

# Método computacional para el análisis fenotípico de embriones modificados por el sistema CRISPR

Jorge Mañes<sup>1</sup>, Miquel Sendra<sup>2</sup>, Morena Raiola<sup>2</sup>, Jorge N. Domínguez<sup>3</sup>, Miguel Torres<sup>2</sup> & Óscar Ocaña<sup>2,4</sup>

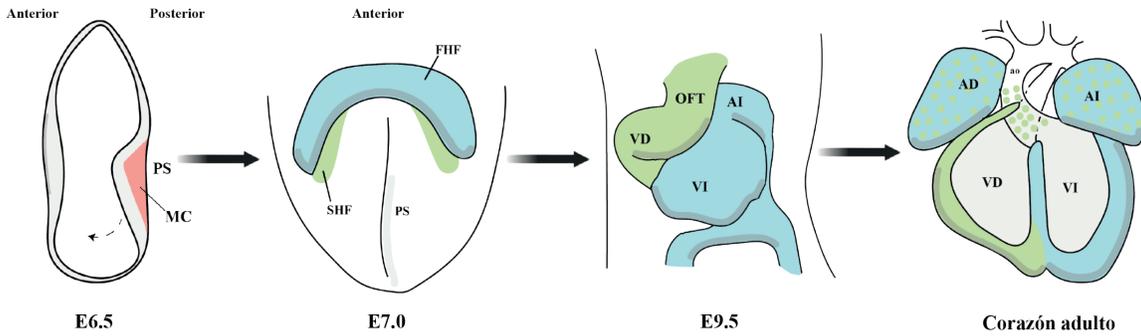
<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Cantoblanco; email: jorge.mannes@estudiante.uam.es

<sup>2</sup>Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Departamento de Biología Celular, Madrid, España.

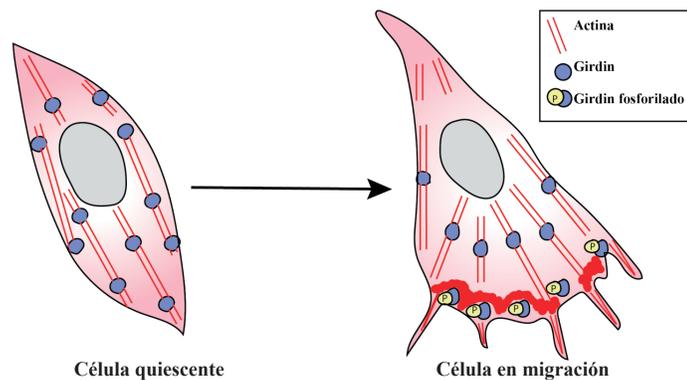
<sup>3</sup>Universidad de Jaén, las Lagunillas, Jaén, España.

<sup>4</sup>Director del TFG; email: ohocana@cnic.es

## INTRODUCCIÓN



**Figura 1. Esquematación del proceso de cardiogénesis en ratón.** En torno al día de desarrollo 6,5 (E 6.5), los precursores situados en el mesodermo cardiaco (MC) comienzan su ingreso por la línea primitiva (primitive streak, PS). Aproximadamente 12 horas después (E7.0), se puede observar los precursores del primer campo cardiogénico (first heart field, FHF) situados en una forma de medialuna en la parte anterior del embrión. El segundo campo cardiogénico (second heart field, SHF) se sitúa contiguo y medial al FHF. Los precursores del SHF comienzan su ingreso al tubo cardiaco, favoreciendo su alargamiento. A estadio E9.5, el corazón comienza el proceso de “looping” cardiaco que dará lugar a la conformación del corazón maduro. En azul y verde están representadas las estructuras del corazón procedentes del FHF y SHF, respectivamente. El ventrículo izquierdo (VI) deriva del FHF, mientras que el ventrículo derecho (VD) deriva del SHF. La aurícula derecha (AD) y aurícula izquierda (AI) se forman a partir del SHF y FHF.

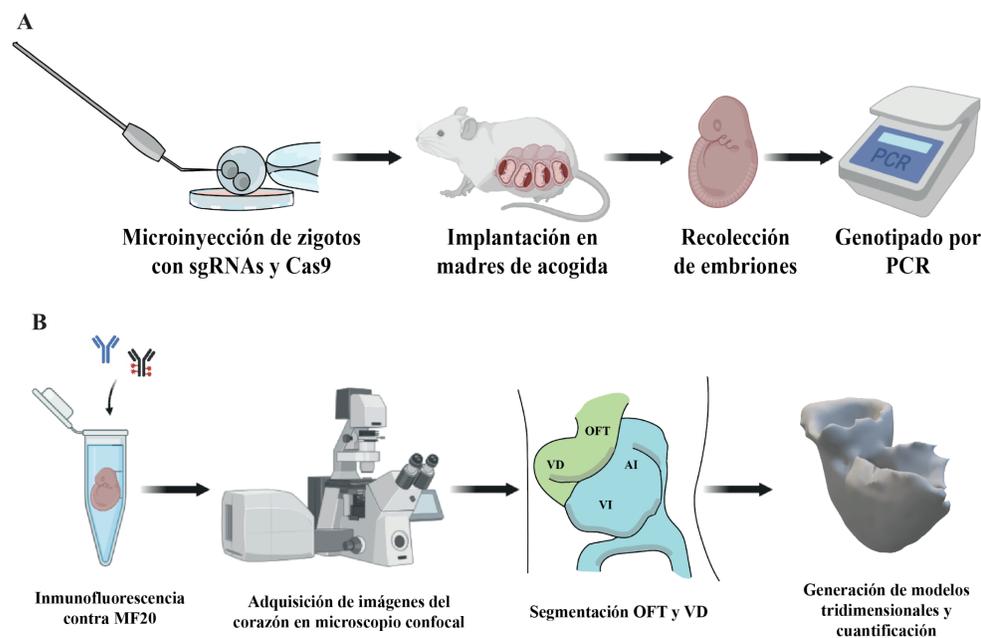


**Figura 2. Papel de Girdin en la migración celular.** Girdin une los filamentos de actina tanto en células quiescentes como en células en migración. En estas últimas, la proteína de Girdin fosforilada se sitúa en las protuberancias que son emitidas durante la migración celular, permitiendo el avance. Este esquema representa el modelo hipotético, por el cual puede actuar Girdin en el segundo campo cardiogénico.

El corazón es el primer órgano en formarse durante el desarrollo embrionario en vertebrados. En ratón, cerca del día embrionario (E) 6.5, los progenitores situados en el mesodermo cardiaco ingresan por la línea primitiva y conforman un órgano contractil primitivo llamado cresta cardiaca<sup>1</sup> (Fig. 1). La cresta cardiaca sufre un intenso proceso de morfogénesis, durante el cual, otra población de progenitores cardiacos, denominada segundo campo cardiogénico (second heart field, SHF), participa en el alargamiento del corazón en desarrollo<sup>1,2</sup>. Los progenitores del SHF se diferencian y migran al tubo cardiaco, dando lugar al tracto de salida (outflow tract, OFT), ventrículo derecho (VD) y parte de las aurículas<sup>1,3</sup>.

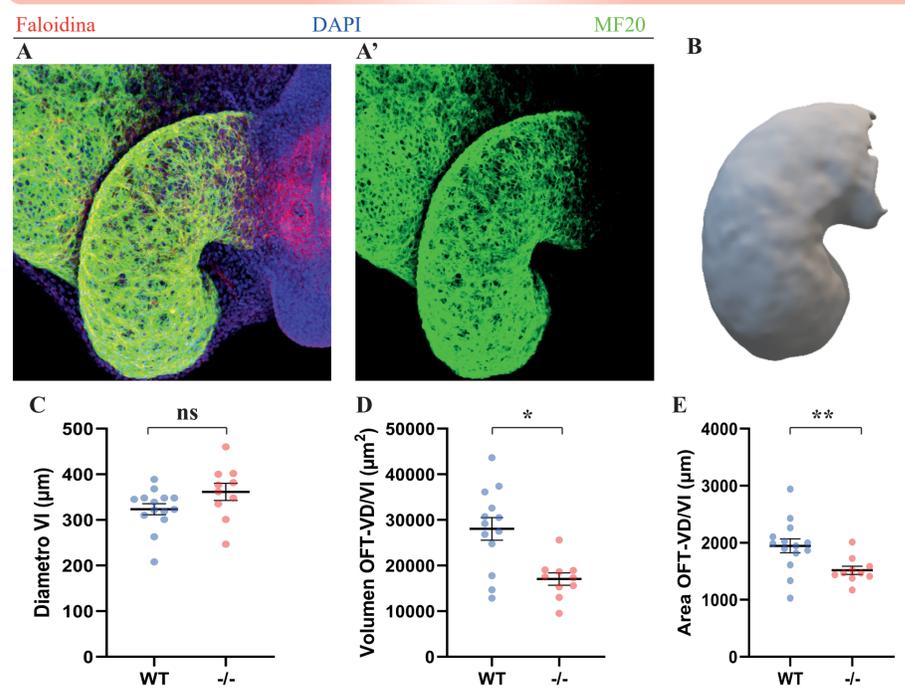
La correcta migración de los precursores del SHF es vital para el desarrollo cardiaco y fallos en este proceso pueden resultar en cardiopatías congénitas<sup>3</sup>. Por este motivo, en los últimos años se han realizado ensayos de secuenciación de RNA, con el fin de identificar los genes que participan en la migración de las células del SHF. A partir de estas bases de datos<sup>4</sup>, un ensayo in silico previamente realizado en el laboratorio reveló una lista de genes de expresión en el SHF potencialmente implicados en la migración de las células de esta región. Uno de los genes seleccionados in silico fue Girdin. Girdin se une a los filamentos de actina y los estabiliza, favoreciendo la migración celular. Por este motivo, se planteó a dicho gen como un posible responsable de la migración de las células del SHF. Para evaluar la función de Girdin en el desarrollo cardiaco, se generaron embriones deficientes en este gen mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas. Mediante una aproximación basada en el uso de modelos tridimensionales, se cuantificó el efecto que la falta de Girdin causó en el tracto de salida del corazón embrionario.

## METODOLOGÍA



**Figura 3. Esquema de la aproximación experimental.** (A) Estrategia de generación de eliminación del gen Girdin por el sistema CRISPR/Cas. Zigotos de ratón se microinyectaron con cuatro RNAs guía dirigidos contra los exones 1 y 2 de Girdin, junto con la enzima Cas9. Los embriones de 2 células supervivientes se implantaron en madres de acogida. Los embriones se desarrollaron con normalidad hasta el estadio E9.5, donde fueron recolectados para su genotipado y análisis. (B) Estrategia de análisis del tracto de salida (OFT) de los embriones tratados con CRISPR. Los embriones se inmunotizaron contra MF20, un marcador de cardiomiocitos. A continuación se adquirieron imágenes confocales del corazón de los embriones, las cuales se utilizaron para segmentar el OFT y generar un modelo 3D de esta estructura. Los modelos 3D se cuantificaron con el software Meshlab, obteniendo el área y volumen del OFT.

## RESULTADOS



**Figura 4. Análisis del OFT de embriones Girdin<sup>-/-</sup>.** (A, A') Proyección máxima del tracto de salida (OFT) de un embrión WT inmunotizado contra MF20 y tratado con faloidina y DAPI. (B) Modelo tridimensional generado a partir de la imagen confocal mostrada en (A'). (C) Dímetro máximo del ventrículo izquierdo (VI) de embriones WT y mutantes nulos de Girdin (-/-). No se encontraron diferencias significativas (ns) con una prueba t (P > 0.05). (D, E) Ratio entre el área del OFT (D) o el volumen del OFT (E) y el diámetro máximo del VI. Las barras negras indican la media de la muestra y las barras de error representan el error estándar de la muestra (SEM). Existen diferencias significativas entre la media del área del OFT y VD de embriones Girdin<sup>-/-</sup> y embriones WT (\*P < 0,05), así como respecto al volumen (\*\*P < 0,005). Todos los datos siguen una distribución normal según el test de Shapiro-Wilk.

## CONCLUSIONES

- Modelos tridimensionales del tracto de salida del corazón permitieron tomar medidas biométricas en esta estructura.
- Embriones Girdin<sup>-/-</sup> a estadio E9.5 presentaron una **reducción** en el área del tracto de salida del corazón, respecto embriones WT.
- La falta de Girdin también provocó una **disminución** en el volumen del tracto de salida del corazón.

## BIBLIOGRAFÍA

- Sendra M, Domínguez JN, Torres M, Ocaña OH. Dissecting the Complexity of Early Heart Progenitor Cells. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2021 Dec 26;9(1):5.
- Kenzo Ivanovitch, Susana Temiño, Miguel Torres. (2017). Live imaging of heart tube development in mouse reveals alternating phases of cardiac differentiation and morphogenesis. *eLife.* 6:e30668.
- Palmquist-Gomes P, Meilhac SM. Shaping the mouse heart tube from the second heart field epithelium. *Curr Opin Genet Dev.* 2022. 73:101896.
- Tyser, R., Ibarra-Soria, X., McDole, K., Arcot Jayaram, S., Godwin, J., van den Brand, T., Miranda, A., Scialdone, A., Keller, P. J., Marioni, J. C., & Srinivas, S. (2021). Characterization of a common progenitor pool of the epicardium and myocardium. *Science.* 371(6533).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a la Unidad de Transgénesis del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, y a Juan de Dios Hourcade, jefe de dicha Unidad, por llevar a cabo las microinyecciones de zigotos. A su vez, agradecemos a la Unidad de Microscopía del CNIC por su ayuda con la adquisición de imágenes y a todos los miembros del laboratorio de M. Torres por sus aportaciones al trabajo. El autor principal quisiera agradecer a la Universidad Autónoma por favorecer el desarrollo de este trabajo y al director del trabajo Óscar Ocaña Terraza por sus enseñanzas, así como a Miguel Torres Sánchez, por permitir el desarrollo del trabajo.

SCAN HERE

