



**Tesina de grado**  
**Licenciatura en Bioquímica**

# **Diapausa I: estudio de la expresión del gen *cordina* en *Austrolebias charrua***

Daniel Fernando Blanco González

Orientadora: Dra. María José Arezo  
Co-orientador: Mag. Nicolas Gabriel Papa

Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos - Sección Biología Celular,  
Facultad de Ciencias  
Julio, 2020

# Agradecimientos

A mi tutora Dra. María José Arezo, por la gran oportunidad de integrarme a un fabuloso equipo de investigadores abocados a su profesión con tenacidad y mucho cariño por lo que hacen. Con una tutoría rigurosa y acompañando en todo momento.

A mi co-tutor Mag. Nicolas Papa, quién me atrajo y despertó una gran curiosidad por el tema de mi pasantía de grado y profesión. Además, dentro del Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, me enseñó buenas prácticas de manipulación y a optimizar al máximo el rendimiento en el laboratorio, lo cual permitió los buenos resultados obtenidos.

Al Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos - Sección Biología Celular (Facultad de Ciencias) por hacer posible la realización de este trabajo.

También muy importante agradecer a mis compañeros en el grupo de trabajo, los estudiantes en su momento ahora el licenciado Ignacio González, y la futura licenciada Hellen Schlueb. Grandes personas y en el porvenir grandes investigadores formados aquí, de los cuales estoy agradecido por su ayuda y compañía en todo momento.

A todos los integrantes de los laboratorios de Biología Celular del séptimo piso de la Facultad de Ciencias, un grupo humano siempre dispuesto a ayudar y compartir todos los momentos como un gran equipo.

Agradecer por último a mi familia y mi prometida Stephanie por tener la paciencia de años de estudio y vencer todas las adversidades para llegar a este logro personal, que como tal, fue realizado gracias al sacrificio de todos ellos.

Muchas gracias...

# Índice

Resumen.....	4
1. Introducción.....	5
1.1 Peces anuales.....	5
1.2 Diapausa.....	8
1.3 Vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP) .....	9
1.4 Proteína cordina, antagonista de BMP.....	10
2. Objetivos.....	13
2.1 Objetivo general	
2.2 Objetivos específicos	
3. Materiales y Métodos.....	14
3.1 Colecta y mantenimiento de peces adultos.....	14
3.2 Obtención y cultivo de embriones.....	15
3.3 Análisis moleculares.....	18
a) Extracción de ARN .....	18
b) Estimación de la calidad y concentración de ARN extraído ....	19
c) Retrotranscripción: síntesis de ADN copia a partir de ARN total extraído.....	19
d) Evaluación de la síntesis de ADN copia(ADNc) .....	19
e) Amplificación del fragmento del gen de cordina-2.....	20
f) Remplificación del fragmento del gen de cordina-2 y purificación de los productos de PCR para secuenciación.....	21
g) Amplificación de un fragmento extenso de cordina .....	22
h) Reamplificación del fragmento y purificación de los productos de PCR para secuenciación .....	23
i) Análisis de secuencias.....	23
4. Resultados y Discusión.....	25
4.1 Valoración del ARN total .....	25
4.2 Síntesis de ADN copia y evaluación de la retrotranscripción..	26
4.3 Amplificación de los genes de interés .....	27
4.4 Secuenciación de los productos de amplificación .....	30
4.5 Análisis preliminar de la secuencia de cordina extensa.....	33

4.6 Análisis comparativo entre las secuencias obtenidas.....	35
4.7 Secuencia consenso de cordina extensa.....	36
4.8 Análisis de regiones conservadas en la secuencia nucleotídica de cordina en A. charrua.....	37
4.9 Análisis de regiones conservadas en la secuencia aminoacídica de cordina en A. charrua.....	40
5. Conclusiones.....	48
6. Perspectivas.....	49
7. Referencias bibliográficas.....	51

## Resumen

Los peces anuales muestran una estrategia de supervivencia peculiar ya que experimentan las condiciones más duras con las que un pez puede lidiar. En cada estación seca, la población juvenil y adulta muere mientras los embriones permanecen enterrados en el fondo del charco hasta la próxima estación de lluvias. Una vez que los charcos se inundan, los embriones eclosionan y los juveniles alcanzan la madurez en pocas semanas. Por esta razón, la supervivencia de las especies depende de los embriones. El mecanismo por el cual logran sobrevivir es el fenómeno de dormancia denominada diapausa, que puede ocurrir en tres momentos del desarrollo. Los mecanismos moleculares que la regulan aún no están dilucidados. Nuestro grupo de investigación se centra en la diapausa I y en este contexto, nos proponemos contribuir al conocimiento de dichos mecanismos tan peculiares. En el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos de la Facultad de Ciencias, en el marco de esta tesina, concentramos la atención en el patrón de expresión del gen *cordina*. En otro pez anual, *Austrofundulus limnaeus*, se observó una expresión diferente de este gen al reportado en vertebrados. En base a que *cordina* es un componente de una vía altamente conservada en el desarrollo de los vertebrados, se presume que podría existir una relación entre este cambio en el patrón de expresión y la aparición de la diapausa I. Por este motivo, en el presente trabajo, se estudió la expresión de *cordina* en *Austrolebias charrua*, una especie que habita en el sur de Brasil y el este de Uruguay. Resultados preliminares (PCR en tiempo final) indicaron, al igual que en *A. limnaeus* y a diferencia del resto de los vertebrados, la presencia de ARNm de *cordina* de origen materno. Asimismo se logró amplificar parte de la secuencia del gen *cordina* en diferentes estadios embrionarios tempranos incluyendo diapausa I. La información generada resultó muy útil para comenzar a caracterizar a *cordina* en esta especie en particular.

Palabras clave:

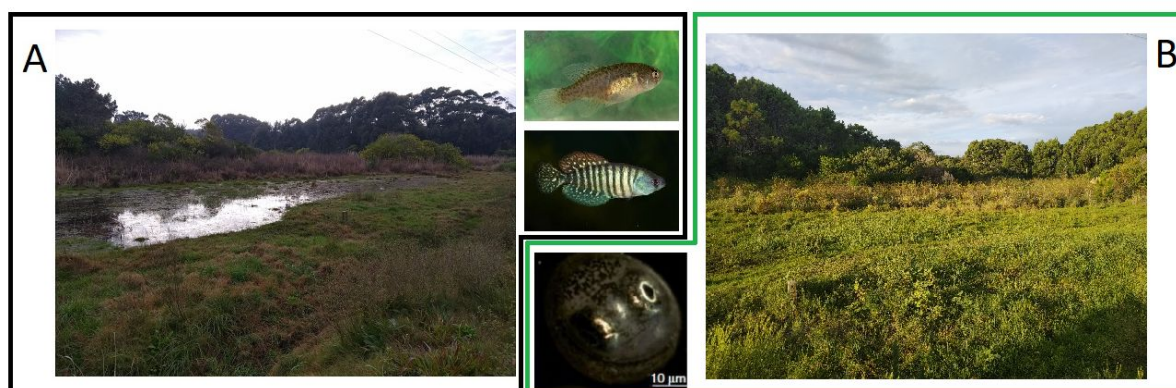
Peces anuales, *Austrolebias*, *cordina*, diapausa.

# 1. Introducción

## 1.1 Peces anuales

Los peces anuales (Cyprinodontiformes, Aplocheilidae), son un grupo de teleósteos de agua dulce que viven en diferentes partes de América y África (Loureiro y col., 2016), que presentan algunas diferencias con el resto de los teleósteos (Myers, 1952).

Este grupo de peces, muestra una estrategia de supervivencia peculiar ya que experimenta las condiciones más duras con las que un pez puede lidiar. En cada estación seca: se evaporan los charcos temporales en los que habitan. Por lo tanto, toda la población juvenil y adulta muere, mientras que los embriones en dormancia o en desarrollo activo, permanecen enterrados en el fondo del charco hasta la próxima estación de lluvias. Una vez que los charcos secos se vuelven a inundar, los embriones eclosionan y los juveniles alcanzan la madurez sexual en unas pocas semanas. Por esta razón, la supervivencia de las especies en una ubicación dada es totalmente dependiente de los embriones (Wourms, 1972c; Errea y Danulat, 2001; Arezo y col., 2007; Berois y col., 2012; Blažek y col., 2013). La supervivencia de los embriones durante el período de lluvia podría depender de la tolerancia a los largos períodos de hipoxia o anoxia (Podrabsky y col., 2011; Anderson y Podrabsky, 2014), mientras que la supervivencia durante la estación seca sería posible por la tolerancia a la hipoxia/anoxia y la capacidad de resistir la pérdida de agua de su ambiente (Podrabsky y col., 2001, 2010a, Figura 1).

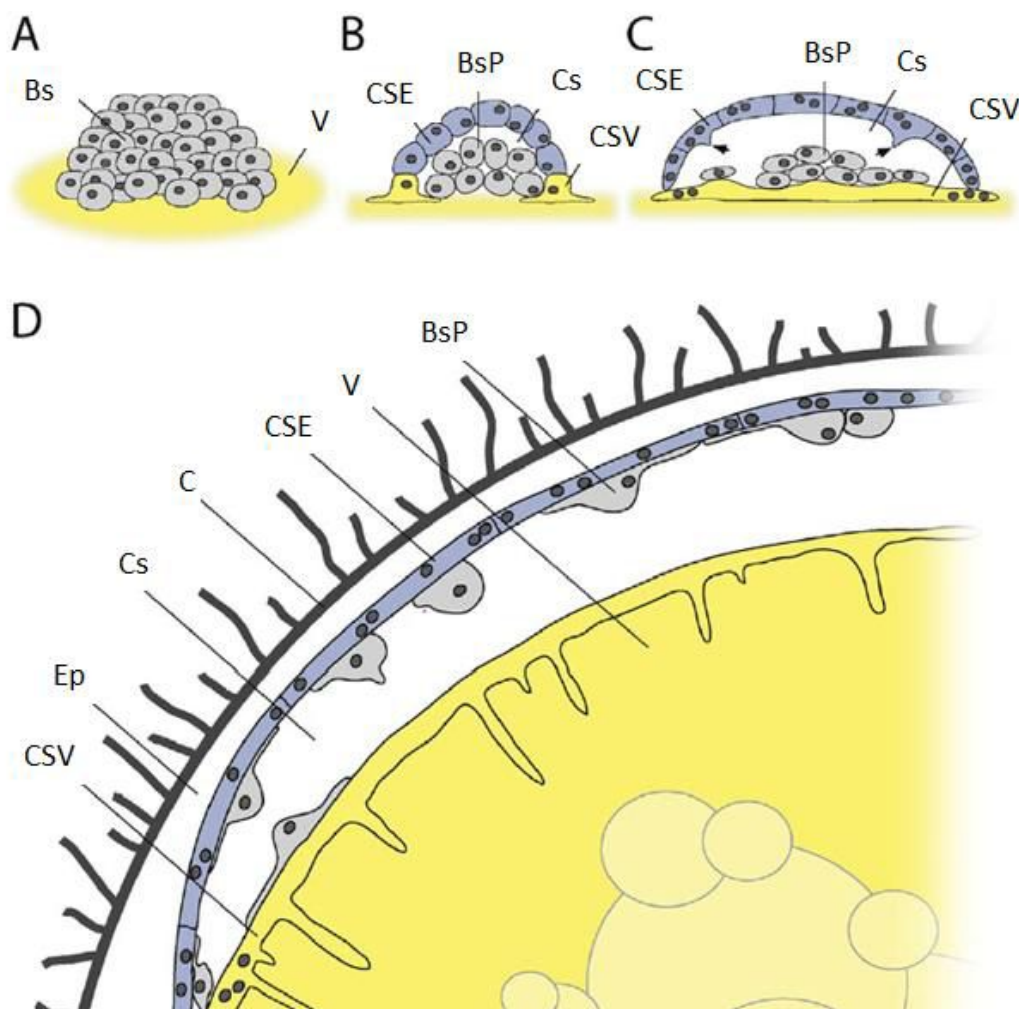


**Figura 1:** Ciclo de vida de los peces anuales. **A)** Charco temporal durante la estación lluviosa en la que los adultos crecen y se reproducen. Charco ubicado en la localidad de La Coronilla, Rocha, Uruguay. Incluidos en la figura A, Macho y hembra adultos de *Austrolebias charrua* (modificado de Berois y col., 2012), se muestran como representantes de esta fase del ciclo. **B)** Mismo charco temporal durante la estación seca. Incluido en la figura B se muestra un embrión pre-eclosión (modificado de Berois y col., 2012) representando esta fase del ciclo.

El género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) comprende 42 especies que se encuentran distribuidas en las cuencas de la “Plata-Paraná” y “Patos-Merín” (revisado por Loureiro y col., 2016). *Austrolebias charrua* es una especie compartida con el sur de Brasil

que se encuentra en los “Bañados del Este” en nuestro territorio (Costa y Cheffe, 2001), considerado Sitio Ramsar y Reserva de Biosfera (PROBIDES, 1999).

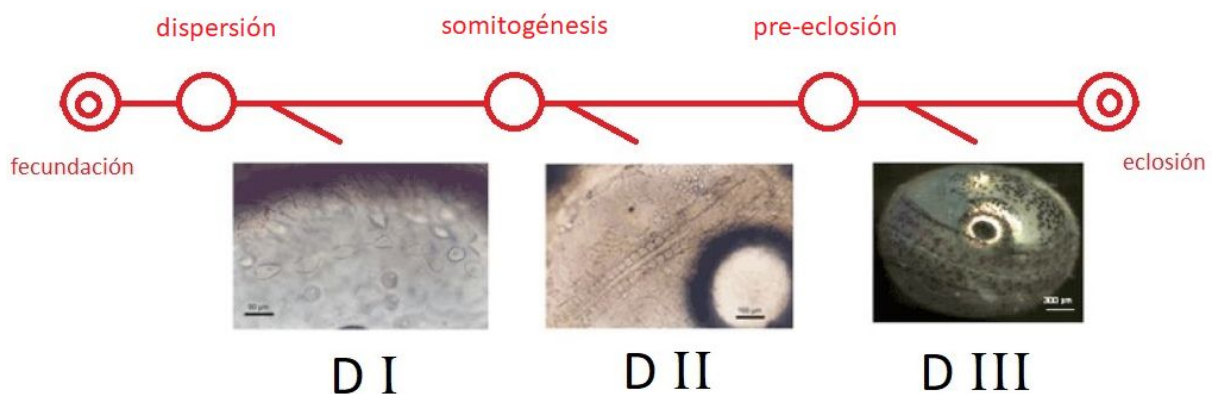
Los peces anuales comparten varias características con otras especies de peces ampliamente utilizadas en la investigación, tales como: oviparidad, transparencia de huevos y embriones, y fácil mantenimiento en el laboratorio (Berois y col., 2012 ). A nivel del desarrollo, los embriones de los peces anuales, al igual que el de otros teleósteos, presentan un clivaje meroblástico discoidal, que origina tres capas de células que posteriormente realizan la epibolia (figura 2). Estas capas se denominan, desde el vitelo a la superficie, la capa sincicial vitelina, un grupo de células mediales denominadas blastómeras profundas (formarán todas las estructuras del embrión) y la capa celular envolvente hacia la superficie. (Trinkaus, 1993; Kimmel y col., 1995).



**Figura 2:** Esquema de las primeras etapas del desarrollo de los peces anuales, modificado de Naumann y Englert, 2018. A) Estadio de blástula temprana. B) Estadio de blástula tardía. C) Comienzo de la epibolia. D) Epibolia temprana, comienzo de la dispersión de las blastómeras profundas. Bs, blastómeras; C, corion; BsP, blastómeras profundas; CSE, capa sincicial envolvente; Ep, espacio perivitelino; Cs, cavidad de segmentación; V, vitelo; CSV, capa sincicial vitelina.

Una de las diferencias destacables es que, previo al comienzo de la epibolia en el pez teleósteo no anual *Danio rerio*, el promedio de blastómeras es de 4000 (Marrable, 1965), mientras que para embriones de peces anuales sudamericanos se han registrado números menores de blastómeras en este estadio: de 200 a 1000 para *Austrofundulus* (Wourms, 1972b), 100 en *Austrolebias viarius* (Arezo y col., 2005) y de 50 a 350 en el género africano *Nothobranchius* (Van Haarlem, 1983). Se ha demostrado que el tiempo de las primeras divisiones celulares en *Nothobranchius furzeri* es mayor al de otros teleósteos no anuales. Sin embargo, la pérdida de sincronía y activación del genoma cigótico ocurre antes que en *D. rerio*. En *N. furzeri* se observa luego de la quinta división (Dolfi y col., 2014), a diferencia de *D. rerio* que ocurre en la décima división (Kimmel y col., 1995).

Además de las particularidades mencionadas anteriormente, presentan dos características de desarrollo únicas. Primero, se interpone una fase de dispersión de las blastómeras profundas sobre la superficie del vitelo y la posterior reagregación de estas células donde ocurrirá la escisión y la internalización del endomesodermo. La formación del eje embrionario tiene lugar en este reagregado. Por lo tanto, la epibolia se desacopla temporal y espacialmente del ingreso del endomesodermo y formación del eje, a diferencia de los teleósteos no anuales. En segundo lugar, los embriones de peces anuales pueden sufrir fenómenos de dormancia en el desarrollo durante la fase de dispersión (diapausa I), durante la somitogénesis (diapausa II) y en la etapa de pre-eclosión (diapausa III) (Peters, 1963.; Wourms 1972a, 1972c). Todas las diapausas son fisiológicamente distintas (Wourms, 1972c) y reaccionan de manera diferente a la misma señal ambiental. Por ejemplo, la hipoxia induce y prolonga la diapausa I y II, pero es señal de salida de la diapausa III (Peters, 1963)(Figura 3).



**Figura 3:** Línea temporal de las etapas del desarrollo embrionario de peces anuales que muestra donde pueden ocurrir las diapausas desde la fecundación hasta la eclosión. Las imágenes de microscopía óptica de campo claro, corresponden a embriones de *Austrolebias charrua* en los estadios en los que se pueden instalar las diapausas: fase de dispersión (DI), embrión somítico (DII), embrión pre eclosión (DIII) (modificado de Berois y col., 2014).

## 1.2 Diapausas

La diapausa se define como una detención programada del desarrollo regulada por factores endógenos y señales ambientales que predicen condiciones futuras, como la temperatura y el fotoperíodo entre otras. Es una adaptación específica que ocurre en una etapa particular



del ciclo de vida de la especie, y es crucial para soportar ambientes extremos. Una detención reversible implica una suspensión o un retraso importante en el crecimiento y desarrollo morfológico, que es diferente de la quiescencia, ya que en este último el desarrollo puede ser inhibido temporalmente por un entorno desfavorable en cualquier etapa y en cualquier momento (Roberts, 1978; Podrabsky y Hand, 2015).

Entonces los embriones de peces anuales se desarrollan de modo continuo, o pasan por períodos variables pero programados de detención. Esta adaptación fisiológica genera trayectorias de desarrollo alternativas definidas como el "efecto multiplicador" (Wourms, 1972c). Además, pueden experimentar detenciones espontáneas en algunos embriones de los mismos progenitores cultivados en condiciones de laboratorio estandarizadas constantes. Wourms (1972c) sugirió que esta característica permite que los peces anuales mantengan poblaciones permanentes en charcos temporales, porque el desarrollo se extiende en gran medida por períodos variables a través de la estación seca. El ingreso a la diapausa I y II continúa la trayectoria directa a la diapausa III o la eclosión dependiendo de una variedad de factores. Estos factores pueden ser: los efectos maternos, como la edad de la hembra (demostrado para el ingreso en la diapausa II) y otros factores como por ejemplo el ARN empaquetado aportado por la madre (Podrabsky y col., 2016b), fotoperíodo (Markofsky y Matias, 1977; Markofsky y col., 1979; Levels and Denucé, 1988; Podrabsky and Hand, 1999), temperatura (Wourms, 1972c; Markofsky y Matias, 1977; Levels and Denucé, 1988; Podrabsky y col., 2010b), hipoxia (Peters, 1963), presencia de adultos (Inglima y col., 1981) y variabilidad genética intrínseca (Wourms, 1972c), así como también variabilidad epigenética que todavía se desconoce (Podrabsky y col., 2016b).

La diapausa ha sido ampliamente estudiada en insectos y se han descrito y estudiado en una gran variedad de metazoarios (incluso en mamíferos) (revisado por Martin y Podrabsky, 2017). En la mayoría de los casos, la diapausa embrionaria está relacionada con la capacidad de disminuir el metabolismo, crecimiento y proliferación celular de manera programada ante ciertas señales que indican estrés ambiental (Yamashita y Hasegawa, 1985; Levels y col., 1986; Podrabsky y Hand, 1999; Hand y col., 2016).

La capacidad de los embriones de peces anuales de detectar las señales ambientales (como temperatura, nivel de oxígeno y fotoperíodo, entre otras ya mencionadas) y responder a éstas mediante la entrada o no en diapausa, permite su supervivencia en los charcos temporales, en los que están sometidos a condiciones de desecación, hipoxia/anoxia y radiación UV (Podrabsky y col., 2016a; Wourms, 1972a-c).

La diapausa I, sucede en la fase de dispersión y podría ser interpretada como un mecanismo de escape a condiciones ambientales severas durante un estadio fundamental del desarrollo según Wourms (1972b). En *Austrofundulus limnaeus* se encontró que las blastómeras profundas son altamente resistentes a la radiación ultravioleta durante la fase de dispersión (Wagner y Podrabsky, 2015a). Sin embargo, estas células no serían totipotentes en esta etapa como postulaba Wourms (1972b), ya que algunas blastómeras estarían expresando marcadores de células germinales primordiales presuntivas como *vasa* (marcador conservado de línea germinal en vertebrados) (Arezo y col., 2016), aunque sí conservan características de pluripotencialidad (Wagner y Podrabsky, 2015b). Hasta el momento existe un único trabajo dedicado exclusivamente a la diapausa I en un pez anual sudamericano en el que se describen dos fenotipos diferentes (diapausas IA y IB) en

embriones de *Austrolebias charrua* y *Austrolebias viarius*, inducidas en un 100 % mediante condiciones de hipoxia/anoxia y presencia de adultos a 19°C (Arezo y col., 2017), pero no se conoce aún su perfil fisiológico y metabólico (Martin y Podrabsky, 2017).

El estudio más exhaustivo fue realizado en *Austrofundulus limnaeus* en diapausa II, en relación a datos de expresión de genes y procesos metabólicos. (Podrabsky y col., 2016a; Podrabsky y col., 2017), en los que se ha demostrado una importante disminución del metabolismo celular (Podrabsky y Hand, 1999), encontrándose a las células en fase G1/G0 del ciclo celular (Meller y col., 2012). Además, los embriones en diapausa II son altamente resistentes a condiciones de hipoxia/anoxia, desecación y radiación ultravioleta, lo que resultaría clave para la supervivencia cuando se encuentran en el sustrato del fondo del charco en la estación seca (Podrabsky y Hand, 1999; Podrabsky y col., 2007; Podrabsky y col., 2011; Anderson y Podrabsky, 2014; Wagner y Podrabsky, 2015a).

Por último la diapausa III es la única diapausa que ha sido descrita como obligatoria, ya que en condiciones de laboratorio los embriones de todas las especies de peces anuales que se han estudiado transcurren por ella (revisado por Martin y Podrabsky, 2017). En embriones de *A. limnaeus* el metabolismo y ritmo cardíaco decrecen progresivamente en esta etapa, en comparación con embriones del mismo estadio inducidos a eclosionar (Levels y col., 1986; Podrabsky y Hand, 1999; Thompson y Orti, 2016). En un trabajo reciente, se encontraron 945 genes diferencialmente expresados al comparar entre el transcriptoma de alevines recién eclosionados y el de embriones en diapausa III de la especie anual *Nematolebias whitei*, muchos de ellos relacionados al metabolismo celular, el ritmo cardíaco y el ciclo circadiano (Thompson y Orti, 2016).

### **1.3 Vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP)**

Con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares que expliquen estos fenómenos de diapausa en el desarrollo embrionario, nuestro grupo de investigación se ha centrado en la diapausa I de *A. charrua*. Enfocamos la atención en una vía muy conservada del desarrollo temprano que es: la vía ancestral de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP), (Dosch y col., 1997).

Esta vía establece el patrón dorso-ventral en el desarrollo embrionario, es uno de los gradientes morfogenéticos mejor comprendidos y está establecida por múltiples proteínas que actúan entre sí en el espacio extracelular generando ese patrón. Una de esas proteínas que regulan el accionar de BMP es la proteína cordina, que junto a nogina y follistatina actúan como antagonistas de BMP a diferentes niveles (Piccolo y col., 1997, Zimmerman y col., 1996).

*Cordina*, *nogina* y *follistatina* entre otros en esta vía de señalización son esenciales durante el avance en el desarrollo hacia la formación de un eje embrionario en la mayoría de los vertebrados (Canalis y col., 2003).

Se sugiere que estos factores pueden desempeñar un papel en el patrón dorsoventral (DV), en peces anuales que es similar a otros teleosteos descritos, como el pez cebra. Sin embargo, en contraste con lo descrito en la mayoría de los vertebrados y en base en la sorprendente observación de que *cordina*, *nogina* y *follistatina*, se encuentran empaquetados por vía materna y sus niveles de expresión temprana están inusualmente

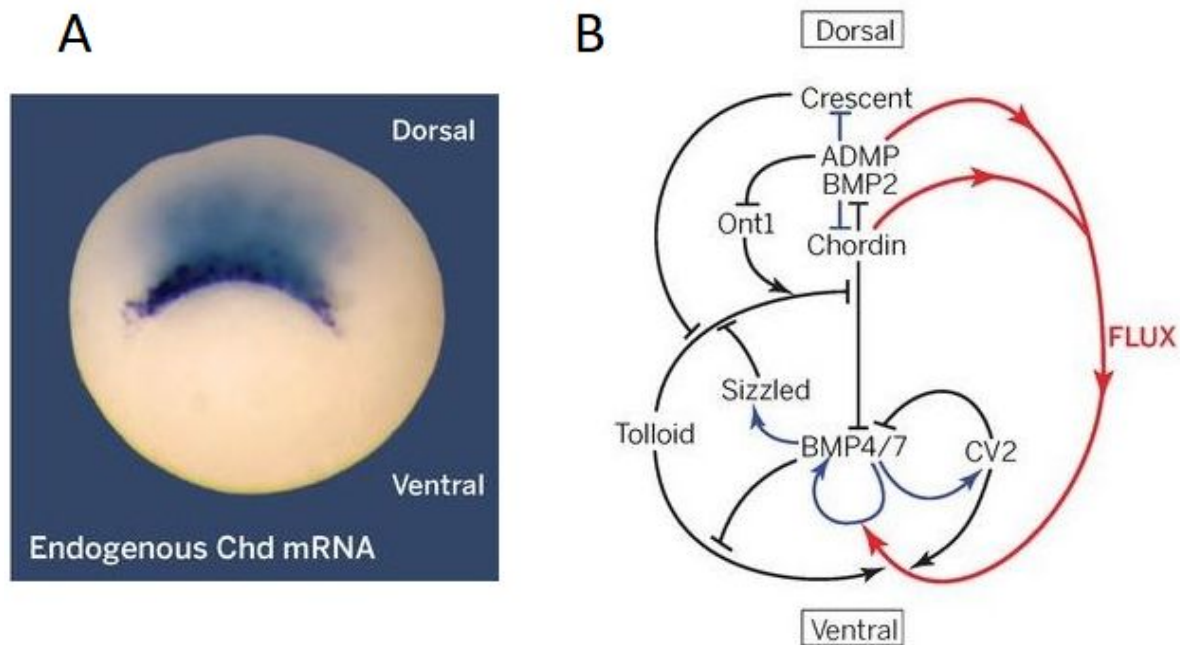
elevados durante los primeros estadios del desarrollo (incluyendo la etapa de dispersión en la que puede ocurrir la diapausa I). Es posible que estos genes puedan ejercer una función única durante el desarrollo temprano en peces anuales (Wagner y Podrabsky, 2015). Los estudios de expresión y localización para estos genes serán necesarios para determinar dónde y cuándo se expresan durante el desarrollo y pueden aclarar sus papeles en la morfogénesis de peces anuales (Wagner y Podrabsky, 2015).

Este patrón diferencial de expresión de *cordina*, *nogina* y *follistatina*, en *A. limnaeus* (comparándolos con otros peces teleósteos), es marcadamente diferente (Wagner y Podrabsky, 2015). Por este motivo es pertinente conocer si presentan el mismo patrón diferencial de expresión de estos antagonistas de BMP, en otras especies de peces anuales como por ejemplo en *Austrolebias charrua*.

#### **1.4 Proteína cordina, antagonista de BMP**

Con respecto al estudio del gen *cordina* en *Austrolebias charrua*, la información disponible sobre la secuencia de la misma proviene del transcriptoma de referencia (datos proporcionados en colaboración con Gajardo y col.). Dicho gen contiene dos fragmentos o isoformas de un mismo gen denominados: uno como *cordina 2* y otro *cordina 1* en sentido 5' a 3'. Entre ambos falta información de la secuencia que los conecta a nivel transcriptómico (Papa N. y col., no publicado).

Como se mencionó anteriormente, la función conservada de *cordina* es contribuir en la dorsalización del embrión en los estadios tempranos del desarrollo embrionario, (Sasai y De Robertis, 1994). *Cordina* modula la bioactividad de morfogenes, que son señales que funcionan como factores de crecimiento y diferenciación celular implicados en el establecimiento de patrones específicos en la arquitectura de órganos y tejidos (Larrain y DeRobertis, 2000). La vía de *cordina*/BMP es ancestral y se conserva en animales bilaterales tan diversos como *Drosophila*, arañas, *anfioxus*, hemicordados, erizos de mar y vertebrados (Bier y De Robertis, 2015).

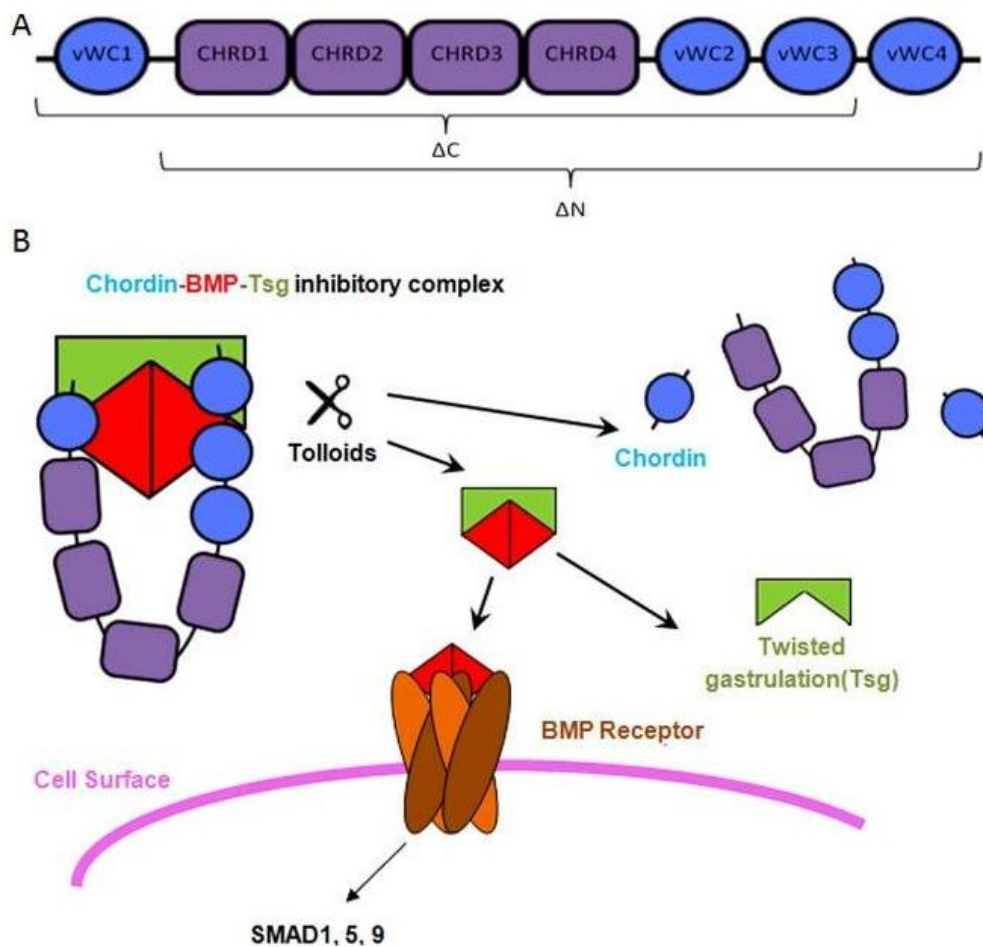


**Figura 4:** **A:** Proteína cordina endógena difundiendo desde el labio dorsal del blastoporo en *Xenopus*. **B:** Esquema de vía de señalización que comprende a los factores de desarrollo óseo BMP y la proteína extracelular cordina, en el plano dorso-ventral del embrión; (Bier, DeRobertis 2015).

*Cordina* se identificó inicialmente en el Centro Organizador de Spemann (figura 4A) por su capacidad para antagonizar la acción de BMP. Se secreta como un homodímero glicosilado de 120 kDa. El gen *cordina* codifica una proteína de 941 aminoácidos que tiene una secuencia señal de secreción y cuatro dominios ricos en cisteína (Cys). Experimentos de microinyección del ARNm de *cordina* demuestran la inducción de ejes gemelos y puede rescatar completamente el desarrollo axial en embriones ventralizados (Sasai y De Robertis, 1994). Esta molécula es un potente factor de dorsalización que se expresa en determinado momento y lugar regulando las interacciones célula-célula y se caracteriza por poseer cuatro dominios, que son los sitios de interacción con BMP (Suzuki y col., 1996). *Cordina* se une específicamente a BMP-2, -4 y -7 y no se une a otros miembros de la superfamilia de TGF $\beta$  (Goodman y col., 1997). *Cordina* está regulado por interacciones delicadas con otras proteínas secretadas de la matriz extracelular (figura 4, B). Entre ellas también se encuentra la proteasa Tsg, que se expresa ventralmente y facilita enormemente la unión de *cordina* a BMP (Little y Mullins, 2009). El complejo cordina-BMP es un sustrato para la metaloproteasa de zinc BMP-1/tolloid, que escinde a Cordina inactivando su actividad biológica y liberando BMP al espacio extracelular (Goodman y col., 1997). Entonces este equilibrio comprende que, para cada acción en el lado dorsal, hay una reacción correspondiente en el lado ventral. La transcripción de *cordina* se activa mediante señales de Nodal altas y BMP bajas. Un trabajo reciente en pez cebra ha demostrado que la microinyección de dos células diferentes del polo animal con ARNm Nodal y BMP en la etapa de 128 células activa la transcripción de *cordina* y es suficiente para inducir un eje secundario completo (Xu y col., 2014).

La proteína cordina se une a BMP a través de dominios de homología del factor tipo C de von Willebrand ricos en cisteína (vWC) y les impide interactuar con sus receptores de

superficie celular (figura 5). Estos dominios también se autoasocian y permiten que cordina se una a proteínas relacionadas a dicha vía, ajustando la regulación de BMP (Piccolo y col., 1997). La inhibición de los BMP por *cordina* se fortalece por la acción de la proteasa ya mencionada Tsg (Larraín y De Robertis, 2000). Sin embargo, la inhibición se produce mediante la escisión de la cordina en dos sitios específicos por las metaloproteasas de la familia tolloid. A medida que Tsg mejora este proceso de escisión, cumple una doble función como promotor al estar libre e inhibidor de la señalización de BMP al estar unido a cordina, es decir estos fragmentos derivados de *cordina* continúan actuando como reguladores de la acción de los BMP durante el desarrollo. En particular, la escisión de la *cordina* en el C-terminal potencia su actividad anti-BMP de una manera específica (Baldock y col., 2015).



**Figura 5:** Representación esquemática de la regulación de cordina, tsg y tolloid en la actuación de BMP en *Xenopus leavis*, (modificada de Baldock y col., 2015): **(A)** Diagrama del diseño del dominio de la *cordina* de longitud completa con los fragmentos más grandes producidos por escisión indicada por tolloid. **(B)** Modelo que muestra el mecanismo de regulación de BMP por *cordina*. BMP se une a *cordina* en un complejo inhibidor, que se fortalece en presencia de Tsg. Después de la escisión de *cordina* por los tolloid en ambos sitios, Tsg compite con los fragmentos residuales para unirse a BMP y se cree que aumenta la tasa de renovación de fragmentos.

Los dominios individuales de vWC son menos activos biológicamente (Larraín y De Robertis, 2000) y se cree que se eliminan del espacio extracelular más rápidamente que la

cordina completa (Larraín y De Robertis, 2000; Zhang y col., 2008). Además, Tsg compite por la unión de BMP, lo que hace que los dominios vWC individuales se disocien de BMP (De Robertis y Kuroda, 2004).

La función específica de los dominios vWC de cordina no están completamente comprendidos más allá de lo mencionado como colaboradores en la unión a BMP y la colaboración en la inhibición de ésta. Un estudio en pez cebra demostró los efectos de la mutación de los sitios de escisión N-terminal, C-terminal o ambos para hacerlos resistentes a tolloid. Cordina truncada en el extremo N-terminal fue un inhibidor de BMP ligeramente menos eficiente. Sin embargo, cuando cordina fue truncada en C-terminal fue más eficiente (*in vivo*) como inhibidor de BMP en vertebrados (Xie y Fisher, 2005).

También se conoce que los dominios vWC están presentes en noggina y follistatina y su repetición como dominios en las respectivas proteínas varía en número (De Robertis y col., 1997).

Nuestro grupo centró su atención en dilucidar los mecanismos moleculares que actúan en el particular evento de la diapausa I y este trabajo específicamente se centra en el antagonista de BMP; *cordina*.

La hipótesis que nos planteamos es que el ARNm de *cordina* de origen materno empaquetado, presente desde la fecundación, cumpliría un rol durante la fase de dispersión en el ingreso de los embriones a diapausa I. Con el fin de contribuir a dilucidar esta hipótesis, en este trabajo se propone analizar si la expresión de *cordina* en *A. charrua* es análoga a lo observado en *Austrofundulus limnaeus* en su particular expresión temprana, y si se expresa durante la diapausa I.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de los mecanismos involucrados en la detención programada del desarrollo durante la fase de dispersión (diapausa I), estudiando la expresión del gen *cordina* en el desarrollo temprano y embriones en diapausa I del pez anual *Austrolebias charrua*.

### 2.2 Objetivos específicos

En este trabajo nos proponemos analizar el patrón de expresión del gen *cordina*, mediante RT-PCR a tiempo final en embriones de grupos experimentales: detenidos en diapausa I y no inducidos en diferentes estadios tempranos.

Para realizar este objetivo nos planteamos:

- 1) Aproximarse a las técnicas de colecta de peces anuales en el campo y reconocimiento de su hábitat natural.
- 2) Reproducción, obtención y cultivo de embriones de *Austrolebias charrua* en condiciones controladas.
- 3) Reconocimiento de los diferentes estadios del desarrollo embrionario en peces anuales.
- 4) Inducción de diapausa I en función de la presencia de adultos e hipoxia a 19°C.
- 5) Aproximación a las técnicas de extracción, amplificación e identificación de ácidos nucleicos (retrotranscripción, PCR, electroforesis en gel de agarosa).
- 6) Diseño y ajuste de condiciones de amplificación de cebadores específicos para el gen *cordina*.
- 7) Análisis comparativos de las secuencias de los amplicones obtenidos.

## 3 Materiales y Métodos

### 3.1 Colecta y mantenimiento de peces adultos

Peces adultos de *Austrolebias charrua* fueron colectados en charcos temporales de la localidad de La Coronilla, departamento de Rocha, Uruguay, entre los meses de agosto y setiembre de 2018 (figura 6). Luego del transporte y adaptación a las condiciones de mantenimiento estandarizadas en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) húmedo (Acuario), de Facultad de Ciencias. Se mantuvieron en peceras de 12 litros con agua sin cloro (pH 6.5-7), temperatura ambiente controlada a 19 °C y fotoperíodo natural.



**Figura 6: Ubicación del charco y colecta**

**a)** Mapa de Uruguay donde se marca en rojo la ubicación de La Coronilla, Rocha (modificado de <https://www.freeworldmaps.net/es/uruguay/>). **b)** Charco temporal de La Coronilla donde se colectaron los ejemplares. **c)** Colecta y selección de los individuos adultos aptos para trasladar al acuario.

Los adultos se separaron en parejas, tríos o cuartetos (1 macho y 1, 2 o 3 hembras), en peceras de agua obtenida mediante filtración por ósmosis inversa y reconstituida con sal para acuarios marinos (Tetra Marine Salt Pro, 300  $\mu$ S, pH 7-7,5) con burbujeo de aire continuo y recambio constante de agua mediante un sistema de recirculación que abarcó a todas las peceras. Se les proporcionó alimento vivo una vez al día, que en etapa de alevines y juveniles consistió en larvas nauplio de *Artemia* spp., y microgusanos



(*Panagrellus redivivus*). Durante la etapa adulta los principales alimentos fueron *Lombriculus variegatus*, *Tubifex* spp. y *Daphnia magna* (Papa y col., 2016).

### 3.2 Obtención y cultivo de embriones

La producción de embriones se realizó en peceras que contenían recipientes con esferas de vidrio de 500 micras de diámetro (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). Se colocó un recipiente en el fondo de la pecera mimetizando el ambiente natural en el cual estas especies, luego de un elaborado cortejo (García y col. 2006) se entierran para depositar sus huevos (figura 7).



**Figura 7: Reproducción de *Austrolebias charrua* en condiciones de cautiverio**

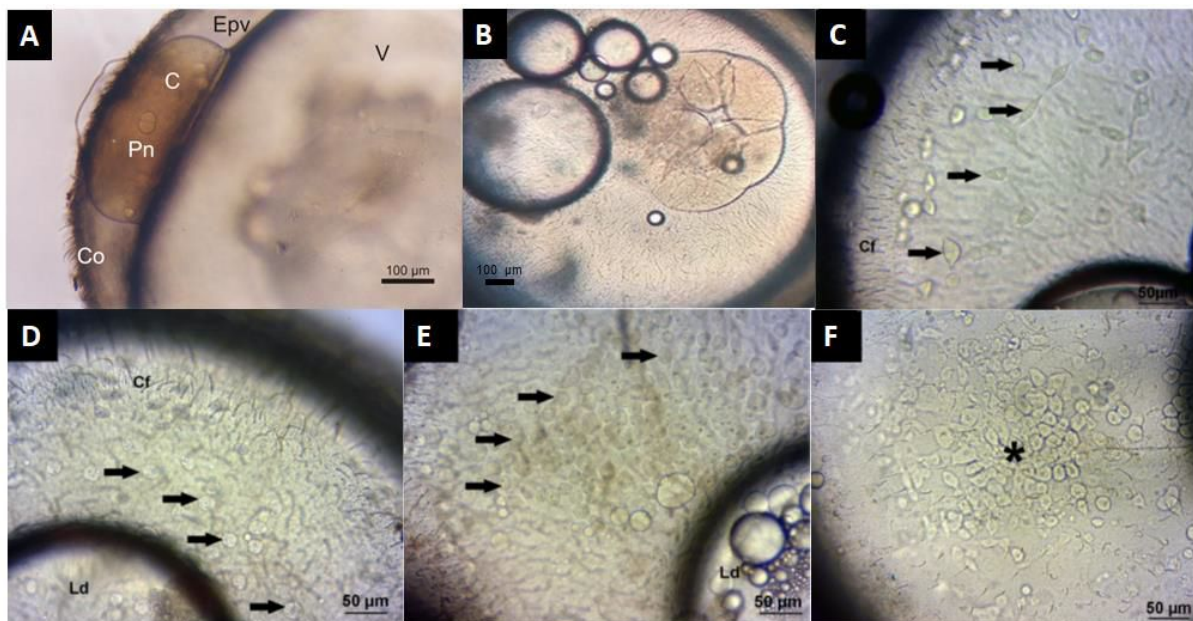
Dos ejemplos de cómo se reproducen los peces utilizando esferas de vidrio como sustrato de depósito de los huevos.

Los embriones de cada cruzamiento fueron colectados del recipiente por medio de un colador de plástico, donde las esferas de vidrio continúan el pasaje y los embriones permanecen retenidos. Se transfirieron a placas de Petri con agua de acuario con una pipeta pasteur de plástico (Papa y col., 2016). Se limpiaron por rodamiento sobre papel de filtro húmedo con agua de clorinada y se observaron en cámaras especialmente diseñadas (1,7 mm de profundidad fabricadas en portaobjetos con cinta aisladora) para su diagnóstico mediante un microscopio óptico Olympus Vanox con el medio de cultivo de Yamamoto (NaCl 7,5 g KCl 0,2 g; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,3 g; pH 7,3 en 1 L; Yamamoto 1967). Utilizando un

cubreobjetos, apoyado sobre la superficie del corion (transparente) se realiza la rotación de los huevos para optimizar el análisis del estadio del desarrollo de los mismos. Los embriones seleccionados se cultivaron en placas de Petri, en Yamamoto a 19 °C.

Los embriones se clasificaron en: Estadio materno que consta de embriones de 1 a 16 células donde el ARN de origen materno es empaquetado en sus células, epibolia entre 80 y 100%, (dispersión de las blastómeras profundas, en migración celular activa, previo al ingreso a una posible diapausa I, según Arezo y col., 2005), y reagregado I y II (fase activa del desarrollo embrionario, etapa posterior a la diapausa I, previo a la internalización del endomesodermo, según Pereiro y col., 2017)

Otro grupo de embriones en el estadio entre 1 y 16 células obtenidos en cada recolección, fueron inducidos a diapausa I utilizando dispositivos de inducción (frascos de vidrio con turba) que se introdujeron en una pecera con condiciones de inducción de diapausa I: presencia de individuos (machos y hembras) de *A. charrua* adultos, temperatura 19°C y aireación escasa. Este sistema genera un ambiente altamente hipóxico (prácticamente anóxico) para los embriones y asegura un 100% de inducción a diapausa I (Arezo y col. 2017)(figura 8).



**Figura 8: Estadios del desarrollo temprano de embriones de *A. charrua* seleccionados para este trabajo.** A) Estadio de 1 célula. C, citoplasma; Pn, pronúcleos; Epv, espacio perivitelino; Co, Corion. Modificado de Arezo y col., 2005. B) Estadio de 8 células. C) Epibolia, blastómeras profundas con morfología triangular/romboidal en dispersión activa. D) Diapausa IA, células dispersas y redondeadas. E) Diapausa IB, células redondeadas formando pequeños grupos. F) Reagregado de tipo II, las células comienzan a agregarse previo a la internalización del endomesodermo. Se señalan

con flechas las blastómeras profundas y con asterisco (\*) el reagregado. Modificado de Arezo y col. (2017).

### **3.3 Análisis moleculares**

#### **a) Extracción de ARN**

Los embriones se colocaron en grupos de 3, 9, 10 o de 20 en tubos de 1,5 ml, para obtener triplicados de los estadios antes mencionados (figura 8, tabla 2). En cada tubo se agregó el reactivo comercial TRIZOL (Invitrogen) en una relación: 0,5 mL de TRIZOL cada 10 embriones. En todos los casos, se homogeneizaron los embriones en los tubos por acción mecánica de un émbolo para tubo de 1,5 mL, se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

El material se descongeló a temperatura ambiente, se agregó cloroformo (0,2 mL por 1 mL de TRIZOL) y se agitó durante 15 segundos. Se centrifugó a 12.000g, 15 minutos a 4 °C para la separación de las fases. Se extrajo cuidadosamente la fase acuosa que contenía el ARN, a la cual se le agregó isopropanol (0,5 mL por 1 mL TRIZOL) y 1 µL de Dextrano Sigma 20 µg/mL (para optimizar la visualización del pellet) y se centrifugó a 12.000g, 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido fue lavado con 1 mL de etanol 75%, centrifugando a 12.000g, 5 minutos a 4°C y secado con el ambiente. Finalmente el ARN fue resuspendido en agua Amresco libre de nucleasas a 55-60°C durante 10 minutos en bloque térmico.

#### **b) Estimación de la calidad y concentración del ARN extraído**

La integridad del ARN fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y 1/10.000 del intercalante no mutagénico GelRed™ (Biotum/Nº de catálogo 41003), en solución tampón Tris-Acetato\_EDTA (TAE) 1X. Se cargaron 4 µL de muestra y 3 µL de tampón de carga específico para ARN (Formamida 70%, Azul Bromofenol 0,1%). La corrida electroforética se realizó en TAE 1X a 80 V durante 20 minutos. Para la visualización de las muestras en el gel se utilizó transiluminador ultravioleta y se registraron fotográficamente.

Para estimar la concentración de ARN se realizó medición en equipo NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo), en ng/µL, junto con el cociente de Absorbancia 260/280.

### c) Retrotranscripción: síntesis de ADN copia a partir de ARN total extraído

Para la retrotranscripción se utilizó la enzima Superscript III Reverse transcriptase (Invitrogen/ N° catálogo 18080-044) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Por cada muestra se incubó durante 5 minutos a 65 °C la mezcla de: ARN total (10 µg a 5 µg) con 1 µL de oligo dT20 50 µM (Invitrogen), 1 µL de dNTPs 10 mM y agua Amresco libre de ARNasas hasta completar 13 µL. Se colocó la mezcla 1 minuto en hielo, luego se adicionaron: 4 µL de solución tampón 5X, 1 µL DTT 0.1 M, 1 µL RNaseOUT (inhibidor de ARNasas Invitrogen) y 1 µL de enzima retrotranscriptasa. Por último la reacción se produjo en el termociclador a 50 °C durante 1 hora y finalizó inactivando la enzima a 70 °C durante 15 minutos. Se utilizó un termociclador Multigene II, de Labnet International, Inc. En la figura 9 se muestra un esquema del procedimiento desde la fijación hasta la síntesis del ADN copia.



**Figura 9:** Procesamiento realizado en las muestras a partir de embriones viables hasta la obtención del ADNc.

### d) Evaluación de la síntesis de ADN copia (ADNc)

Para evaluar si ocurrió síntesis de ADNc y posible contaminación con ADN genómico (en la extracción de ADN) en las muestras se utilizó el método de amplificación de una región codificante del gen de  $\beta$  Actina (un gen de expresión constitutiva), que si dicho gen es genómico al amplificarlo el mismo posee intrones, mientras que el gen derivado del ARN mensajero no los tiene. La amplificación se realizó utilizando una pareja de cebadores específicos diseñados para el pez cebra: *Danio rerio* (número de acceso del GenBank AF057040, Barrallo y col., 1999), que amplifican una región codificante del gen de la  $\beta$  Actina de *A. charrua* (Arezo y col., 2014).

$\beta$ -actina-RSA-1: 5' GCCGGTTTTGCTGGAGATGAT 3' Tm: 70 °C

$\beta$ -actina-RSA-2: 5' ATGGCAGGGGTGTTGAAGGTC 3' Tm: 70 °C

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Multigene II, bajo las condiciones de amplificación que se detallan a continuación: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de 32 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de

hibridación a 55 °C y 1 minuto de extensión a 72 °C. Luego una extensión final de 7 minutos a 72 °C. La mezcla de reacción se realizó agregando a cada tubo 10,4 µL de agua Amresco, 1,5 µL de tampón (Taq) 10X, 0,6 µL de Cloruro de Magnesio (50 mM), 0,3 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de cada cebador (10 µM) y 0,2 µL de enzima Taq DNA polimerasa 5 UE/µL (Invitogen). Al final se agregó 1 µL de cada ADN copia a evaluar. Se preparó un control negativo de la reacción para descartar posibles contaminantes en los reactivos utilizados que contenía: la mezcla de reacción y 1 µL de agua Amresco sustituyendo el ADNc. El volumen final de reacción fue de 15 µL.

Los productos de las reacciones de amplificación se analizaron en geles de agarosa (Biotools) al 1,5%, en TAE 1X, a 80 V durante 30 minutos y agregando a la corrida el marcador de masa molecular (Mass Ruler DNA ladder SM0403 Fermentas). La visualización se realizó mediante el agente intercalante GelRed™ 0,5% (Biotum) en transiluminador ultravioleta, tomándose registro fotográfico.

## **e) Amplificación del fragmento del gen de *cordina-2***

A partir de las muestras de ADNc de cada estadio, se amplificó el fragmento del gen de *cordina-2* por triplicado. La amplificación de este fragmento se realizó utilizando una pareja de cebadores específicos diseñados a partir del genoma de referencia (Gajardo y col., en preparación) del pez anual: *Austrolebias charrua*. Los cebadores fueron analizados utilizando el software libre Oligo Analyzer (<http://www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware>). Se seleccionaron los pares de cebadores con menor probabilidad de generar horquillas, homodímeros y/o heterodímeros y se enviaron a sintetizar a la empresa coreana Macrogen (Corea).

Cordin2F6: 5' -ACG TCG AAA CAA GCG CTC AA- 3' Tm: 58,4 °C

Cordin2R6: 5' -GCT GAG CAT TCA CAG TGG CAT- 3' Tm: 61,3 °C

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Multigene II, bajo las condiciones de amplificación: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de 35 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de hibridación a 56 °C y 2 minutos de extensión a 72 °C. Luego una extensión final de 15 minutos a 72 °C. La mezcla de reacción se realizó agregando a cada tubo 10,4 µL de agua Amresco, 1,5 µL de tampón (Taq) 10X, 0,6 µL de Cloruro de Magnesio (50 mM), 0,3 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de cada cebador (10 µM) y 0,2 µL de enzima Taq DNA polimerasa 5 UE/µL (Invitogen). Al final se agregó 1 µL de cada ADN copia a evaluar. Se realizó un control negativo de la reacción para descartar posibles contaminantes en los reactivos utilizados que contenía la mezcla de reacción y 1 µL de agua Amresco sustituyendo el ADNc. El volumen final de reacción fue de 15 µL.

Los productos de las reacciones de amplificación se analizaron en geles de agarosa de igual manera que en el ítem anterior.

## **f) Remplificación del fragmento del gen de *cordina-2* y purificación de los productos de PCR para secuenciación**

Se reamplificó el fragmento de *cordina-2* perteneciente a la muestra biológica que contenía el empaquetado materno (embriones en etapa de 1-16 células).

Se llevó a cabo en las mismas condiciones que la amplificación previa (ítem 4) pero variando la temperatura de hibridación en el termociclador, (57 °C, 30 segundos). La mezcla de reacción contenía los mismos componentes descritos en el punto 4, pero en este caso se agregó 1 µL del producto de amplificación de la reacción previa. Se realizó esta reamplificación por cuadruplicado, con el objetivo de obtener suficiente cantidad de producto para secuenciar, también se incluyó un control negativo idéntico al del paso protocolo de amplificación descrito en el punto 4.

Los productos de las reacciones de amplificación se analizaron en geles de agarosa (Biotools) al 1,5%, en TAE 1X, de la misma manera descrita previamente en el ítem 4.

Para confirmar que los productos obtenidos a partir de las reacciones de amplificación y reamplificación corresponden al fragmento *cordina-2* de *A. charrua* se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TAE 1X, en las mismas condiciones que las corridas electroforéticas anteriores, pero aumentando el tiempo de corrida a 1 hora. Se utilizó GelGreen™ 0,5% (Biotum) como agente intercalante. Se realizó el recorte de las bandas de amplificación con pipetas Pasteur de plástico estériles usadas como sacabocado. Luego las bandas se purificaron mediante el kit GFX PCR DNA Gel Band purification kit (General Electric), según las especificaciones del fabricante. Los productos purificados fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (secuenciador automático ABI3130 Applied Biosystems).

## **g) Amplificación de un fragmento extenso de *cordina***

A partir de las muestras de ADNc por triplicado de cada estadio, se amplificó el fragmento de *cordina* extenso utilizando cebadores para los fragmentos de *cordina-2* y de *cordina-1*, así como también la secuencia que los separa, que es conocida en otras especies. La amplificación de este fragmento se realizó utilizando la combinación de cebadores específicos diseñados de manera que el directo corresponde al fragmento *cordina-2* y el reverso a *cordina-1* (ver figura 13), a partir de las secuencias obtenidas del genoma de referencia (Gajardo y col., en preparación) para el pez anual *Austrolebias charrua*. Los cebadores para amplificar *cordina-1* fueron analizados utilizando el software libre Oligo Analyzer (<http://www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware>). Se seleccionaron los pares de cebadores con menor probabilidad de generar horquillas, homodímeros y/o heterodímeros y se enviaron a sintetizar a la empresa coreana MacroGen (Corea).

Cordin2F6: 5' -ACG TCG AAA CAA GCG CTC AA- 3' Tm: 58,4 °C

Cordin1R4: 5' -AGC TGC TTA CAT CAC ACC AGC- 3' Tm: 61,3 °C

Las reacciones se llevaron a cabo en el mismo termociclador, bajo las siguientes condiciones de amplificación: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 35 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de hibridación a 57 °C y 2 minutos de extensión a 72 °C. Luego una extensión final de 15 minutos a 72°C. La mezcla de reacción (Mix) y la siembra de la muestra fue idéntica a la amplificación anterior . Se realizó un gel de electroforesis 1,5%, según se especificó previamente (item 4).

Con el objetivo de reamplificar los productos se eligieron las réplicas biológicas que mostraron mejores resultados de amplificación (presencia de bandas más intensas en el gel). No se incluyó la muestra de materno ya que en las condiciones ensayadas no se detectó amplificación de este fragmento de ADNc.

## **h) Reamplificación del fragmento y purificación de los productos de PCR para secuenciación**

Los fragmentos amplificados de los estadios anteriormente mencionados se reamplificaron en las mismas condiciones de amplificación (ítem 6) pero variando la temperatura de hibridación en el termociclador (58 °C, 30 segundos). También se repitió la composición de la mezcla de reacción, agregando 1 µL del producto de amplificación previa. Se realizó esta reamplificación por cuadruplicado para cada estadio, con el fin de obtener suficiente cantidad de producto para secuenciar. El control negativo se realizó según el protocolo de amplificación descripto.

Los productos de las reacciones de amplificación se analizaron en geles de agarosa Biotools al 1,5%, en TAE 1X, de la misma manera que en el paso 4.

Los productos obtenidos mediante la reamplificación se separaron mediante electroforesis de agarosa al 2% y recorte de bandas según paso 5 del protocolo, para posterior purificación con Kit GFX PCR DNA Gel Band purification kit (General Electric). Los productos eluidos fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo, en el secuenciador automático 3500 Genetic Analyzer Applied Biosystems, con ambos cebadores de cada par.

## **i) Análisis de secuencias**

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X, Kumar y col., 2018) y Sequencher 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EE.UU.1988). En una primera instancia se procesó la secuencia de nucleótidos en el electroferograma derivado de la secuenciación de manera manual para optimizar los resultados obtenidos editando la secuencia en caso de ser necesario.

Luego se realizó la búsqueda de secuencias nucleotídicas homólogas en la base de datos de secuencias del NCBI (GenBank), mediante el algoritmo de megaBLAST para la búsqueda de secuencias altamente similares (Altschul y col., 1990).

Posteriormente se realizó el análisis comparativo entre las secuencias obtenidas junto a las 16 secuencias con mayor homología encontradas en el GenBank (códigos de rastreo: ver tabla 1), para cada gen mediante el BLAST y las secuencias de ARNm de *D. rerio* correspondientes a cada gen seleccionadas de forma manual en la misma base de datos. Se utilizó el método de múltiples alineamientos CLUSTALW del programa MEGA X (<https://www.megasoftware.net>; Kumar y col., 2018) para alinear las secuencias de la matriz de datos. A partir de los alineamientos se realizaron los análisis filogenéticos con el método de “maximum likelihood estimation”, basado en el número de diferencias entre las secuencias de la matriz de datos. El soporte estadístico de los nodos generados en cada una de las filogenias fue obtenido aplicando el método de “bootstrap” (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas.

**Tabla 2:** Códigos de rastreo de secuencias alineadas de cordina en los árboles filogenéticos.

<b>Especie</b>	<b>ARNm</b>	<b>Proteína</b>
<i>Kryptolebias marmoratus</i>	XM_017441445	XP_017296934
<i>Austrofundulus limnaeus</i>	XM_014025695	XP_013881147.1
<i>Nothobranchius furzeri</i>	XM_015952125	XP_015807611
<i>Lates calcarifer</i>	XM_018684060.1	XP_018539576
<i>Xenopus leavis</i>	XM_018263539.1	NP_001081778
<i>Danio rerio</i>	NM_130973.3	NP_571048.2
<i>Mus musculus</i>	NM_001278041.1	NP_001264970.1
<i>Puecilia latipinna</i>	XM_015018474	XP_014873960
<i>Xiphophorus maculatus</i>	XM_005805884	XP_005805941
<i>Fundulus heteroclitus</i>	XM_012863237	XP_021172550
<i>Oryzias latipes</i>	XM_023961777	XP_023817545
<i>Oryzias melastigma</i>	XM_024277957	XP_024133725.1
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XM_021588347	XP_021444022
<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_005461007	XP_005461064949
<i>Physeter catodon</i>	XM_028491802.1	XP_028347603

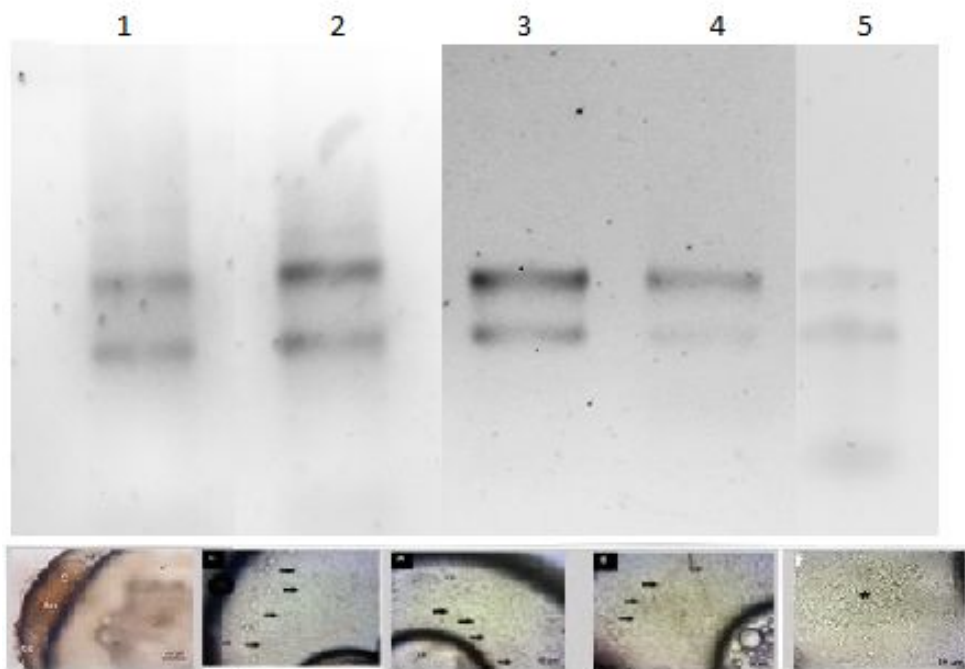


A partir de estos alineamientos se realizó la traducción teórica de las secuencias nucleotídicas a secuencia aminoacídica de las distintas isoformas de *cordina* de cada especie analizada, con las que se realizó la búsqueda de dominios proteicos conservados en la base de datos del NCBI mediante la función BLASTp. Luego, los alineamientos fueron exportados y convertidos a formato clustal en el programa CLUSTAL X (Larkin y col., 2007) para obtener información adicional sobre el grado de conservación de las secuencias obtenidas mediante la comparación con secuencias de otros teleósteos que se incluyeron en los alineamientos.

## 4. Resultados y discusión:

### 4.1) Valoración del ARN total

La integridad de los ARNs totales obtenidos se evaluó mediante la electroforesis de las muestras en geles de agarosa al 1,5% (Fig. 10) y la concentración de las mismas se midió mediante nanodrop (tabla 2).



**Figura 10: Extracción de ARN total en embriones de *Austrolebias charrua*.** Gel de agarosa al 1,5%, teñido con GelRed 1/10.000. El primer carril del gel (carril 1) corresponde a la muestra de ARN

extraído de estadio materno (MD2), el carril 2 a la muestra de estadio de epibolia (ED2), carril 3 a la muestra de diapausa IA (DIA1), el carril 4 a la muestra diapausa IB (DIB1), y por último el carril 5 corresponde a la muestra de estadio de reagregado I-II (Rmix). Las figuras inferiores corresponden a imágenes de microscopía óptica de los estadios analizados (fig. 8).

**Tabla 2: Muestras utilizadas para la extracción del ARN total.** Se indican los estadios analizados, el número de embriones de cada una, el volumen de TRIZOL empleado en la fijación, el volumen final de ARN total extraído y la concentración estimada de ARN utilizado en la reacción de retrotranscripción. Los valores de concentración de ARN fueron calculados a partir del valor de concentración obtenido en el NanoDrop (mediciones posiblemente sobreestimadas). Los valores indicados con \* fueron calculados a partir de BioAnalyzer.

Muestra (estadio)	Número de embriones	TRIZOL ( $\mu\text{L}$ )	ARN total ( $\mu\text{L}$ )	Concentración de ARN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )
MD1 (1-16c)	10	500	10	45
MD2 (1-16c)	20	1000	20	200
MN1 (1-16c)	10	500	10	274
ED1(Epibolia 80-100%)	10	500	10	889
ED2(Epibolia 80-100%)	20	1000	20	111
EN1(Epibolia 80-100%)	20	1000	20	104
DIA 1 (diapausa IA)	9	450	15	38*
DIA 2 (diapausa IA)	9	450	15	64*
DIA 3 (diapausa IA)	9	450	15	50*
DIB 1 (diapausa IB)	9	450	15	66*
DIB 2 (diapausa IB)	9	450	15	88*
DIB 3 (diapausa IB)	3	150	15	18*
R1 (reagregado I-II)	20	1000	20	267
R2 (reagregado I-II)	20	1000	20	169
Rmix (reagregado I-II)	10	500	10	52

A partir de la figura 10 es posible concluir que los ARNs obtenidos estaban íntegros y no mostraron indicios de degradación. Su integridad se aprecia claramente en todas las muestras donde se observan dos bandas por cada carril, correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S. Las bandas inferiores (muy tenues) corresponden a los ARN de

transferencia ubicados por detrás del frente de corrida. Es posible observar un sombreado por debajo de las bandas de ARN 28S y 18S perteneciente a los ARN mensajeros. Cabe mencionar que la extracción de ARN total también fue exitosa en las otras dos réplicas biológicas procesadas (datos no mostrados aquí).

**Tabla 3: Estimación de la concentración de ARN.**

Se estimó mediante Nanodrop las concentraciones de los estadios materno, epibolia y reagregado y mediante BioAnalyzer se midió la concentración de diapausa I A y B (representadas con \*).

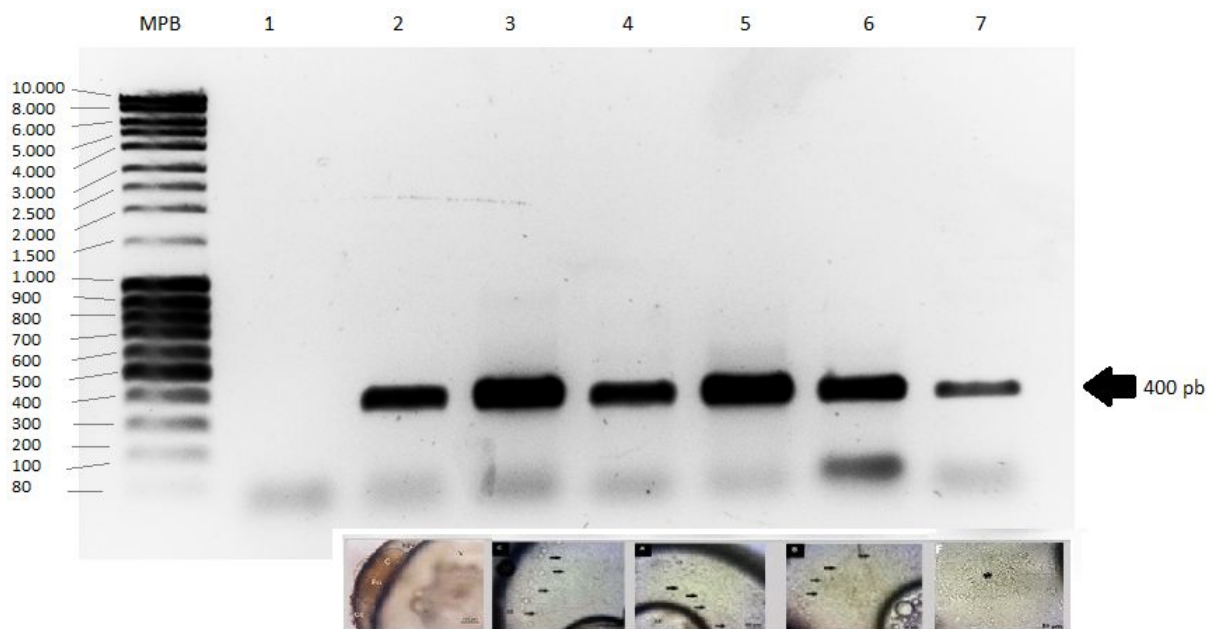
Estadio	Concentración en (ng/ $\mu$ L)
Materno	200,0
Epibolia	111,1
Diapausa IA	25*
Diapausa IB	33*
Reagregado	267,4

Estos resultados permitieron utilizar los ARNs obtenidos como molde para la siguiente etapa de retrotranscripción.

#### 4.2) Síntesis de ADN copia y evaluación de la retrotranscripción

El primer objetivo de este paso es evaluar si ocurrió (o no) síntesis de ADNc a partir del ARN total y evidenciar si existe contaminación con ADN genómico utilizando los cebadores diseñados para un fragmento codificante del gen beta-actina de *Danio rerio*. El análisis de la electroforesis en agarosa reveló un amplicón de aproximadamente 400 pares de bases para todos los ADNc sintetizados (figura 11). Estos resultados concuerdan con los reportados para beta-actina de *D. rerio* (banda migratoria de 340 pb, Barrallo y col., 1999). En trabajos previos del laboratorio se confirmó la identidad de la banda de beta-actina mediante secuenciación de la misma (Arezo y col., 2014).

Se observa también la ausencia de bandas en el control negativo (figura 11), lo que indica que los productos de amplificación en las muestras no provienen de contaminación de los reactivos utilizados. Es importante mencionar la ausencia de un amplicón de 700 pb que contiene un intrón en el gen que codifica para la actina. Este hecho permite inferir que no hay contaminación con ADN genómico de las muestras analizadas (Arezo y col., 2014).

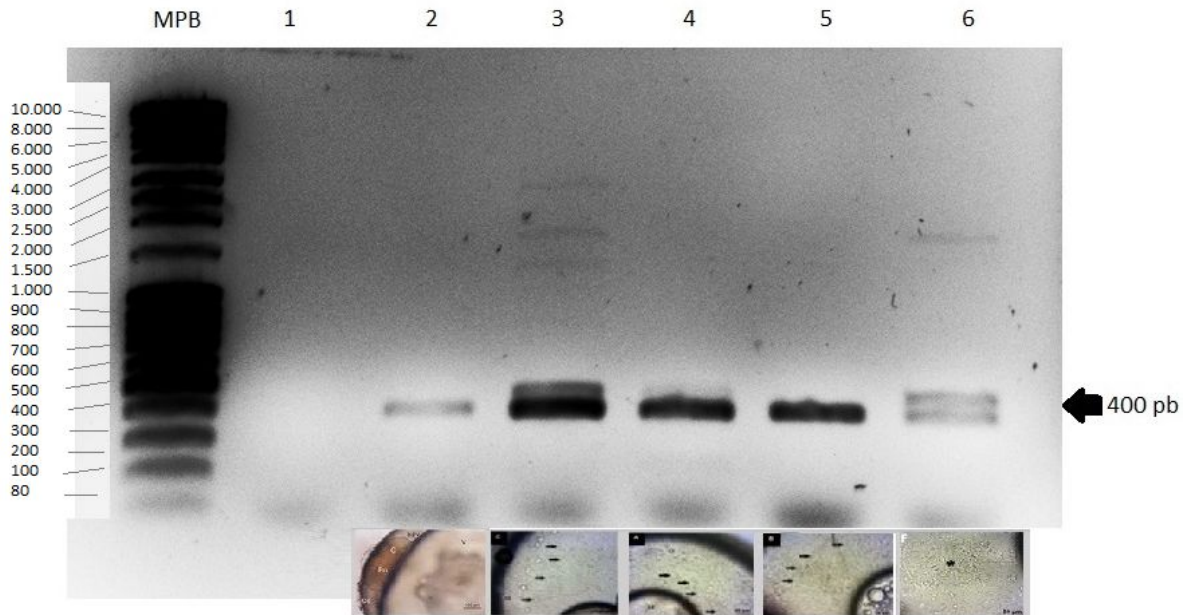


**Figura 11: Electroforesis en gel al 1,5% teñido con GelRed 1/10.000 de los productos de amplificación con los cebadores para amplificar beta-actina.** MPB: marcador de pares de bases, Carril 1: control negativo, Carril 2: ADNc de estadio materno (MD2), Carril 3 ADNc de epibolia (ED2), Carril 4: ADNc de diapausa IA (DIA1), Carril 5: ADNc de diapausa IB (DIB1), Carril 6: ADNc de reagregado I-II (Rmix) y Carril 7: control positivo de muestra de ADNc a partir de ARN total de hígado de *A. charrua* hembra adulta diluido 1/20, como control positivo. En cada carril a los 300 pb se observan las bandas de los dímeros de cebadores de cada producto de PCR. Las figuras inferiores corresponden a imágenes de microscopía óptica de los estadios analizados (fig. 8).

### 4.3) Amplificación de los genes de interés

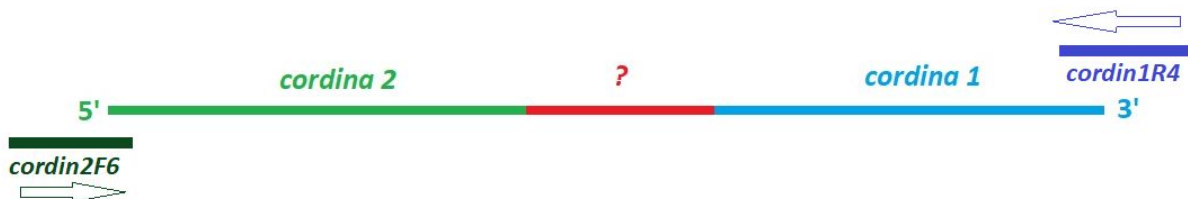
Una vez confirmada la integridad y calidad de los ADNc obtenidos, se realizaron los ensayos de amplificación con los cebadores específicos para el gen de interés que en este caso fue *cordina*. En una primera instancia se logró la amplificación del fragmento denominado *cordina-2* en todos los estadios de estudio, con sus correspondientes cebadores (detallados en Materiales y Métodos).

El análisis del registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa (figura 12), reveló un amplicón de aproximadamente 400 pares de bases en cada estadio. También se detectó que existen en algunos estadios una doble banda y hasta múltiples bandas en algunos casos (estadios de epibolia y reagregado). Este resultado podría explicarse por la existencia de amplificación inespecífica o eventos como el procesamiento alternativo (corte y empalme alternativo del transcrito primario). Con respecto a las múltiples bandas de mayor tamaño, en el orden de los 1000 pares de bases, una posibilidad podría ser la amplificación inespecífica y para esto podría subirse la temperatura de hibridación de cebadores y confirmarlo (figura 12).



**Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con GelRed 1/10.000, de los productos de amplificación de *cordina 2***

En el primer carril del gel se observa el marcador de pares de bases (MPB). En los siguientes, Carril 1: control negativo, Carril 2: ADNc de estadio materno (MD2), Carril 3: ADNc de epibolia (ED2), Carril 4: ADNc de diapausa IA (DIA1), Carril 5: ADNc de diapausa IB (DIB1), Carril 6: ADNc de reagregado I-II (RN1). En cada carril por debajo de cada producto de PCR correspondientes a las bandas correspondientes a los cebadores. Las figuras inferiores corresponden a imágenes de microscopía óptica de los estadios analizados (fig. 8).



**Figura 13: Esquema de los fragmentos de cordina presentes en el transcriptoma de referencia de *Austrolebias charrua* (Gajardo y col., en preparación). *Cordina 2* y *1* en sentido 5'-3' son secuencias conocidas con sus respectivos cebadores (*cordin2F6* y *cordin1R4*) y el fragmento señalado en rojo está ausente en la información transcriptómica disponible**

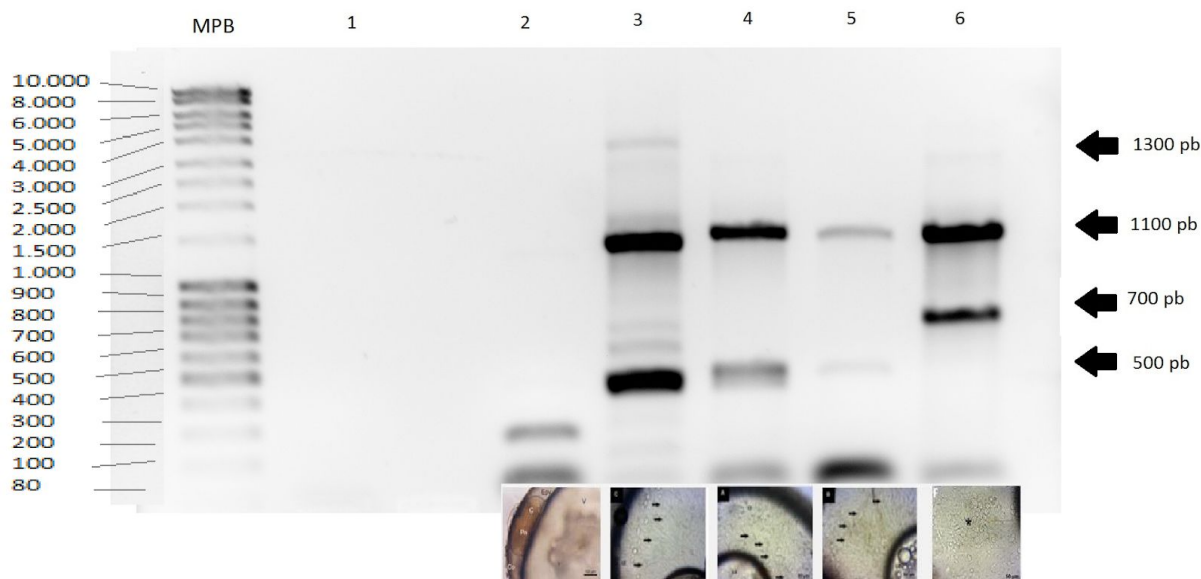
Con el objetivo de complementar la información de secuencia ausente en los datos transcriptómicos (figura 13), se realizaron PCR, utilizando cebadores: *Cordin2F6* y *Cordin1R4* (detallados en Materiales y Métodos). El producto amplificado comprende *cordina 2*, *cordina 1*, y la región incognita entre ellos.

El análisis de la electroforesis en gel de agarosa (figura 14), reveló dos amplicones (1100 y 500 pares de bases) en todos los estadios, excepto el estadio de materno.



**Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con gelRed 1/10.000 de los productos de amplificación de *cordina extensa*.** En el primer carril del gel está el marcador pares de bases (MPB), luego, Carril 1: control negativo, Carril 2: ADNc de estadio materno (MD2), Carril 3: ADNc de epibolia (ED2), Carril 4: ADNc de diapausa IA (DIA1), Carril 5: ADNc de diapausa IB (DIB1), Carril 6: ADNc dec reagregado I-II (R22). El fragmento extenso de cordina se encuentra en los 1100 pb (flecha de arriba) y en el entorno de los 500 pb se encuentra el segundo fragmento (flecha de abajo). Las figuras inferiores corresponden a imágenes de microscopio óptico de los estadios analizados (fig.8).

Para confirmar la ausencia de amplificación en el estadio materno y presencia de esas bandas en los estadios analizados, se reamplificó el producto de PCR obtenido en cada estadio, usando estos productos como molde para la reacción. La figura 15 muestra que, además de las mismas bandas obtenidas en la primera reacción de amplificación de *cordina extensa*, no se amplifica el fragmento en la muestra estadio materno en estas condiciones. Se observa la aparición de bandas extra que pueden ser amplificaciones inespecíficas (por ejemplo: estadio de epibolia, carril 3 de la figura 15) a nivel de las 1300 y 500 pares de bases, previamente amplificadas durante la primera reacción de amplificación. Otra diferencia que cabe destacar es la aparición de un fragmento de 700 pb, en el estadio de reagregado I-II, (mayor tamaño que el fragmento de 500 pb observado en los otros estadios). Este hallazgo genera mas preguntas sobre el procesamiento alternativo que podría experimentar este gen en este estadio del desarrollo, sin embargo, no es posible responderlas en el marco de esta tesina.



**Figura 15:** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con gelRed 1/10.000 de la reamplificación del producto obtenido en la amplificación del fragmento de *cordina extensa*. Primer carril se encuentra el marcador de pares de bases (MPB), luego en el Carril 1: control negativo, Carril 2: ADNc de estadio materno (MD2), Carril 3: ADNc de epibolia (ED2), Carril 4: ADNc de diapausa IA (DIA1), Carril 5: ADNc de diapausa IB (DIB1), Carril 6: ADNc de reagregado I-II (R22). Las figuras inferiores corresponden a imágenes de microscopía óptica de los estadios analizados (fig. 8).

Con respecto a la existencia de dos bandas, al igual que en el caso anterior, podría significar que la banda de menor tamaño, corresponde a una amplificación inespecífica o específica (se podría también aumentar la temperatura de hibridación en la PCR para deducir esto y si persiste dicha banda, secuenciarla). Es factible que existan ARNs con regiones comunes y otras divergentes que generarían amplicones de tamaño similares. También es factible que sea otra isoforma del gen *cordina*, referido a un evento de corte y empalme alternativo o resultado de un evento de transposición que involucró este gen. Esta posibilidad surge de la evidencia que refleja las características del genoma de *Austrolebias charrua*. Este genoma presenta el doble de tamaño que el del resto de los rivúlidos y tiene gran cantidad de elementos transponibles (García y col., 2015).

#### 4.4) Secuenciación de los productos de amplificación

En la tabla 4 se muestra el resumen de los resultados obtenidos en cada estadio, réplica biológica y cebadores utilizados. Se indican además las bandas seleccionadas y enviadas a secuenciar.

**Tabla 4:** Resumen de los resultados obtenidos en las distintas réplicas biológicas a partir de la amplificación *in vitro* utilizando los cebadores diseñados para *cordina* en las versiones *cordina 2* y

*cordina extensa*, con sus respectivos cebadores. La **X** indica presencia y el - ausencia de la banda para cada una de las muestras. A su vez las bandas que fueron purificadas y enviadas a secuenciar están indicadas con la letra **(S)**.

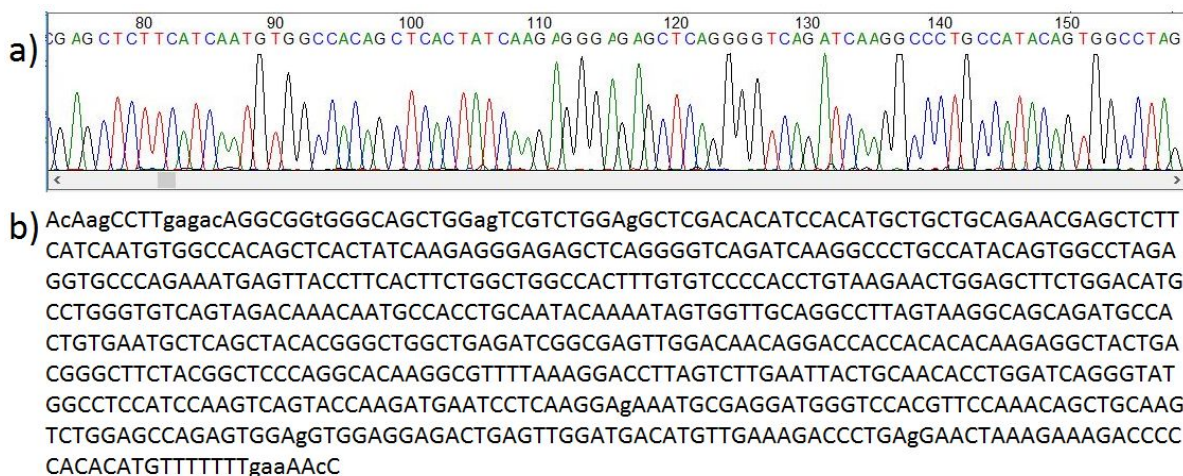
<b>Cebadores</b>	Cordin2R6 y Cordin2F6	Cordin2F6 y Cordin1R4	Cordin2F6 y Cordin1R4	Cordin2F6 y Cordin1R4
<b>Muestra</b>	<b>Banda de 400pb</b>	<b>Banda 500pb</b>	<b>Banda 700pb</b>	<b>Banda 1100pb</b>
MD1 (1-16c)	-	-	-	-
MD2 (1-16c)	<b>XS</b>	-	-	-
MN1 (1-16c)	-	-	-	-
ED1(Epibolia)	-	<b>X</b>	-	<b>X</b>
ED2(Epibolia)	<b>X</b>	<b>XS</b>	-	<b>XS</b>
EN1(Epibolia)	<b>X</b>	<b>X</b>	-	<b>X</b>
DIA1 (diapausa IA)	<b>X</b>	<b>XS</b>	-	<b>XS</b>
DIA2 (diapausa IA)	<b>X</b>	<b>X</b>	-	<b>X</b>
DIA3 (diapausa IA)	<b>X</b>	<b>X</b>	-	<b>X</b>
DIB1 (diapausa IB)	<b>X</b>	<b>XS</b>	-	<b>XS</b>
DIB2 (diapausa IB)	<b>X</b>	<b>X</b>	-	<b>X</b>
DIB3 (diapausa IB)	<b>X</b>	<b>X</b>	-	<b>X</b>
R1 (reagregado I-II)	-	-	-	-
R22 (reagregado I-II)	<b>X</b>	-	<b>XS</b>	<b>XS</b>
Rmix (reagregado I-II)	<b>X</b>	-	<b>X</b>	<b>X</b>

Los resultados de la secuenciación para *cordina-2* en el estadio de materno (MD2), evidenciaron la presencia de más de un fragmento de ADN con el mismo tamaño (es decir, no se logró resolver completamente, ya que el electroferograma demostró la presencia de más de una secuencia amplificada). Por este motivo no fue posible analizar esta secuencia. Para analizar cada fragmento de ADN obtenido en el estadio materno de *cordina 2* por separado, es necesario clonar los fragmentos obtenidos con el fin de obtener secuencias únicas de cada clon y así lograr el análisis de cada una de ellas, objetivo que excede la propuesta de este trabajo.



El análisis del producto de amplificación de *cordina* fragmento extenso, se realizó de la misma forma que con los productos de amplificación de *cordina 2*. Se envió a secuenciar en un solo sentido de la doble hebra de ADN.

Los resultados preliminares del cromatograma muestran que el fragmento extenso (la banda de 1100 pb) fue secuenciado de manera exitosa en los estadios donde fue amplificada (epibolia, diapausas y reagregado). Los resultados preliminares del cromatograma, muestran que se logró obtener secuencias únicas en cada análisis de secuenciación, pero también se debió realizar una edición de la secuencia de forma manual, que consiste en sustituir las bases identificadas con N, que el programa del secuenciador no logró identificar en la secuencia o no pudo resolver con las señales que fueron emitidas en el proceso y que, observando los colores de los picos del cromatograma es posible adjudicar. Las secuencias fueron cortadas en los extremos ya que al comienzo y al final de la secuenciación las señales no son claras ni fiables. Este proceso de edición fue realizado en el programa Mega X (figura 16).



**Figura 16: Electroferograma y secuencia obtenida a partir del ADNc de *cordina* extensa**

- La imagen representa el cromatograma de la secuenciación en el programa Mega-X (<https://www.megasoftware.net>; Kumar y col., 2018) (solo un segmento de la secuencia obtenida).
- Secuencia completa del fragmento extenso de *cordina*, correspondiente al producto de amplificación del estadio epibolia. Las bases nitrogenadas escritas en minúsculas fueron corregidas manualmente en el programa Mega-X en el análisis de secuencia.

El fragmento más corto del producto de amplificación (banda ubicada entre 500 y 700 pares de bases) de *cordina* extensa, de la misma manera que ocurrió con *cordina 2*, no se logró resolver su secuencia debido a que el electroferograma presentaba información de varias secuencias. Por este motivo el análisis de secuencia de esa variante del gen *cordina* extenso o bien amplificaciones inespecíficas y se tendrá que repetir la PCR para estas muestras a mayor temperatura de hibridación y observar los resultados, esto será abordado en futuros estudios.

#### **4.5) Análisis preliminar de la secuencia de *cordina extensa***

La secuencia obtenida se sometió a la función BLASTn del programa BLAST 2.2.22 (Altschul y col.,1990). El análisis comparativo con el conjunto de secuencias presentes en el GenBank presentó la mayor identidad con el ARNm de *cordina* de *Kryptolebias marmoratus* (88.08% y cobertura: 98%) un Cyprinodontiforme no anual y en segundo lugar con el ARNm de *cordina* de *Austrofundulus limnaeus*, con una identidad de 86.67% y cobertura idéntico al anterior (Figura 17). Estos resultados de alineación confirman que la secuencia obtenida correspondiente al producto de amplificación del ARNm de *cordina* de *A. charrua*, dada la alta similitud de secuencias con otras especies entre ellas las ya mencionadas.

**PREDICTED: Austrofundulus limnaeus chordin (chrD), transcript variant X5, mRNA**

Sequence ID: [XM\\_014025695.1](#) Length: 3947 Number of Matches: 1

Range 1: 1746 to 2390 [GenBank](#) [Graphics](#)

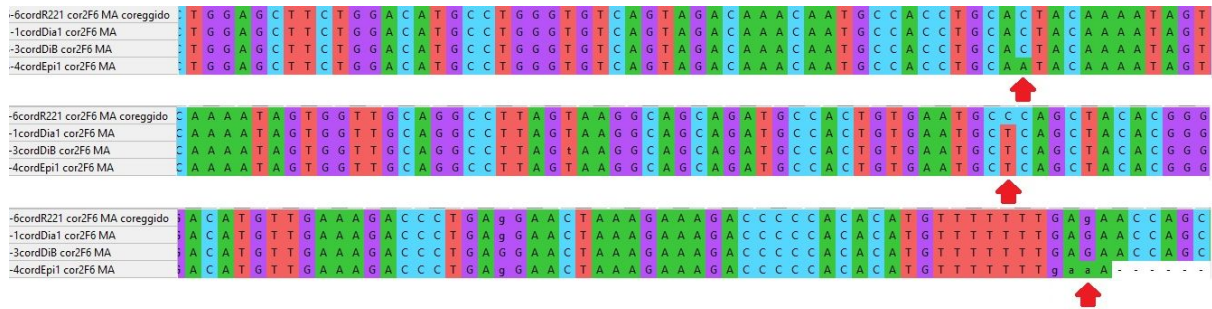
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
735 bits(382)	0.0	559/645(87%)	3/645(0%)	Plus/Plus
Query 12	GACAGGCGGTGGGCAGCTGGAGTCGTCTGGAGGCTCGACACATCCACATGCTGCTGCAGA	71		
Sbjct 1746	GACAGGCGGTGGGCAGCTGGAGTCGTCTGGAGGCTCGACACATCCACATGCTGCTGCAGA	1805		
Query 72	ACGAGCTCTTCATCAATGTGGCCACAGCTCACTATCAAGAGGGAGAGCTCAGGGGTGAGA	131		
Sbjct 1806	ATGAGCTCTTCATCAATGTGGCTACAGCACACAGCCAGGAGGGGGAACTCAGGGGCCAAA	1865		
Query 132	TCAAGGCCCTGCCATACAGTGGCCTAGAGGTGCCAGAAATGAGTTACCTTCACTTCTGG	191		
Sbjct 1866	TCAAGGCCCTGCCATACAGCGGCTTAGAGGTGCCAGACAGGATTGCCACCCCTCTAG	1925		
Query 192	CTGGCCACTTTGTGTCCACCTGTAAGAACTGGAGCTTCTGGACATGCCTGGGTGTGAG	251		
Sbjct 1926	CTGGCCACTTCTTGTCTCCACCAGTAAGAACAGGAGCTTCTGGCCACGCCTGGGTGTGAG	1985		
Query 252	TAGACAAACAATGCCACCTGCAATACAAAATAGTGGTTGCAGGCCTTAGTAAGGCAGCAG	311		
Sbjct 1986	TGGACAAACAGTGCCACCTGCACTATGAAATAGTAGTCGCGGGTCTGAGTAAGAAGGAGG	2045		
Query 312	ATGCCACTGTGAATGCTCAGCTACACGGGCTGGCTGAGATCGGCGAGTTGGACAACAGGA	371		
Sbjct 2046	ACGTCACGTGAATGCCACCTACATGGACTGGCTGAGATCGGGGAGCTGGACAACAGCA	2105		
Query 372	CCACCACACACAAGAGGCTACTGACGGGCTTCTACGGCTCCCAGGCACAAGGCGTTTTAA	431		
Sbjct 2106	GCACCACACACAAGAGGCTGCTGACGGGCTTCTATGGCTCCCAGGCTCAGGGAATTTTTAA	2165		
Query 432	AGGACCTTAGTCTTGAATTACTGCAACACCTGGATCAGGGTATGGCCTCCATCCAAGTCA	491		
Sbjct 2166	AGGACCTTAGTCTTGAATTACTGCAACACCTGGACCAGGGAACGGCCTTCATCCAAGTCA	2225		
Query 492	GTACCAAGATGAATCCTCAAGGAGAAAATGCGAGGATGGGTCCACGTTCCAAACAGCTGCA	551		
Sbjct 2226	GCACCAAGCTGAATCCCCAAGGAGAAAATACGAGGACGGGTCCATGTTCCAAACAGCTGCG	2285		
Query 552	AGTCTGGAGCCAGAGTGGAGGTGGAGGAGACTGAGTTGGATGACA---TGTTGAAAGACC	608		
Sbjct 2286	AGTCTGGAGCCGAGCCGAGGTGGAGGAGGCGGAGTTGGATGACACGTTGCTGACAGATC	2345		
Query 609	CTGAGGAACTAAAGAAAGACCCCAACATGtttttttGAAAACC 653			
Sbjct 2346	CCGAGGAACTAAAGAAAGACCCCAACACTTGTtttttttGAGAACC 2390			

**Figura 17: Alineamiento obtenidos por BLASTn del programa BLAST 2.2.22**

El alineamiento corresponde a la variante *x5* de *cordina* de *Austrofundulus limnaeus*, quien fue el segundo mejor alineamiento mediante este programa, con respecto al fragmento de *cordina* de *A. charrua* obtenido en este trabajo.

#### 4.6) Análisis comparativo entre las secuencias obtenidas

Se realizó un alineamiento entre las secuencias (epibolia, Diapausa IA, Diapausa IB y reagregado I-II) y se compararon utilizando el método de múltiples alineamientos de CLUSTALW del programa (<https://www.megasoftware.net>; Kumar y col., 2018). Este análisis reveló una identidad casi total (Figura 18).



**Figura 18: Análisis comparativo entre secuencias amplificadas de *cordina extensa*, alineamiento realizado mediante el algoritmo CLUSTALW.**

En la figura se muestra solo algunos lugares de alineación entre las secuencias de *cordina extensa* amplificada en cada estadio (epibolia diapausa IA, Diapausa IB, y reagregado II-III). Con flechas rojas se señalan las únicas diferencias entre nucleótidos en el tramo que se alinean las 4 secuencias.

Se identificaron tres variantes de *cordina* en *A. charrua* correspondiente a los estadios mencionados, las cuales pueden calificarse de mutaciones puntuales: la primera se trata de una transversión de citosina por adenina, y las últimas dos mutaciones refieren a transiciones de timina por citosina y guanina por adenina respectivamente.

Luego se realizó el análisis de la secuencia aminoacídica deducida a partir de las secuencias de *cordina extensa* mediante la función Blastx del programa BLAST 2.2.22 (Altschul y col., 1990). El análisis comparativo con las secuencias presentes en el GenBank presentó una mayor identidad con la proteína de *cordina* en *Kryptolebias marmoratus* y *Austrofundulus limnaeus* (Figura 19), al igual que el análisis a nivel nucleotídico.

### chordin isoform X1 [*Kryptolebias marmoratus*]

Sequence ID: [XP\\_017296933.1](#) Length: 958 Number of Matches: 1

Range 1: 491 to 708 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
399 bits(1026)	3e-130	Compositional matrix adjust.	196/218(90%)	203/218(93%)	1/218(0%)	-2
Query 652		QALRQAVGWSRLEARHIHMLLQNELFINVATAHYQEGELRGQIKALPYSGLVPRNELP			473	
		+ALRQAVGWSRLEARHIHMLLQNELFINVATAH QEGELRGQIKALPYSGLVPR+ELP				
Sbjct 491		KALRQAVGWSRLEARHIHMLLQNELFINVATAHSQEGELRGQIKALPYSGLVPRHEL			550	
Query 472		SLLAGHFVSPVVRTGASGHAWVSVDKQCHLQYKIVVAGLSKAADATVNAQLHGLAEIGEL			293	
		+LAGHFVSPVVRTGASGHAWVSVDKQCHL Y+IVV GLSKA DATVNA LHGLAEIGEL				
Sbjct 551		TPLAGHFVSPVVRTGASGHAWVSVDKQCHLHYEIVVEGLSKAEDATVNAHLHGLAEIGEL			610	
Query 292		DNRTTTHKRLLTGFYGSQAQGVLDKLSLELLQHLDOGMASIQVSTKMNPOGEMRGWVHVP			113	
		DN +T HKRLLTGFYGSQAQGVLDKLS ELLQHLDOG A IQVSTKMNPOGE+RG VHVP				
Sbjct 611		DNSSTAHRKRLLTGFYGSQAQGVLDKLSPELLQHLDOGTAFIQVSTKMNPOGEIRGQVHVP			670	
Query 112		NSCKSGARVEVEEELDDML-KDPEELKKDPHTCFFEN 2				
		NSC+SGA VEVEE ELDDML KDPEELKKDPHTCFFEN				
Sbjct 671		NSCRSGAAVEVEEELDDMLPKDPEELKKDPHTCFFEN 708				

### PREDICTED: chordin isoform X4 [*Austrofundulus limnaeus*]

Sequence ID: [XP\\_013881149.1](#) Length: 851 Number of Matches: 1

Range 1: 382 to 599 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
382 bits(982)	7e-125	Compositional matrix adjust.	187/218(86%)	197/218(90%)	1/218(0%)	-2
Query 652		QALRQAVGWSRLEARHIHMLLQNELFINVATAHYQEGELRGQIKALPYSGLVPRNELP			473	
		Q QAVGWSRLEARHIHMLLQNELFINVATAH QEGELRGQIKALPYSGLVPR LP				
Sbjct 382		QTSGQAVGWSRLEARHIHMLLQNELFINVATAHSQEGELRGQIKALPYSGLVPRQGLP			441	
Query 472		SLLAGHFVSPVVRTGASGHAWVSVDKQCHLQYKIVVAGLSKAADATVNAQLHGLAEIGEL			293	
		+LAGHF+SPPVVRTGASGHAWVSVDKQCHL Y+IVVAGLSK D TVNA LHGLAEIGEL				
Sbjct 442		TPLAGHFVSPVVRTGASGHAWVSVDKQCHLHYEIVVAGLSKEDVTVNAHLHGLAEIGEL			501	
Query 292		DNRTTTHKRLLTGFYGSQAQGVLDKLSLELLQHLDOGMASIQVSTKMNPOGEMRGWVHVP			113	
		DN +TTHKRLLTGFYGSQAQG+LKDLSLELLQHLDOG A IQVSTK+NPQGE+RG VHVP				
Sbjct 502		DNSSTTHKRLLTGFYGSQAQGILDKLSLELLQHLDOGTAFIQVSTKLNPOGEIRGRVHVP			561	
Query 112		NSCKSGARVEVEEELDD-MLKDPEELKKDPHTCFFEN 2				
		NSC+SGA EVEE ELDD +L DPEELKKDP+TCFFEN				
Sbjct 562		NSCESGAGAEVEEELDDTLLTDPEELKKDPNTCFFEN 599				

#### Figura 19: Blastx para la secuencia del estadio de epibolia

Alineamiento correspondiente a una región de la proteína cordina, el primero de la lista referente a la variante x1 de *cordina* de *Kryptolebias marmoratus*. El segundo alineamiento corresponde a la variante x4 de *cordina* de *Austrofundulus limnaeus*.

El porcentaje de homología obtenido entre secuencias aminoacídicas es mayor que la obtenida mediante el alineamiento de secuencias nucleotídicas, en este estudio a través del Blastx, que es del orden de 89,91 % con *Kryptolebias marmoratus* y cobertura de 99% y con *Austrofundulus limnaeus* de 85,89% e idéntica cobertura.

El análisis entre secuencias proteicas evidenció solo una variante de cambio de aminoácido en la cadena polipeptídica de cordina extensa y esta variante se observa en el estadio de epibolia (figura 20).

<input checked="" type="checkbox"/> 1. 6-cordR221 cor2F6 MA coregido	S	G	L	E	V	P	R	N	E	L	P	S	L	L	A	G	H	F	V	S	P	P	V	R	T	G	A	S	G	H	A	W	V	S	V	D	K	Q	C	H	L	H	Y	K	I	V	V	A	G	L	S	K	A	A	D	A	T	V	N	A	Q
<input checked="" type="checkbox"/> 2. 1-1cordDia1 cor2F6 MA	S	G	L	E	V	P	R	N	E	L	P	S	L	L	A	G	H	F	V	S	P	P	V	R	T	G	A	S	G	H	A	W	V	S	V	D	K	Q	C	H	L	H	Y	K	I	V	V	A	G	L	S	K	A	A	D	A	T	V	N	A	Q
<input checked="" type="checkbox"/> 3. 3-3cordDiB cor2F6 MA	S	G	L	E	V	P	R	N	E	L	P	S	L	L	A	G	H	F	V	S	P	P	V	R	T	G	A	S	G	H	A	W	V	S	V	D	K	Q	C	H	L	H	Y	K	I	V	V	A	G	L	S	K	A	A	D	A	T	V	N	A	Q
<input checked="" type="checkbox"/> 4. 4-4cordEpi1 cor2F6 MA	S	G	L	E	V	P	R	N	E	L	P	S	L	L	A	G	H	F	V	S	P	P	V	R	T	G	A	S	G	H	A	W	V	S	V	D	K	Q	C	H	L	Q	Y	K	I	V	V	A	G	L	S	K	A	A	D	A	T	V	N	A	Q



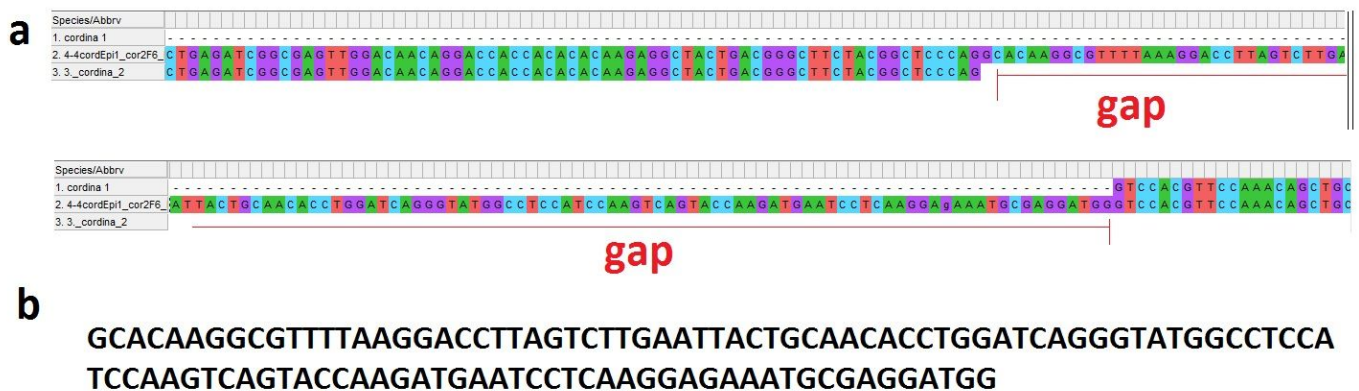
**Figura 20: Alineamiento entre secuencias aminoacídicas de *cordina* extensa, con el alineamiento realizado mediante el algoritmo CLUSTALW.**

La secuencia de aminoácidos alineada muestra una única variación de un aminoácido en la secuencia de *cordina* extenso en el estadio de epibolia señalado con una flecha roja.

Se alinearon nuevamente las secuencias de *cordina* extensa de los cuatro estadios en estudio (epibolia, diapausa IA, diapausa IB, y reagregado I, II) con la conversión de cada codón por el aminoácido correspondiente. Este análisis mostró que sólo una de las variantes evidenciadas previamente en la secuencia nucleotídica no es silenciosa. Esta variación sucede en el estadio de epibolia en la posición 158 desde la metionina inicial donde hay glutamina (Q), en lugar de histidina (H), que es el aminoácido que se encuentra en la secuencia aminoacídica de los demás estadios. Este evento podría ser interesante desde el punto de vista funcional de la proteína. Para saber si esta variante en este estadio específico tiene alguna función biológica relevante será retomado en futuros abordajes.

#### 4.7) Secuencia consenso de *cordina* extensa

Como se mencionó previamente, con el objetivo de completar la información de secuencia ausente de *cordina* de *A. charrua*, se realizó el análisis mediante la alineación en el programa MegaX de las secuencias conocidas a partir del análisis transcriptómico (*cordina* 1 y 2) y la generada en este trabajo (*cordina* extensa). Se obtuvo 100% de identidad entre *cordina* extensa y *cordina* 1 y 2, delimitando una región (gap) desconocida hasta el momento (figura 21a). esta nueva región, descrita en este trabajo presenta 114 pb y se muestra en la figura 21b. Este resultado permite completar la información de secuencia ausente en el fragmento de *cordina* con el fragmento amplificado y secuenciado en este trabajo (figura 21).



**Figura 21: Alineamiento de secuencias de cordina extenso y cordina 2 y 1 respectivamente.**

- a) Las 3 secuencias alineadas evidencian el sector donde falta información de secuencia denominado secuencia incógnita (gap), arriba *cordina 2*, y abajo *cordina 1*.
- b) secuencia completa de nucleótidos de la secuencia incógnita (gap).

#### 4.8) Análisis de regiones conservadas en la secuencia nucleotídica de *cordina* en *A. charrua*

Con el objetivo de profundizar en el análisis de la secuencia de cordina en *Austrolebias charrua*, se utilizó la información disponible de la secuencia del estadio de diapausa IA y se alineó con las secuencias de cordina de otras especies de peces teleósteos. Para este análisis se construyó una secuencia que se denominará *cordina "completa"* utilizando la información de la secuencia amplificada en esta tesina, y las secuencias de *cordina 2* y *cordina 1* provenientes del transcriptoma de referencia (Gajardo y col., en preparación). De esta manera se obtuvo una secuencia de 1479 pares de bases.

Se procedió a realizar un ClustalX 2.2.22 (Altschul y col., 1990) con esta secuencia reconstruida, y con las especies más cercanas filogenéticamente: *Kryptolebias marmoratus*, *Austrofundulus limnaeus*, *Nothobranchius furzeri* (figura 22). En este análisis se observó que predominan las regiones conservadas de *cordina* en concordancia con lo reportado en la bibliografía que caracteriza a este gen como un gen muy conservado en los vertebrados (Sasai y De Robertis, 1994). Sin embargo, es interesante mencionar que es posible distinguir regiones no conservadas donde se visualizan las variantes puntuales de *cordina* de *A. charrua* únicas en comparación a sus homólogas de otras especies, por ejemplo en casos puntuales como el de nucleótidos como el de la posición 327 donde *A. charrua* posee una timina en lugar de adenina como todas las otras especies. También en las posiciones 315, 414, 435, 674, 693, 727, 763, 822, 1221, y a partir de 1462, donde luego de esta variante única, ocurren otras variantes casi consecutivas en la secuencia de *cordina* de *A. charrua*, hasta el final (ver figura 22).

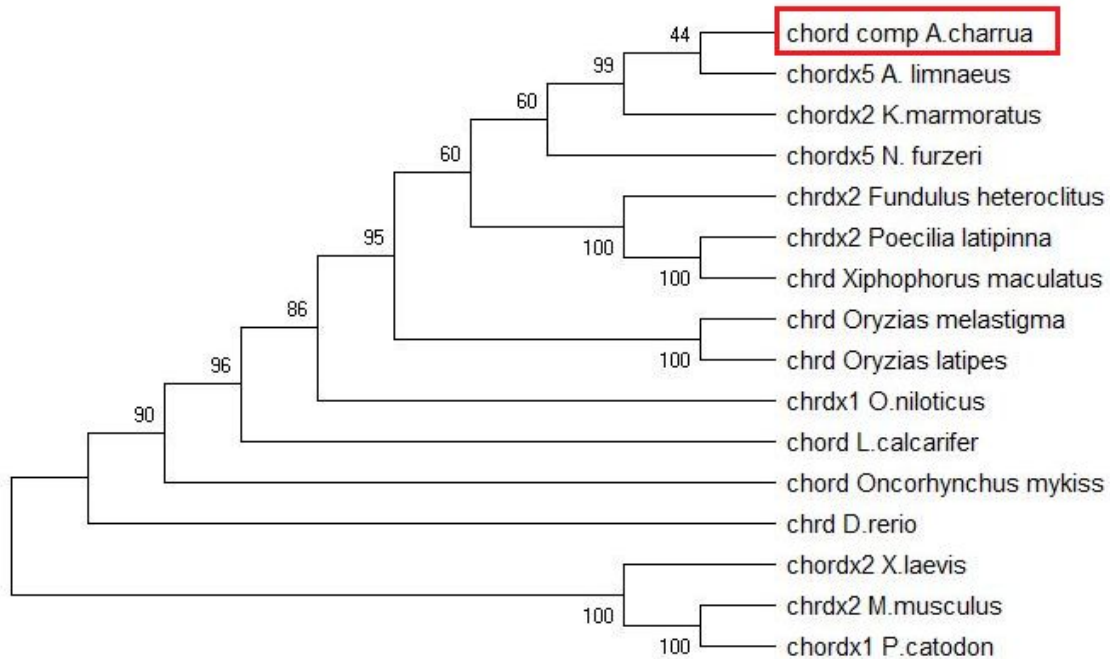
Table with 5 columns: Sequence identifier (e.g., chord\_comp\_A.charrua), Line number, Nucleotide sequence (e.g., ATGTCCAGTG), Position (10-80), and another line number (80). The table is divided into 8 blocks of 80 positions each. Clustal Consensus lines are indicated by asterisks.





*limnaeus*, cuarto lugar la variante 5 (x5) de la especie de *N. furzeri*, quinto lugar variante 5 (x5) de *F. heteroclitus*, en sexto lugar la especie *D. rerio* y por último se encuentra la característica que resalta los nucleótidos conservados indicados con un asterisco (\*) y con la anotación de “*clustal consensus*”.

Con el fin de determinar las relaciones evolutivas entre la secuencia *cordina* completa obtenida de *Austrolebias charrua* en este trabajo y *cordina* de otras 15 especies de vertebrados (seleccionadas del Genebank) se realizó un análisis filogenético utilizando el algoritmo “Maximum likelihood” (figura 23).



**Figura 23: Árbol filogenético.** Construido a partir de una matriz de datos generada mediante el alineamiento de 16 secuencias nucleotídicas de *cordina* de vertebrados utilizando el método “Maximum likelihood” y bootstrap de 1000 réplicas como soporte estadístico.

Los resultados de esta reconstrucción muestran que la secuencia obtenida en *A. charrua* presenta mayor similitud con especies de peces de la familia Rivulidae (*A. limnaeus* y *K. marmoratus*), con un apoyo de bootstrap en el orden de 99% en este nodo (figura 23). La secuencia siguiente con mayor cercanía pertenece a otro pez anual, *Nothobranchius furzeri*.

#### 4.9) Análisis de regiones conservadas en la secuencia aminoacídica de *cordina* en *A. charrua*

Se alinearon las secuencias de aminoácidos de *cordina* completa de *A. charrua* con las secuencias aminoacídicas de cada variante de *cordina* de las mismas especies alineadas anteriormente en sus secuencias nucleotídicas (figura 24). En este análisis se obtuvo

información de relevancia al evidenciarse mutaciones que derivan en cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína.

```

10      20      30      40      50      60
chord_comp_A.charrua 1  MSSGDALTPG KTGGVGSALF NLHDNGTLEY QIQVAGLSSD VVGLTIELKP RRRNRKRSILY 60
chordx2_K.marmoratus 1  MSSGDALTPG KTGGVGSAIF NLQDNGTLEY QVQVAGLSSD VVGLTIELKP RRRNRKRSVLY 60
chordx2_A.limnaeus 1  MSSGDALTPG KTGGVGSAVF NLNDNGTLEY QVQVAGLSSD VVGLTIELKP RRRNRKRSVLY 60
chordx2_N.furzeri 1  MSSGDALTPG KTGGVGSAVF NLHDNGTLDY QVQVAGLTS D VVGLTIELKP RRRNRKRSVLY 60
chordx1_F.heteroclitus 1  MSSGDALIPG KTGGVGSAIF NLHDNGTLEY QVQVAGLTS D VVSLTIELKP RRRNRKRSVLY 60
chord_D.rerio 1  LSSGAALTAG QTGGVGSVAV TLHPNGSLDY QLLVAGLSSA VLSVSIEMKP RRRNRKRSVLY 60
Clustal Consensus 1  :*** ** .* :*****.* .*: **:* * :***** * :.:**:* **:***:*** 52

70      80      90      100      110      120
chord_comp_A.charrua 61  DLTPPEYNKAL RQAVGWSRLL EARHIHMLLQ NELFINVATA HYQEGELRQQ IKALPYSGLE 120
chordx2_K.marmoratus 61  DLTPPEYSKAL RQAVGWSRLL EARHIHMLLQ NELFINVATA HSQEGELRQQ IKALPYSGLE 120
chordx2_A.limnaeus 61  DLTPPEFSQTS GQAVGWSRLL EARHIHMLLQ NELFINVATA HSQEGELRQQ IKALPYSGLE 120
chordx2_N.furzeri 61  DLTAKYIKAS RWAVGWSRLL EARHIHMLLQ NELFINVATA HNQEGELRQQ IKALPYNGLE 120
chordx1_F.heteroclitus 61  DLTAEYKAA GRAAGWSRLL EARHIHMLLQ NELFINVATA HNQEGELRQQ IKALPYSGLE 120
chord_D.rerio 61  ELSAVFTDQR --AAGSCGRV EARHTHMLLQ NELFINIATA LQPDGELRQQ IRLLPYNGLD 118
Clustal Consensus 53  :*.: . . *.*.*.: ***** ***** :***** * :***.: 95

130     140     150     160     170     180
chord_comp_A.charrua 121  VPRNELPSSL AGHFVSPFVR TGASGHAWVS VDKQCHLHYK IIVAGLSKAA DATVNAQLHG 180
chordx2_K.marmoratus 121  VPRHELPTPL AGHFVSPFVR TGASGHAWVS VDKQCHLHYE IIVAGLSKAE DATVNAHLHG 180
chordx2_A.limnaeus 121  VPRQGLPTPL AGHFVSPFVR TGASGHAWVS VDKQCHLHYE IIVAGLSKKE DVTVNAHLHG 180
chordx2_N.furzeri 121  APRNELP2PL AGHFVSPFVR TGSSGHAWVS VDKQCHLHYE IIVAGLSKTD DATVNAHLHG 180
chordx1_F.heteroclitus 121  VPRHELPTPL AGHFVSPFVR TGASGHAWVS VDKQCHLHYE IIVAGLSKAD DLTVNAHLHG 180
chord_D.rerio 119  ARRNELPVPL AGVLVSPFVR TGAAGHAWVS VDPQCHLHYE IIVNGLSKSE DASISAHLHG 178
Clustal Consensus 95  . * : * * * * :***** **.:***** ** ***** : * : * * * * * : :.:**:* 143

190     200     210     220     230     240
chord_comp_A.charrua 181  LAEIGELDNR TTHKRLLTG FYGSQAQGVV KDLSELLOH LDQGMASIQV STKMNPQGEI 240
chordx2_K.marmoratus 181  LAEIGELDNS STAHRLLTG FYGSQAQGVV KDLSEPLLQ LDQGTAFIQV STKMNPQGEI 240
chordx2_A.limnaeus 181  LAEIGELDNS STTHKRLLTG FYGSQAQGVV KDLSELLOH LDQGTAFIQV STKLNQGEI 240
chordx2_N.furzeri 181  LAEIGELGNS SASHRLLTG FYGSQAQGVV KDLSELLOH LDQGTAFIQV STKMNPQGEI 240
chordx1_F.heteroclitus 181  LAEIGELDDS STSHKRLTG FYGSQAQGVV KDMSEVLLQ LDQGTAFIQV STKMNPQGEI 240
chord_D.rerio 179  LAEIGEMDDS STNHKRLTG FYGQAQGVV KDLSELRLH LNEGTAAYLV STKMNPGEI 238
Clustal Consensus 144  *****.: : :***** **:***:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* 196

250     260     270     280     290     300
chord_comp_A.charrua 241  RGWVHPVNSC KSGARV--EV EETELEDLML K-DPEELKKD PHT---CFE ENQHHAGHS 292
chordx2_K.marmoratus 241  RGQVHPVNSC RSGAAV--EV EVELDDMLP K-DPEELKKD PHT---CFE ENHHHAGHS 293
chordx2_A.limnaeus 241  RGRVHPVNSC ESGAGA--EV EEAELDDTLL T-DPEELKKD PNT---CFE ENQHHAGHS 293
chordx2_N.furzeri 241  RGRVHPVNSC MSGAGAGAEV EEEVFDVLL K-DPEELKKD PHT---CFE ENQHQAHS 295
chordx1_F.heteroclitus 241  RGRVHPVNTC KLGAPP--EV EEAFFDVFL N-DPEELKKD PNT---CFE ENQHHAGHS 293
chord_D.rerio 239  RGRVHPVNSC ESPAPRAEFL EEPDEFLLF TREPTLRKD THTHHSCEF EGEQTHSQA 298
Clustal Consensus 197  ** :*** * * : * * * : * : * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * 233

310     320     330     340     350     360
chord_comp_A.charrua 293  WTPNYDKCFT CSCQKRVVIC DPVICPILSC SRTIQPENKC CPICDEKREA KDMKAPERVE 352
chordx2_K.marmoratus 294  WTPNYDKCFT CSCQKRVVIC DPVICPVLTSC SKTIQPEDKC CPVCEKREP KDMKVSERVE 353
chordx2_A.limnaeus 294  WTPNYDKCFT CSCQKRVVIC DPVICPVLTSC SRTIQPEDKC CPICDEKREP KDMKAGEKVE 353
chordx2_N.furzeri 296  WTPNYDKCFT CGCQKRVVIC DPVICPVLTSC SRTVQPENKC CPVCDERREP KDMKVPEWVE 355
chordx1_F.heteroclitus 294  WTPSYDKCVT CSCQKRVVIC DPVICPELTSC SRTIQPEDKC CPVCDERREP KDMKALETLE 353
chord_D.rerio 299  WTPQYNTCFT CTCQKRVVIC DPVMCPTLSC THTVQPEDQC CPICEBKKEB KETAAEKVE 358
Clustal Consensus 234  ***.:**.* * ***** **:***:* **:***:* **:***:* **:***:* **:***:* **:***:* 280

370     380     390     400     410     420
chord_comp_A.charrua 353  EHPGEGYFEG DQKIHAPGIS WHFVPPFGY IKCAVCTCKG SSGEVHCEKV TCPVLCSHP 412
chordx2_K.marmoratus 354  EHPGEGYFEG DQKMHAPGTT WHFVPPFGY IKCAVCTCKG SSGEVHCEKV TCPVLCSHP 413
chordx2_A.limnaeus 354  EHPGEGYFEG DQKMHAPGIS WHFVPPFGY IKCAVCTCKG SSGEVHCEKV TCPVLCSHP 413
chordx2_N.furzeri 356  EHPGEGYFEG DQKMHAPGTT WHFVPPFGY IKCAVCTCKG STGEVHCEKV TCPVLCSHP 415
chordx1_F.heteroclitus 354  EHLEGYFEG DQKMHAPGTT WHFVPPFGY IKCAVCTCKG STGEVHCEKV TCPVLTCNHP 413
chord_D.rerio 359  ENPGEYFEG DQKMHAPGTT WHFVPPFGY IKCAVCTCKG STGEVHCEKV TCPPLTCRSP 418
Clustal Consensus 281  * : ***** **:***:* : ***** ***** ***** ***** ***** ***** * : * : * 335

430     440     450     460     470     480
chord_comp_A.charrua 413  VRRNPSDCK ECPEERTPE GLQSDMMQA DGRHRCKFGK NYYQNNDNH PWVPLVGEMK 472
chordx2_K.marmoratus 414  VRRSPDCK ECPEERTPA GLQSDMMQA DGRHRCKFGK NYYQNSDSW PWVPLVGEMK 473
chordx2_A.limnaeus 414  VRRNPSDCK ECPEERTPA GLRHTDMMQA DGRHRCKFGK NYYQNSDSW PWVPLVGEMK 473
chordx2_N.furzeri 416  VRRSPDCK ECPEERTPA GLQSDMMQA DGRHRCKFGK NYYQNSDSW PWVPLVGEMK 475
chordx1_F.heteroclitus 414  VRRSPDCK ECPEERTPA GLRHTDMMQA DGRHRCKFGK NLYQNSDSW PWVPLVGEMK 473
chord_D.rerio 419  IRRNPSDCK ECPEE-TPP -LEDEMMQA DGRTRCKFGK NYYQNSDWH PVPVVGEMK 476
Clustal Consensus 336  :**:***:* **:***:* * :***** **:***:* **:***:* **:***:* **:***:* **:***:* 380

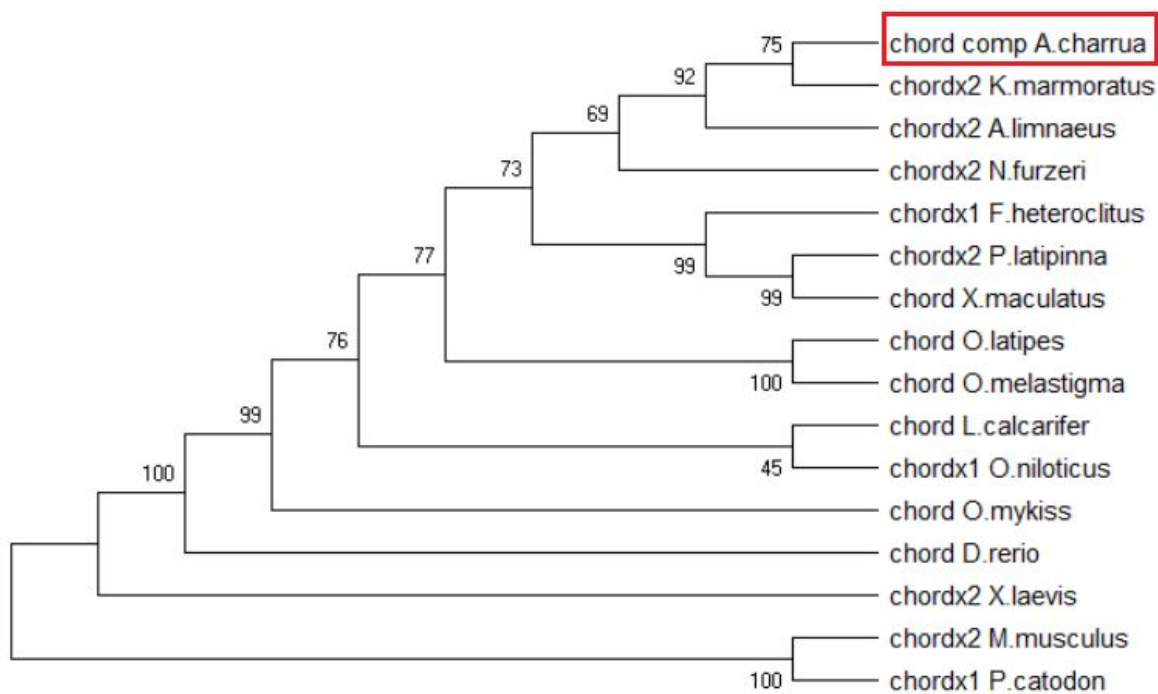
490     500     510     520
chord_comp_A.charrua 473  CINWCDV ---SYTSRC---LSEYK 492
chordx2_K.marmoratus 474  CINWCDHGV TKCQRKQCAV LTCSNITRTE NSCCPECSVH SADSKE 519
chordx2_A.limnaeus 474  CINWCDHGV TKCQRKQCAV LTCSNITRTE NSCCPEC---ADSKE 515
chordx2_N.furzeri 476  CINWCDHGV TKCQRKQCPV LACSNITRTE NSCCPEC---AGTKE 517
chordx1_F.heteroclitus 474  CINWCDHGV TKCQRKQCPV LTCSNITRTE SSSCCPEC---GDQKE 515
chord_D.rerio 477  CITWCDHGV TKCQRKQCPV LSCRNPIRTE GKCCPEC---IEDFM 518
Clustal Consensus 381  **.*** * . . . * 387

```

**Figura 24: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de cordina de 5 especies de Rivulidae con la perteneciente a la de *A. charrua*, utilizando el programa ClustalW.** El alineamiento muestra el patrón de regiones conservadas ilustrado con asteriscos (\*) aminoácidos marcados con dos puntos (:) evidenciando regiones semiconservadas (aminoácidos con características químicas similares) y con un solo punto (.) se observan regiones de menor conservación entre secuencias pero con similitud estructural. En el rectángulo rojo se señala una región donde no coincide la secuencia aminoacídica de *A. charrua*, respecto a cordina de las especies comparadas. El rectángulo azul señala la secuencia siguiente al segmento faltante de cordina en *A. charrua* con respecto a las otras especies.

En la figura 24, se evidencia que los últimos 13 aminoácidos de la secuencia de la proteína de cordina en *Austrolebias charrua* no coinciden con las secuencias de las otras especies analizadas. Este evento podría sugerir la ausencia de una región de 22 aminoácidos (ver recuadro rojo en figura 24), seguida de una secuencia exclusiva de 12 aminoácidos en *A. charrua*, con respecto a las otras especies (ver recuadro azul de la figura 24). En una proteína tan conservada en los vertebrados este evento es posible que implique una relevancia biológica importante en esta especie apoyando la hipótesis planteada por Wagner y Podrabsky (2015) sobre un rol único de cordina en el patrón de desarrollo particular de *Austrolebias charrua* (se retomará más adelante en el análisis de la figura 26).

Con el objetivo de comparar el árbol filogenético construido con las secuencias nucleotídicas en la figura 22 y las secuencias aminoacídicas, se construyó un árbol filogenético utilizando las mismas secuencias de cordina de las mismas 16 especies de vertebrados (figura 25).

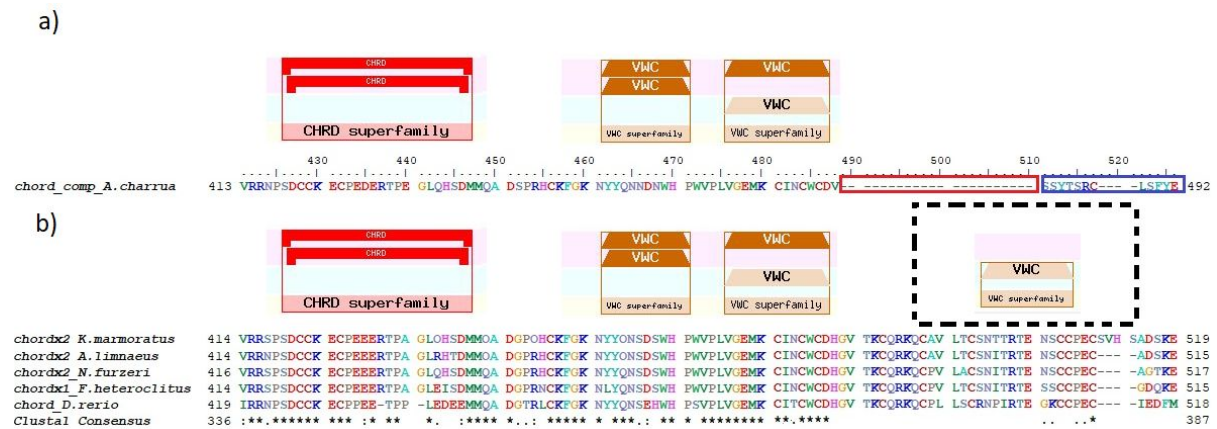


**Figura 25: Árbol filogenético.** Construido a partir de una matriz de datos generada mediante el alineamiento de 16 secuencias aminoacídicas de cordina de vertebrados utilizando método "Maximum likelihood" y bootstrap de 1000 réplicas.

La topología de este árbol es concordante, como se esperaba con la reconstrucción a partir de las secuencias nucleotídicas (figura 22). Este análisis filogenético evidenció que la secuencia de *A. charrua* presenta mayor similitud con las secuencias de las especies de Cyprinodontiformes y entre ellos los peces anuales *A. limnaeus* (92%) y *N. furzeri* con un bootstrap mayor de 60 (figura 25).

El análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas en el marco abierto de lectura a partir de las secuencias nucleotídicas sumado al análisis de los dominios proteicos (figura 26), permite confirmar que la proteína *cordina* de *A. charrua* no coincide en los últimos 13 aminoácidos identificados con respecto a cordina de la especie más cercana filogenéticamente (*A. limnaeus*). La secuencia aminoacídica de esta región no coincide con la del fragmento esperado del dominio von Willebrand Factor Type C (vWC), que se presenta en repetidos sucesivos o tandem, identificado en las especies cercanas. Este dominio está presente en muchas proteínas antagonistas de BMP (noggina y follistatina) (Coffinier y col., 2002). En el esquema de la figura 26 se puede observar mediante el BLASTp como la proteína cordina de *A. charrua* carece del último dominio repetido de vWC. Este dominio fue caracterizado por cumplir funciones en la unión extracelular de cordina a distintos receptores influyendo directamente en la actuación de cordina como antagonista a distintos BMPs (Zhang y col., 2007).

Como se mencionó en la introducción, en el mecanismo de acción descrito para cordina se produce un corte en la proteína liberando el dominio vWC que amplifica la actividad antagonista de BMP (Zhang y col., 2007). Es esencial ampliar la información de secuencia obteniendo información ya sea del transcriptoma de referencia o del mismo genoma de *A. charrua*, para evaluar la región N-terminal de esta proteína.



**Figura 26: Análisis de los dominios proteicos de cada zona de las secuencias, usando BLASTp realizado en la base de datos del NCBI. Secuencias aminoacídicas deducidas en el marco abierto de lectura a partir de las secuencias nucleotídicas de (a) *A. charrua* y en la parte de arriba de la secuencia a qué dominio corresponden. (b) *K. marmoratus*, *A. limnaeus*, *N. furzeri*, *F. heteroclitus*, *D. rerio*, y en la parte de arriba de la secuencia a qué dominio corresponden. Enmarcado en recuadro punteado el dominio vWC presente en todas las especies analizadas con excepción de en *A. charrua*.**

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en *Austrolebias charrua* con respecto al patrón de expresión de *cordina* en el desarrollo temprano son similares a los descritos en el pez anual *Austrofundulus limnaeus*. Aunque resta confirmar la identidad de la secuencia amplificada en el estadio materno. La detección del ARNm de *cordina* particularmente en ambos fenotipos de la diapausa I (A y B), podría indicar un posible rol en esta fase tan peculiar en el desarrollo embrionario observado en los peces anuales.

En este trabajo se logró amplificar la secuencia desconocida entre los fragmentos de *cordina* 2 y 1. Esta información es de gran utilidad para completar la secuencia de *cordina* de *A. charrua*, para futuros abordajes. La banda de 1100 pb detectada en los estadios de: epibolia, diapausa IA, diapausa IB y reagregado (*cordina* extensa) evidenció una alta homología con las variantes de *cordina* de otros *Cyprinodontiformes*.

Se logró dilucidar la secuencia desconocida faltante entre los fragmentos de *cordina* 2 y *cordina* 1 y combinar estas secuencias obteniéndose una secuencia denominada *cordina completa* de 1479 pares de bases.

Se identificaron tres variantes de *cordina* en *A. charrua* correspondiente a los estadios de epibolia, diapausa IA, IB, y reagregado I-II. En el alineamiento de nucleótidos y posterior traducción, se detectaron 2 variantes silenciosas y una con cambio nucleotídico que generó cambio aminoacídico en el estadio de epibolia.

Se identificaron regiones muy conservadas al comparar las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del estadio de diapausa IA de *cordina* de *A. charrua* con otras especies de vertebrados, lo cual coincide con la bibliografía en su conservación dentro de estos.

Se detectó la ausencia de una región en la secuencia de aminoácidos sólo en *A. charrua* de 22 aminoácidos, que corresponde a un dominio completo de vWC (dominio von Willebrand Factor Type C) con posible actividad de unión a la proteína morfogénica ósea BMP. Esta variación podría generar un cambio en la difusibilidad de la proteína *cordina* y por ende un cambio en la señalización durante el desarrollo temprano de *A. charrua*.

En el presente trabajo se logró amplificar un fragmento de 450 pares de bases, en todos los estadios tempranos del desarrollo analizados. Los resultados obtenidos no permitieron concluir que se trata del fragmento de *cordina* 2 debido a la presencia de múltiples secuencias en el producto de PCR purificado en el estadio más temprano del desarrollo analizado (estadio materno). Resulta esencial determinar la identidad de esta secuencia para definir si *cordina* se expresa en estadio materno como sucede en *A. limnaeus*. Nuestros resultados no generan evidencia de que *cordina* extensa se exprese en el estadio materno, una posible explicación a estos resultados puede ser porque los niveles de *cordina* 2 empaquetado de origen materno sean extremadamente bajos e indetectables para las técnicas aquí utilizadas.

Estos resultados son los primeros relacionados a la caracterización de *cordina* en *A. charrua* y generan una base para continuar investigando sobre los mecanismos moleculares que permitan explicar el desarrollo embrionario de tan particular especie de vertebrado, principalmente la diapausa I.



## Perspectivas

En relación a la expresión temprana de *cordina 2* en estadios previos a la transición de la blástula media (estadio materno), es pertinente clonar el amplicón que se obtuvo en un vector plasmídico, para lograr obtener información de una única secuencia por clon analizado. De obtenerse un clon de *cordina*, se podrá confirmar que al igual que lo que ocurre en *Austrofundulus limnaeus*, existe expresión en este estadio en *Austrolebias charrua*.

Un diseño experimental complementario a este estudio sería medir específicamente los niveles de expresión del gen *cordina* en cada etapa del desarrollo temprano de *A. charrua*, mediante RT-qPCR (por sus siglas en inglés reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa), para comparar resultados con el trabajo de Wagner y Podrabsky (2015).

Se propone realizar hibridación *in situ* fluorescente en embriones enteros en distintas etapas del desarrollo temprano con el fin de analizar el patrón de expresión temporal y espacial del ARN mensajero del gen *cordina* en *A. charrua*. Además se podría complementar mediante la identificación de la proteína con anticuerpos específicos para determinar si presenta regulación post-transcripcional y comparar con estudios realizados en otros otros organismos.

Para analizar el cambio estructural generado por la porción final del fragmento *cordina completa* y su efecto a nivel funcional, se podrían utilizar programas computacionales de simulación estructural proteica que resuelvan su estructura espacial y emulen una posible interacción biológica de *cordina* con su receptor. Para profundizar en estos aspectos serían necesarios datos de cristalografía y difracción de rayos-X y ampliar la secuencia obtenida de *A. charrua* en la región 3`.

Para analizar los eventos de delección y mutaciones identificados en este trabajo sería necesario realizar un análisis en profundidad del genoma y transcriptoma de referencia de *A. charrua*, para ampliar la información 5`y 3` respecto al fragmento del gen *cordina* identificado, buscando posibles sitios de procesamiento alternativo del ARNm.

Para evaluar si *cordina* tiene implicación directa en mecanismos moleculares de inducción a la diapausa I de los peces anuales, sería importante realizar experimentos de microinyección con ARN antisentidos modificados (morfolinos), que regulen una disminución de la expresión. Estos resultados podrían complementarse con ensayos de sobreexpresión del gen (experimentos ya realizados en otros teleósteos como pez cebra).

## Bibliografía

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 215(3) 403-410.
- Anderson, S. N. & Podrabsky, J. E. 2014. The effects of hypoxia and temperature on metabolic aspects of embryonic development in the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Comparative Physiology B*. 184(3) 355-370.
- Arezo, M. J., Pereiro, L., Berois, N. 2005. Early development in the annual fish *Cynolebias varius*. *Journal of Fish Biology*. 66(5) 1357-1370.
- Arezo, M. J., Papa, N., Guttierrez, V., García, G., Berois, N. 2014. Sex determination in annual fishes: searching for the master sex-determining gene in *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetics and molecular biology*. 37(2) 364-374.
- Arezo, M. J., Papa, N. G., Berois, N., García, G., Gutiérrez, V., Antonelli, M. 2016. Sex determination and differentiation in annual fishes. En: Berois N, García RO, de Sa R, editores. *Annual fishes: life history strategy, diversity and evolution*. Vol. 1 Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis. p 73–90. ISSN/ISBN: 9781482299717.
- Arezo, M. J., Papa, N. G., Berois, N., Clivio, G., Montagne, J., De la Piedra, S. 2017. Annual killifish adaptations to ephemeral environments: diapause I in two *Austrolebias* species. *Developmental Dynamics*. 246(11) 848-857.
- Barrallo A., González-Sarmiento, R., García-Isidoro, M., Ciudad, P., Porteros, A., Rodríguez, R. E. 1999. Differential brain expression of a new  $\beta$ -actin gene from zebrafish (*Danio rerio*). *European Journal of Neuroscience*. 11(1) 369-372.
- Berois, N., Arezo, M. J., Papa N. G., Clivio, G. A. 2012. Annual fish: developmental adaptations for an extreme environment. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 1:595–602. doi: 10.1002/wdev.39.
- Bier, E., De Robertis, M. 2015. BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. *Science*. 348. doi: 10.1126/science.aaa5838.
- Blažek, R., Polačik, M., Reichard, M. 2013. Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo* 4:24. doi: 10.1186/2041-9139-4-24.
- Canalis, E., Economides, A. N., Gazzero, E. 2003. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*. 24:218–35.
- Costa, W. J. E. M. & Cheffe, M. M. 2001. Three new annual fishes of the genus *Austrolebias* from the laguna dos Patos system, southern Brazil, and a redescription of *A. adloffii*

(Ahl)(Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, série Zoologia*, 14(2), 179-200.

Coffinier, C., Ketpura, N., Tran, U., Geissert, D., De Robertis, E. M. 2002. Mouse *Crossveinless-2* is the vertebrate homolog of a *Drosophila* extracellular regulator of BMP signaling. *Mechanisms of development*, 119 Suppl 1(1), S179–S184. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(03\)00113-8](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(03)00113-8).

De Robertis, E.M. & Kuroda, H. 2004. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 285–308.

De Robertis E.M. 2006. Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 296-302.

De Robertis, E.M. 2008. Variations on ancestral themes. *Cell* 132(2): 185–195. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.003.

De Robertis, E. M., Moriyama, Y. 2016. The Chordin Morphogenetic Pathway. *Curr Top Dev Biol.* 116:231-45. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.10.003.

Dosch, R., Gawantka, V., Delius H., Blumenstock, C., Niehrs C., 1997. *Bmp-4* acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*. *Development.* 124: 2325-2334.

Dolfi, L., Ripa, R., Cellerino, A. 2014. Transition to annual life history coincides with reduction in cell cycle speed during early cleavage in three independent clades of annual killifish. *EvoDevo* 5:1–9.

Errea, A., & Danulat, E. 2001. Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. *Environ Biol Fishes* 61:261–268. doi: 10.1023/A:1011047611009.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39(4), 783-791.

Gajardo F, Di Genova A, Valdivieso C, Pereiro L, Arezo MJ, Nardocci G, Rojas N, Gutiérrez V, Cumplido N, Marina R, Papa N, Berois N, Orellana A, Gutiérrez RA, González M, Mendez M, Montecino M, Hodar C, Glavic A, Maass A, García G, Allende ML. Evolutionary genomics of South American annual killifish. (En preparación)

García, G. 2006. Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *J Zool Syst Evol Res.* 44. 75-87.

- García, G., Ríos, N., Gutiérrez, V. 2015. Next-generation sequencing detects repetitive elements expansion in giant genomes of annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, 143(3), 353-360.
- Genade, T., Benedetti, M., Terzibasi, E., Roncaglia, P., Vallenzano, D.R., Cattaneo, A., Cellerino, A. 2005. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell* 4:223–233. doi: 10.1111/j.1474-9726.2005.00165.
- Goodman, S., Dale, L., De Robertis, E.M. 1997. Cleavage of chordin by xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell*. 91:407–16.
- Inglima, K., Perlmutter, A., Markofsky, J. 1981. Reversible stage-specific embryonic inhibition mediated by the presence of adults in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *J Exp Zool* 215:23–33.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. 1995. Stages of embryonic development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203: 253-310. doi: 10.1002/aja.1002030302.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nkya, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Larrain, J., Bachiller, D., Lu, B., Agius, E., Piccolo, S., De Robertis, E.M., 2000. BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Development*; 127: 821-830.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Thompson, J. D. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Levels, P.J., Denucé, J.M. 1988. Intrinsic variability in the frequency of embryonic diapause of the annual fish *Nothobranchius korthausae*, regulated by light: dark cycle and temperature. *Environ Biol Fishes* 22:211–223. doi: 10.1007/BF00005382.
- Little, S., Mullins, M.C., and De Robertis, E.M., 2009. The pro-BMP activity of Twisted gastrulation is independent of BMP binding. *Development* 130, 4047–4056.
- Loureiro, M., Borthagaray, A., Hernández, D., Duarte, A., Pinelli, V., Arim, M. 2016. *Austrolebias* in space: scaling from ponds to biogeographical regions. En: Berois N, García RO, de Sá R, editores. *Annual fishes: life history strategy, diversity and evolution*. Vol. 1 Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis. p 111–132. ISSN/ISBN: 9781482299717.

Markofsky, J., Matias, J.R. 1977. The effects of temperature and season of collection on the onset and duration of diapause in embryos of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *J Exp Zool* 202:49–56. doi: 10.1002/jez.1402020107.

Markofsky, J., Matias, J.R., Inghima, K., Vogelmann, J.H., Orentreich, N. 1979. The variable effects of ambient and artificial light: dark cycles on embryonic diapause in a laboratory population of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *J Exp Biol* 83:203–215.

Meller, C., Meller, R., Simon, R., Culpepper, K., Podrabsky, J. 2012. Cell cycle arrest associated with anoxia-induced quiescence, anoxic preconditioning, and embryonic diapause in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J Comp Physiol B*. 182(7): 909–920.

Martin, K. L. & Podrabsky, J. E. 2017. Hit pause: developmental arrest in annual killifishes and their close relatives. *Developmental Dynamics*, 246(11), 858-866.

Marrable, A. W. (1965). Cell numbers during cleavage of the zebra fish egg. *Development*, 14(1), 15-24.

Myers, G.S. (1952) Annual fishes. *Aquarium Journal* 23: 125–141.

Naumann, B. & Englert, C. 2018. Dispersion/reaggregation in early development of annual killifishes: Phylogenetic distribution and evolutionary significance of a unique feature. *Developmental biology*, 442(1), 69-79.

Papa, N. G., Clivio, G. A., Montagne, J. 2016. Husbandry, reproduction, and embryo culture of annual fishes under laboratory conditions. En: Berois N, García RO, de Sa R, editores. *Annual fishes: life history strategy, diversity and evolution*. Vol. 1 Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis. p 99–107. ISSN/ISBN: 9781482299717.

Pereiro, L., Loosli, F., Fernández, J., Härtel, S., Wittbrodt, J., Concha M. 2017. Gastrulation in an annual killifish: Molecular and cellular events during germ layer formation in *Austrolebias*. *Developmental Dynamics* 812–826. doi: 10.1002/dvdy.24496.

Peters, N. 1963. Embryonale Anpassungen oviparer Zahnkarpfen aus periodisch austrocknenden Gewässern. *Int Rev Ges Hydrobiol* 48:257–313.

Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, EM. 1997. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*. 86:589–98.

Podrabsky, J.E., Riggs, C.L., Duerr, J.M. 2011. Anoxia tolerance during vertebrate development - insights from studies on the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. En: Padilla P, editor. *Anoxia*. doi: 10.5772/39079.

Podrabsky, J.E., Carpenter, J.F., Hand, S.C. 2001. Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. *Am J Physiol* 280:R123–R131.

Podrabsky, J.E., Tingaud-Sequeira, A., Cerdà, J. 2010a. Metabolic dormancy and responses to environmental desiccation in fish embryos. En: Lubzens E, Cerdà J, Clark M, editores. Dormancy and resistance in harsh environments. Topics in current genetics. Vol. 21. Berlin: Springer-Verlag. p 1-4.

Podrabsky, J.E., Garrett, I.D.F., Kohl, Z.F. 2010b. Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. J Exp Biol 213:3280–3288. doi: 10.1242/jeb.045906.

Podrabsky, J.E., Hrbek, T., Hand, S.C. 1999. Physical and chemical characteristics of ephemeral pond habitats in the Maracaibo basin and Llanos region of Venezuela. Hydrobiologia. 362:67–78.

Podrabsky, J.E., Hand, S.C. 2015. Physiological strategies during animal diapause: lessons from brine shrimp and annual killifish. J Exp Biol 218:1897–1906.

Podrabsky, J.E., Riggs, C.L., Wagne, J.T. 2016a. Tolerance of environmental stress. En: Berois N, García RO, de Sá R, editores. Annual fishes: life history strategy, diversity and evolution. Vol. 1 Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis. p 160–184. ISSN/ISBN: 9781482299717.

Podrabsky, J.E., Romney, A.L., Culpepper, K.M. 2016b. Alternate developmental pathway. En: Berois N, García RO, de Sá R, editores. Annual fishes: life history strategy, diversity and evolution. Vol. 1 Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis. p 63–73. ISSN/ISBN: 9781482299717.

Roberts, E.M. 1978. Seasonal strategies in insects. N Z Entomol 6:350–356.

PROBIDES. 1999. Plan director. Reserva de Biosfera “Bañados del Este”. p 159. Rocha, Uruguay.labos.

Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K., De Robertis, E. M. 1994. Xenopus chordin: A novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. Cell, 79 (5), 779–790. doi:10.1016/0092-8674(94)90068-x.

Spemann, H., Mangold, H. 2001. Über induction von embryonalanlagen durch implantation artfremder organis atoren. W. Roux' Arch. Ent. Org. 100, 599–638 (1924). [translated and reprinted in Int. J. Dev. Biol. 45, 15.

Suzuki, N., Labosky, P. A., Furuta, Y., Hargett, L., Dunn, R., Fogo, A. B., Takahara, K., Peters, D. M., Greenspan, D. S., Hogan, B. L. 1996. Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by Bmp1, a mammalian gene related to Drosophila tolloid. Development 122:3587–95.

Xu P. F. Houssin N. Ferri-Lagneau K. F. Thisse B. Thisse C. 2014. Construction of a vertebrate embryo from two opposing morphogen gradients. Science (New York, N.Y.), 344(6179), 87–89. <https://doi.org/10.1126/science.1248252>.

- Thompson, A. W., & Ortí, G. 2016. Annual killifish transcriptomics and candidate genes for metazoan diapause. *Molecular biology and evolution*. 33(9), 2391-2395.
- Trinkaus J. P. 1993. The yolk syncytial layer of *Fundulus*: its origin and history and its significance for early embryogenesis. *Journal of Experimental Zoology*, 265(3), 258-284.
- Troilo, H., Barrett, A., Wohl, A., Jowitt, T., Collins, R., Bayley, C., Zuk, A., Sengle, G., Baldock, C. 2015. The role of chordin fragments generated by partial tolloid cleavage in regulating BMP activity. *Biochem Soc Trans*. 43(5) 795-800.
- Van Haarlem, R. 1983. Early ontogeny of the annual fish genus *Nothobranchius*: cleavage plane orientation and epiboly. *Journal of morphology*. 176 (1) 31-42.
- Wagner, J.T. & Podrabsky, J. 2015. Gene expression patterns that support novel developmental stress buffering in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limneus*. *EvoDevo* 6:2. doi: 10.1186/2041-9139-6-2.
- Wourms, J.P. 1972a. The developmental biology of annual fishes III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J Exp Zool* 182:389–414. doi: 10.1002/jez.1401820310.
- Wourms, J.P. 1972b. The developmental biology of annual fish II. Naturally occurring dispersion and reaggregation of blastomeres during the development of annual fish eggs. *J Exp Zool*. 182:169–200. doi: 10.1002/jez.1401820203.
- Wourms, J.P. 1972c. Developmental biology of annual fishes I. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi* Dahl. *J Exp Zool* 182:143–168. doi: 10.1002/jez.1401820202.
- Xie, J., Fisher, S. 2005. Twisted gastrulation enhances BMP signaling through chordin dependent and independent mechanisms. *Development*. 132:383-391 doi: 10.1242/dev.01577.
- Xu P. F., Houssin N., Ferri-Lagneau KF, Thisse B, Thisse C. Construction of a vertebrate embryo from two opposing morphogen gradients. *Science*. 2014;344(6179):87-89. doi:10.1126/science.1248252.
- Yamamoto, T. 1967. Medaka. En: Wilt FH, Wessels N, editores. *Methods in developmental biology*. New York: Thomas and Crowell Company. p 101–111.
- Yamashita, O., Hasegawa, K. 1985. Embryonic diapause. En “*Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 1” editores GA Kerkut, LI Gilbert.
- Zhang, J. L., Huang, Y., Qiu, L., Nickel, J., Sebald, W. 2007. von Willebrand factor type C domain-containing proteins regulate bone morphogenetic protein signaling through different recognition mechanisms. *J Biol Chem*. 282(27):20002-20014.

Zhang, J. L., Qiu, L.Y., Kotsch, A., Weidauer, S., Patterson, L., Hammerschmidt, M., Sebald, W., Mueller, T. D. 2008. Crystal structure analysis reveals how the Chordin family member crossveinless 2 blocks BMP-2 receptor binding. *Developmental cell*. 14(5) 739–750.

Zimmerman, L.B., DeJesus-Escobar, J. M., Harland, R. M. 1996. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*. 86:599–606.