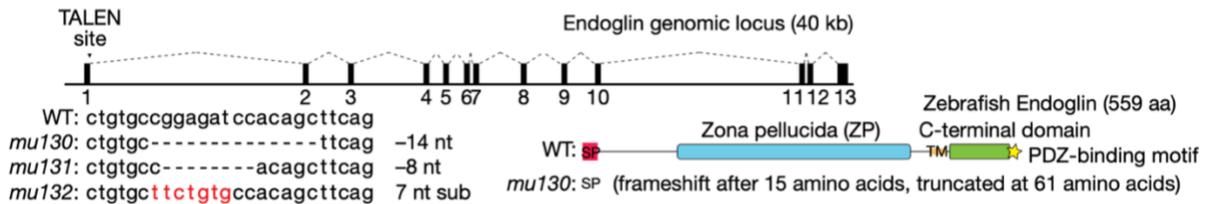


Figura 5. Sitio TALEN en el gen ENG de pez cebra, generando un cambio de marco de lectura después de 15 aminoácidos y un codón de paro prematuro después de 61 aminoácidos. Imagen obtenida de Sugden, et al. 2017.

Cruzas de peces para obtener el doble mutante

Para obtener un organismo doble mutante, que no expresara BG ni ENG se siguieron las reglas de la genética mendeliana para planear una serie de cruzas entre los peces mutantes de ENG y los peces mutantes de BG. Esto, con el objetivo de obtener una población con alto número de peces dobles mutantes.

En estas poblaciones de peces es posible utilizar la genética mendeliana para predecir los genotipos en las crías debido a que el BG (en pez cebra se encuentra en el cromosoma 6) y la ENG (en pez cebra se localiza en el cromosoma 5) (ZNP,2024) presentan segregación independiente, es decir, los alelos de genes diferentes se

reparten en los gametos independientemente el uno del otro. Por lo tanto, podemos utilizar cuadros de Punnett para ilustrar las posibles combinaciones y proporciones esperadas en cada cruce. Para crear los cuadros Punnett, se determinó designar a los siguientes símbolos: **B** para el alelo BG silvestre, **b** para el alelo de BG mutado, **E** para el alelo de ENG silvestre y **e** para el alelo de ENG mutado.

Las primeras cruces fueron entre hembras mutantes nulos de BG (bb) y machos mutantes nulos de ENG (ee) obteniendo una población de peces heterocigos de BG y heterocigos de ENG ($Bb Ee$).

Las siguientes cruces fueron entre peces hembra heterocigos de BG y heterocigos de ENG x machos heterocigos de BG y heterocigos de ENG ($BbEe \times BbEe$) (Figura 6a), obteniendo una población diversa y siguiendo las reglas de Mendel se esperaba obtener una proporción de $1/8$ de dobles mutantes del total de la población total. Finalmente, con la intención de obtener mayor proporción de peces dobles mutantes en cada cruce se decidió realizar una cruce intermedia (figura 6b).

La cruce intermedia consistió en cruzar un pez mutante nulo de BG x un pez heterocigo de BG y de ENG ($bbEExBbEe$), se obtienen peces mutantes nulos de BG y heterocigo de ENG ($bbEe$) (Figura 6b). Al cruzar a mutantes nulos de BG y heterocigo de ENG x mutantes nulos para BG y heterocigo de ENG ($bbEexbbEe$), de acuerdo a las proporciones mendelianas $1/4$ del total de la población corresponden a embriones dobles mutantes ($bbee$) (Figura 6c).

¿

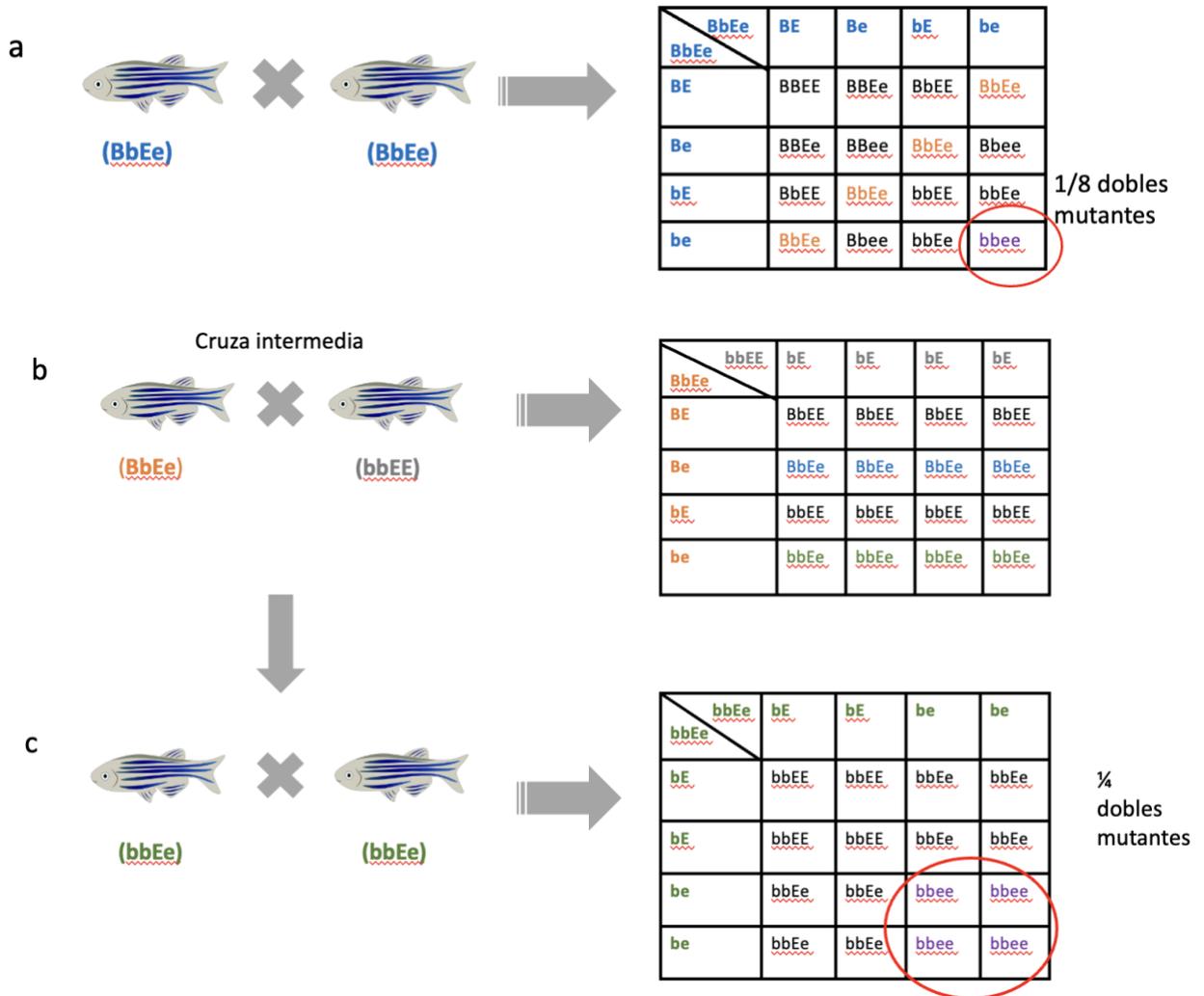


Figura 6. Ilustración de las cruzas de pez cebrá para obtener a un organismo doble mutante. **a.** cruza de organismos heterocigoto de BG y ENG ($Bb \times Ee$) que proveen embriones con una proporción 1/8 de organismos dobles mutantes. **b.** Cruza intermedia entre un pez mutante de BG y un pez heterocigoto de BG y heterocigoto de ENG ($bbEE \times BbEe$), de los cuales se obtienen peces mutantes de BG y ENG ($bbEe$) **c.** Cruza de un peces mutantes de BG y heterocigotos de ENG ($bbEe \times bbEe$) que genera una población de embriones con proporción de 1/4 de organismos dobles mutantes ($bbee$).

Extracción de DNA genómico

Para determinar la presencia de las mutaciones se genotifica a los peces, así que para extraer el DNA genómico, se utilizaron 2 técnicas de extracción, una para peces adultos y otra para peces en estado larvario.

Peces adultos

Para la extracción de DNA de peces adultos, estos se anestesiaron con Tricaina, posteriormente, se cortaron con un bisturí quirúrgico 8 mm del extremo posterior de la aleta caudal con un bisturí quirúrgico. El material biológico extraído se degrada con 50 μ l de NaOH 50 mM y se coloca a 90 °C, el pH se estabiliza con 5 μ l de Tris-HCl 1M.

Larvas

Genotipificación

Para determinar la presencia de la mutación de BG y/o de ENG se utilizaron métodos específicos para cada gen.

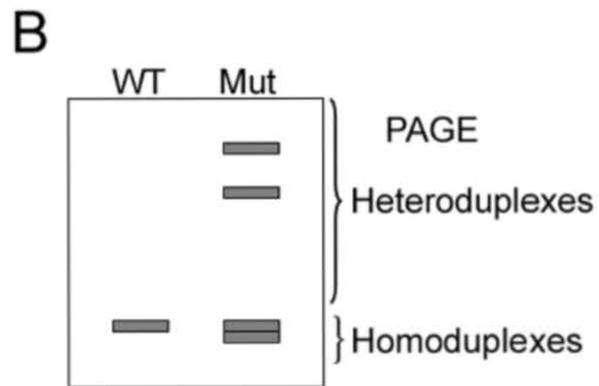
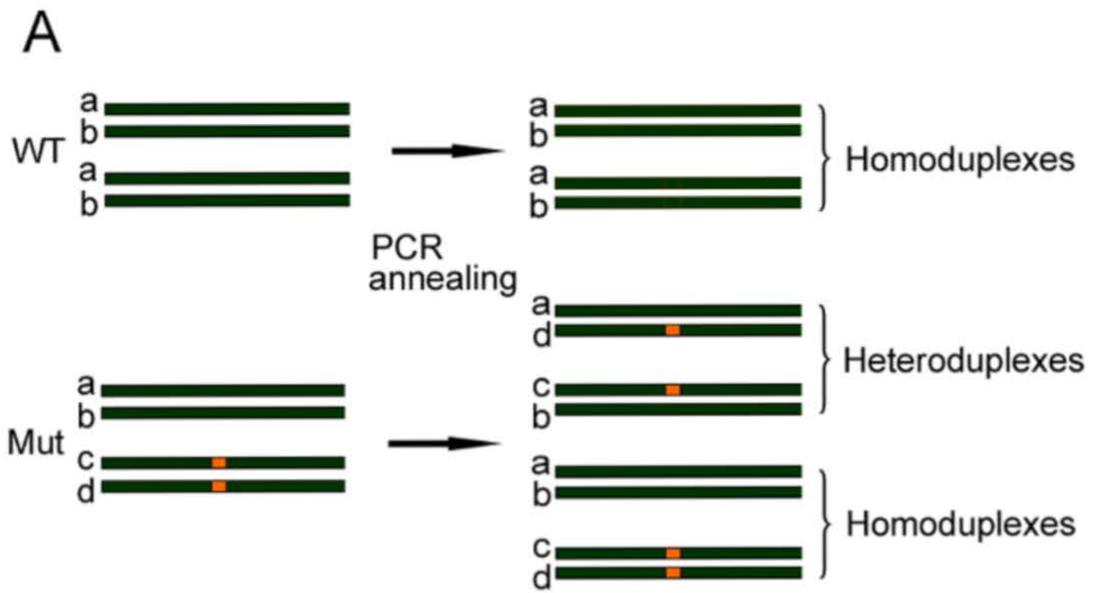
En el caso del BG, la genotipificación se basa en la amplificación por PCR y electroforesis de poliacrilamida (Zhu et al. 2014). Para detectar la actividad de Cas9 y la lesión causada al genoma, se generaron los primers: BG002 (3'-ccctattcccaccatttacgtag-5') y BG003 (5'-ccccataactcttctcatcttc- 3'), que amplifican un fragmento de 471 pb. Se generaron plásmidos con la secuencia que contiene a la mutación de BG *tgfbr3*^{una201} y plásmidos que tienen la secuencia WT, sin modificaciones.

El proceso de genotipificación inicia con la extracción de DNA genómico del pez cebra, se procede haciendo un PCR utilizando a los primers de BG002 y BG003, amplificando al gen de BG. El producto del PCR se corre en un gel de agarosa por electroforesis y al identificar el fragmento de 471 pb se recupera y purifica el DNA, finalmente se mide la concentración de DNA en un Nanodrop, ya que ese DNA es la muestra que se va a utilizar para genotipificar y se nombra como secuencia muestra.

El siguiente paso consiste en amplificar por PCR a los plásmidos que tienen la secuencia WT y a los plásmidos con la secuencia *tgfbr3*^{una201}, también pasan por electroforesis, se extraen del gel y purifican, se mide la concentración de DNA con el Nanodrop, para identificarlas se les nombra secuencia WT y secuencia mutante (Δ 7).

Se utilizan 25ng de la secuencia WT y se aparean con 25 ng de la secuencia muestra, al mismo tiempo se aparean 25 ng de secuencia mutante con secuencia muestra. El producto del apareamiento se corren en una electroforesis de acrilamida al 15% a 150 V por 2 hrs. La electroforesis muestra 2 tipos de bandas, son llamadas homodúplex y heterodúplex, cuando las secuencias apareadas son idénticas solo se forman bandas homodúplex, mientras que cuando las secuencias son distintas se forman bandas heterodúplex (Figura 7A). Para genotipificar se evalúan los patrones de bandeo, donde tenemos bandas homodúplex y bandas heterodúplex (Figura 7B).

Un pez cebra es WT para BG cuando el producto del apareamiento entre la secuencia mutante y la secuencia muestra generan bandas heterodúplex, mientras que el apareamiento de la secuencia WT y la secuencia muestra generan bandas homodúplex (Figura 7C). Un pez cebra es heterócigo (het) para BG cuando el producto del apareamiento entre la secuencia mutante y la secuencia muestra generan bandas heterodúplex, y que el apareamiento de la secuencia WT y la secuencia muestra también generan bandas heterodúplex (Figura 7C). Un pez cebra es mutante (Mut) para BG cuando el producto del apareamiento entre la secuencia mutante y la secuencia muestra generan bandas homodúplex y que el apareamiento de la secuencia WT mientras que la secuencia muestra generan bandas heterodúplex (Figura 7C).



C

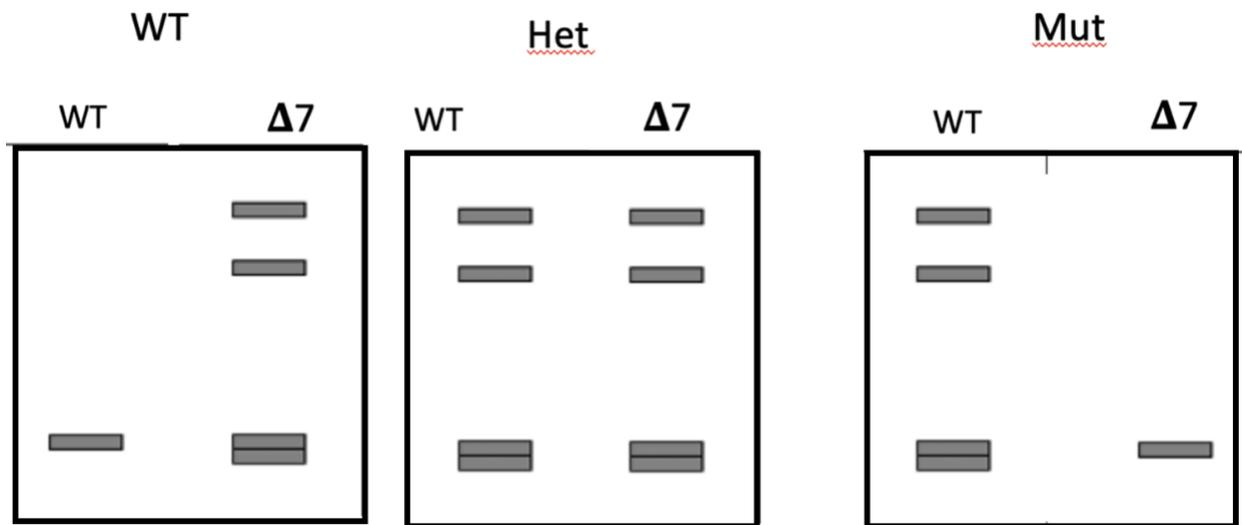


Figura 7. Ilustración del apareamiento de DNA WT y DNA mutante que genera bandas homoduplex y heterodúplex, cuando el apareamiento entre dos secuencias iguales de DNA obtenemos únicamente bandas homoduplex, mientras que cuando las secuencias de DNA difieren (por una mutación) se presentan bandas heterodúplex. Imagen obtenida de Zhu et al. 2014.

La genotipificación de ENG se basa en la técnica reportada por Sugden, et al. 2019 Para detectar la mutación generada por TALEN, se generan los *primers*: End_TAL6 FWD (5' -tcttcgagccctaatacagc-3') y End_TAL6 REV (5' -agcaactgtaaaattaccacaaca-3'), que amplifican una sección de 418 pb que tiene un C[^]CGG que es reconocido por la enzima de restricción Msp1. Los amplicones *wild type* (WT) son digeridos generando 2 bandas, una de 246 pb y otra de 172 pb, los amplicones heterocigoto (Het) muestran la banda sin digerir de 418, otra banda de 246 y una última de 172 pb, mientras que los amplicones mutantes (Mut) de eng^{mu130} no se digieren y obtenemos una banda de 418pb (figura 8).

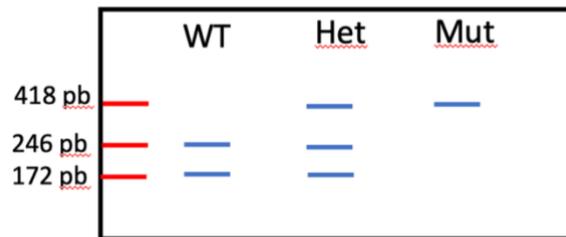


Figura 8. Ilustración del bandeo obtenido en la genotipificación de ENG.

Sobrevivencia

Después de cada cruce, los embriones se limpian y contabilizan; a partir de las 24 hpf se cuentan los embriones/larvas sobrevivientes cada día por 40 días. El número inicial de larvas en cada cruce se toma como el 100% y se calcula el porcentaje de sobrevivientes para cada día. Se evaluó la sobrevivencia de las poblaciones de las cruces WT, mutantes de BG (bbxbbb), mutantes de ENG (eexee), mutantes de BG y heterocigos de ENG (bbEexbbEe) y dobles mutantes (bbeexbbe).

Observaciones en el microscopio

Observaciones fenotípicas en el microscopio óptico

Los huevos obtenidos en cada cruce se colocan en una incubadora a 27°C, se realizan observaciones en etapa de cigoto (0.5 hpf), blástula (3 hpf), periodo de segmentación (24 hpf), periodo faríngea (48 hpf) y periodo de eclosión (72 hpf), en un microscopio óptico para observar posibles cambios visibles en el corazón y el sistema vascular, se utilizó un microscopio óptico marca Olympus SZX7 y un microscopio de epifluorescencia Olympus BX53 con un objetivo de 10x (Figura 18).

Frecuencia cardiaca

Para evaluar la frecuencia cardiaca de las larvas en estado de 24 hpf, 48 hpf y 72 hpf, se observaron en un microscopio óptico con un objetivo 10x, se grabaron videos con una cámara Olympus Mark IV y en edición se redujo la velocidad del video para

contar manualmente el número de latidos por min, cada larva se evalúa por triplicado y se obtiene un promedio de latidos/min (tabla 3). Todos los embriones se mantuvieron a 28°C.

Talla de peces adultos

Los peces adultos con más de un año post-fecundación se anestesiaron con Tricaina 25% en una solución 1:4, diluida en agua de acuario, se colocaron en la platina del microscopio y se colocó una regla para medir el largo (de la boca a la aleta caudal) y el ancho (base de la aleta pélvica a la base de la aleta dorsal). Los datos de cada grupo genotípico evaluado se promediaron.

Microscopio confocal

Los embriones en estadio de 72 hpf fueron montados con agarosa 1%, para ser observados en el microscopio confocal LSM 800 de la marca Zeiss del departamento de imagenología del Instituto de Fisiología Celular. Se tomaron imágenes usando el objetivo 20x, en el área de somita 8, 9 y 10 (Figura 20a).

Ensayos de qRT-PCR

Extracción de RNAm

Se usaron los cuatro grupos fenotípicos de este trabajo: WT, *tgfbr3^{una201}*, *Eng^{mu130}* y *tgfbr3^{una201}Eng^{mu130}*. Se seleccionaron al azar larvas en estadio de 8 dpf, el RNA total fue obtenido por extracción con TRIZOL (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la concentración de RNA total extraído con un espectrofotómetro NanoDrop.

Síntesis del cDNA

Para obtener el cDNA se usa 1µg de RNA total y la reacción de retrotranscripción con la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) con oligonucleótidos hexaméricos aleatorios (Invitrogen) durante 50 min a 37 °C. En todos los casos se generó un control de la reacción sin enzima RT para analizar posible contaminación con DNA genómico.

Oligonucleótidos

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'
BG (TGFBRIII)	F:AAAGCAGCAGAAGGGTGTGT R:ACCTGGAAAGCACTGTAGGG
ENG	F:GCCGGAGATCCACAGCTTCAGA R:GTTATCGAAAAGCATGGCGTGA
TGFB1	F: GCACACCATAGAAGATCCAAC R: TGACAACCTGTTCCACCTTATGC
TGFB2	F: GTTCAAGAAGAAGCGGATCG R: GGGGTCTTGCCGATGTAGTA
TGFB3	F: CGGGCAGGACAACACTGA R: GGCAGTAGGGCAGGTCAT

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para experimentos de qRT-PCR.

PCR cuantitativo en tiempo real

Se prepararon reacciones de 15 μ l con la composición de la tabla 2.

	μ l
SYBR Green mix con Rox (Invitrogen)	7.5
Oligonucleótido Forward	1.5
Oligonucleotido Reverse	1.5
Templado	1.2
H₂O (estéril)	3.3

Tabla2. Componentes de la reacción de qRT-PCR.

El templado fue diluido 1:10, además se incluyeron controles de RT- (sin enzima RT).

La amplificación se realizó por 5min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58 °C por 1 min y 60 °C por 1 min. La expresión del gen es calculada por la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$

Todos los ensayos de qRT-PCR fueron realizados por triplicado y la expresión fue normalizada con α -actina.

Análisis estadístico

Se utilizó una Anova de una vía para el análisis estadístico de datos. El error estándar promedio (SEM) para cada valor de la expresión relativa del gen se calculó como la media de la variación de los datos. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos (Figura 20c).

Resultados

Obtención de organismos dobles mutantes

Las primeras cruces de peces cebras que se realizaron para obtener a los organismos dobles mutantes fueron entre una hembra BbEe y un macho bbEE, con el objetivo de obtener organismos con el genotipo bbEe. Una cruce promedio entre la hembra BbEe y el macho bbEE genera alrededor de 150-300 huevos fecundados, los embriones fueron criados hasta la adultez (alrededor de 4 meses post-fecundación). Se obtuvieron 23 peces adultos, de los cuales se extrajo DNA genómico para la genotipificación.

De la población de 23 peces adultos se genotipificó primero para ENG (Figura 9) se determinó que 11 eran heterocigos de ENG. Se separaron los peces heterocigos de ENG y se realizó la genotipificación para BG (Figura 10) identificando tres organismos que fueron mutantes de BG. De esos tres organismos se determinó que 2 eran machos y 1 era hembra. Con estos tres peces se iniciaron las cruces para obtener peces dobles mutantes adultos.

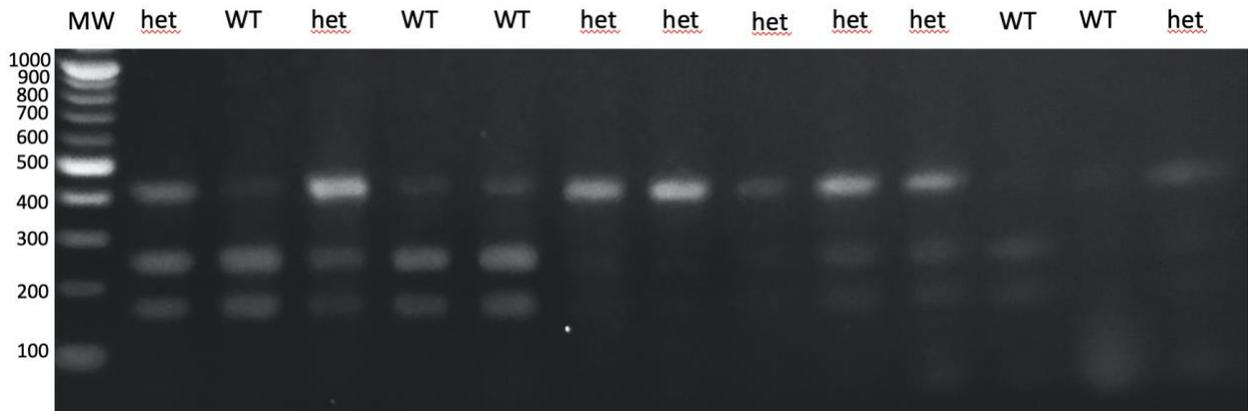


Figura 9. Imagen representativa de la genotipificación de ENG para las cruzas bbEExBbEe, los organismos wild type son representados con WT, los heterócigos con het y los mutantes con Mut.

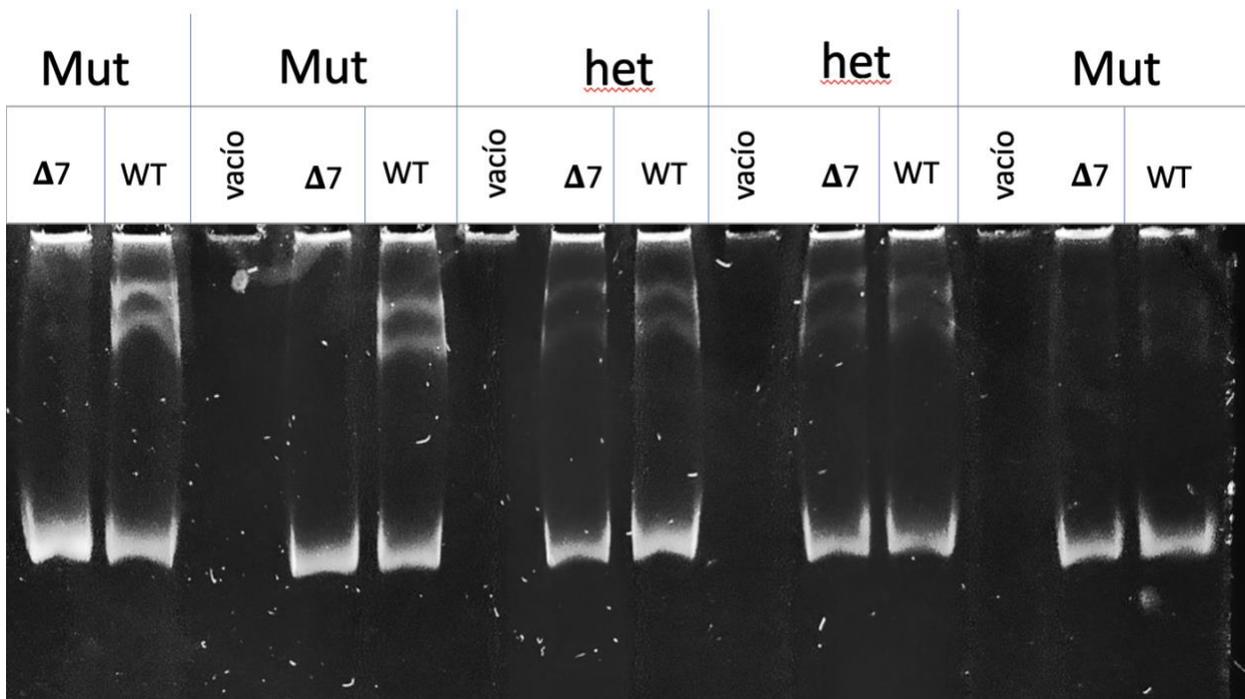


Figura 10. Imagen representativa de la genotipificación de BG para las cruzas bbEExBbEe, el signo WT representa el apareamiento con 25ng de la secuencia WT, mientras que signo " $\Delta 7$ " representa el apareamiento con 25ng de la secuencia mutante. Los organismos mutantes están simbolizados con Mut, los heterócigos con het y los Wild Type con WT. Entre cada carril se dejó un espacio vacío. El primer carril representa el apareamiento de la secuencia mutante con la secuencia muestra, se observa solo bandas homodúplex. El segundo carril representa el apareamiento de la secuencia WT con la secuencia muestra, se observan bandas heterodúplex, indicando

que el pez es un organismo mutantes nulo de BG. Esto se repite para todos peces evaluados en ésta población.

La crusa promedio de los organismos bbEe x bbEe provee de 100-300 huevos, se realizaron aproximadamente 10 cruza, de las cuales no se obtuvo ningún pez adulto, la población de larvas disminuye con el paso de los días y entre el día 15 – 30 post-fecundación muere todas las larvas.

En una de las cruza bbEe x bbEe se obtuvieron 120 huevos, de los cuales sobrevivieron 20 peces adultos, al genotipificarlos para BG y ENG, se comprobó que todos los peces era mutantes de BG (figura 11) entre esos peces se encontró uno que también es mutante de ENG (Figura 12), por lo tanto era un doble mutante (bbee), era un macho fértil que tenía las mismas medidas que los peces WT y que al cruzarlo con hembras bbEe produjo entre 100 a 300 huevos.

Demostrando que los organismos dobles mutantes pueden llegar a la adultez, son fértiles y no tienen defectos fenotípicos notables (Figura 13).

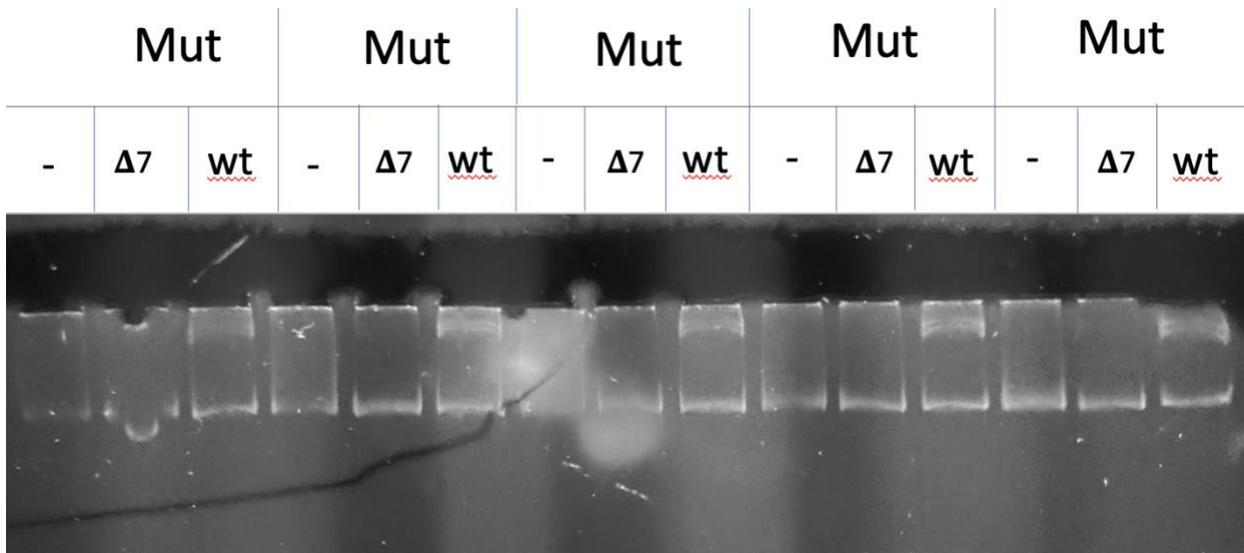


Figura 11. Imagen representativa de la genotipificación de BG para las cruza bbEeXbbEe, el signo WT representa el apareamiento con 25ng de la secuencia WT, mientras que signo " $\Delta 7$ " representa el apareamiento con 25ng de la secuencia mutante. El carril con signo "-" es un control de DNA del pez sin apareamiento, es un

control que permite comprobar que el carril $\Delta 7$ si hay DNA. Los organismos mutantes están simbolizados con Mut, los heterócigos con het y los Wild Type con WT. El primer carril representa el apareamiento de la secuencia mutante con la secuencia muestra, se observa solo bandas homodúplex. El segundo carril representa el apareamiento de la secuencia WT con la secuencia muestra, se observan bandas heterodúplex, indicando que el pez es un organismo mutantes nulo de BG. Esto se repite para todos peces evaluados en ésta población.

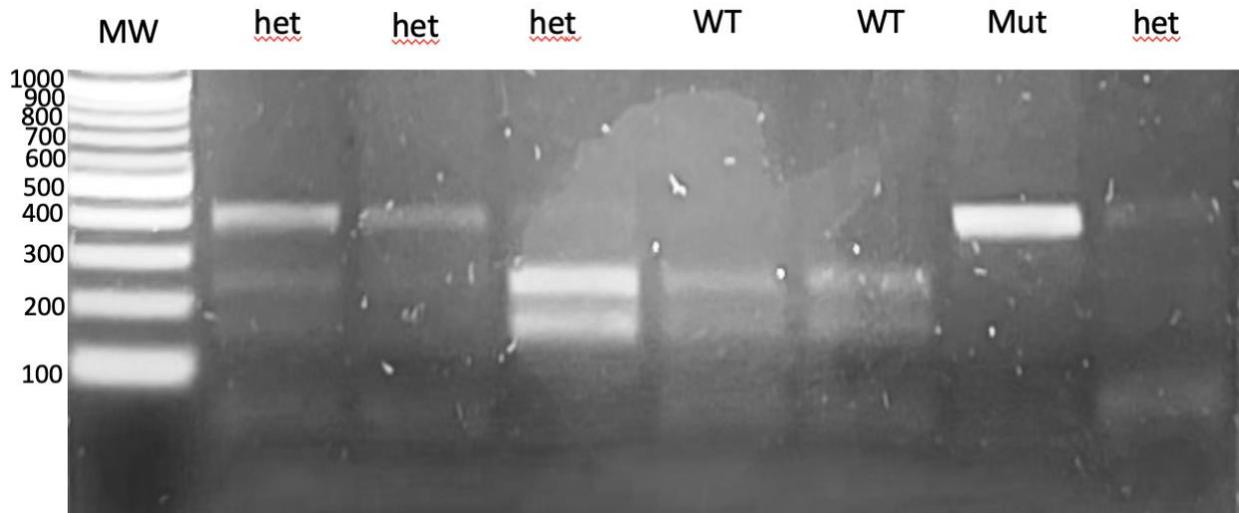


Figura 12. Imagen representativa de la genotipificación de ENG para las cruza $bbEexbbEe$, los organismos wild type son representados con WT, los heterócigos con het y los mutantes con Mut.



Figura 13. Imagen tomada en un microscopio óptico con un objetivo 5x del pez adulto doble mutante ($bbee$).

Se realizaron más cruza $bbee \times BbEe$ con la intención de obtener más organismos dobles mutantes, ya que en esa cruza se obtiene $\frac{1}{2}$ de embriones

mutantes de BG y heterocigotos de ENG (bbEe) y ½ de dobles mutantes (bbee). De estas cruzas se obtuvieron 18 peces adultos dobles mutantes; sin embargo, casi todos fueron machos, solo se encontró 1 hembra. La hembra era fértil y las cruzas entre dobles mutantes produjeron entre 100 – 200 embriones, sin aparentes defectos vasculares u otros defectos que afecten el desarrollo.

Sobrevivencia

El seguimiento diario de la población de embriones-larvas por aproximadamente 40 días, de todos los grupos genotípicos utilizados en este trabajo, nos indica la capacidad de sobrevivencia de cada grupo. La Figura 14 muestra como los organismos WT tienen mayor sobrevivencia respecto a los mutantes individuales de ENG, de BG y a los dobles mutantes. Los mutantes de ENG o BG tienen un patrón de sobrevivencia similar que disminuye constantemente, mientras que los dobles mutantes tienen una reducción del número de embriones-larvas con el paso de los días, principalmente en los primeros 7 dpf y luego se mantiene constante.

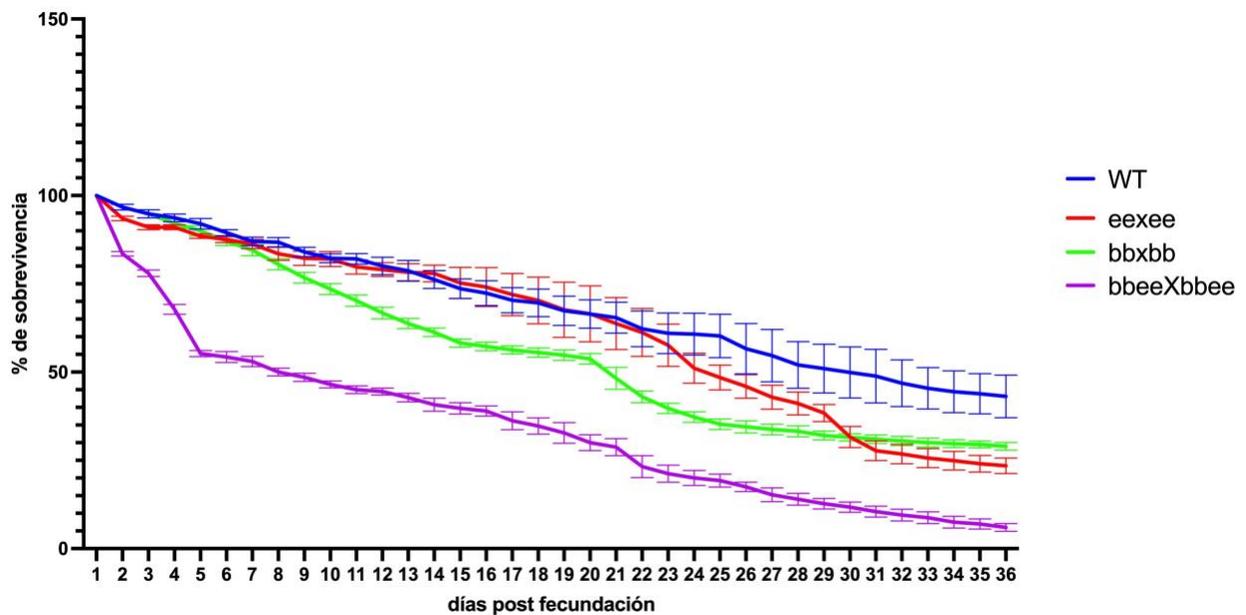


Figura 14. Porcentaje de sobrevivencia poblacional del día 1 al día 36 post fecundación de peces WT, mutantes de BG (bbXbb), mutantes de ENG (eeXee), mutantes de BG y ENG (bbeexbbee). La prueba de Kruskal-Wallis muestra que la población bbeexbbee tiene valor de $p < 0.05$, por lo tanto es significativamente diferente respecto a la población WT.

Para observar los cambios en la sobrevivencia entre los grupos heterocigos y mutantes, también se siguió la sobrevivencia de la población de las cruzas de heterocigos de ENG (EeXEe) (Figura 15) y de las cruzas de mutante de BG y heterocigos de ENG (bbEe X bbEe) (Figura 16).

La población de cruzas de heterocigos de ENG (EeXEe) tiene el mismo patrón de sobrevivencia que las cruzas WT y vemos que las cruzas de peces mutantes de ENG (eeXee) tienen una menor sobrevivencia, especialmente después de los 20 dpf (Figura 15). Sin embargo, la prueba de Kruskal-Wallis indica que esas diferencias no son estadísticamente significativas.

En el caso de las cruzas de mutantes de BG y heterocigos de ENG (bbEeXbbEe) también se tiene un patrón de sobrevivencia similar al WT y por lo tanto una mayor sobrevivencia que las cruzas de mutantes de BG (bbXbb) y que las cruzas de dobles mutantes (bbeeXbbee) (Figura 16). La prueba de Kruskal-Wallis indica que únicamente la población doble mutante tiene diferencias significativas respecto a la población WT.

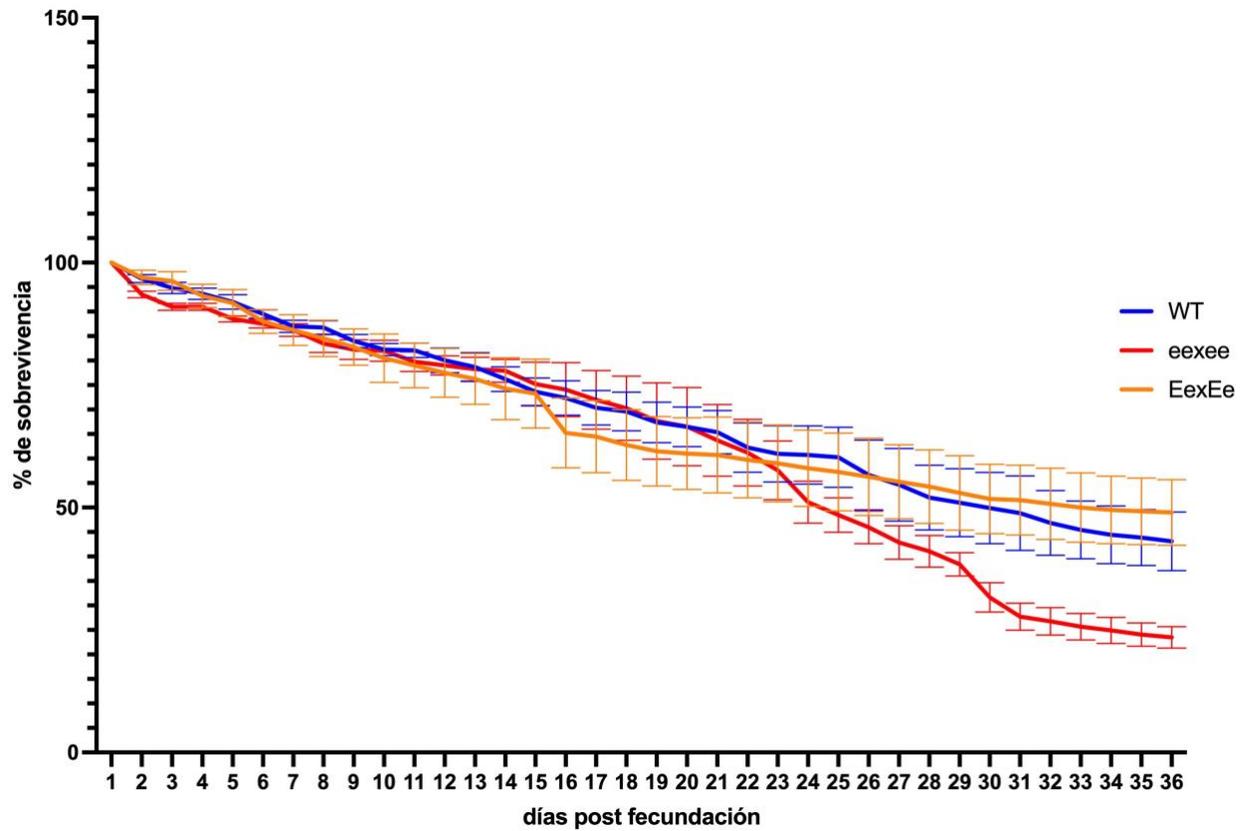


Figura 15. Porcentaje de supervivencia poblacional del día 1 al día 36 post fecundación de peces WT, mutantes de ENG (eeXee) y heterocigos de ENG (Ee x Ee). La prueba de Kruskal-Wallis no marca diferencias significativas entre la población eeXee y Ee X Ee respecto a la población WT.

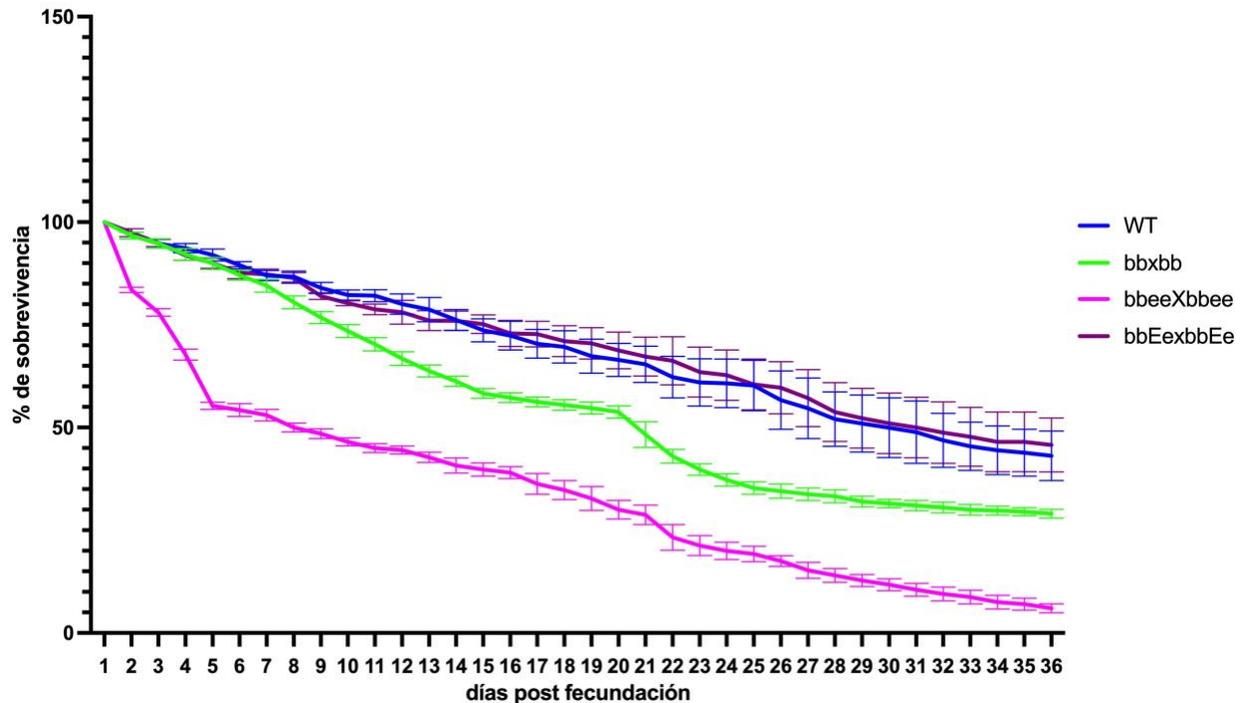


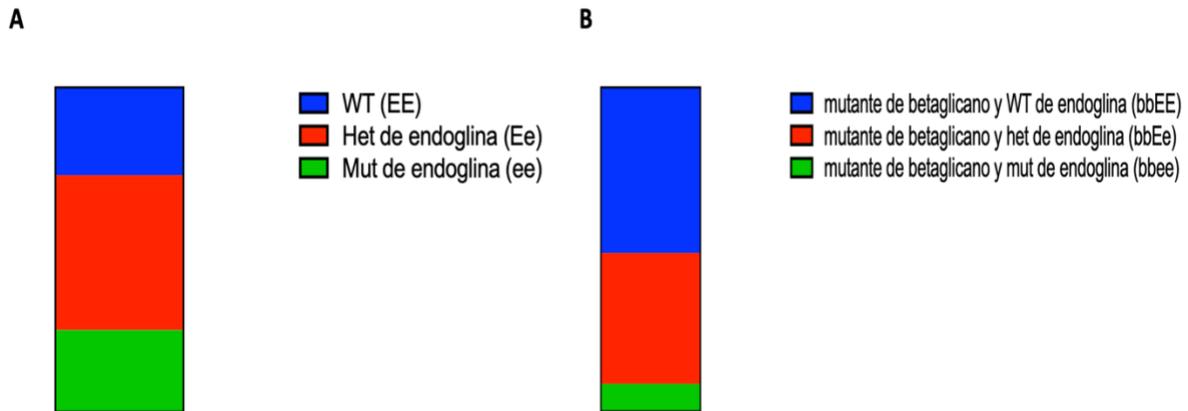
Figura 16. Porcentaje de sobrevivencia poblacional del día 1 al día 36 post fecundación de peces WT, mutantes de BG (bbXbb), mutantes de BG y heterócigos de ENG (bbEe X bbEe) mutantes de BG y ENG (bbeeXbbee). La prueba de Kruskal-Wallys muestra que la población bbeeXbbee tiene valor de $p < 0.05$, por lo tanto es significativamente diferente respecto a la población WT.

La población de peces adultos que se obtienen en cada crusa se genotifica y se clasifican según el genotipo de ENG y BG. Se observó que al genotipificar a las poblaciones obtenidas de las distintas siempre se obtenían menos peces dobles mutantes de lo que se esperaba según las proporciones mendelianas. (Figura 17a).

Se evaluaron los genotipos obtenidos de los peces adultos obtenidos en cruzas EexEe y en las cruzas bbEexbbEe, para comparar las proporciones mendelianas esperadas con las proporciones mendelianas obtenidas de cada crusa. Ambas cruzas tienen como factor común que los animales son heterócigos de ENG, pero la crusa de bbEexbbEe tiene el factor de ser mutantes nulos de BG, al hacer genotipificación de ENG para ambas cruzas se esperaba tener las mismas proporciones mendelianas: $\frac{1}{4}$ WT de ENG, $\frac{2}{4}$ heterócigos de ENG y $\frac{1}{4}$ mutantes nulos de ENG.

La cantidad de peces adultos obtenidos en las cruzas EexEe sí cumplen con las proporciones mendelianas esperadas, en cambio los peces obtenidos en las cruzas bbEexbbEe no cumplen con esas proporciones. La cantidad de peces con genotipo mutante para ENG obtenidos en las cruzas bbEexbbEe es significativamente menor a la esperada mientras que la cantidad de peces con genotipo WT y het para ENG es mayor a la esperada (Figura 17c).

Los peces con genotipo mutante para ENG de las cruzas bbEexbbEe tienen el factor de ser también mutantes nulos para BG, es decir son peces dobles mutantes (bbee), por lo tanto se observa que la sobrevivencia de peces únicamente mutantes de ENG es mayor que la sobrevivencia de los peces dobles mutantes. Se realizó una prueba de chi-cuadrado (X^2) o de Pearson que permite contrastar las poblaciones obtenidas con las poblaciones esperadas y determinar si hay una diferencia estadísticamente significativa entre ambas (Figura 17c).



C

	genotipo	#observado	#esperado	%esperados	Prueba Chi-cuadrado
Cruza de heterócigo de endogлина x heterócigo de endogлина (Ee x Ee)	Wild type (EE)	30	25	27.03	P>0.05 No significativo
	Heterócigo de endogлина (Ee)	53	50	47.75	
	Mutante de endogлина (ee)	28	25	25.23	
Cruza de mutante de betaglicano y heterócigo de endogлина x mutante de betaglicano y heterócigo de endogлина (bbEe x bbEe)	Mutante de betaglicano y wild type de endogлина (bbEE)	48	25	51.06	P<0.05 cambios significativos
	Mutante de betaglicano y heterócigo de endogлина (bbEe)	38	50	40.43	
	Mutante de betaglicano y mutante de endogлина (bbee)	8	25	8.511	

Figura 17. Comparación de las proporciones genotípicas de cruza mutantes de BG y heterócigos de ENG (bbEeXbbEe) y heterócigo de ENG y dobles mutantes (bbeeXbbee). A. Gráfica de las proporciones obtenidas en las cruza mutantes de BG (bbEeXbbEe). B Gráfica de las proporciones obtenidas en las cruza de dobles mutantes (bbeeXbbee). C Tabla de la prueba de Chi-Cuadrado (X^2) evaluando las proporciones esperadas contra las obtenidas, $P < 0.05$ significativo.

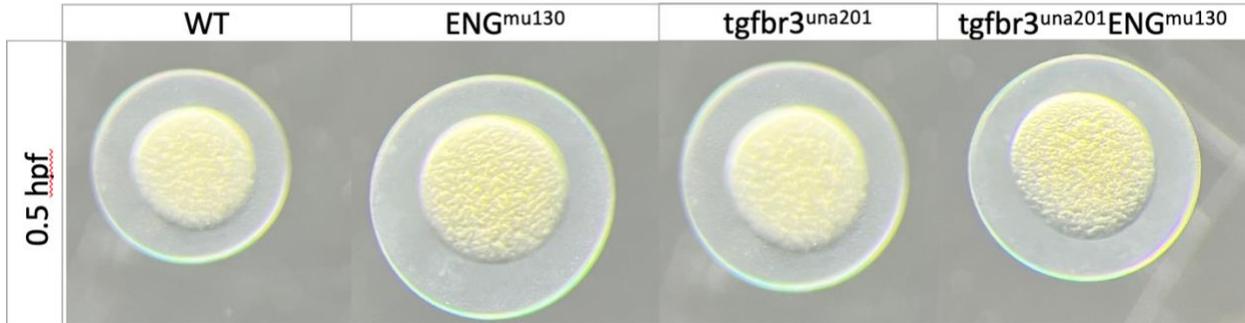
Observaciones fenotípicas en microscopio óptico

Para comparar aspectos fenotípicos del desarrollo embrionario las larvas se clasificaron en 4 grupos genotípicos: WT, mutantes de Eng (ENG^{mu130}), mutantes de BG ($tgfbr3^{una201}$) y dobles mutantes ($tgfbr3^{una201} ENG^{mu130}$). Se hicieron observaciones tanto en microscopio óptico como en microscopio confocal LSM710 Zeiss.

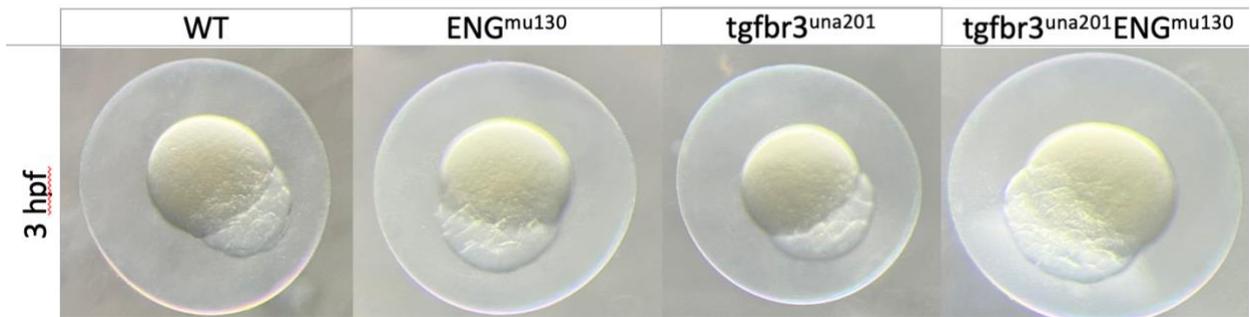
¿

Las observaciones iniciales en microscopio óptico con un objetivo 20x se realizaron durante las primeras 24 hpf, los 4 grupos genotípicos fueron observados y comparados en los primeros estados de desarrollo embrionario, lo que fue evaluado siguiendo la descripción de Kimmel, et al 1995, ya que se evaluaron los estados de cigoto (0 hrs-3/4 hpf), blástula (3 hpf), periodo de segmentación (24hpf), periodo de faríngrula (48hpf) y periodo de eclosión (72hpf), (figura 18). Al terminar de tomar las imágenes las larvas se separaban y etiquetaban, se les extraía el DNA y se procedía a genotipificar, así se tenía la seguridad del genotipo de cada larva.

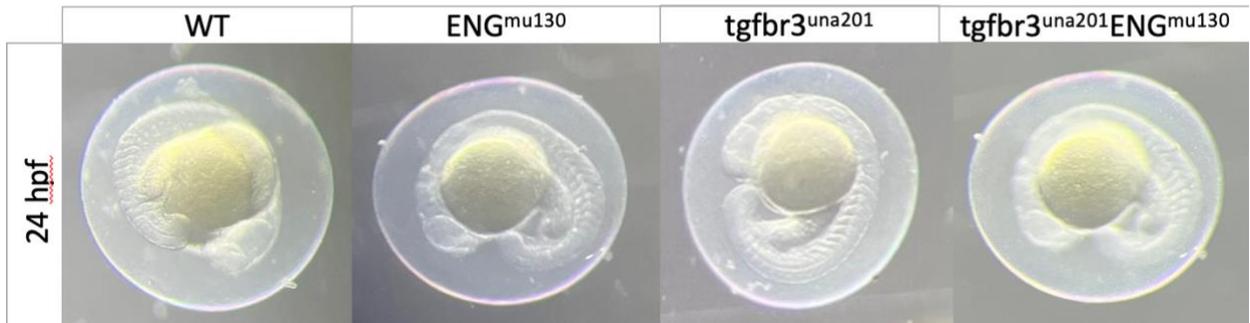
A



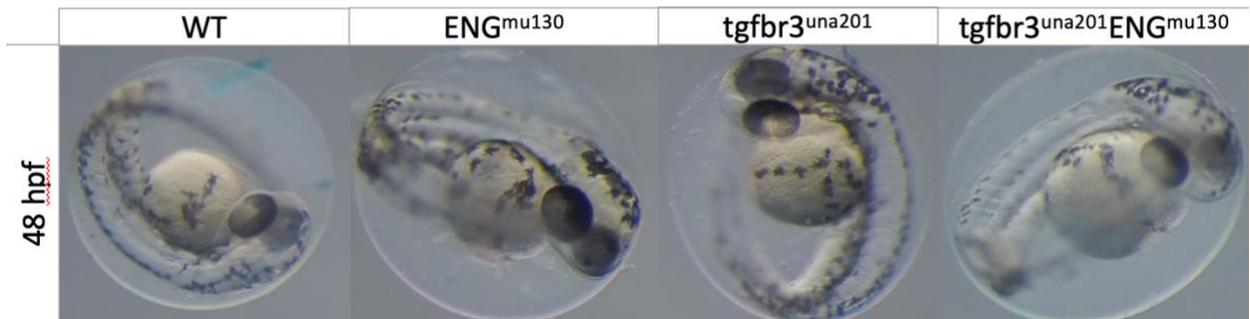
B



C



D



E

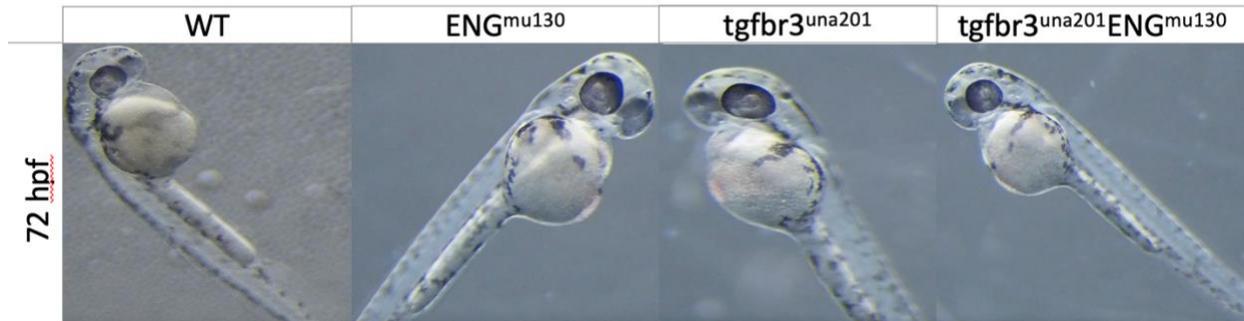


Figura 18. Imágenes de microscopio óptico con objetivo 10x de organismos WT, mutantes de ENG (ENG^{mu130}), mutantes de BG ($tgfbr3^{una201}$) y dobles mutantes ($tgfbr3^{una201} ENG^{mu130}$). A Cigoto 0.5 horas post fecundación (hpf). B Blástula 3 hpf. C Periodo de segmentación 24 hpf. D periodo faríngea 48 hpf. E Periodo de eclosión 72 hpf.

Los organismos mutantes de ENG (ENG^{mu130}), mutantes de BG ($tgfbr3^{una201}$) y dobles mutantes ($tgfbr3^{una201}ENG^{mu130}$) no presentaron defectos fenotípicos, tienen movimiento y un comportamiento general similar al organismo WT y todos los grupos observados tienen el tiempo de desarrollo reportado como normal para el pez cebra (Kimmel et al. 1995)

Frecuencia cardiaca

Como se demuestra en la tabla 3, la frecuencia cardiaca (latidos por minuto) de los embriones mutantes de ENG (ENG^{mu130}), mutantes de BG ($tgfbr3^{una201}$) y dobles mutantes ($ENG^{mu130}tgfbr3^{una201}$) a 24, 48 y 72 hpf no varía significativamente respecto al organismo WT y está dentro de los parámetros reportados para el pez cebra, (Bonifasius Putera Sampurna et al. 2018)

	24 HPF (LATIDO/MIN)	48 HPF (LATIDO/MIN)	72 HPF (LATIDO/MIN)
WT	75 ± 5	145 ± 11	162 ± 5
MUTANTES DE ENG	79 ± 8	139 ± 8	165 ± 12
MUTANTES DE BG	70 ± 6	150 ± 3	155 ± 9
DOBLES MUTANTE	85 ± 4	142 ± 8	171 ± 10

Tabla 3. Frecuencia cardiaca de los embriones WT, mutantes de ENG (ENG^{mu130}), mutantes de BG ($tgfbr3^{una201}$) y dobles mutantes ($tgfbr3^{una201}ENG^{mu130}$) a las 24, 48 y 72 hpf.

Talla de peces adultos

Los peces adultos de los 4 grupos genotípicos fueron observados en un microscopio óptico con un objetivo 5x y se midió su largo y ancho, al comparar los datos de cada grupo (Figura 19), se puede ver que no hay diferencias significativas en la talla de los peces, es decir los organismos dobles mutantes son del mismo tamaño que los organismos WT, ENG^{mu130} y $tgfbr3^{una201}$.



Promedio de talla de pez cebrá adulto (1 año post fecundación)

WT	tgfbr3 ^{una201}	ENG ^{mu130}	tgfbr3 ^{una201} ENG ^{mu130}
Largo 2.3cm Ancho 0.6cm	Largo 2.5cm Ancho 0.6cm	Largo +/- 2.6cm Ancho +/- 0.7cm	Largo +/- 2.0cm Ancho +/- 0.5cm

Figura 19. Medidas de un pez cebrá WT y tabla de promedios de talla, largo y ancho de peces adultos WT, mutantes de ENG (ENG^{mu130}), mutantes de BG (tgfbr3^{una201}) y dobles mutantes (tgfbr3^{una201}ENG^{mu130}).

Observaciones en un microscopio confocal

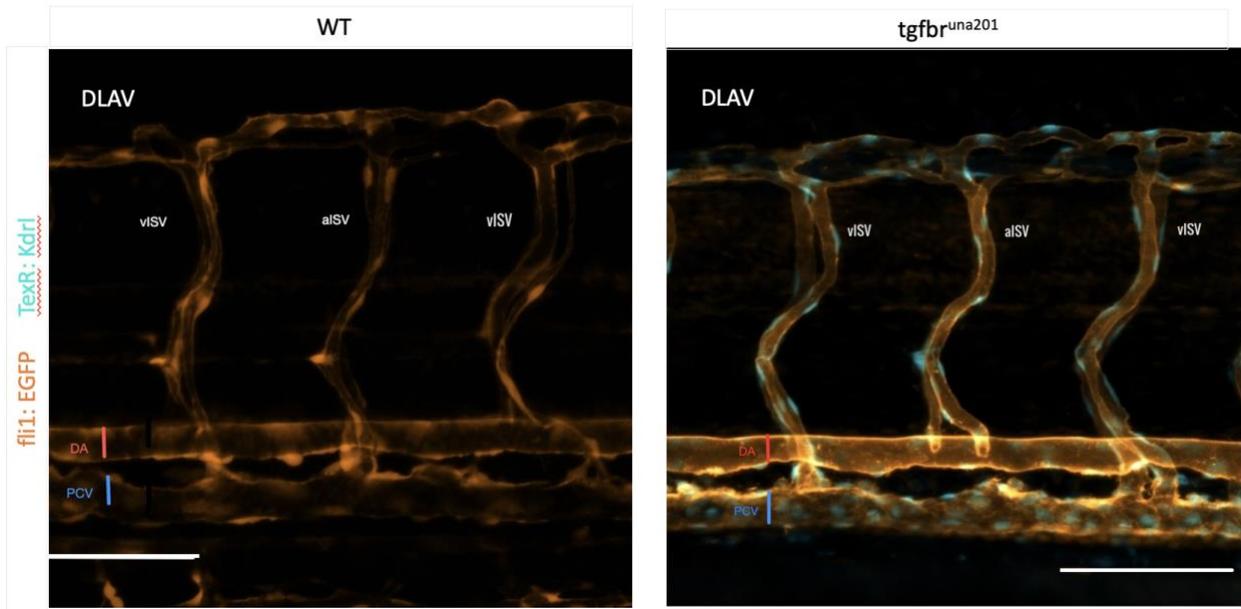
En las observaciones en un microscopio confocal, se buscó evaluar si los mutantes de ENG coinciden con lo reportado por Sugden, *et al*, quienes observaron que a las 72 hpf la mutación de ENG genera disminución en el diámetro de las arterias intersegmentales, además de un incremento en el diámetro de la aorta dorsal.

Se realizó la medición del diámetro de las venas ISV y de las arterias intersegmentales (aISV), la DA y la PCV de los organismos WT, mutantes de ENG (ENG^{mu130}), mutantes de BG (tgfbr3^{una201}) y dobles mutantes (tgfbr3^{una201} ENG^{mu130}) a 72 hpf (Figura 20a y 20b). Podemos ver en la Figura 20a que tal como está reportando en Sugden, *et al*, 2017, el organismo mutante de ENG tienen una disminución del diámetro de las aISV y de las vISV. Los organismos dobles mutantes también

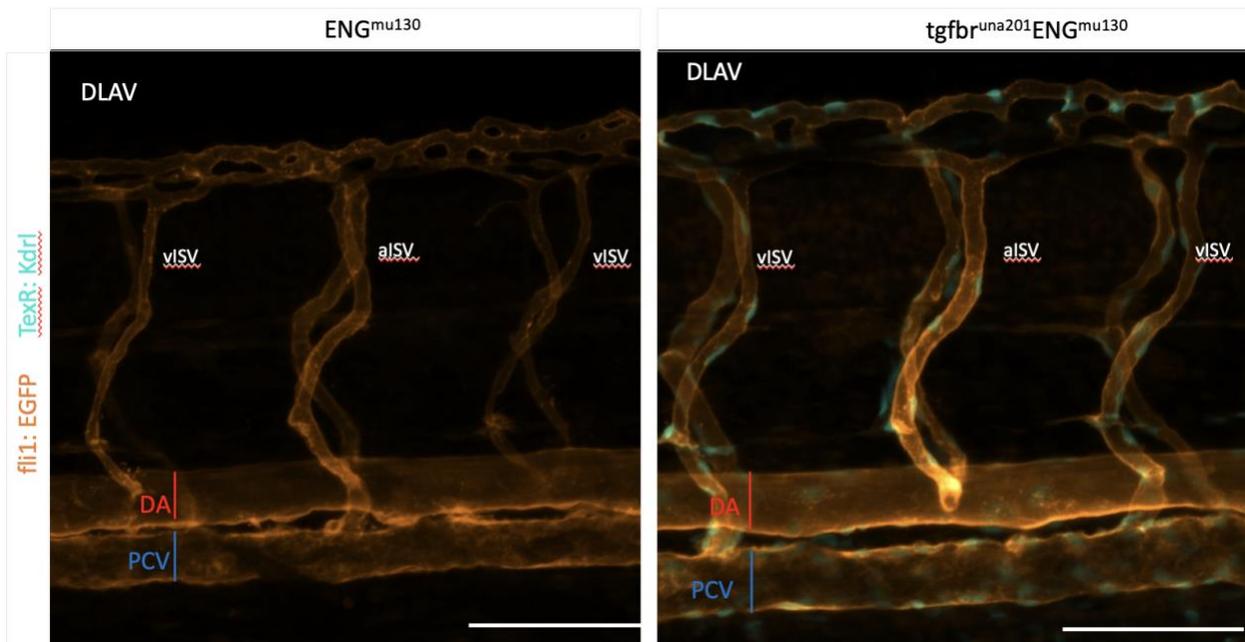
presentan disminución en las venas y las arterias intersegmentales (Figura 20b), mientras que los organismos mutantes de BG no presentan diferencias con respecto al control.

En el caso del diámetro de la DA y de la vena caudal posterior PCV se encuentra un aumento en el organismo mutante de ENG, tal como está reportado en Sugden, *et al*, 2017. Así mismo el organismo doble mutante también muestra incremento del diámetro de DS, pero no se observa para PCV. El mutante de BG no tiene diferencias con respecto al control (Figura 20b y 20c).

A



B



C

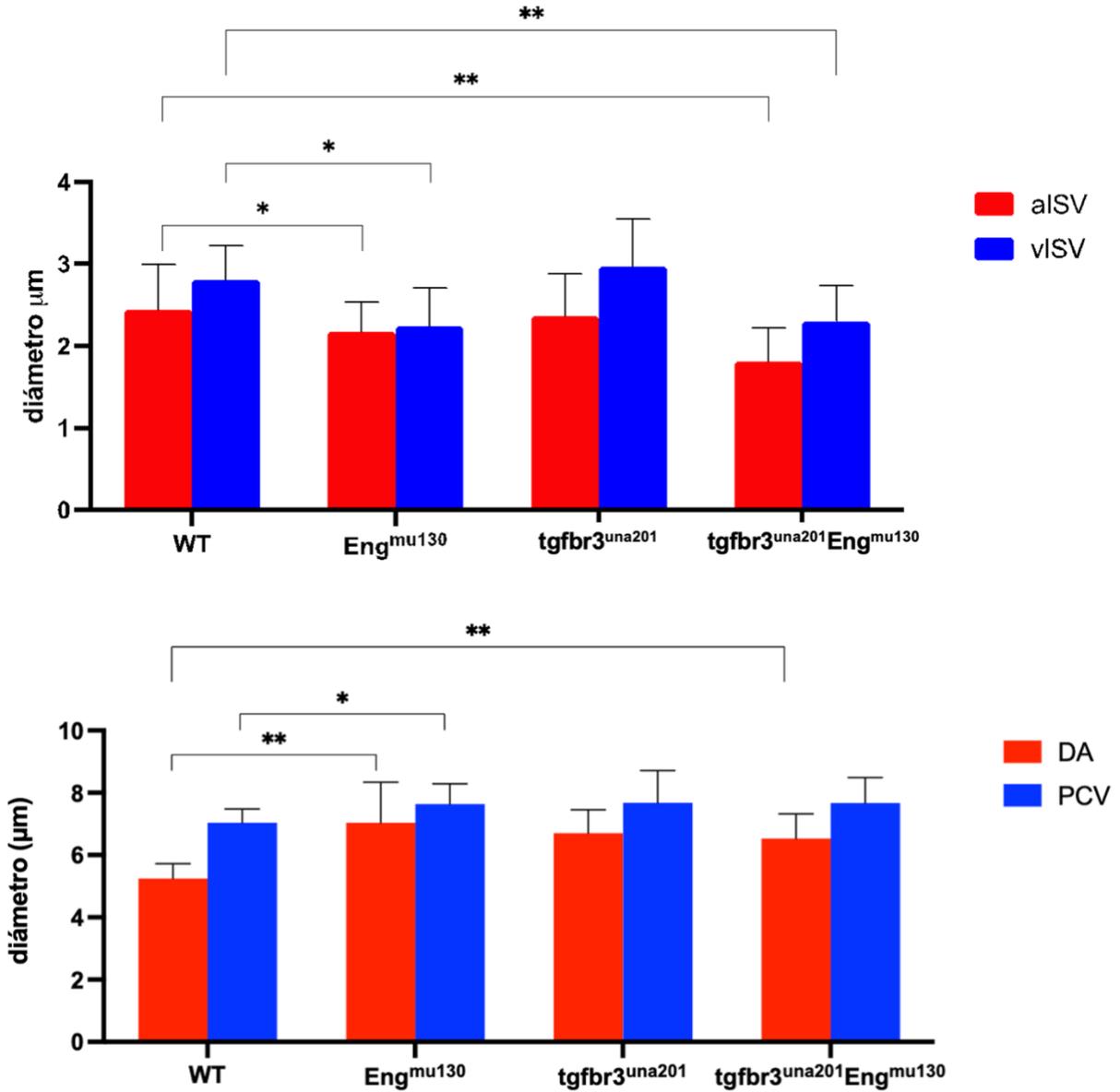


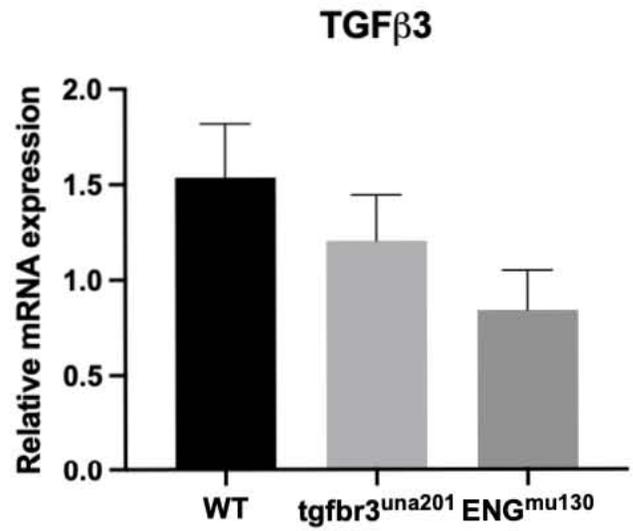
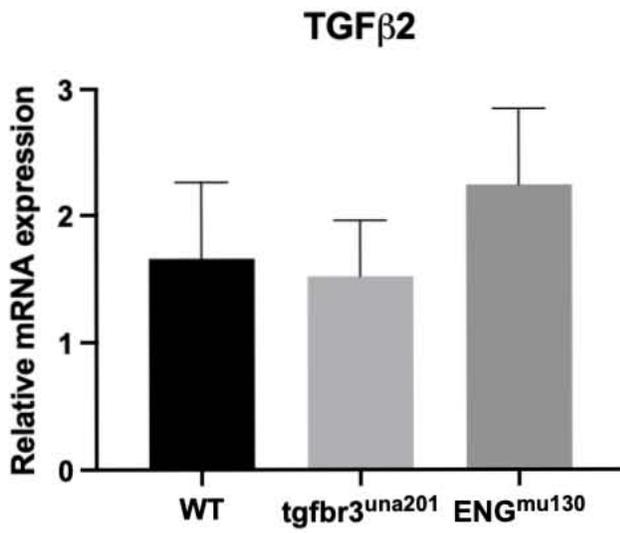
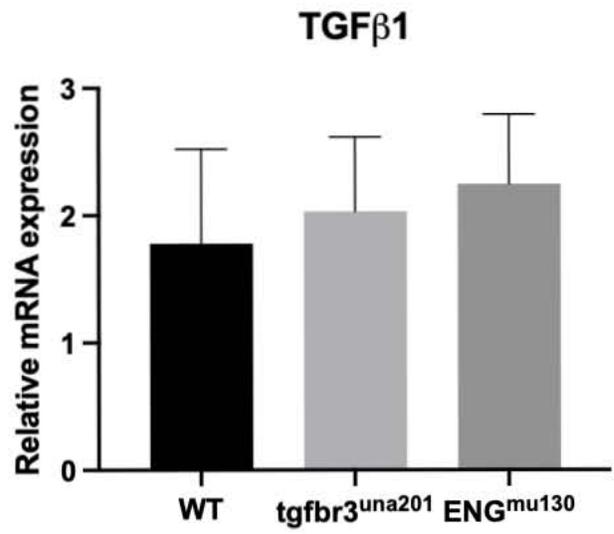
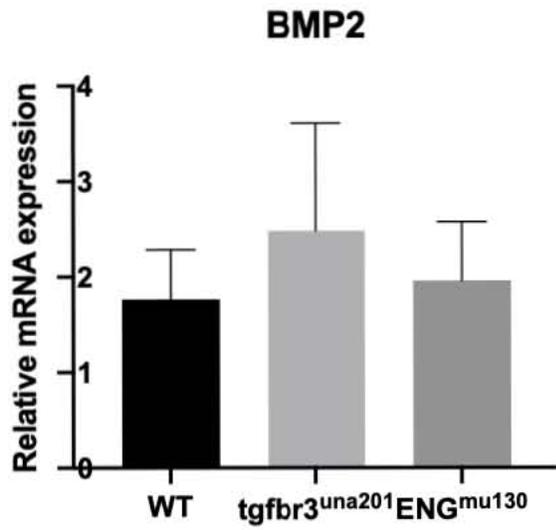
Figura 20. Imágenes obtenidas por microscopio confocal, de embriones de 78 hpf, sobre la somita 8, 9 y 10. **A.** Imagen obtenida de embrión 72hpf WT, mutante de BG ($tgfbr3^{una201}$), mutante de ENG (Eng^{mu130}) y doble mutante ($tgfbr3^{una201} Eng^{mu130}$), $tg(Kdr1:TexR) tg(fli1:EGFP)$. La barra de escala corresponde a $100\mu m$. **B.** Análisis estadístico del diámetro de vISV y diámetro de aISV. **C.** Análisis estadístico del diámetro de DA y diámetro de PCV, se realizó la prueba de ANOVA * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Expresión de componentes de la vía de TGF- β en mutantes nulos de BG y de ENG

El resultado de los qRT-PCRs indican que para los genes evaluados: TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, TG β R2b y BMP, no hay diferencias significativas en su expresión en el mutante de BG ni en el mutante de ENG respecto al control (Figura 21). Notablemente, la expresión de la isoforma TGFBR2a está significativamente disminuida en el mutante de BG (Figura 21), pero no en el mutante de ENG.

En el caso de la expresión del gen de BG (Figura 21) es notorio que en el mutantes de ENG (ENG^{mu130}) no está sobrepresado, para el mutante de BG (tgfbr3^{una201}) la disminución de expresión del gen no es significativa, tal como está reportado en la descripción del mutante.

La expresión del gen de ENG en el mutante de BG (tgfbr3^{un201}) no tiene cambios significativos con respecto al control (Figura 21), mientras que en el mutante de ENG (ENG^{mu130}) sí presenta una disminución drástica en su expresión, lo cual corresponde a lo reportado en la descripción de estas mutantes (Sugden, et al. 2017).



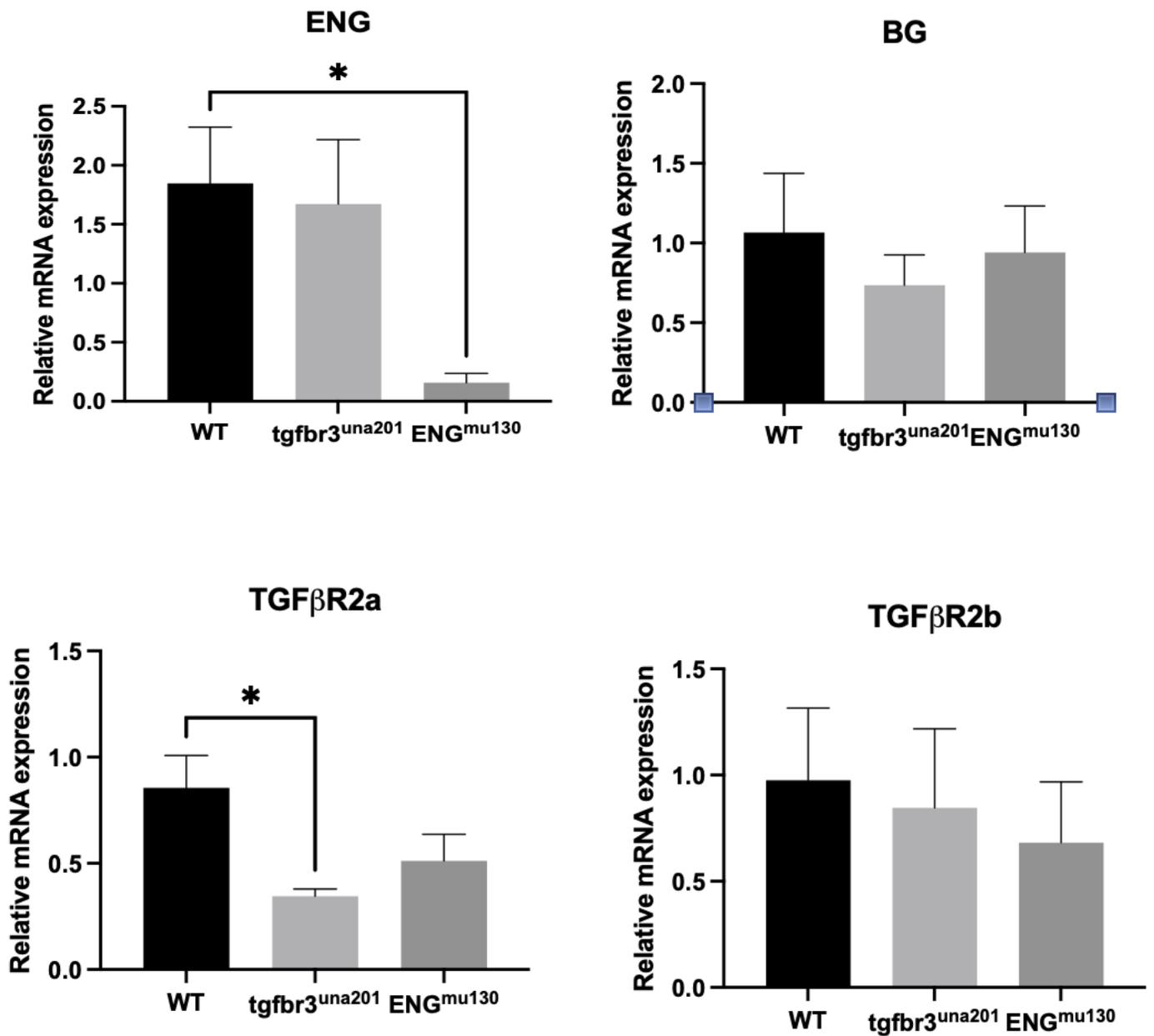


Figura 21. Cuantificación de expresión de los RNAm de componentes de la vía de TGF- β . El análisis estadístico se realizó por ANOVA de una vía, * $P < 0.05$.

Discusión

El pez cebra es un modelo ampliamente utilizado en el área de la biología del desarrollo, incluyendo estudios de las vías de señalización celular que participan en el desarrollo embrionario, como la vía del TGF- β . En ésta vía hay dos co-receptores que no han sido estudiados tan profundamente como otros componentes de la vía: el BG y la ENG; ambas son proteínas con alta similitud estructural (Kim, 2019) que se han relacionado con el desarrollo vascular (Sugden, et al. 2017; McAllister, et al. 1994; Kamaid et al. 2015) y que se expresan en el pez cebra, en etapas tempranas del desarrollo, además la ENG se detecta desde el cigoto (Zeng, et al. 2019;) y el BG a partir de las 8 hpf (Molina-Villa, 2015; Ramírez-Vidal, et al., 2023). Por lo que se hipotetizó que ante una mutación nula de BG por CRIPR-Cas podría existir un proceso de compensación genética que promoviera la transcripción del gen de ENG y así evitar defectos en la vasculogénesis y angiogénesis, como los observados en los peces *knock-down* de BG por morfolinós (Kamaid et al. 2015).

El abordaje para evaluar la posible compensación de la pérdida de BG por ENG fue obtener un organismo que tuviera ambas mutaciones, lo cual se logró con cruza entre peces cebra que tenían la mutación nula de BG y peces cebra con la mutación nula de ENG. Obtener organismos dobles mutantes a través de cruza es un proceso largo que permite conocer el comportamiento poblacional de cada grupo genotípico utilizado, donde los organismos WT fueron el control para comparar a los mutantes de ENG, los mutantes de BG y a los doble mutantes.

Se obtuvieron organismos dobles mutantes que llegan a la etapa de adultez y son fértiles, en las observaciones constantes con microscopio óptico desde la etapa de cigoto a estado larvario (1-72hpf) no se detectaron cambios morfológicos con respecto a los WT. Sin embargo, el seguimiento de la sobrevivencia de los embriones-larvas-peces adultos demuestra una disminución en la capacidad de sobrevivencia de los dobles mutantes, en comparación con los otros grupos. La mayor reducción del número de embriones-larvas de los dobles mutantes se da entre los días 1-15 dpf. Aunque los

mutantes de ENG y los mutantes de BG también tienen una reducción de su sobrevivencia respecto a los WT, pero los dobles mutantes tienen una caída más drástica y es la única población de peces que tiene diferencias estadísticas con respecto a la población WT. Es posible que en las cruzas $Ee \times Ee$ y $bbEe \times bbEe$ la diversidad de genotipos que existen en la población de embriones-larvas permite que la reducción de la población en los 36 dpf evaluados no sea tan drástica.

La cantidad de peces de cada cruce que llegaba a la adultez era genotipificado y se notó que las cruces de mutantes de BG y heterocigos de ENG ($bbEe \times bbEe$) no cumplían con las proporciones genotípicas mendelianas esperadas, la prueba de Chi-cuadrado de lo esperado contra lo obtenido demuestra que la cantidad de los peces dobles mutantes adultos obtenidos es significativamente menor a los esperados (Figura 17). Al comparar las proporciones genotípicas obtenidas de cruces $bbEe \times bbEe$ con cruces de heterocigo de ENG ($Ee \times Ee$) tenemos un resultado interesante, ya que los peces adultos obtenidos de estas cruces sí cumplen con las proporciones mendelianas esperadas (Figura 16); la única variable entre ambas cruces es la ausencia de BG.

El seguimiento del número de embriones/larvas contra los días post fecundación nos muestran un patrón similar para ambas cruces (Figura 14); es decir la población de organismos obtenidos en las cruces $bbEe \times bbEe$ y las cruces $Ee \times Ee$ se reduce a través del tiempo de manera similar y constante, no hay momentos de incremento de muerte drástica.

En las cruces $bbEe \times bbEe$ no solo tenemos menos dobles mutantes de lo esperado, también hay menos peces $bbEe$ de lo esperado, mientras que incrementa la proporción de peces $bbEE$ de lo esperado. Indicando que ante la pérdida de BG el detrimento parcial o total de ENG resulta en una disminución de la capacidad de sobrevivencia. La disminución de sobrevivencia indica que durante el seguimiento de una población día a día de embriones a larvas y a peces adultos, cuando la población se merma con el tiempo, principalmente se pierden los peces dobles mutantes. Si bien

los organismos dobles mutantes sobreviven hasta la adultez y son fértiles puede que exista alguna deficiencia en su proceso de desarrollo embrionario y en la etapa larvaria.

Las observaciones de embriones/larvas de los mutantes, dobles mutantes y WT en un microscopio óptico muestran que no hay diferencias fenotípicas evidentes en las etapas tempranas, Por otro lado, la disminución de la sobrevivencia en los dobles mutantes no se puede atribuir a algún cambio estructural o incluso de comportamiento, ya que especialmente en las larvas, estas tuvieron un comportamiento similar en sus patrones de nado y alimentación. Las larvas nadan cerca de la superficie y en línea recta, en algunos casos hay larvas que nadan en círculos pequeños, usualmente esas larvas no sobrevivían por mucho tiempo, sin embargo ese patrón de comportamiento se pueden observar en todos los grupos evaluados (incluyendo WT), en cuanto a su alimentación, todos los grupos se alimentan con un alimento especial para larvas según su edad y a los 10dpf se alimentan con artemia (alimento para peces adultos), aunque en su mayoría las larvas inician el consumo de la artemia como alimento hasta los 15-20 dpf.

Es importante mencionar que durante el cuidado de las larvas, en el caso de las cruza de dobles mutantes era necesario cambiar diario el agua en la que habitaban, ya que en el caso de que se mantuvieran en la misma agua con alimento por más de 1 día se incrementaba la muerte en los días siguientes, eso no ocurrió con los embriones/larvas de las cruza WT y de las cruza de los mutantes, indicando que los dobles mutantes necesitan un ambiente más limpio.

Cuando los peces llegan a adultos se midió la talla tomando en cuenta el tamaño de largo y ancho, y no se encontraron diferencias significativas en la talla de los peces WT y mutantes de BG, ENG o dobles mutantes (figura 19), todos los grupos están en el mismo rango, de largo 2-3cm y de ancho 0.5-1cm.

Continuando con otras evaluaciones de posibles defectos en los organismos dobles mutantes, se consideró evaluar la frecuencia cardiaca en las etapas tempranas

de desarrollo: 24 hpf, 48 hpf y 72 hpf. Los embriones de cruza WT, cruza mutantes de BG, mutantes de ENG y los dobles mutantes, tienen la misma frecuencia cardiaca (latidos/min) que los WT en todos los tiempos evaluados. Indicando que el funcionamiento general del corazón no se ve afectado por la pérdida de BG, ENG o ambos.

Considerando lo reportado por Sugden, et al. 2017, la descripción de mutantes de ENG (eng^{mu130}) señala una reducción del diámetro de los ISV y un engrosamiento de la DA y de la PCV, por lo que era necesario repetir esas mediciones con el organismo doble mutante. Por lo que se hicieron tomas en un microscopio confocal de embriones con 72 hpf tanto WT, mutantes de ENG, mutantes de BG y dobles mutantes. Los análisis estadísticos muestran que los dobles mutantes mantienen el fenotipo reportado en los Eng^{mu130} (Figura 20), mientras que los mutantes de BG no presenta cambios respecto al control (los embriones WT).

El hecho de que el fenotipo de los mutantes de ENG se conserva en los dobles mutantes confirma que se debe únicamente a la pérdida de ENG. El BG no participa en el proceso que está provocando estos cambios vasculares y no hay indicios de que el BG y la ENG interactúen en estos procesos, ya sea a nivel proteína o a nivel genético, por lo tanto en el desarrollo vascular (angiogénesis y vasculogénesis) la hipótesis de una compensación genética entre BG y ENG se vuelve poco viable, pero considerando la disminución de la sobrevivencia de los dobles mutantes, es posible que el BG y la ENG interactúen en otros procesos del desarrollo.

Como co-receptores de la vía del TGF- β era importante conocer la expresión de sus principales factores, considerando la pérdida de BG y/o de ENG podría inducir cambios en la expresión de sus ligandos o del receptor con el que forman el complejo señalizador (TGF β 2a y TGF β 2b); sin embargo. vemos que para los mutantes de BG y ENG no hay diferencias significativas con respecto a los WT en la expresión de TGF β 1, TGF β 2 TGF β 3 y BMP2. El receptor TGF β R2a está significativamente disminuido en los mutante de BG.

Utilizando la herramienta del *Expression Atlas* podemos ver el nivel de expresión de genes que tengan registrados, utilizando el valor de transcritos por millón (TPM) para medir la expresión de genes, que en el caso del pez cebra se tienen registrados a todos los genes que participan en la vía del TGF- β . El receptor TGF β R2a se empieza a expresar desde la etapa de faríngrula (72 hpf), mientras que el receptor TGF β R2b se detecta desde la etapa cigoto; sin embargo, es hasta los 5dpf que el TGF β R2a alcanza un nivel de expresión de 3 TPM (transcritos por millón) comparándolo con los 31 TPM del TGF β R2b (EMBL-EBI, 2024), denotando que durante el desarrollo temprano el receptor TGF β R2a tiene poca presencia y en los mutantes de BG está aún más aminorado. Esta pérdida puede estar relacionada con la disminución de sobrevivencia con respecto a los peces WT o incluso estar involucrado en el retraso de mineralización de la corda central reportada en los mutantes de BG (Molina-Villa et al. 2021).

En los resultados de qRT-PCR de BG y ENG vemos que el mutante de BG no muestra una disminución del mRNA de BG, eso ya estaba reportado en la descripción del mutante donde se demuestra que el mutante *tgfbr3^{una201}* no tiene la proteína de BG aunque si haya mRNA (Molina-Villa et al. 2021). La compensación genética por el mecanismo de adaptación transcripcional requiere de la degradación del mRNA mutante por el sistema NMD, para inducir la transcripción del gen compensatorio (El-Brolosy y Stainier 2017), que en este caso sería la ENG. Por lo tanto, en el mutante de BG (*tgfbr3^{una201}*) no podría haber compensación genética por el mecanismo de adaptación transcripcional, pero eso no descarta que el mutante de BG pueda tener otros mecanismos de compensación genética, se han propuesto mecanismos en donde el mRNA mutante y proteínas de unión a mRNA inducen remodelación de la cromatina o estabilización de mRNA de genes homólogos al gen mutado, promoviendo la expresión de una proteína compensatoria. Sin embargo el fenotipo del organismo doble mutante no muestra indicaciones de que algún proceso de compensación genética esté ocurriendo.

Finalmente, considerando las observaciones en los organismos dobles mutantes, especialmente en los vasos intersegmentales y la aorta dorsal, se deduce que es poco probable que la ENG pueda compensar la pérdida de BG. También se descarta que el BG pueda compensar la pérdida de ENG, los cambios en estructuras reportados en el mutante de ENG (Sugden, et al. 2017) se conservan en el doble mutante. Sin embargo, los peces dobles mutantes pueden ser un modelo vivo para estudiar a la vía de TGF- β en ausencia de sus co-receptores.

Conclusión

Las evidencias señalan que la ENG no participa en un proceso de compensación genética ante la mutación nula de BG en el pez cebra (*Danio rerio*). Sin embargo, podemos observar que ante la ausencia de ambas proteínas, BG y ENG aumenta la mortandad en las larvas entre 10-20 días post fecundación. Ésta disminución en la sobrevivencia no se puede adjudicar a un problema en específico durante el desarrollo y puede ser motivo de otro estudio.

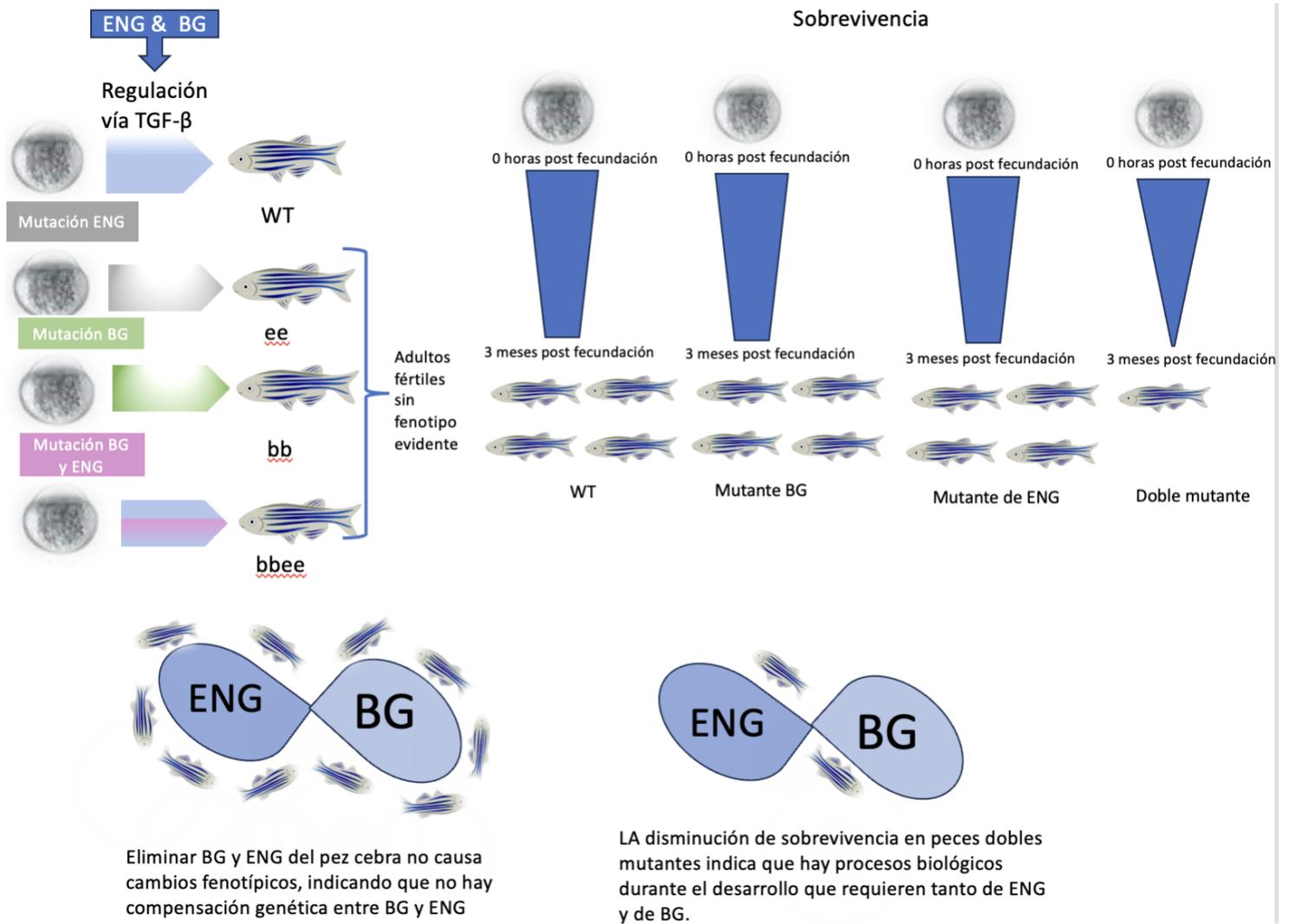


Figura 22. Modelo que representa los resultados y las conclusiones.

Perspectivas

Si bien los datos obtenidos durante el desarrollo de este proyecto indican que la hipótesis planteada no se cumple, las observaciones de la disminución en la sobrevivencia de peces dobles mutantes nos plantea nuevas perspectivas de investigación para el futuro, ya que los peces dobles mutantes nos permiten tener organismos modelo que no expresan a los dos co-receptores de la vía de TGF- β (ENG y BG), por lo tanto hay un amplio margen de procesos biológicos que podemos evaluar, incluyendo a otros factores que intervienen en la vía del TGF- β que no se estudiaron en este trabajo, como las activinas y los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), entre otros. También nos permitirá evaluar otros procesos en los que participa la vía del TGF- β , como el desarrollo de vasos linfáticos.

Referencias

- Altman, Amnon. 2002. *Signal Transduction Pathways in Autoimmunity*. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Bernabeu, Carmelo, Jose M. Lopez-Novoa, y Miguel Quintanilla. 2009. “The Emerging Role of TGF- β Superfamily Coreceptors in Cancer”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1792(10):954–73. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.07.003.
- Betz C, Lenard A, Belting HG, Affolter M. Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development*. 2016 Jul 1;143(13):2249–60. doi: 10.1242/dev.
- Bonifasius Putera Sampurna, Audira, Gilbert, Juniardi Stevhen, Lai, Yu-Heng, y Hsiao, Chung-Der. s/f. “A simple ImageJ-Based MMethod to Measure Cardiac Rhythm in zebrafish Embryos”. 2(21):11. doi: <https://doi.org/10.3390/inventions3020021>.
- Bilandzic M, Stenvers KL. 2011. “Betaglycan: a multifunctional accessory”. *Mol Cell Endocrinol*. 6;339(1-2):180-9. doi: 10.1016/j.mce.2011.04.014
- Ciarmela, P., P. Florio, P. Toti, D. Grasso, R. Santopietro, P. Tosi, y F. Petraglia. 2003. “Expression of Betaglycan in Pregnant TIssues throughout Gestation”. *European Journal of Endocrinology* 433–37. doi: 10.1530/eje.0.1490433.
- Dijke, Peter ten, y Caroline S. Hill. 2004. “New Insights into TGF- β –Smad Signalling”. *Trends in Biochemical Sciences* 29(5):265–73. doi: 10.1016/j.tibs.2004.03.008.
- Duff, Sarah E., Chenggang Li, John M. Garland, y Shant Kumar. 2003. “CD105 Is Important for Angiogenesis: Evidence and Potential Applications”. *The FASEB Journal* 17(9):984–92. doi: 10.1096/fj.02-0634rev.
- El-Brolosy, Mohamed A., Zacharias Kontarakis, Andrea Rossi, Carsten Kuenne, Stefan Günther, Nana Fukuda, Khrievono Kikhi, Giulia L. M. Boezio, Carter M. Takacs, Shih-Lei Lai, Ryuichi Fukuda, Claudia Gerri, Antonio J. Giraldez, y Didier Y. R. Stainier. 2019. “Genetic Compensation Triggered by Mutant mRNA Degradation”. *Nature* 568(7751):193–97. doi: 10.1038/s41586-019-1064-z.
- El-Brolosy, Mohamed A., y Didier Y. R. Stainier. 2017. “Genetic Compensation: A Phenomenon in Search of Mechanisms” editado por C. Moens. *PLOS Genetics* 13(7):e1006780. doi: 10.1371/journal.pgen.1006780.
- Esparza-Lopez J, Montiel JL, Vilchis-Landeros MM, Okadome T, Miyazono K, López-Casillas F. 1994. “Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A”. *J Biol Chem*. 4;276(18):14588-96. doi: 10.1074/jbc

- Heldin CH, Moustakas A. 2016. “Signaling Receptors for TGF- β Family Members”. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 8(8):a022053. doi: 10.1101/cshperspect.a022053.
- Galaris, Georgios, Kévin Montagne, Jérémy H. Thalgott, Geoffroy J. P. E. Goujon, Sander van den Driesche, Sabrina Martin, Hans-Jurgen J. Mager, Christine L. Mummery, Ton J. Rabelink, y Franck Lebrin. 2021. “Thresholds of Endoglin Expression in Endothelial Cells Explains Vascular Etiology in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 1”. *International Journal of Molecular Sciences* 22(16):8948. doi: 10.3390/ijms22168948.
- Gallardo-Vara, Ruiz-Llorente, Casado-Vela, Ruiz-Rodríguez, López-Andrés, Pattnaik, Quintanilla, y Bernabeu. 2019. “Endoglin Protein Interactome Profiling Identifies TRIM21 and Galectin-3 as New Binding Partners”. *Cells* 8(9):1082. doi: 10.3390/cells8091082.
- Gálvez-Gastélum, Francisco Javier, Ana Soledad Sandoval-Rodríguez, y Juan Armendáriz-Borunda. 2004. “El factor de crecimiento transformante β como blanco terapéutico”. *salud pública de méxico* 10.
- García-Pozo, L., M. E. Miquilena-Colina, T. Lozano-Rodríguez, y C. García-Monzón. 2008. “ENG: estructura, funciones biológicas y papel en la fibrogénesis”. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 100(6). doi: 10.4321/S1130-01082008000600008.
- Gore AV, Monzo K, Cha YR, Pan W, Weinstein BM. Vascular development in the zebrafish. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 May;2(5):a006684. doi: 10.1101/cshperspect.a006684.
- Gougos, A., y M. Letarte. 1990. “Primary Structure of Endoglin, an RGD-Containing Glycoprotein of Human Endothelial Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 265(15):8361–64. doi: 10.1016/S0021-9258(19)38892-1.
- Goumans, Marie-Jose, Franck Lebrin, y Gudrun Valdimarsdottir. 2003. “Controlling the Angiogenic Switch”. 13(7):7.
- Goumans, Marie-José, Zhen Liu, y Peter ten Dijke. 2009. “TGF- β Signaling in Vascular Biology and Dysfunction”. *Cell Research* 19(1):116–27. doi: 10.1038/cr.2008.326.
- Jonker L. TGF- β & BMP receptors endoglin and ALK1: overview of their functional role and status as antiangiogenic targets. *Microcirculation* 21: 93–103, 2014.
- Kamaid, Andrés, Tonatiuh Molina-Villa, Valentín Mendoza, Cristina Pujades, Ernesto Maldonado, Juan Carlos Ispizua Belmonte, y Fernando López-Casillas. 2015. “Betaglycan Knock-down Causes Embryonic Angiogenesis Defects in Zebrafish: Betaglycan in Zebrafish Embryonic Angiogenesis”. *Genesis* 53(9):583–603. doi: 10.1002/dvg.22876.
- Kim, Sun Kyung, Morkos A. Henen, y Andrew P. Hinck. 2019. “Structural Biology of Betaglycan and Endoglin, Membrane-Bound Co-Receptors of the TGF-Beta Family”. *Experimental Biology and Medicine* 244(17):1547–58. doi: 10.1177/1535370219881160.

- Kim, Sun Kyung, Matthew J. Whitley, Troy C. Krzysiak, Cynthia S. Hinck, Alexander B. Taylor, Christian Zwieb, Chang-Hyeock Byeon, Xiaohong Zhou, Valentín Mendoza, Fernando López-Casillas, William Furey, y Andrew P. Hinck. 2019. “Structural Adaptation in Its Orphan Domain Engenders Betaglycan with an Alternate Mode of Growth Factor Binding Relative to Endoglin”. *Structure* 27(9):1427-1442.e4. doi: 10.1016/j.str.2019.06.010.
- Kimmel, Charles B., William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, y Thomas F. Schilling. 1995. “Stages of Embryonic Development of the Zebrafish”. *Developmental Dynamics* 203(3):253–310. doi: 10.1002/aja.1002030302.
- Kok, Fatma O., Masahiro Shin, Chih-Wen Ni, Ankit Gupta, Ann S. Grosse, Andreas van Impel, Bettina C. Kirchmaier, Josi Peterson-Maduro, George Kourkoulis, Ira Male, Dana F. DeSantis, Sarah Sheppard-Tindell, Lwaki Ebarasi, Christer Betsholtz, Stefan Schulte-Merker, Scot A. Wolfe, y Nathan D. Lawson. 2015. “Reverse Genetic Screening Reveals Poor Correlation between Morpholino-Induced and Mutant Phenotypes in Zebrafish”. *Developmental Cell* 32(1):97–108. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.018.
- Kontarakis, Zacharias, y Didier Y. R. Stainier. 2020. “Genetics in Light of Transcriptional Adaptation”. *Trends in Genetics* 36(12):926–35. doi: 10.1016/j.tig.2020.08.008.
- Lawson ND, Weinstein BM. 2002. “In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish”. *Dev Biol.* 248(2):307-18. doi: 10.1006/dbio.
- Li, Dean Y., Lise K. Sorensen, Benjamin S. Brooke, Lisa D. Urness, Elaine C. Davis, Douglas G. Taylor, Beth B. Boak, y Daniel P. Wendel. 1999. “Defective Angiogenesis in Mice Lacking Endoglin”. *Science* 284(5419):1534–37. doi: 10.1126/science.284.5419.1534.
- Lidia Ruiz-Llorente, Eunáte Gallardo-Vara, Elisa Rossi, David M. Smadja, Luisa M. Botella & Carmelo Bernabeu. 2017. “Endoglin and alk1 as therapeutic targets for hereditary hemorrhagic telangiectasia”. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21:10, 933-947, DOI: [10.1080/14728222.2017.1365839](https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1365839)
- Lopez-Casillas, Fernando, Jeffrey L. Wrana, y Joan Massague. 1993. “Betaglycan Presents Ligand to the TGFP Signaling Receptor”. 10.
- López-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massagué J. 1994 “Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites”. *J Cell Biol.* 124(4):557-68. doi: 10.1083/jcb.
- Lykke-Andersen, Søren, y Torben Heick Jensen. 2015. “Nonsense-Mediated mRNA Decay: An Intricate Machinery That Shapes Transcriptomes”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16(11):665–77. doi: 10.1038/nrm4063.
- Margioulas-Siarkou G, Margioulas-Siarkou C, Petousis S, Margaritis K, Vavoulidis E, Gullo G, Alexandratou M, Dinas K, Sotiriadis A, Mavromatidis G. 2022. “The role of endoglin and its soluble form in pathogenesis of preeclampsia”. *Mol Cell Biochem.* 477(2):479-491. doi: 10.1007/s11010-021-04294-z.

- McAllister, K., Grogg, K., Johnson, D. *et al.* Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* **8**, 345–351 (1994). <https://doi.org/10.1038/ng1294-345>
- Molina-Villa, T. (2015). *Detección del receptor tipo III de TGF- β en embriones de pez cebra (Danio rerio)*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Molina-Villa, Tonatiuh, Lizbeth Ramírez-Vidal, Valentín Mendoza, Diana Escalante-Alcalde, y Fernando López-Casillas. 2021. “Chordacentrum Mineralization Is Delayed in Zebrafish Betaglycan-null Mutants”. *Developmental Dynamics* dvdy.393. doi: 10.1002/dvdy.393.
- Okuda KS, Hogan BM. Endothelial Cell Dynamics in Vascular Development: Insights From Live-Imaging in Zebrafish. *Front Physiol.* 2020 Jul 22;11:842. doi: 10.3389/fphys.2020.00842.
- Pece-Barbara, Nadia, Sonia Vera, Kirishanthy Kathirkamathamby, Stefan Liebner, Gianni M. Di Guglielmo, Elisabetta Dejana, Jeffrey L. Wrana, y Michelle Letarte. 2005. “Endoglin Null Endothelial Cells Proliferate Faster and Are More Responsive to Transforming Growth Factor B1 with Higher Affinity Receptors and an Activated Alk1 Pathway”. *Journal of Biological Chemistry* 280(30):27800–808. doi: 10.1074/jbc.M503471200.
- Rossi, Andrea, Zacharias Kontarakis, Claudia Gerri, Hendrik Nolte, Soraya Hölper, Marcus Krüger, y Didier Y. R. Stainier. 2015. “Genetic Compensation Induced by Deleterious Mutations but Not Gene Knockdowns”. *Nature* 524(7564):230–33. doi: 10.1038/nature14580.
- Ramírez-Vidal L, Molina-Villa T, Mendoza V, et al. 2023 “Betaglycan promoter activity is differentially regulated during myogenesis in zebrafish embryo somites”. *Developmental Dynamics*. 252(9): 1162-1179. doi:[10.1002/dvdy.602](https://doi.org/10.1002/dvdy.602)
- Schuermann, Annika, Christian S. M. Helker, y Wiebke Herzog. 2015. “Metallothionein 2 Regulates Endothelial Cell Migration through Transcriptional Regulation of Vegfc Expression”. *Angiogenesis* 18(4):463–75. doi: 10.1007/s10456-015-9473-6.
- Stainier, Didier Y. R., Zacharias Kontarakis, y Andrea Rossi. 2015. “Making Sense of Anti-Sense Data”. *Developmental Cell* 32(1):7–8. doi: 10.1016/j.devcel.2014.12.012.
- Stenvers, Kaye L., Melinda L. Tursky, Kenneth W. Harder, Nicole Kountouri, Supavadee Amatayakul-Chantler, Dianne Grail, Clayton Small, Robert A. Weinberg, Andrew M. Sizeland, y Hong-Jian Zhu. 2003. “Heart and Liver Defects and Reduced Transforming Growth Factor β 2 Sensitivity in Transforming Growth Factor β Type III Receptor-Deficient Embryos”. *Molecular and Cellular Biology* 23(12):4371–85. doi: 10.1128/MCB.23.12.4371-4385.2003.
- Sugden WW, Meissner R, Aegerter-Wilmsen T, Tsaryk R, Leonard EV, Bussmann J, Hamm MJ, Herzog W, Jin Y, Jakobsson L, Denz C, Siekmann AF. 2017 “Endoglin controls blood vessel diameter through endothelial cell shape changes in response to haemodynamic cues”. *Nat Cell Biol.* 2017 19(6):653-665. doi: 10.1038/ncb3528.

- Sztaf, Tamar E., y Didier Y. R. Stainier. 2020. “Transcriptional Adaptation: A Mechanism Underlying Genetic Robustness”. *Development* 147(15):dev186452. doi: 10.1242/dev.186452.
- Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza-Hernández G, López-Casillas F. 2001. “Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent”. *Biochem J.* 355(Pt 1):215-22. doi: 10.1042/0264-6021
- Walton, Kelly L., y Craig A. Harrison. 2019. “Inhibin: To Betaglycan, or Not to Betaglycan”. *Endocrinology* 160(2):341–42. doi: 10.1210/en.2018-01049.
- Wong, S. H., L. Hamel, S. Chevalier, y A. Philip. 2000. “Endoglin Expression on Human Microvascular Endothelial Cells”. *European Journal of Biochemistry* 267(17):5550–60. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01621.x.
- Wrana, J. L. 2013. “Signaling by the TGF Superfamily”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(10):a011197–a011197. doi: 10.1101/cshperspect.a011197.
- Yamashita, H., H. Ichijo, S. Grimsby, A. Morén, P. ten Dijke, y K. Miyazono. 1994. “Endoglin Forms a Heteromeric Complex with the Signaling Receptors for Transforming Growth Factor-Beta.” *Journal of Biological Chemistry* 269(3):1995–2001. doi: 10.1016/S0021-9258(17)42126-0.
- The Zebrafish Information Network (ZFIN), 2024. <https://zfin.org/>.