



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

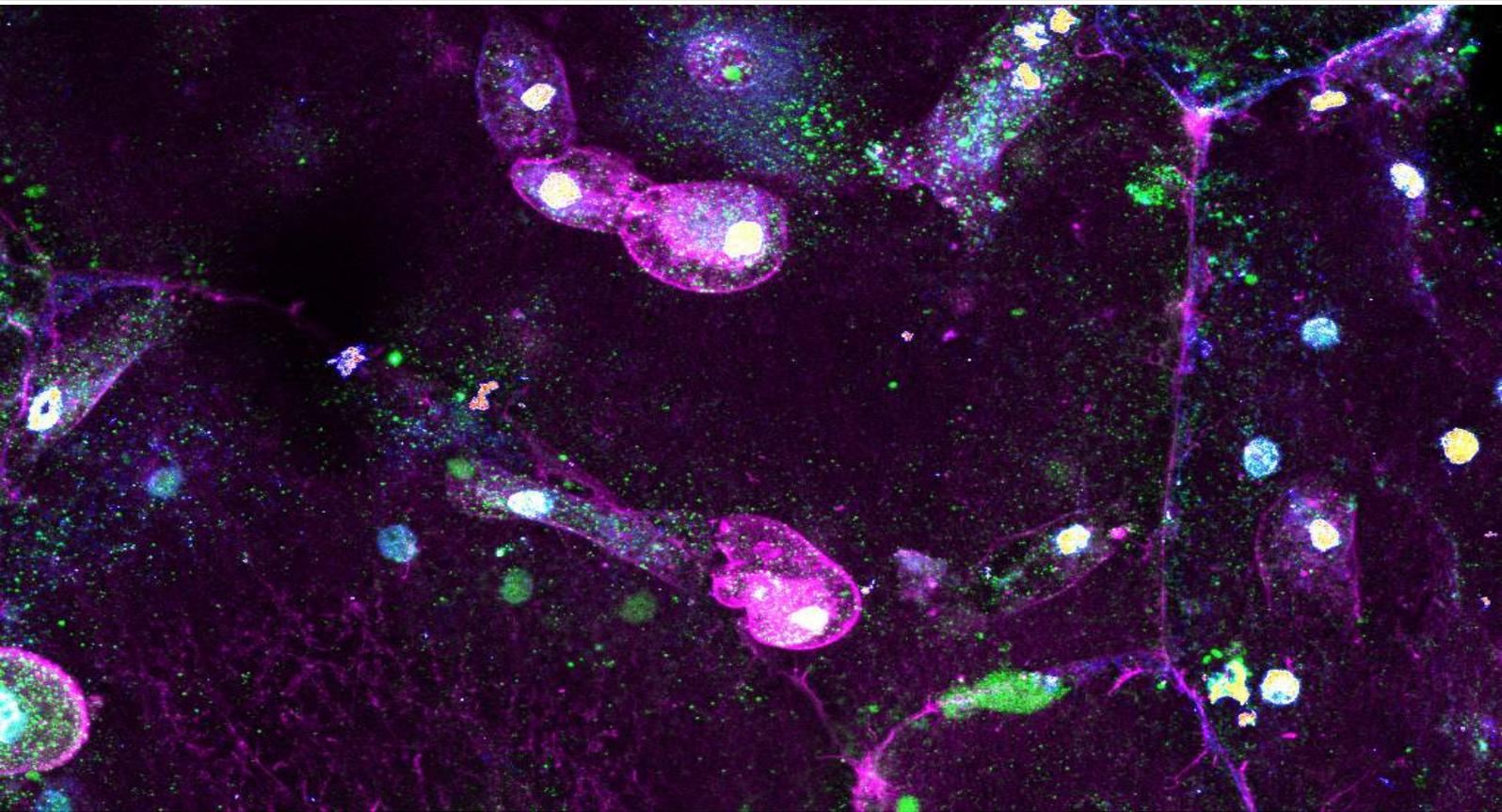
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

*Tesina para optar por el grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas*



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

# **Análisis de la morfología celular de las blastómeras profundas de embriones de *Austrolebias charrua* durante el desarrollo temprano**



**Hellen Schlueb Bentancur**

Orientadora: María José Arezo

Co-orientador: Gonzalo Aparicio

Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos  
Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias

*Diciembre de 2020*

## **Agradecimientos**

A mis tutores, María José por abrirme las puertas del laboratorio y permitir desarrollarme como investigadora y a Gonza por estar siempre presente. Por la dedicación y paciencia de ambos, y por acompañarme no solo en mi formación como investigadora sino también en mi crecimiento personal.

A mis compañeros de laboratorio, Nicolás Papa, Daniel Blanco y Nacho González quienes me acompañaron en el día a día, siempre dispuestos a ayudarme.

A los miembros del tribunal Uriel Koziol y Gabriela Casanova por aceptar la evaluación de mi tesina de grado.

A Gabriela Casanova por prestarme las pinzas que me permitieron decorionar los embriones de todos los experimentos de este trabajo.

A la gente del Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos y los de la Sección Biología Celular por la buena onda, realmente hacen que ir trabajar sea un disfrute.

A mi familia, en especial a mis abuelos.

A Adam por acompañarme en el proceso de escritura y ayudarme con las figuras.

Agradezco profundamente a todos mis amigos, los que me acompañan desde antes y a los que conocí a lo largo de mis años en la facultad, este logro es en gran parte gracias a ustedes.

# Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
Materiales y Métodos.....	13
Obtención y mantenimiento de adultos de <i>A.charrua</i> en el laboratorio.....	13
Obtención de embriones, cultivo, inducción de diapausa I y fijación.....	14
Decoronado, tinción fluorescente e inmunomarcaje indirecto sobre embriones <i>in toto</i> .....	15
Adquisición y análisis de imágenes.....	17
Resultados.....	18
Epibolia.....	18
Diapausa IB.....	30
Diapausa Reactivada.....	43
Reagregado.....	57
Área y circularidad de las blastómeras.....	73
Análisis de la morfología nuclear.....	77
Discusión.....	83
Ajuste del inmunomarcaje y tinción fluorescente.....	83
El rol de la CCE: Citoesqueleto y Cadherinas.....	85
Citoesqueleto de la CCE.....	85
Cadherinas de la CCE.....	86
Blastómeras, citoesqueleto y proteínas de adhesión.....	87
Blastómeras durante la Epibolia: células migratorias.....	87
Blastómeras durante la Diapausa IB: células redondeadas.....	88
Blastómeras durante Diapausa Reactivada y Reagregado.....	90
Señales nucleares de Cadherina y Tubulina acetilada.....	92
Morfología nuclear.....	93
Conclusiones.....	95
Perspectivas.....	97
Bibliografía.....	98

## Resumen

---

Las diapausas son estados de dormancia que permiten la supervivencia en los ambientes extremos. Estas detenciones están presentes durante el desarrollo embrionario de los peces anuales y son una estrategia de tolerancia a la desecación del ambiente donde habitan. Los embriones disminuyen las actividades vitales hasta que las condiciones sean favorables, momento en el que vuelven a retomar su desarrollo embrionario. Los peces sudamericanos *Austrolebias charrua* presentan tres diapausas en su desarrollo. Si bien dichos estadios han comenzado a ser estudiados a nivel molecular, no se ha indagado en profundidad sobre la morfología de las células y cómo el citoesqueleto o moléculas de adhesión celular se ven afectadas durante la dormancia, a pesar de que se observa una morfología diferente a la que muestran las células en el desarrollo activo. En este trabajo se realizó un estudio a nivel morfológico de las células. Se presentan resultados de la distribución y localización subcelular de moléculas de adhesión de tipo cadherinas y elementos del citoesqueleto (filamentos de actina y microtúbulos acetilados) en diferentes etapas del desarrollo embrionario activo y diapausa I con el fin de evidenciar diferencias morfológicas de las células. Este abordaje es la primera aproximación al estudio de la morfología de las células en diapausa I, con un enfoque más global para contribuir a la caracterización de estos estadios tan particulares.

En este trabajo se logró un ajuste exitoso del protocolo de inmunodetección. Se observó que en las células de la capa celular envolvente (CCE), en el estadio anterior (epibolia) y posterior (reagregado) a la diapausa, los elementos del citoesqueleto se disponen en los bordes celulares. A diferencia de éstos, en el estadio diapáusico y reactivado se observa una distribución fibrilar citoplasmática. Asimismo, las cadherinas se distribuyen de manera puntiforme en la totalidad del embrión durante todos los estadios analizados, presentando además una acumulación en los bordes de las células de la CCE. Sin embargo, ésta se encuentra disminuída en la diapausa IB. En las blastómeras se observó una distribución de los elementos del citoesqueleto en los bordes celulares en los estadios embrionarios de epibolia, diapausa y reagregado. No obstante en la salida de la diapausa se observó que la disposición del citoesqueleto presentó cambios. Además se detectó una disminución de las cadherinas en blastómeras durante la diapausa, en conjunto con una diferencia morfológica celular con respecto a los demás estadios. Los núcleos celulares mostraron valores diferentes de área y circularidad a lo largo de los estadios estudiados, y además fue posible detectar tubulina acetilada y cadherina dentro de los núcleos en todos los estadios analizados.

## Introducción

---

Durante el transcurso del desarrollo embrionario las células experimentan una secuencia de eventos que definen su forma y posición generando arquitecturas corporales complejas. Estos eventos pueden ser divisiones, movimientos celulares, adhesión diferencial, diferenciación, secreción de señales moleculares, entre otros (Salazar-Ciudad y col., 2003). Esto acontece temprano en el desarrollo, con un número de células relativamente bajo, con morfologías similares y dispuestas en estructuras simples, ya sea agrupadas o formando láminas (Solinica-Krezel y Sepich 2012). La migración celular es un mecanismo conservado que aparece tanto en el desarrollo como en el funcionamiento de organismos uni y multicelulares. El movimiento coordinado de células a diferentes distancias juega un papel crítico en todas las etapas del mismo, desde la gastrulación hasta la formación de un organismo adulto (Gilbert, 2019). Se postula que todas las migraciones de diferentes tipos celulares ocurren mediante mecanismos similares, ya que la mayoría de los componentes son funcionalmente conservados en la evolución (Kurosaka y Kashina, 2008).

El inicio de la migración durante el desarrollo embrionario depende de las señales que reciben las células que van a promover el movimiento de la maquinaria molecular que impulsa a las mismas. La migración es un proceso cíclico en el cual la célula se polariza, formando un frente de avance que se extiende mediante protrusiones dinámicas conformadas por una lamela, lamelipodios y filopodios. La lamela es una zona amplia que abarca el área hacia adentro desde el frente de avance y concentra gran parte de los eventos mecánicos y reguladores responsables de la migración celular. La zona exterior de la lamela se denomina lamelipodio, es muy importante para la direccionalidad del movimiento. El otro tipo de estructura, los filopodios, son pequeñas protuberancias en el frente de avance y cumplen la función de explorar el entorno durante la migración. Existen cuatro etapas durante este proceso: (1) polarización, (2) protrusión, (3) adhesión y (4) retracción (Kurosaka y Kashina, 2008).

(1) En la etapa de polarización las células se van a desplazar en una cierta dirección, para esto, los reguladores centrales son proteínas de la familia Rho GTPasa Cdc42, y gradientes de fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). Durante esta etapa ocurre un rearme del citoplasma y un reordenamiento de los organelos. Para que la migración ocurra se necesita de la coordinación de los tres elementos del citoesqueleto (filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios). La actina es una proteína que se encuentra en la célula de manera globular (actina-G) y en forma filamentosa (actina-F). Ésta última se asocia con motores de miosina II para formar la red de actomiosina que genera fuerzas contráctiles cumpliendo un

rol principal ya que proporciona la mayor fuerza impulsora del movimiento, en conjunto con otros organelos y los otros elementos del citoesqueleto (Seetharaman y Etienne-Manneville, 2020). Los microtúbulos son tubos huecos conformados por dímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina que a su vez configuran protofilamentos (13 en general) que se alinean para formar un tubo. Son estructuras muy dinámicas, polarizadas, con un extremo más (donde se incorporan subunidades) y un extremo menos (de lento crecimiento). Además pueden incorporar modificaciones postraduccionales como destirosinación/tirocinación, acetilación/desacetilación, fosforilación, poliglutamilación y poliglicilación, todas estas modificaciones ocurren en el extremo C-terminal, excepto por la acetilación (Nogales, 2001) que tiene lugar en la superficie interior del microtúbulo en la Lisina-40 (Howes y col., 2014). Las funciones de los microtúbulos son variadas, desde la formación de cilios, flagelos hasta el huso mitótico durante la división celular. Las proteínas motoras utilizan los microtúbulos como guías para trasladar su carga hacia los diferentes extremos de los mismos. La mayoría de los microtúbulos se nuclean a partir de un centrosoma o centros organizadores, y durante la migración estos centros se reorientan en la periferia del núcleo en la parte frontal alineado con el frente de avance. De esta manera actúan como guías a las proteínas motoras en el transporte de vesículas hacia el frente de avance (Müsch, 2004; Nogales, 2001, Kurosaka y Kashina, 2008).

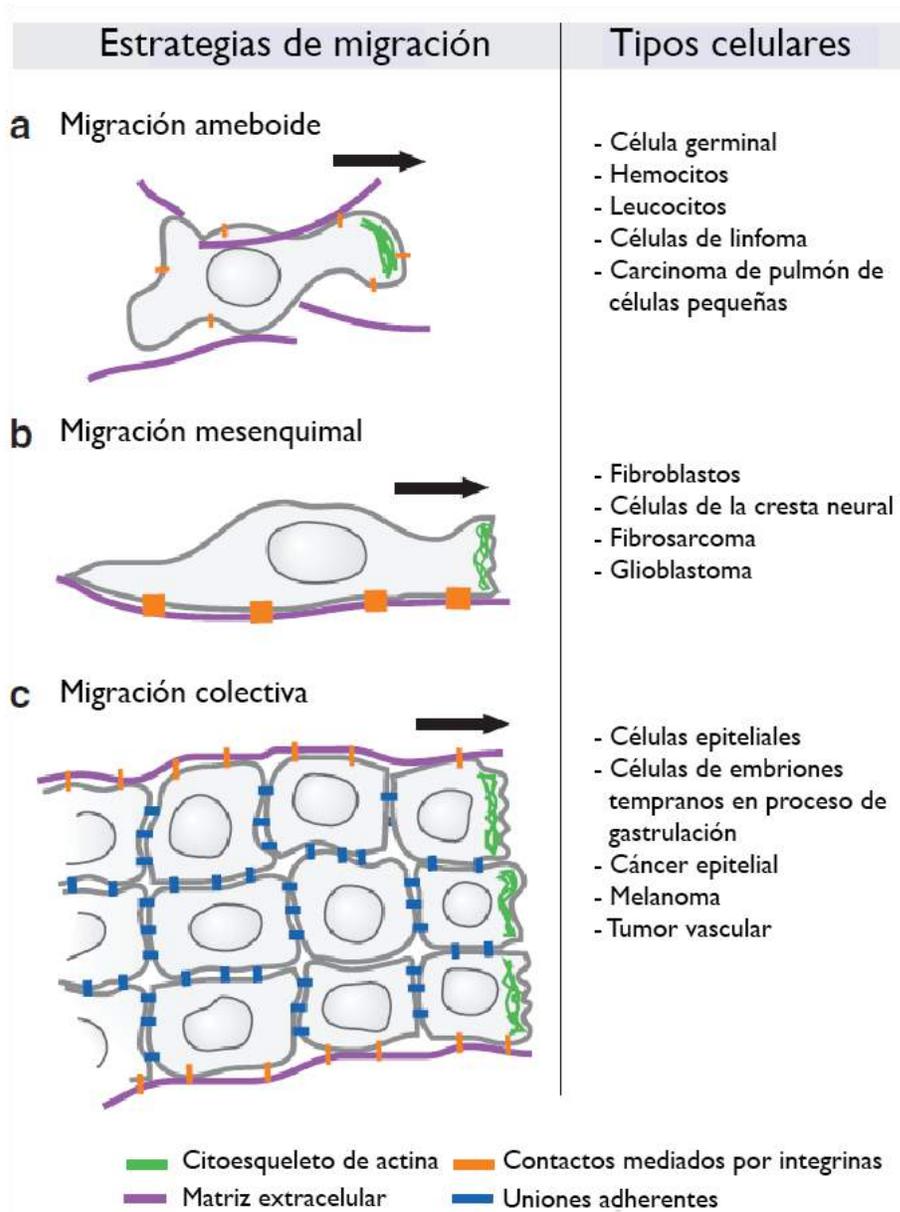
(2) La segunda etapa es la protrusión generada por la polimerización de filamentos de actina en el frente de avance empujando la membrana plasmática hacia adelante, ya sea como largos haces paralelos para formar filopodios, o como una red dendrítica ramificada durante la formación del lamelipodio (Kurosaka y Kashina, 2008).

(3) En la etapa de adhesión, la célula se adhiere al sustrato y se estabiliza. Esta etapa es llevada a cabo mayoritariamente por las integrinas, proteínas transmembrana cuyo dominio intracelular interactúa con filamentos de actina mediante proteínas accesorias y su dominio extracelular se une al sustrato, generando puntos estables de interacción célula-sustrato. A medida que se unen al sustrato cambian de conformación, promoviendo cascadas de señalización intracelular que conducen a cambios en todas las moléculas de señalización que participan en el frente de avance. La activación de la integrina en el dominio citoplasmático está mediado por proteínas (quinasa PKC, GTPasas Rap1 y vías de señalización de PI3K) que llevan al agrupamiento de integrinas y reclutamiento de proteínas estructurales y de señalización para formar adherencias, las cuales eventualmente maduran hasta conformar una adhesión focal (Kurosaka y Kashina, 2008)

Cuando la migración ocurre en grupos celulares coordinados, actúan también otras proteínas de adhesión. Las cadherinas son proteínas de adhesión transmembrana de uniones homofílicas calcio-dependientes mediante su dominio extracelular. La interacción cadherina-cadherina por los dominios extracelulares forma uniones de tipo adherentes. Asimismo, mediante el dominio intracelular, las

cadherinas interaccionan con la  $\beta$ -catenina, capaz de reclutar a la  $\alpha$ -catenina que interactúa directamente con los filamentos de actina u otras proteínas que son capaces de interaccionar con la misma, como la Vinculina y Afadina. Las cadherinas también son capaces de interaccionar con los microtúbulos. El dominio intracelular próximo a la membrana contiene un sitio de p120-catenina. P120 puede unir las cadherinas a los extremos más de los microtúbulos mediante la dineína, una proteína motora, y al extremo menos mediante PLEKHA7 y Nezha. Por lo tanto existe una interacción entre las cadherinas y distintos componentes del citoesqueleto (Theveneau y Mayor, 2012). La mayor resistencia en una célula migratoria se transmite a través de las adherencias en la lamela principal y en las regiones de retracción en la parte posterior de la célula. A medida que las células se desplazan las adhesiones se desensamblan (Kurosaka y Kashina, 2008).

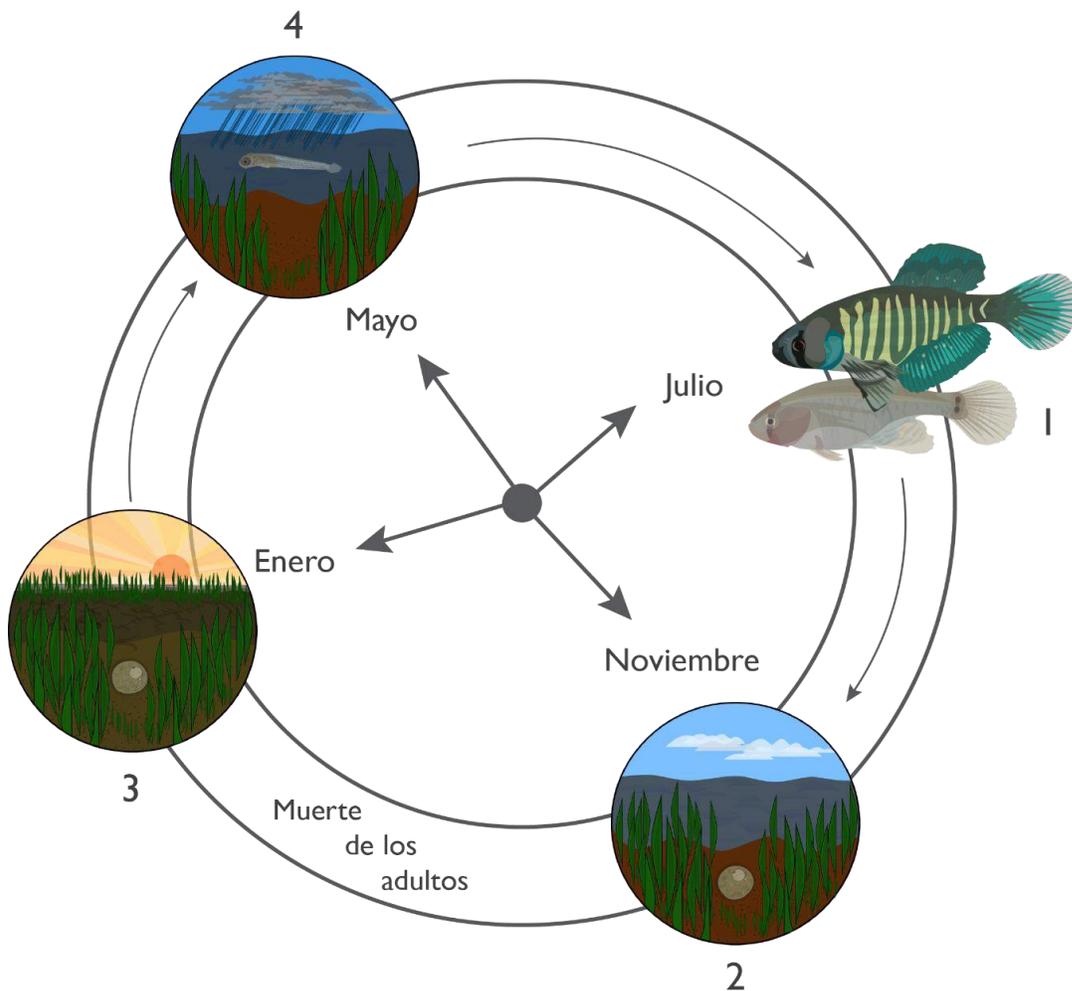
(4) Por último ocurre la etapa de retracción del borde posterior, a medida que la célula se mueve, el borde posterior se retrae para permitir el avance. Se estima que la fuerza de estiramiento creada durante la liberación de la adhesión focal es suficiente para abrir los canales de  $Ca^{2+}$  activados por estiramiento que desencadenan la activación de la proteasa calpaína dependiente del calcio. Esta proteína participa en el desensamblaje de la adhesión focal al escindir una serie de proteínas de adhesión focal, incluida la vinculina (Franco y col., 2004). Dependiendo del contexto en donde se encuentre la célula y las señales recibidas, existen diferentes estrategias de migración celular. En la migración ameboide las células polarizadas presentan un frente de avance evidente. En la migración mesenquimal, las células exhiben morfología de huso, son elongadas. Además las células pueden migrar de manera colectiva, formando un agrupamiento de células conectadas mediante uniones adherentes (Kunwar y col., 2006; Kurosaka y Kashina, 2008)(ver Figura I1).



**Figura 11** Diferentes estrategias de migración **A** Migración ameboide. En la migración ameboide las células están polarizadas, con un claro frente de avance y son altamente capaces de modificar su forma y dirección. Migran por huecos en la matriz extracelular. Son menos adhesivas y no requieren integrinas, metaloproteasas o cadherinas. **B** Migración mesenquimal. Las células presentan forma de huso con morfologías alargadas. Son dependientes de integrinas para contactar la matriz extracelular y usan metaloproteasas para degradar la misma. **C** Migración colectiva. Las células forman un agrupamiento que se conectan por uniones adherentes (líneas azules). Las células migran como capas y se mueven por la matriz usando metaloproteasas para degradarla. Modificado de Kunwar y col., 2006.

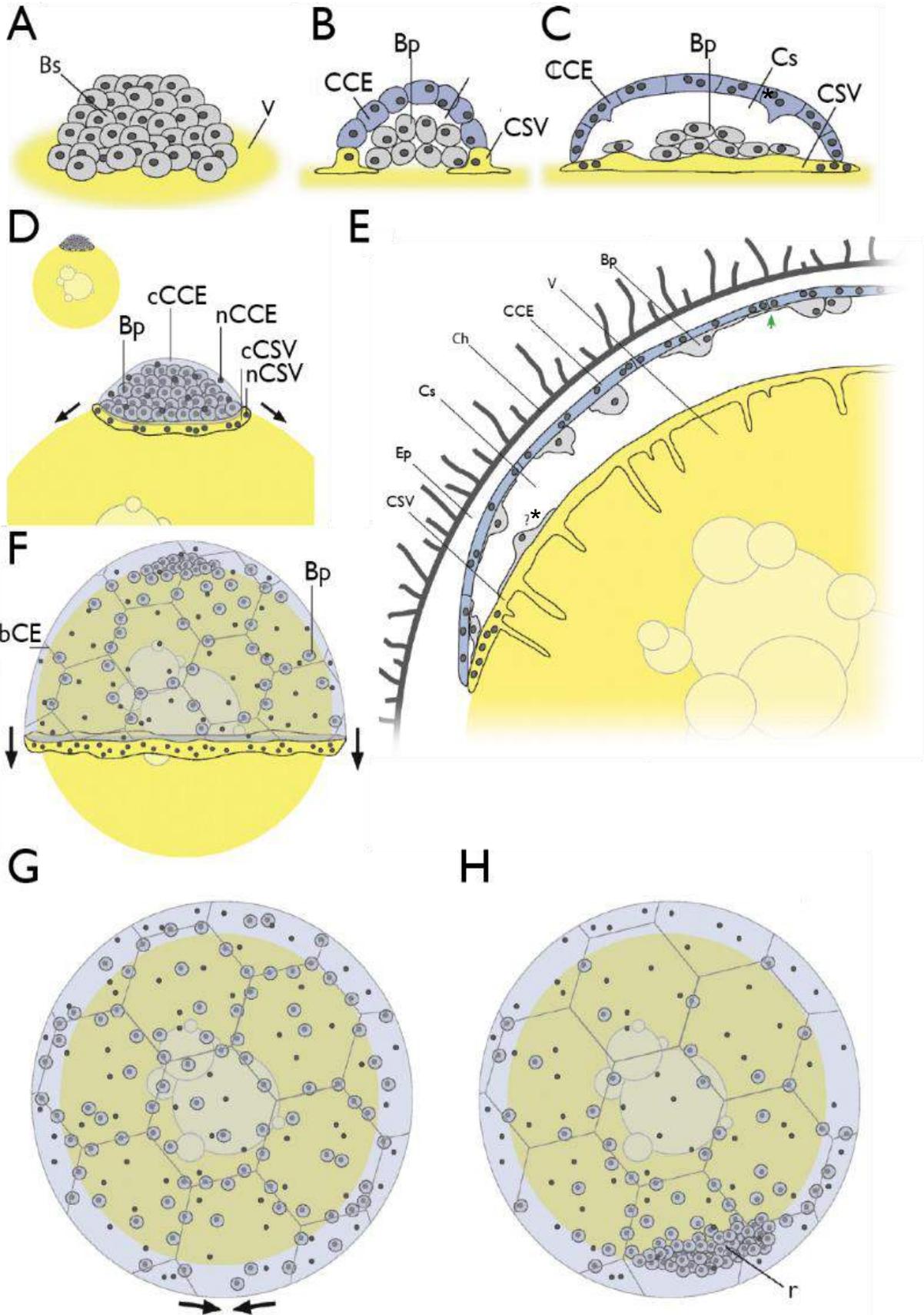
## Organismo de estudio

Los peces anuales (orden Cyprinodontiformes, Aplocheilidae) son teleósteos que presentan un patrón de desarrollo embrionario con características muy particulares (Myers, 1952). Estos peces habitan ambientes dulceacuícolas efímeros ampliamente distribuidos en América y África (Loureiro y de Sá, 2016). Durante las épocas de lluvia, los charcos se llenan, los embriones eclosionan, los juveniles alcanzan rápidamente la madurez sexual y los adultos se reproducen. Luego, en las épocas de sequía los adultos mueren y los embriones permanecen en el sustrato hasta la próxima estación lluviosa, momento en que comienza nuevamente el ciclo de vida (Wourms, 1964, 1967, 1972b). Los embriones de estos peces presentan tolerancia a la hipoxia/anoxia, a la radiación UV, y también resistencia a la desecación (Podrabsky y col., 2016). La tolerancia y resistencia están potenciadas en las detenciones reversibles en el desarrollo de los embriones. Estas características son claves para la supervivencia en el sustrato debido a las condiciones extremas que allí afrontan (Podrabsky y Hand, 2015; Machado y Podrabsky, 2007; Podrabsky y col., 2011; Anderson y Podrabsky, 2014).



**Figura I2** Ciclo de vida de *Austrolebias*, modificado de Wourms 1972 c. **1-2** Puesta de huevos durante el período de lluvias en invierno. **2-3** Muerte de los adultos a medida que los charcos se secan y los huevos quedan enterrados en el sustrato durante los meses de verano. **3-4** Período de lluvias donde los charcos se llenan de agua y nacen los alevines. **4-1** Desarrollo y maduración de alevines a adultos, inicio del nuevo período reproductivo.

Durante el desarrollo embrionario, luego del clivaje (meroblástico radial) ocurre la formación de las tres capas celulares típicas de los teleósteos: la capa sincitial vitelina (CSV), que está en contacto con el vitelo, compuesta por múltiples núcleos en una única célula vitelina, la capa celular envolvente (CCE) compuesta por grandes células multinucleadas ubicada próxima al corion, y las blastómeras profundas que se ubican entre las capas anteriormente mencionadas (ver Figura I3). Luego de la formación de las tres capas, comienza el primer movimiento de gastrulación en los peces: la epibolia (Gilbert y Barresi, 2019). Las blastómeras profundas son las que originarán al embrión, éstas comienzan a migrar contactando la CCE o la CSV, y se dispersan desde el polo animal hacia el vegetal hasta cubrir la totalidad del huevo en conjunto con las otras capas. Esta fase de dispersión es una de las características particulares que presenta el desarrollo embrionario de los peces anuales (Wourms, 1972a) (ver flechas en Figura I4 A) (Naumann y Englert, 2018). Las blastómeras en migración presentan formas triangulares, alargadas o romboidales con filopodios (Carter y Wourms, 1991; Arezo y col., 2005). La epibolia en los peces anuales está desacoplada a nivel temporal y espacial del ingreso del endomesodermo, a diferencia de lo que ocurre en el desarrollo de los peces teleósteos no anuales (Peters, 1963; Wourms, 1972 a, b; Trinkaus, 1993; Arezo y col., 2005, Pereiro y col., 2017; Reig y col., 2017).



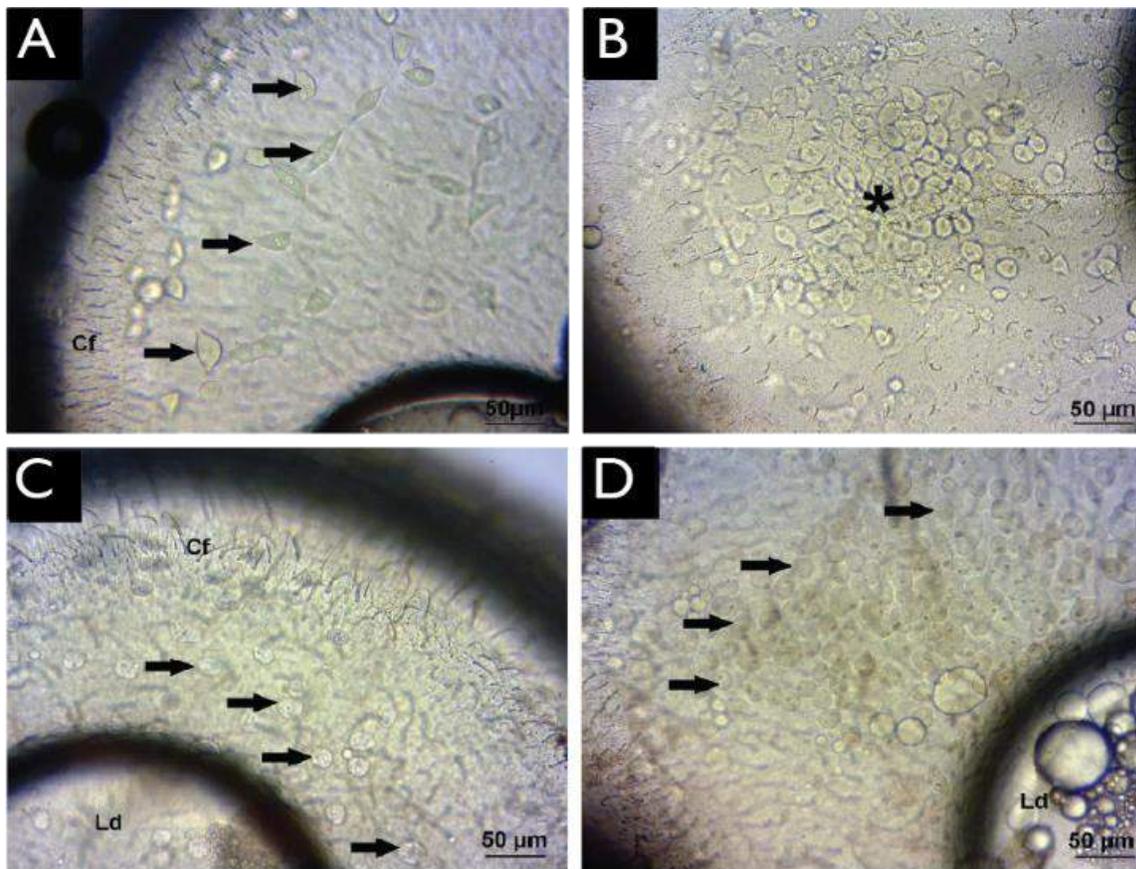
**Figura I3** Esquema representativo de las primeras etapas del desarrollo de los peces anuales, modificado de Naumann y Englert, 2018. **A** Estadio de blástula temprana **B** Estadio de blástula tardía. Las células se separan en: la capa celular envolvente, la capa sincitial vitelina y las blastómeras profundas. Se forma la cavidad de segmentación. **C, D y E** Comienzo de la epibolia y dispersión de las blastómeras profundas. Las blastómeras comienzan a migrar sobre la superficie interna de la CCE, algunas migran por la superficie de la CSV (?\*). Flecha verde: filopodio. La CCE se vuelve multinucleada y presenta filamentos de actina en los bordes (Reig y col., 2017). **F** Epibolia cincuenta por ciento. **G** Epibolia cien por ciento. **H** Reagregado II según Pereiro y col., 2017. Bs: blastómeras. Ch: corion. Bp: Blastómeras profundas. CCE: Capa celular envolvente. cCCE: citoplasma de la CCE. nCCE: núcleos de la CCE. Ep: espacio perivitelino. Cs: cavidad de segmentación. V: vitelo. CSV: capa sincitial vitelina. cCSV: citoplasma de la CSV. nCSV: núcleos de la CSV. r: reagregado.

Una vez finalizada la epibolia, en la fase dispersa, los embriones pueden o no experimentar la primera detención en el desarrollo, denominada diapausa I. Las diapausas son estados de dormancia reversibles, que ocurren en estadios específicos del desarrollo, inducibles por factores endógenos (claves genéticas y epigenéticas) o exógenos (diferentes señales ambientales) (Wourms, 1972 c). Las diapausas en los peces anuales están caracterizadas por una gran depresión metabólica, un cambio morfológico de las células (se redondean) y una detención del ciclo celular en la fase G1 (ver Figura I3 B y C) (Podrabsky y Hand, 2015). Se han descrito dos fenotipos, A y B, de diapausa I en dos especies de peces anuales sudamericanos, *Austrolebias charrua* y *Austrolebias viarius*. El fenotipo A presenta células dispersas equidistantes y redondeadas, mientras que el fenotipo B presenta células redondeadas próximas o en contacto formando grupos de más de diez células. Este fenotipo es similar a estadios tempranos de la siguiente etapa en el desarrollo (Reagregado II) pero se distingue de éste por la morfología de las células que conforman el reagregado por no mostrar células migratorias (Arezo y col., 2017) (ver Figura I4).

En los peces anuales pueden ocurrir otras dos diapausas: en embriones somíticos (diapausa II); y la última (la diapausa III) sucede en embriones formados en su totalidad y a punto de eclosionar (Peters, 1963; Wourms, 1972a,b). Las tres diapausas son fisiológicamente distintas y pueden reaccionar diferente frente a las mismas condiciones ambientales (Wourms, 1972b).

Luego de la epibolia (o salida de la diapausa I), comienza la fase de reagregación, etapa única de los peces anuales (Wourms, 1972a). Las blastómeras comienzan a migrar hacia una región en la que comienza a aumentar la densidad y el contacto celular. El reagregado I consiste en un grupo de células de entre 10 y 30 que presentan lamelipodios y filopodios. A medida que el desarrollo transcurre, el área del reagregado aumenta de tamaño, por incremento del número de células y mayor proximidad de las mismas en el centro del reagregado, formando una

monocapa de células (Reagregado II) (ver asterisco en Figura I3 D). Conforme las células se dividen el reagregado aumenta su tamaño y las células son más pequeñas, y presentan diversas morfologías. En el centro predominan células redondeadas y en la periferia se observan células alargadas de tipo filiforme (Reagregado III). El reagregado aumenta de tamaño al punto que no es posible distinguir los límites celulares (Reagregado IV) y modifica su morfología de discoidal a elipsoidal (Reagregado V). El eje embrionario donde ocurrirá la organogénesis se evidencia en la zona media del reagregado. El eje embrionario donde ocurrirá la organogénesis se evidencia en la zona media del reagregado (Wourms, 1972a; Pereiro y col., 2017).



**Figura I4** Estadios del desarrollo del pez anual del género *Austrolebias* Arezo y col., 2017. **A** Estadio de epibolia (80-100%). **B** Reagregado II (según Pereiro y col., 2017). Asterísco: centro del reagregado. **C** Embrión en diapausa IA. **D** Embrión en diapausa IB. Flechas: blastómeras. Cf: filamentos del corion. Ld: gota lipídica.

En suma, es posible observar que durante el desarrollo embrionario las blastómeras de los peces anuales experimentan cambios morfológicos, desde formas migratorias durante la epibolia, a redondeadas en la diapausa y reagregado.

Estudios recientes demuestran que la disminución de la expresión de la cadherina de tipo epitelial (cadherina-E, implicada en la adhesión célula-célula) durante el desarrollo en el pez anual sudamericano *Austrolebias nigripinis*, tiene como consecuencia un cambio en la morfología de las blastómeras profundas y presenta pérdida de adhesión a las células de la capa celular envolvente (Reig y col., 2017). Este fenómeno es muy similar al observado en las células durante la diapausa I. Por este motivo, es posible pensar que una disminución de la expresión de cadherina estaría implicada en este estadio tan particular de diapausa I y que el cambio de morfología de las blastómeras, de migratoria a redondeada, muy probablemente implique un reordenamiento del citoesqueleto.

*Austrolebias charrua* (Costa y Cheffe, 2001) es una especie de pez anual cuya distribución abarca el este del Uruguay, específicamente el departamento de Rocha, y sur de Brasil en la cuenca de las lagunas Patos-Merín. Esta especie presenta las tres diapausas reversibles a lo largo de su desarrollo. En el grupo de investigación en el que se desarrolló este trabajo se ha logrado estandarizar la inducción de la diapausa I en embriones de esta especie en el laboratorio mediante técnicas sencillas (Arezo y col., 2017). En este marco, el estudio de la morfología celular y presencia y localización subcelular de moléculas de cadherina en células en diapausa I de *A. charrua* generará pistas para comprender la organización celular de este estadio particular de los peces anuales.

Considerando los antecedentes mencionados que muestran un fenotipo celular redondeado con ausencia de uniones célula célula como resultado de la disminución de la expresión de cadherina-E, se propone como hipótesis que la cadherina se expresa durante las etapas activas del desarrollo embrionario y se encuentra ausente durante la diapausa I. Asimismo, ocurriría un reordenamiento de los elementos del citoesqueleto acompañando los cambios morfológicos descritos.

## Objetivos

---

### Objetivo general

Contribuir al análisis de la morfología celular en embriones de *Austrolebias charrua* en el estadio de epibolia, diapausa I, salida de diapausa I (reactivado) y reagregación temprana mediante técnicas de marcaje de los componentes del citoesqueleto e inmunofluorescencia indirecta *in toto* de moléculas presentes en uniones célula-célula.

### Objetivos específicos

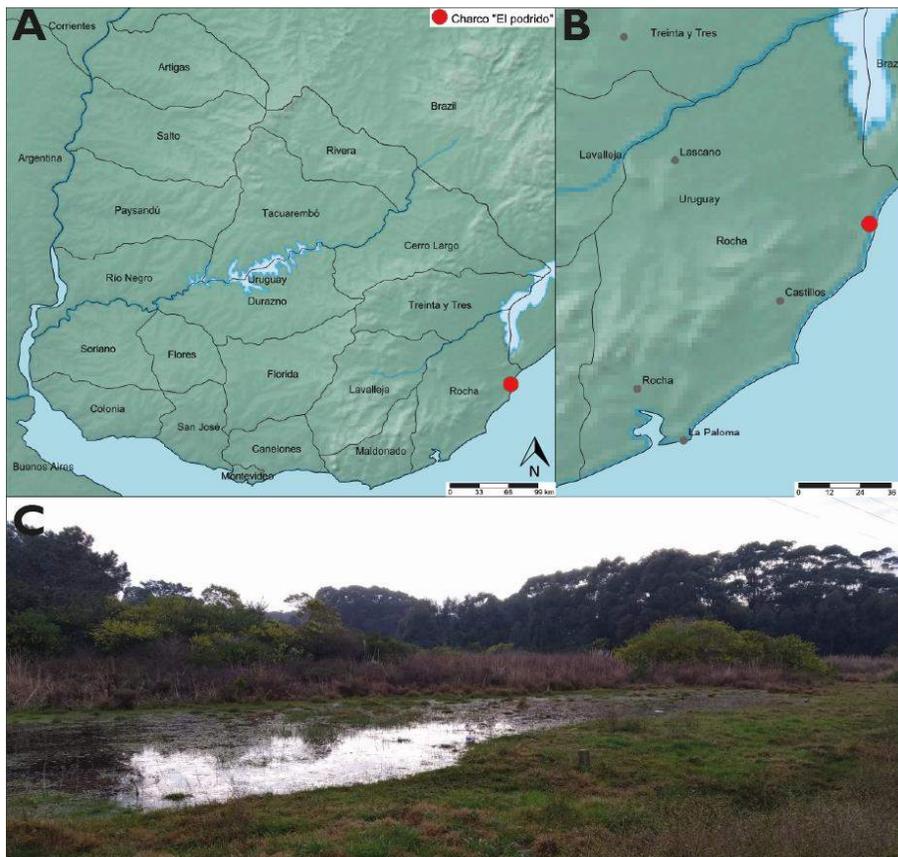
1. Aproximación a las técnicas de colecta de peces anuales en el campo y reconocimiento de su hábitat natural.
2. Reproducción, obtención y cultivo de embriones de *Austrolebias charrua*.
3. Reconocimiento de los diferentes estadios del desarrollo embrionario en peces anuales.
4. Inducción de diapausa I en función de la presencia de adultos e hipoxia a 19°C.
5. Fijación y almacenamiento de embriones en diapausa I, epibolia (20-50%) y reagregado (I, II y III) como control positivo. Decorionado de embriones.
6. Puesta a punto de tinción fluorescente e inmunodetección para diferentes componentes del citoesqueleto y moléculas de adhesión célula-célula sobre embriones *in toto*.
7. Puesta a punto del montaje de embriones para su visualización al microscopio de barrido láser confocal.
8. Análisis de las imágenes obtenidas mediante el programa FIJI.

## Materiales y métodos

---

### Obtención y mantenimiento de adultos de *A.charrua* en el laboratorio

Para este trabajo se utilizaron especímenes adultos de *A. charrua* de fenotipo salvaje colectados durante 2018 y 2019 de los charcos temporales del Departamento de Rocha (La Coronilla, Uruguay: latitud -33.53, longitud -53.30) (Figura I1). Asimismo, se utilizaron adultos obtenidos en el laboratorio a partir de la eclosión de embriones generados en condiciones de cautiverio mediante la reproducción de parejas colectadas en el campo durante 2017, provenientes del charco mencionado anteriormente. Los peces de campo y los generados en condiciones de laboratorio no se cruzaron entre sí.



**Figura MM1** A Mapa físico de Uruguay (Shorthouse, 2010) el círculo rojo indica la localización del charco donde se colectaron los ejemplares adultos de *Austrolebias charrua*, ubicado en el departamento de Rocha. B Ubicación del charco en el departamento de Rocha. C Charco inundado.

Los adultos fueron criados y mantenidos en el Laboratorio de Experimentación Animal húmedo de la Facultad de Ciencias en peceras de 20 litros de capacidad. El agua se preparó mediante la filtración por ósmosis reversa y el agregado de sal marina sintética (Tetra Marine Salt Pro, Tetra). Posteriormente se almacenó en un tanque de 150 L (300±50 µS, pH 6.5-7.5) con continuo burbujeo de aire. El recambio de agua fue constante mediante un sistema de recirculación que abarcó a todas las peceras. La temperatura ambiente se mantuvo a 19-20°C, con un fotoperíodo natural. Los peces fueron alimentados una vez al día principalmente con *Lombriculus variegatus*, *Tubifex spp* y *Daphnia magna* (Papa y col., 2016).

La colecta y el mantenimiento de los ejemplares adultos, se realizó según lo establecido en el protocolo avalado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias. Exp. 240011-001 205-16.

## **Obtención de embriones, cultivo, inducción de diapausa I y fijación**

Los peces adultos se colocaron en peceras separados en tríos de dos hembras y un macho, o cuartetos conformados por un macho y tres hembras. Para el desove se colocaron cubas que contenían esferas de vidrio (Thomas Scientific Swedesboro, NJ) de 200-500 µm de diámetro. Luego del cortejo, el macho y la hembra se entierran en el sustrato proporcionado por las esferas de vidrio, depositan los huevos y los ovocitos son fecundados (Vaz-Ferreira y col., 1964; Papa y col., 2016).

Para obtener los embriones, las esferas se tamizaron a través de una malla de 0,5 mm. Los embriones fueron recolectados utilizando una pipeta de plástico y se colocaron en placas de Petri con agua de acuario (Papa y col., 2016). Posteriormente, los embriones se clasificaron inicialmente en viables y no viables, y en fecundados o no fecundados haciendo uso de la lupa binocular en función de la presencia de espacio perivitelino, el movimiento de la gota lipídica y la presencia de una sola célula. Se tomaron los embriones y se cultivaron en solución Yamamoto (Yamamoto, 1967) a 19 °C. Para obtener embriones en estadio epibolia 60-90% se cultivaron los embriones por 3 a 4 días (Arezo y col., 2005), y para obtener el estadio de reagregado (I, II y III) se cultivaron por 6 a 7 días (Pereiro y col., 2017). Los embriones fueron visualizados por medio de un microscopio óptico de campo claro (Olympus Vanox).

Los embriones utilizados para la inducción de diapausa I (Arezo y col., 2017) fueron extraídos aproximadamente 2 horas luego del desove. Los embriones se colocaron en el dispositivo de inducción, el cual se rellenó con turba y agua de acuario, y se cubrió con una malla. Por último, el dispositivo se depositó en una pecera con especímenes adultos. Los embriones permanecieron en el dispositivo durante un tiempo mínimo de 30 días. Posteriormente se retiraron los embriones de

los dispositivos y se clasificaron según los diferentes fenotipos (diapausa IA y IB) según Arezo y col. (2017).

Los embriones fueron fijados usando el mismo método independiente del estadio embrionario. Se fijaron en PFA 4% PBS 1% durante toda una noche a temperatura ambiente.

## **Decorionado, tinción fluorescente e inmunomarcaje indirecto sobre embriones *in toto***

Luego de la fijación de los embriones en el estadio embrionario requerido, se procedió a decorionarlos utilizando el microscopio estereoscópico Nikon SMZ 745. Para retirar el corion de cada embrión se utilizaron pinzas Dumont N°5 y N°3.

Con el objetivo de marcar las proteínas de adhesión, cadherinas, y la tubulina acetilada, como elemento del citoesqueleto, se utilizó la técnica de inmunodetección. Esta técnica se basa en el uso de anticuerpos primarios que presentan un sitio de unión específico a las proteínas de interés, sobre los embriones enteros. Luego se utilizó un anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario, que posee acoplado una molécula fluorescente. Éste método de reconocimiento se denomina inmunocitoquímica o inmunomarcaje indirecto. En este trabajo, el protocolo utilizado fue ajustado por nosotros. Para observar las moléculas fluorescentes del anticuerpo secundario se utilizó la microscopía de barrido láser confocal, que excita por medio de láseres la muestra a longitudes de ondas específicas y a diferentes alturas, generando secciones ópticas de la muestra. Se escanea para distintas alturas de la muestra en el plano XY. La fluorescencia emitida por las moléculas fluorescentes es captada por un fotomultiplicador, posteriormente se integran para formar una imagen utilizando el software del microscopio. Delante del fotomultiplicador se coloca una apertura denominada *pinhole*, la cual evita el pasaje de fluorescencia de distintas regiones de la muestra que no están en foco, de este modo los fotones convergen sobre esta apertura e ingresa en el detector. Finalmente se obtiene la información mediante un barrido por todo el campo, generando así una imagen tridimensional que puede ser observada en una pantalla de computadora para realizar un posterior análisis y procesamiento con softwares especiales (Alberts y col., 2002).

Para realizar el inmunomarcaje indirecto de los embriones *in toto*, se realizaron 4 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y 2 lavados con PBS-T (Tritón al 1% en PBS) de 5 minutos cada uno, seguido de dos lavados con PBS-T para permeabilizar los embriones. Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos mediante la incubación en solución de bloqueo (albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y Tritón 1% en PBS), durante 3 horas a temperatura ambiente. Finalizado el bloqueo, los embriones se incubaron con los anticuerpos primarios (ver Tabla MM1) diluidos en solución de bloqueo toda la noche a 4°C con una leve agitación

horizontal cada 2 horas. Luego de la incubación, se recuperó el anticuerpo primario, e inmediatamente se realizaron 5 lavados de 20 minutos cada uno en PBS-T para retirar el anticuerpo primario que no se unió a su antígeno. Se incubó con el anticuerpo secundario, se agregó el marcador fluorescente de filamentos de actina (actina-F) Faloidina-Rodamina, y se incluyó el marcador de ADN, verde metilo (Prieto y col., 2014) o Hoechst 33342, toda la noche a 4 °C con leve agitación horizontal cada 2 horas.

**Tabla MM1:** Anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios y marcadores utilizados para marcaje e inmunodetección.

Detección	Tipo	Marca y código	Dilución
Pan-cadherina	Anticuerpo primario	Sigma-Aldrich, C3678	1:2000
Tubulina acetilada	Anticuerpo primario	Sigma-Aldrich, T7451	1:200
Alexa 488, anti-conejo	Anticuerpo secundario	ThermoFisher Scientific, 421706	1:1000
Alexa 647, anti-ratón	Anticuerpo secundario	SAB4600182	1:1000
Filamentos de actina	Marcador, faloidina conjugada a rodamina (TRITC)	ThermoFisher Scientific, P1951	1:1000
ADN	Marcador, verde de metilo	(Dr.G. Grüber, Leipzig, Germany; Prieto y col., 2014)	1:5000
ADN	Marcador, Hoechst	ThermoFisher Scientific, 33342	1:2000

Finalmente se realizaron 4 lavados de 1 hora cada uno con PBS-T y dos lavados en PBS-T de 30 minutos cada uno. Los embriones se montaron en glicerol 70% en Tris 20 mM pH 8 agarosa 1% en una cámara fabricada con cinta aisladora sobre un portaobjetos. Se colocó esmalte de uñas para sellar los bordes entre el cubre y portaobjetos.

Los controles negativos fueron realizados siguiendo el mismo protocolo de decoronado, inmunodetección y tinción fluorescente pero sin incubación con anticuerpo primario. Por cada experimento se realizó un control con un número de 3 embriones.

## Adquisición y análisis de imágenes

Se observaron las muestras mediante microscopía de barrido de láser confocal empleando los microscopios confocales Zeiss LSM 800 y 880, ambos ubicados en el Instituto Pasteur de Montevideo. Se utilizaron varias líneas de excitación (de 500 a 700 nm) y una lente objetiva de 20X con una apertura numérica de 0,7.

El procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas se llevó a cabo con el programa de acceso libre FIJI (Schindelin y col., 2012)(<https://fiji.sc/>). Las imágenes mostradas en este trabajo son proyecciones de máxima intensidad a partir del apilamiento de imágenes, compuestas por entre 40 y 70 secciones ópticas, separadas por 0.5  $\mu\text{m}$ . Las figuras presentes en este trabajo fueron diagramadas utilizando Adobe Photoshop 2020 (Adobe Systems Incorporated).

El estudio de la cantidad, morfología y área de los núcleos celulares también fue realizada con el programa FIJI, utilizando descriptores de forma: circularidad= $4\pi \cdot \text{área} / \text{perímetro}^2$  y área ( $\mu\text{m}^2$ ). Se seleccionó el contorno de cada uno y con la herramienta *Measure* se extrajeron dichos valores. Para la toma de estos valores se utilizaron tanto imágenes de núcleos teñidos con verde de metilo como con Hoechst 33342. Asimismo, se calculó el área y circularidad de las blastómeras profundas utilizando la marca del citoesqueleto de actina.

Los datos obtenidos fueron separados por estadio embrionario, para analizar diferencias estadísticas entre los estadios se realizó la prueba no paramétrica de Mann–Whitney–Wilcoxon que permite comparar las variables sin asumir una distribución normal. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando R environment for statistical computing version 2.15.3 ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)) (R Development Core Team, 2013) y se graficaron utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software v8, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## Resultados

---

Los análisis presentados en este trabajo muestran el primer estudio a nivel morfológico de células embrionarias de *Austrolebias charrua*, incluyendo componentes subcelulares. Conforme a esto se presentan resultados de marcajes que incluyen: tinción de actina-F, inmunomarcaje de tubulina acetilada, identificación de proteínas de adhesión celular de la familia de las cadherinas mediante inmunodetección y contratinciones con el fin de evidenciar la presencia de núcleos celulares. El objetivo de esta aproximación es estudiar el cambio de morfología que experimentan las blastómeras entre la epibolia (morfología migratoria) y la diapausa I (morfología redondeada) y cómo se ven afectados los componentes subcelulares, en este caso el citoesqueleto y proteínas de adhesión. En base a las observaciones del comportamiento de estas células *in vivo* realizadas por Arezo y col., 2017, se sugiere que podría existir un reordenamiento del citoesqueleto, así como también de las uniones entre las blastómeras como con las células de la CCE. Además, en el fenotipo de Diapausa IB se encuentran grupos de células similares a los estadios tempranos de reagregados (RII y III). Este abordaje es la primera aproximación al estudio de la morfología de las células en diapausa I que incluye marcadores subcelulares, con un enfoque general para lograr una mayor comprensión de los eventos celulares que ocurren durante estas fases observadas únicamente durante el desarrollo embrionario de peces anuales.

### Epibolia

En la Figura R1 se distinguen las células de la capa CCE que se posiciona cubriendo el embrión, posee múltiples núcleos y sus células son de grandes tamaños (Wourms, 1972 a). En la Figura R1 (A y B) se señalan con flechas los filamentos de actina que forman parte del citoesqueleto cortical de las células de la CCE, y además se visualizan los núcleos de la CCE posicionados en el contorno de las mismas (ver flechas en Figura R1 D). En el citoplasma de las blastómeras profundas es posible observar filamentos de actina (ver recuadros en Figura R1 D). Estas células presentan una morfología migratoria típica del estadio epibolia/dispersión. Se logra observar una acumulación de la marca hacia un extremo de las células (señalado con cabezas de flecha en la Figura 1 A y B).

En la Figura R2 (J) se señala con cabezas de flecha verdes tubulina acetilada posicionada en los bordes de las células de la CCE, y en naranja se señala la distribución de la misma en el citoplasma de blastómeras profundas (ver recuadros en Figura R2 L y Ñ). Se observa una leve inmunomarcación prácticamente homogénea en el citoplasma de las blastómeras. También se encontró tubulina

acetilada dentro de los núcleos en experimentos en los que se marcó ADN (E1-3) y en el que no se marcó (E4) (ver Figura R2 H, O y R). La Figura R3 muestra planos ortogonales de diferentes núcleos elegidos al azar que evidencian inmunomarcaje para tubulina acetilada con una distribución homogénea (ver cabezas de flechas Figura R3 C, F, I, L y Ñ).

En relación al inmunomarcaje de cadherinas, en la Figura R4 es posible observar que la señal fluorescente se localiza de manera puntiforme en todo el embrión (cabezas de flechas naranja en la Figura R4 A) con una leve acumulación en los bordes de las células de la CCE (cabezas de flechas verdes en la Figura R4 A). Las blastómeras parecen evidenciar una mayor señal del inmunomarcaje de cadherinas con respecto al resto del embrión (ver recuadros en la Figura R4 A y G). Además, se observó señal fluorescente en los núcleos presente en el experimento que se realizó tinción para ADN (E1) y en el que no se realizó (E2) (ver flechas en Figura R4 G y K). Ésta se analizó de la misma manera que se realizó para la tubulina acetilada. La Figura R5 muestra planos ortogonales de diferentes núcleos elegidos al azar que evidencian señal fluorescente para cadherina con una distribución homogénea (ver cabeza de flechas Figura R5 C, F, I, L y Ñ).

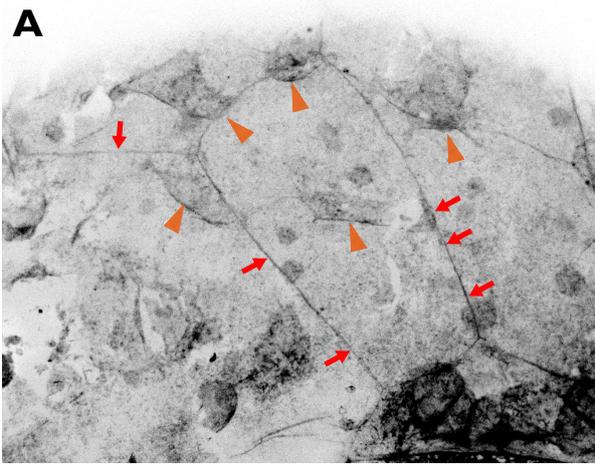
En resumen, en el estadio de epibolia es posible observar que las blastómeras profundas exhiben una morfología migratoria. Es posible distinguir esta morfología en base al marcaje de los filamentos de actina que conforman el citoesqueleto cortical de las blastómeras. La distribución de tubulina acetilada se observó homogénea y con una señal leve. En cambio las cadherinas presentan una distribución puntiforme en todo el embrión, con un aparente aumento de la señal en las blastómeras profundas. Se observó además que esta proteína se localiza en los núcleos con un patrón homogéneo, y al igual que esta, la tubulina acetilada también se detectó con clara señal en los núcleos.

Cabe mencionar que mediante esta aproximación experimental registramos un bajo número de blastómeras para dicho estadio. Los embriones incubados en ausencia de anticuerpo primario no presentaron señal fluorescente.

E1

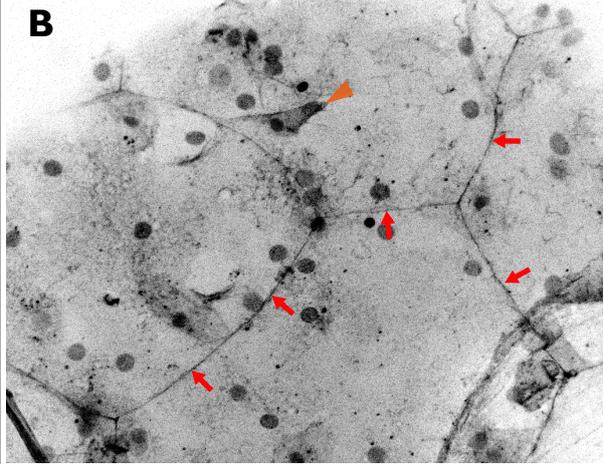
**Actina-F**

**A**



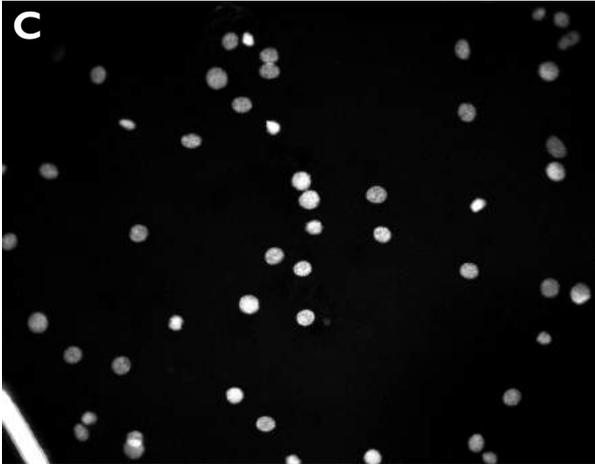
E2

**B**



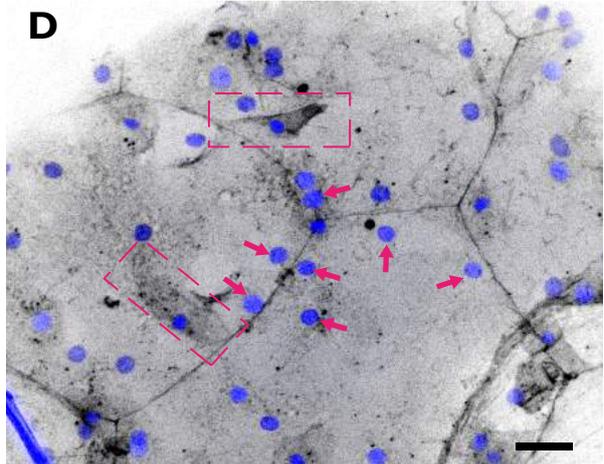
**ADN**

**C**

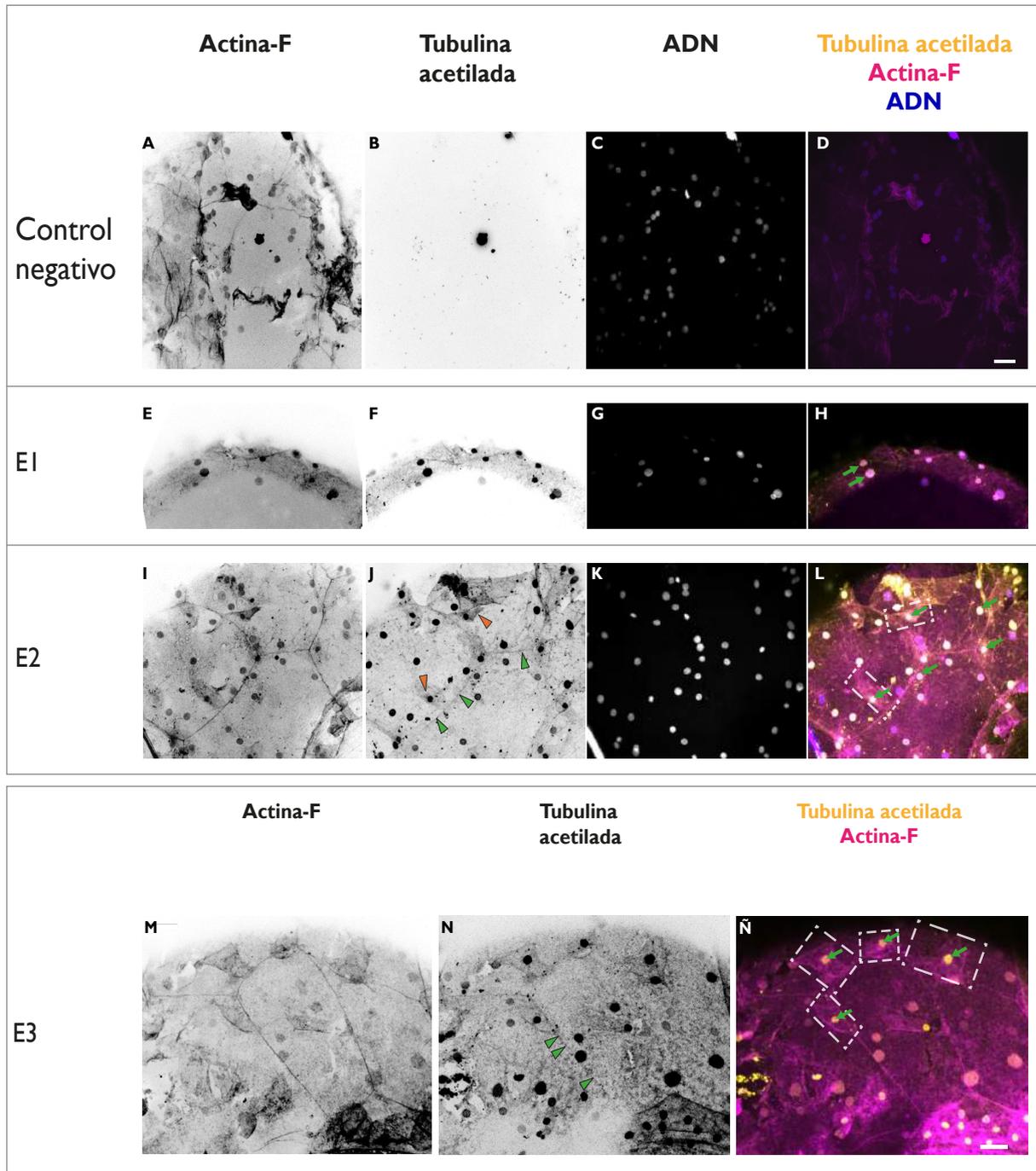


**Actina-F  
ADN**

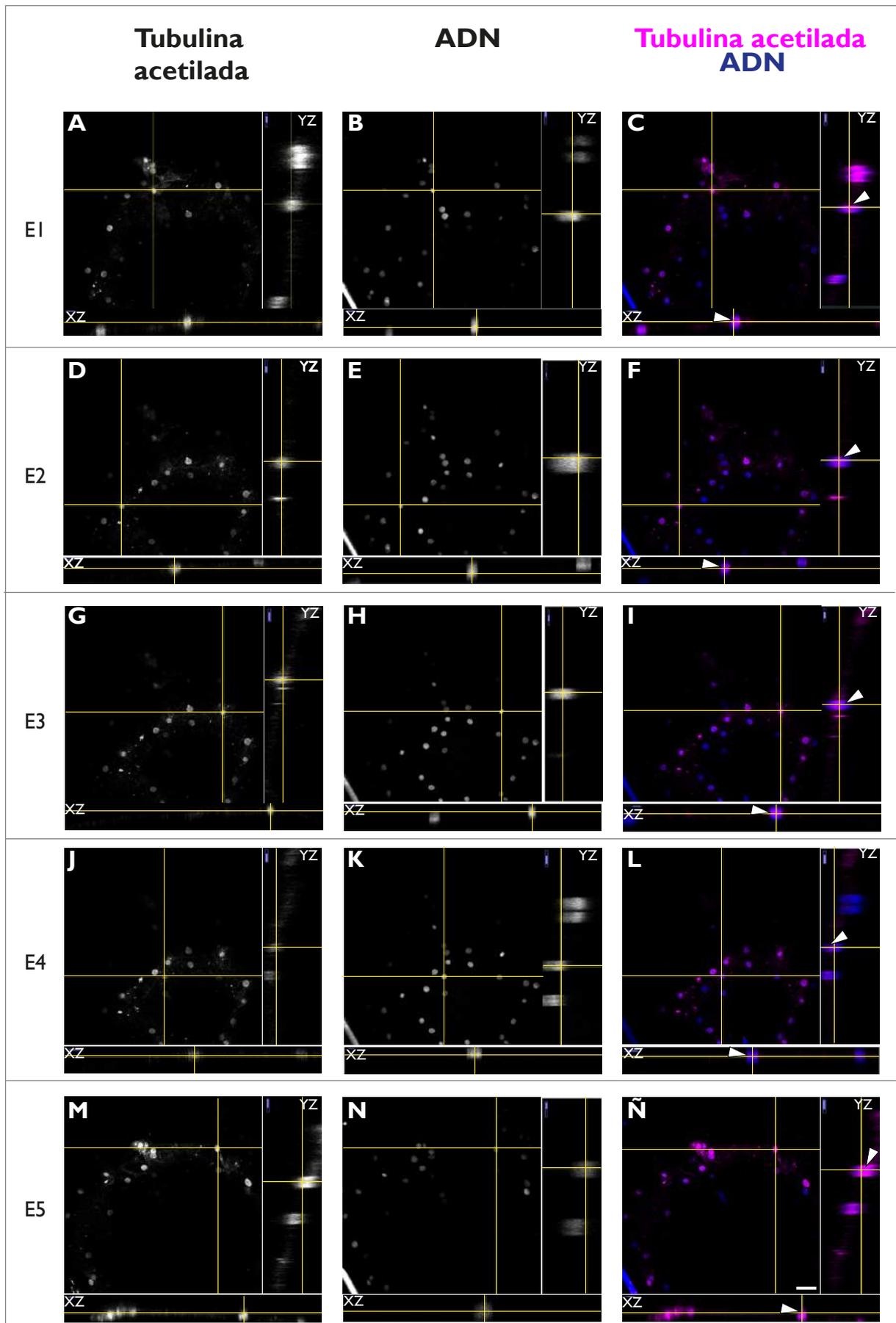
**D**



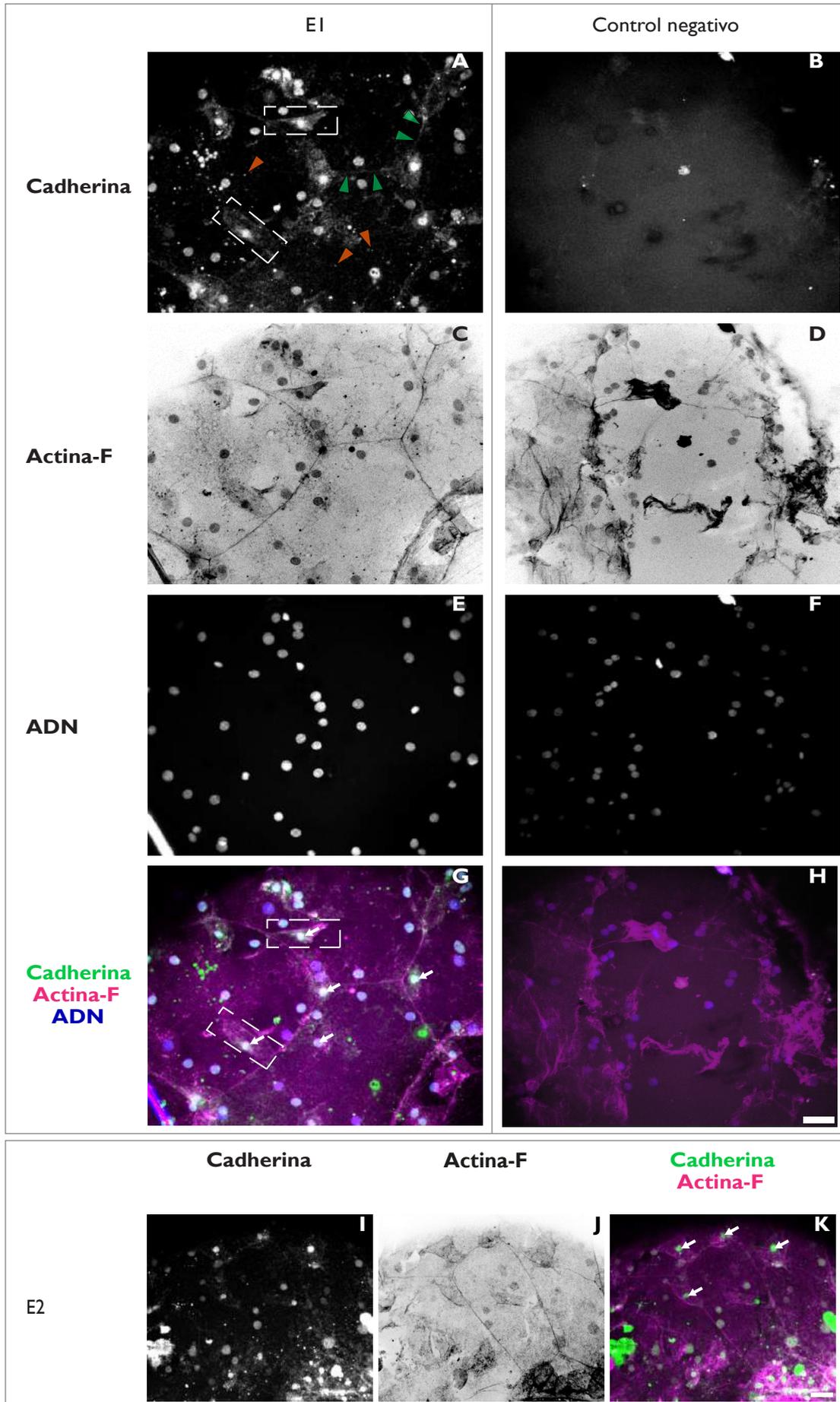
**Figura (R1)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio epibolia. Marcado de filamentos de actina con faloidina y tinción de ADN con Hoechst 33342. **A y B** Filamentos de actina. Flechas: citoesqueleto cortical de las células de la CCE. Cabezas de flecha: acumulación de actina-F en blastómeras. **C** Núcleos. **D** Actina-F (negro) y ADN (azul). Flechas: núcleos. Recuadro: blastómeras con morfología migratoria. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura (R2)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio epibolia en dos experimentos diferentes (A-O y P-R). Inmunomarcaje de tubulina acetilada y tinción de ADN con Hoechst 33342. **A, E, I y M** Actina-F. **B, F, J y N** Tubulina acetilada. **C, G y K** Núcleos. **D, H, L y Ñ** Superposición: tubulina acetilada (amarillo), actina-F (magenta) y ADN (azul). **A-D** Control negativo. E: embrión. Flechas: tubulina acetilada localizada en núcleos. Recuadro: filamentos de tubulina acetilada en blastómeras. Cabezas de flechas naranjas: microtúbulos acetilados en blastómeras. Cabezas de flechas verdes: microtúbulos acetilados en CCE. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura (R3)** Planos ortogonales generados a partir de imágenes confocales de embriones *in toto* en el estadio epibolia **A, D, G, J y M** Tubulina acetilada en embriones. **B, E, H, K y N** Núcleos teñidos con Hoechst 33342. **C, F, I, L y Ñ** Superposición, tubulina acetilada (magenta) y ADN (azul). Cabezas de flechas: tubulina acetilada dentro del núcleo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .

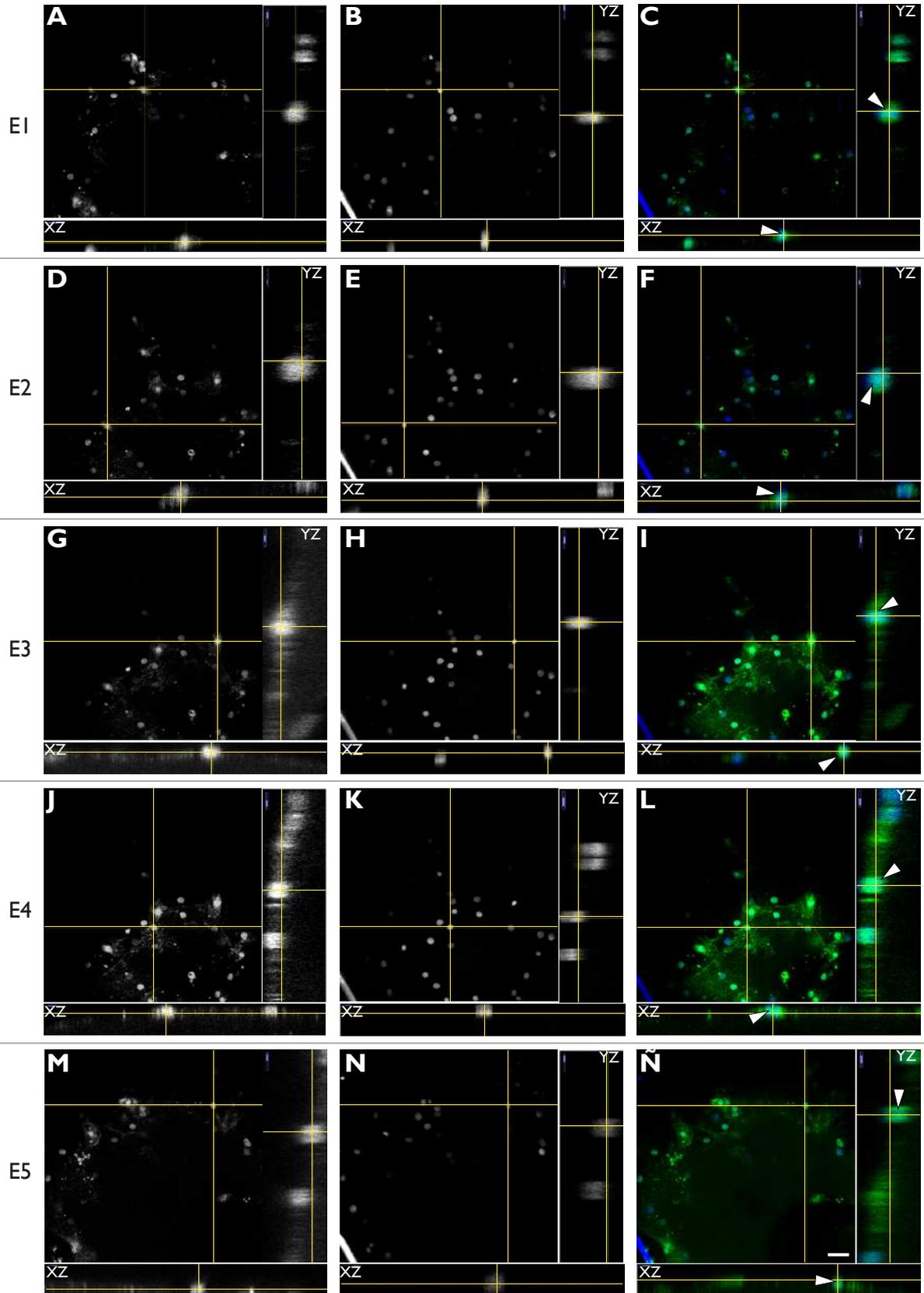


**Figura (R4)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio epibolia en dos experimentos. Inmunomarcaje de cadherinas y tinción de ADN con Hoechst 33342. **A, B e I** Cadherinas. Cabezas de flechas naranjas: cadherinas con distribución puntiforme. Cabezas de flechas verdes: cadherinas en la CCE. Recuadro: acumulación de cadherina. **C, D y J** Actina-F. **E, F** Núcleos. **G, H y K** Superposición: cadherinas (verde), actina-F (magenta) y ADN (azul). Flechas: cadherina localizada en núcleos. Recuadro: blastómeras profundas con distribución de cadherina. **B, D, F y H** Control negativo. Barra de escala 40  $\mu\text{m}$ . E: embrión. Flechas: cadherina localizada en núcleos. Recuadro: blastómeras profundas con presencia de cadherina.

Cadherina

ADN

Cadherina  
ADN



**Figura (R5)** Planos ortogonales generados a partir de imágenes confocales de embriones *in toto* en el estadio epibolia. **A, D, G, J y M** Cadherina en embriones. **B, E, H, K y N** Núcleos teñidos con Hoechst 33342. **C, F, I, L y Ñ** Superposición, cadherina (verde) y ADN (azul). Cabezas de flechas: cadherina dentro del núcleo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .

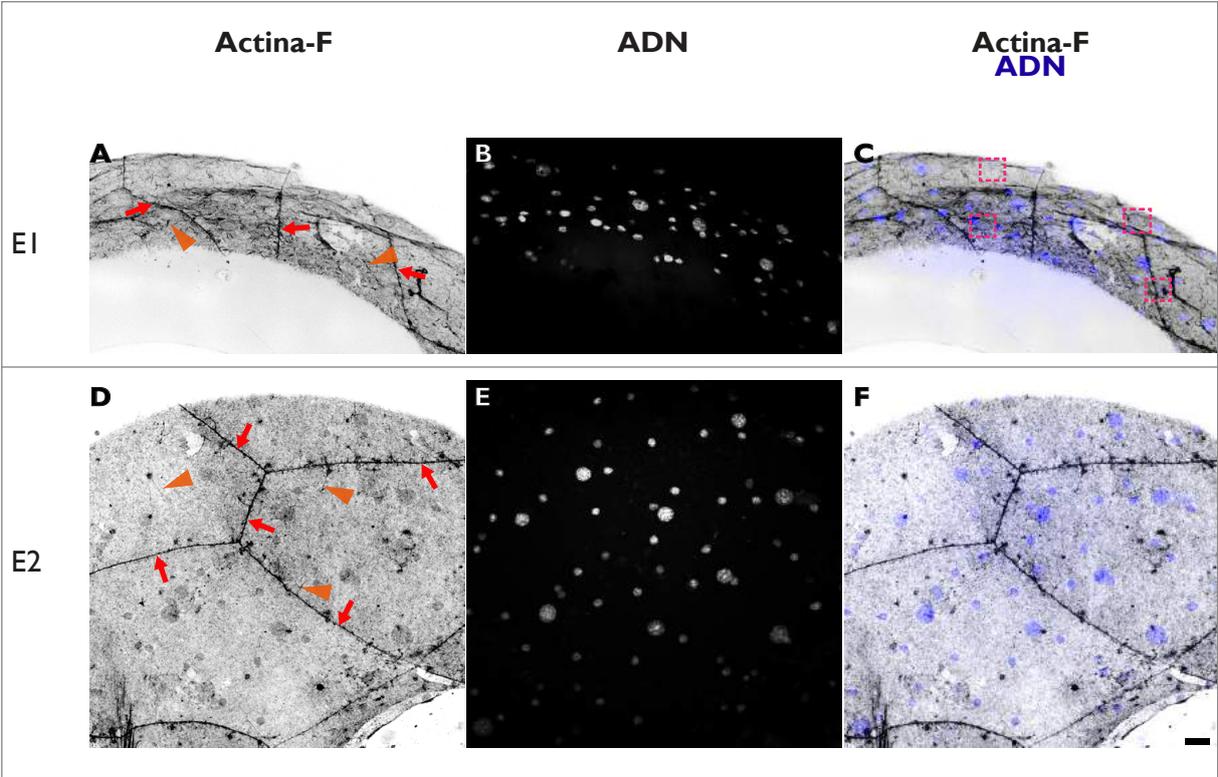
## Diapausa IB

En la Figura R6 A y D se marcan con flechas los filamentos de actina que conforman el citoesqueleto cortical de las CCE, es posible, además, observar haces de filamentos de actina en el citoplasma de las células de la CCE (ver cabezas de flechas en Figura R6 A y D). Asimismo, se observan blastómeras profundas que presentan una morfología redondeada característica de estas células en este estadio. Se observan filamentos de actina en los bordes de las blastómeras con una señal tenue pero evidente (ver recuadros en Figura R6 C).

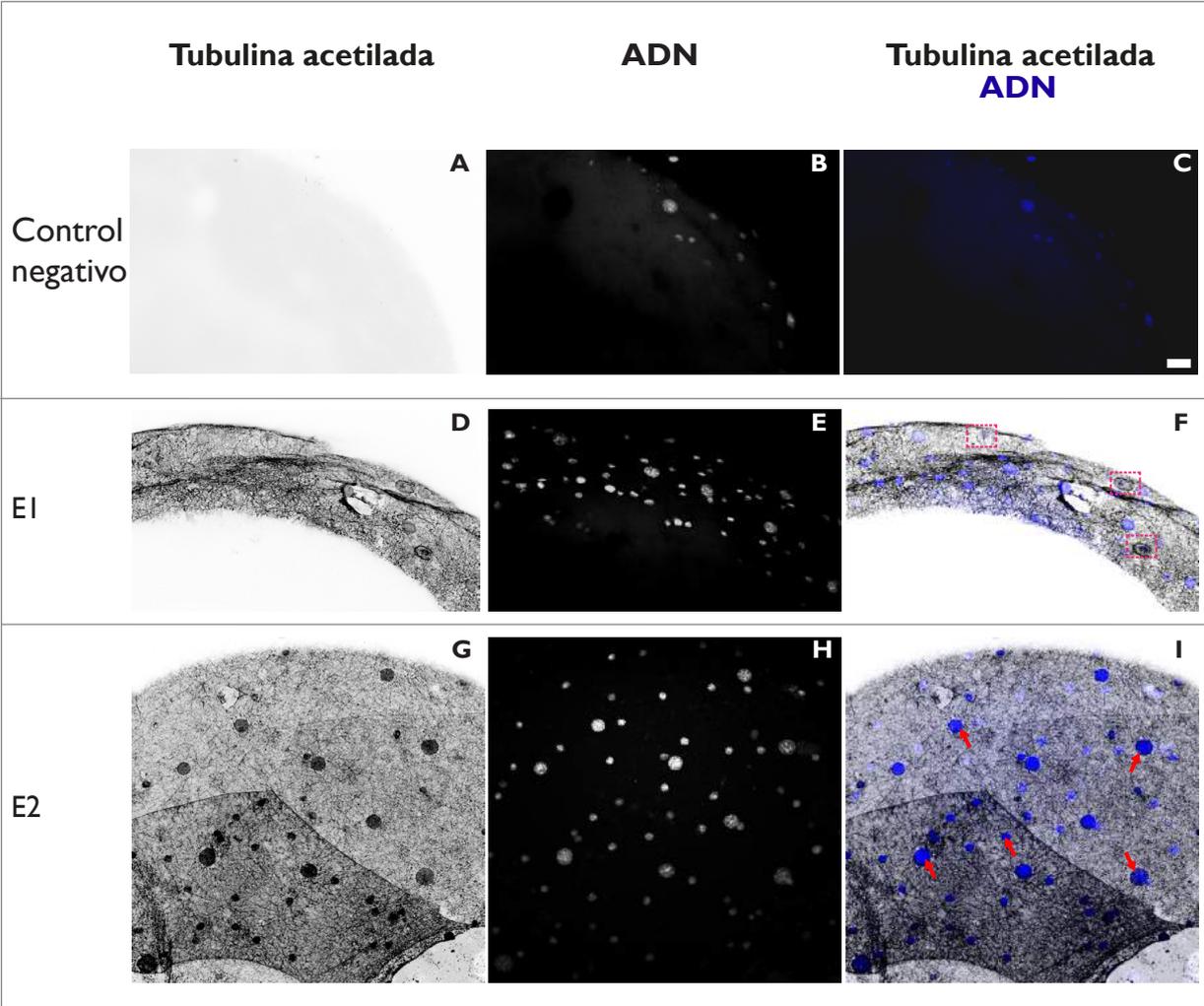
En la Figura R7 se visualizan microtúbulos acetilados dispersos en el citoplasma de las células de la CCE sin seguir un orden distinguible. En las blastómeras profundas se observó una señal fluorescente con acumulación periférica evidenciando su morfología redondeada. En cambio para el embrión incubado sin anticuerpo primario no presentó señal fluorescente. Además, se detectó inmunomarcaje en el interior de los núcleos. Se realizó un estudio de localización subcelular de tubulina acetilada y cadherina en núcleos seleccionados al azar, donde se analizaron planos ortogonales logrando observar un marcaje granular (ver cabezas de flechas en Figura R8 C, F, I, L y Ñ). En la superposición del marcaje para actina-F y tubulina acetilada, se observa que ambas señales presentan una distribución muy similar en las blastómeras profundas, con un aumento del marcaje hacia los bordes celulares (ver recuadros en Figura R9 F).

Con respecto a las proteínas de unión, cadherinas, se observa una distribución puntiforme uniforme en todo el embrión (ver cabezas de flecha en Figura R10 E e I) a diferencia del embrión incubado sin anticuerpo primario. Es posible evidenciar que las blastómeras con morfología redondeada, a diferencia del estadio anterior (epibolia) no se visualiza una acumulación de inmunomarcaje en estas células (ver recuadros en Figura R10 H). Además se registró inmunomarcaje en los núcleos (ver flechas Figura R10 L). Se realizaron planos ortogonales de núcleos elegidos al azar, evidenciando señal fluorescente dentro de los mismos, con una distribución de tipo granular (ver cabezas de flecha en Figura R11 C, F, I, L y Ñ).

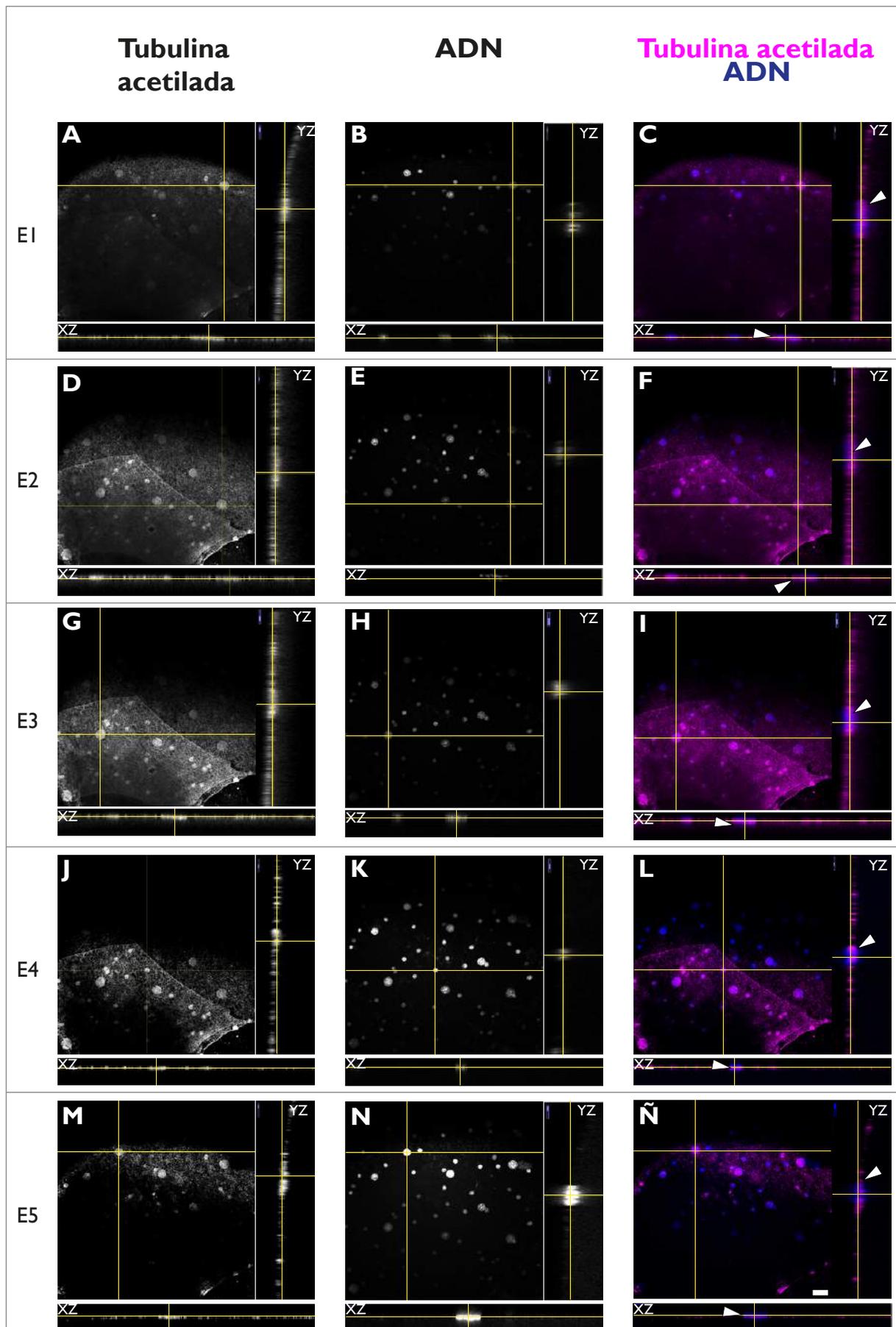
En resumen, en este estadio se identificaron los componentes del citoesqueleto en la CCE y en las blastómeras, distinguiéndose en éstas un patrón de distribución del citoesqueleto que acompaña la morfología redondeada (ver recuadros en Figura R6 C y Figura R9 F). Las cadherinas se distribuyen de manera uniforme en todo el embrión y con una aparente menor acumulación en las blastómeras con respecto a lo observado en el estadio de epibolia. Si bien se detectó señal fluorescente para tubulina acetilada y cadherina dentro de los núcleos tal como en el estadio de epibolia, en este último el marcaje fue homogéneo (ver flechas en Figura R3 y R5 C, F, I, L y Ñ), mientras que en diapausa se observó una marca granular (ver flechas Figura R9 y R11 C, F, I, L y Ñ). Cabe destacar que fue posible visualizar muy pocas blastómeras y que no se localizó el grupo de blastómeras característicos del fenotipo diapausa IB (Arezo y col., 2017).



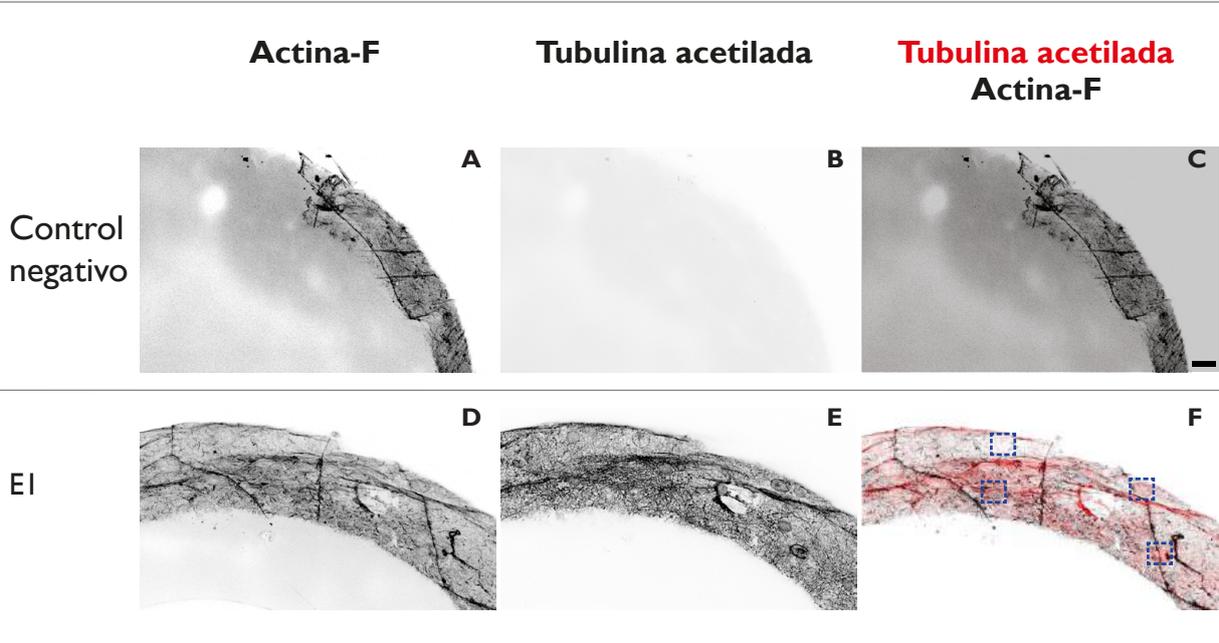
**Figura (R6)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio de diapausa IB. Marcado de filamentos de actina con faloidina y tinción de ADN con Hoechst 33342. **A y D** Filamentos de actina. Flechas: citoesqueleto cortical de las células de la CCE. Cabezas de flechas: filamentos de actina. **B y E** Núcleos. **C y F** Superposición, filamentos de actina (negro) y ADN (azul). Recuadro: blastómeras con morfología redonda. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



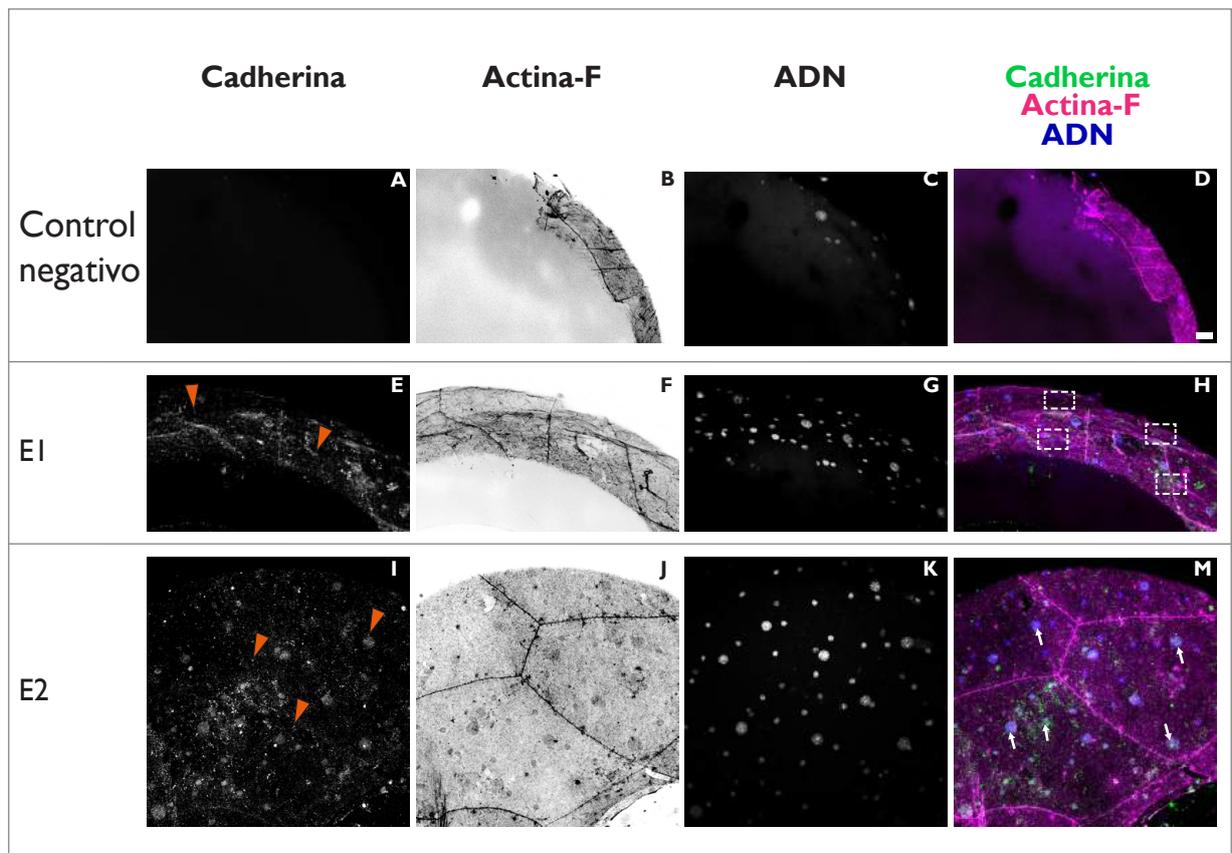
**Figura (R7)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio diapausa IB. Inmunomarcaje de tubulina acetilada y tinción de ADN con Hoechst 33342. **A, D y G** Tubulina acetilada. Cabezas de flechas: filamentos de tubulina acetilada. **B, E y H** Núcleos. **C, F e I** Superposición, tubulina acetilada (negro) y ADN (azul). Recuadro: tubulina acetilada localizada en blastómeras profundas de morfología redonda. Flechas: tubulina acetilada localizada en núcleos. **A-C** Embrión control. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



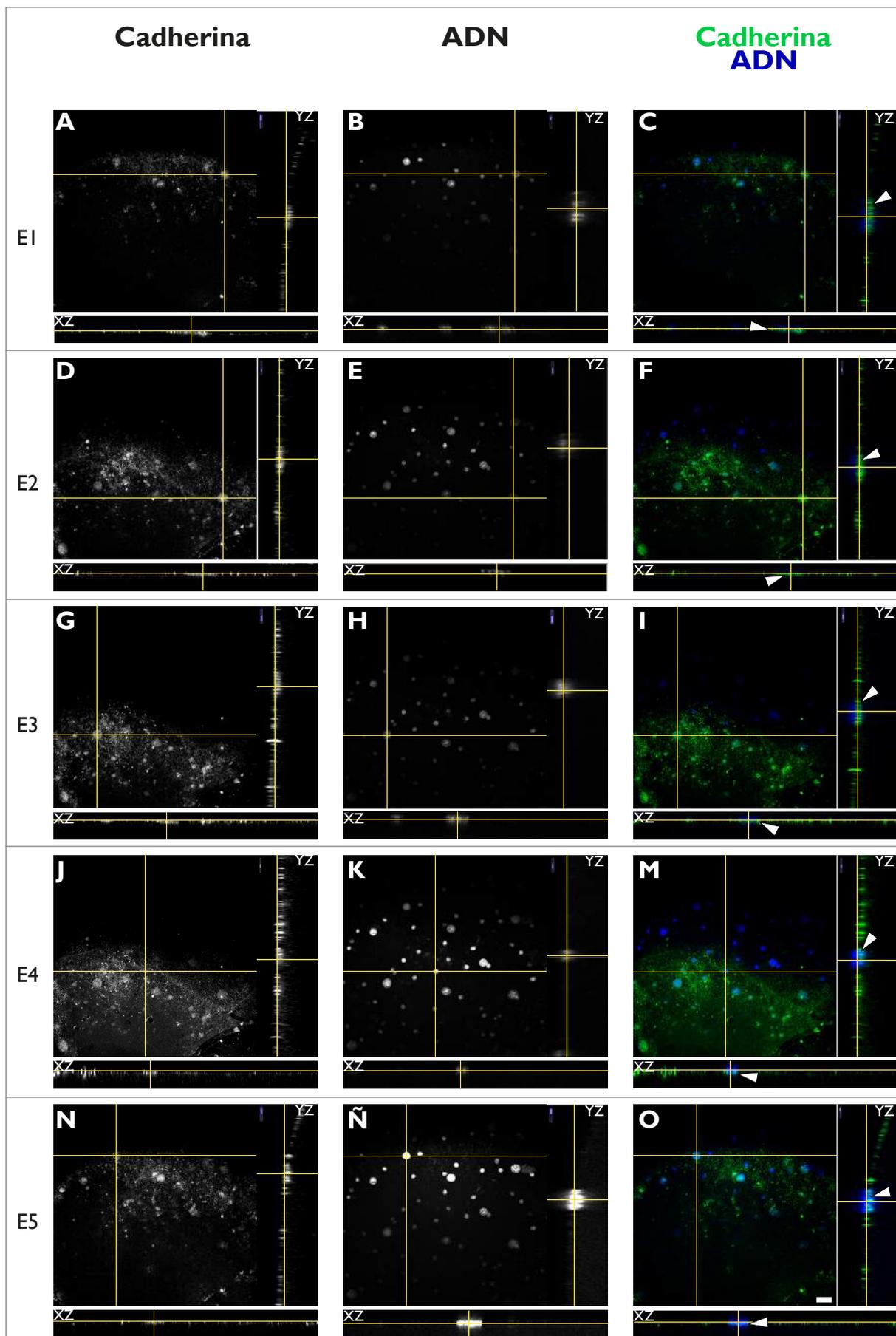
**Figura (R8)** Planos ortogonales generados a partir de imágenes confocales de embriones *in toto* en el estadio diapausa IB. **A, D, G, J y M** Tubulina acetilada. **B, E, H, K y N** Núcleos teñidos con Hoechst 33342. **C, F, I, L y Ñ** Superposición, tubulina acetilada (magenta) y ADN (azul). Cabezas de flechas: señal fluorescente de tubulina acetilada dentro del núcleo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura (R9)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en estadio de diapausa IB. Marcado de filamentos de actina con faloidina e inmunomarcaje de tubulina acetilada. **A y D** Actina-F. **B y E** Tubulina acetilada. **C y F** Filamentos de actina (negro) y tubulina acetilada (rojo). Recuadros: distribución de filamentos de actina y tubulina acetilada en blastómeras profundas. **A-C** Embrión control negativo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura (R10)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio diapausa IB. Inmunomarcage de cadherinas y tinción de ADN con Hoechst 33342. **A, E e I** Cadherina. Cabezas de flechas: cadherinas con una distribución puntiforme. **B, F y J** Actina-F. **C, G y K** Núcleos. **D, H y M** Superposición, cadherinas (verde), actina-F (magenta) y ADN (azul). Flechas: cadherina en núcleos. Recuadros: blastómeras con morfología redondeada. **A-D** Embrión control. **E**: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura (R11)** Planos ortogonales generados a partir de Imágenes confocales de embriones *in toto* en el estadio diapausa IB. **A, D, G, J y N** Cadherina. **B, E, H, K y N** Núcleos teñidos con Hoechst 33342. **C, F, I, L y Ñ** Superposición, cadherina (verde) y ADN (azul). Cabezas de flechas: cadherina dentro del núcleo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu$ m.

## Diapausa reactivada

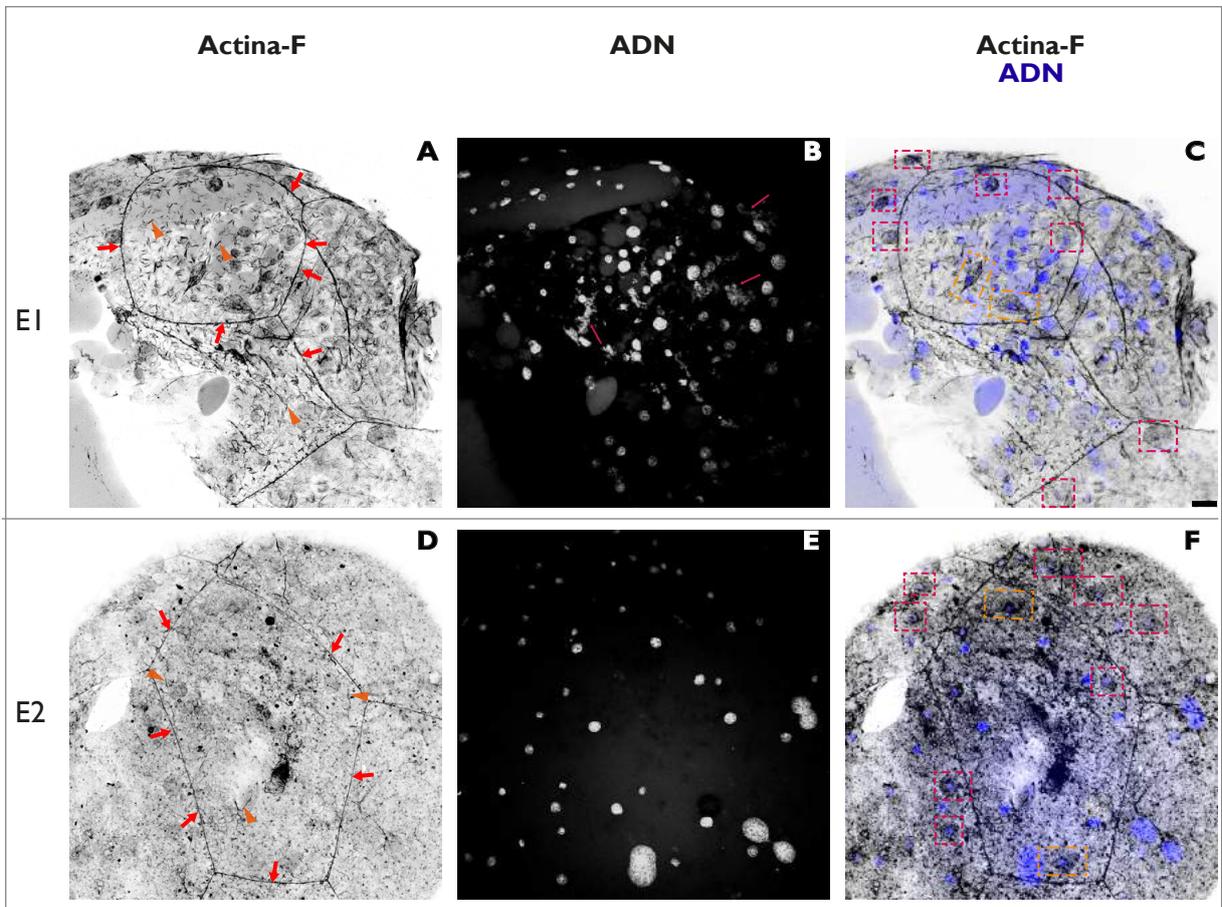
En relación a la actina-F, se observan filamentos en el citoplasma de la CCE (ver cabezas de flechas en Figura R12 A y D) y en los bordes celulares como parte del citoesqueleto cortical (ver flechas en Figura R12 A y D). En las blastómeras con morfología redondeada se distingue una mayor señal de actina-F en los bordes celulares (ver recuadros magenta en Figura R12 C y F). En blastómeras con morfología migratoria se pueden observar dos ejes: uno mayor y uno menor. El eje mayor suele determinarse por la polaridad celular en la migración, siendo el eje de migración direccionado según el desplazamiento celular, mientras que el menor se ubica perpendicular al mayor. En las blastómeras migratorias se percibe en el eje mayor una acumulación de la señal de actina-F así como también en los bordes celulares (ver recuadro naranja en Figura R12 C y F).

Las marcas correspondientes a microtúbulos acetilados se localizan en el citoplasma de las blastómeras profundas, tanto aquellas con morfología redondeada así como también en las de morfología migratoria (ver Figura R13). En las blastómeras redondeadas (ver recuadros magenta en Figura R13 F e I) se observa que la señal fluorescente es mayor en regiones cercanas al núcleo y en los bordes de las células. En los embriones sin incubación de anticuerpo primario no se detectó señal fluorescente. En cuanto a las blastómeras con morfología migratoria en recuadros naranja en la Figura R13 F e I, se observa una mayor acumulación de microtúbulos en los extremos del eje mayor. Además se observa marca para tubulina acetilada en núcleos (ver flechas en Figura R13 F). Se realizó un análisis de núcleos elegidos al azar al igual que en otros estadios, donde se realizaron planos ortogonales de los mismos evidenciando señal fluorescente distribuida de manera granular (ver cabezas de flecha en Figura R14 C, F, I, L y Ñ). Si bien se distingue marcaje de tubulina acetilada en los bordes celulares, ésta se localiza principalmente cercana a los núcleos celulares y al centro de la célula, mientras que la marca de actina-F se localiza en los bordes celulares (ver recuadros en Figura R15 F e I).

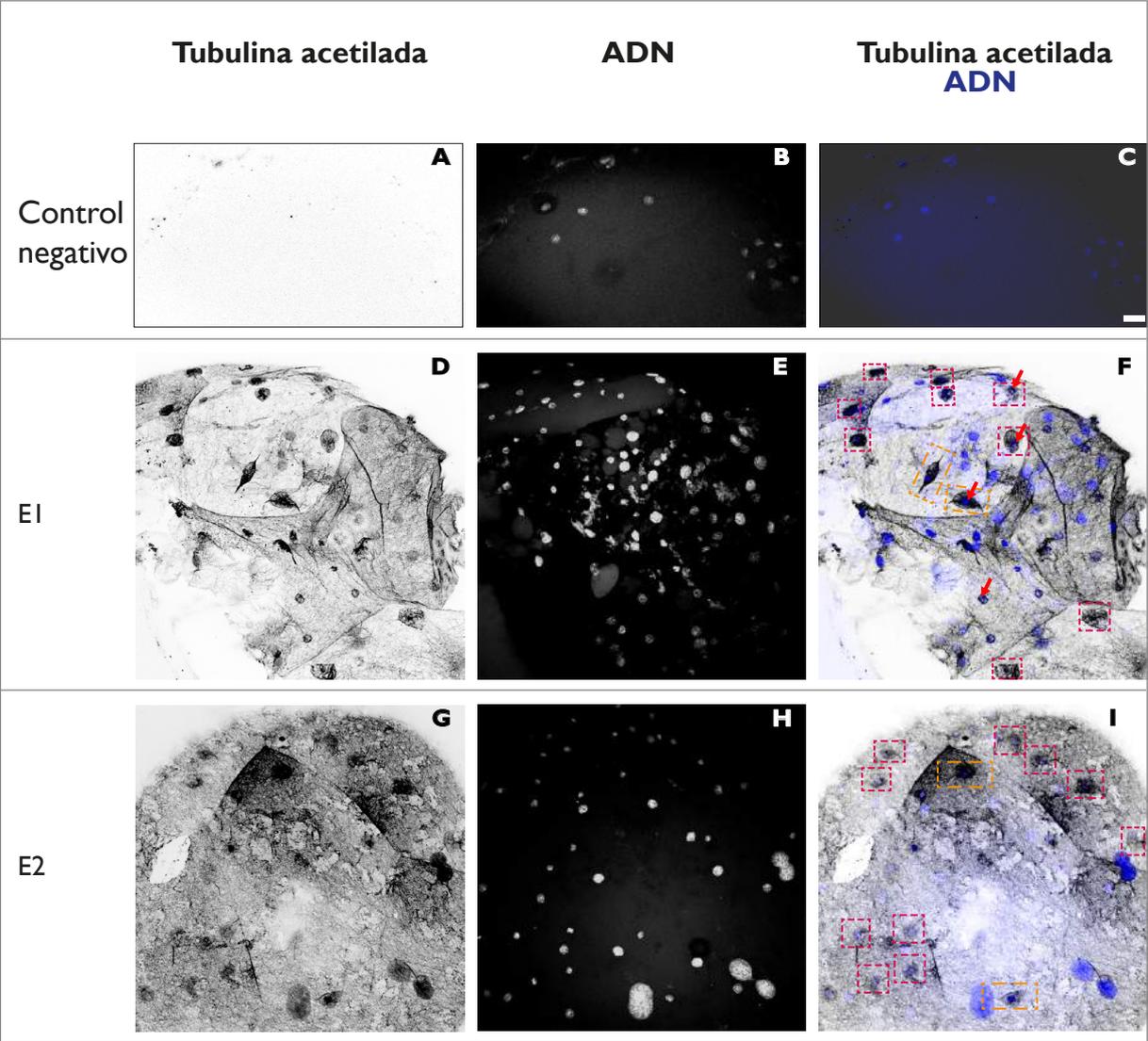
Las cadherinas exhiben una distribución puntiforme en todo el embrión (ver cabezas de flecha en Figura R16 E e I) con una leve acumulación en blastómeras profundas (ver recuadro en Figura R16 L) a diferencia del embrión que fue incubado sin anticuerpo primario en el cual no se detectó señal. En las blastómeras profundas las cadherinas aparecen tanto en citoplasma como en núcleos (señalado con flechas en la Figura R16 H). Se seleccionaron núcleos al azar y se realizaron planos ortogonales de los mismos, se detectó señal fluorescente dentro de los núcleos con distribución granular (ver cabezas de flecha en Figura R17 C, F, I, L y Ñ).

En suma, se observaron blastómeras con dos morfologías: redondeada y migratoria. Las células con fenotipo redondeado presentan una morfología similar a la observada en diapausa IB. También se encontró que la señal para tubulina acetilada en estas blastómeras se localiza de manera central en comparación con

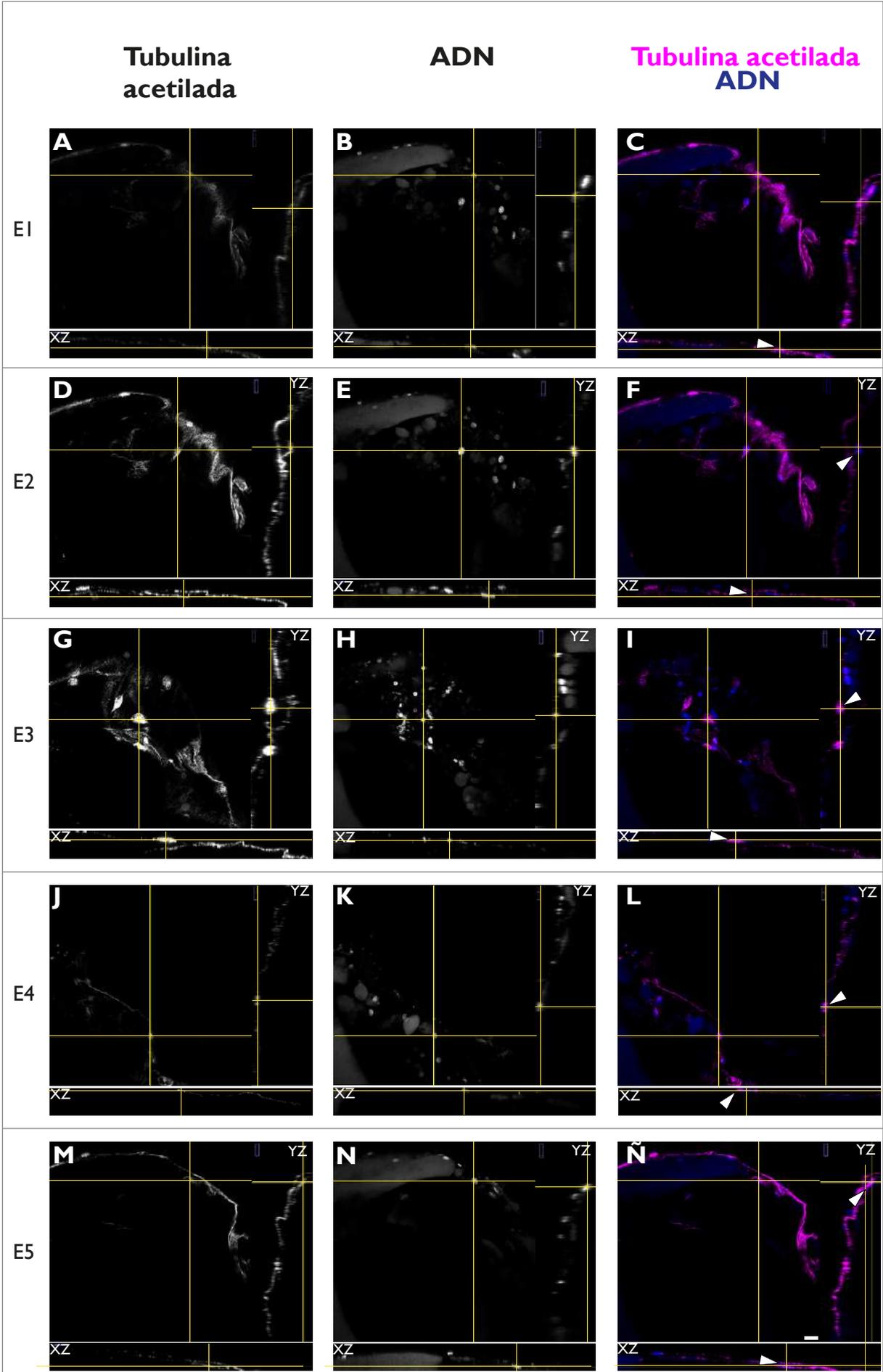
células que exhiben morfología migratoria, en las cuales se observan microtúbulos y la señal se acumula en los extremos del eje mayor. Al igual que en los otros estadios analizados, se observa tubulina acetilada y cadherina en los núcleos, con una distribución granular similar a la que se observó en diapausa IB. Se distingue una leve acumulación de señal para cadherina en las blastómeras profundas con respecto al resto del embrión.



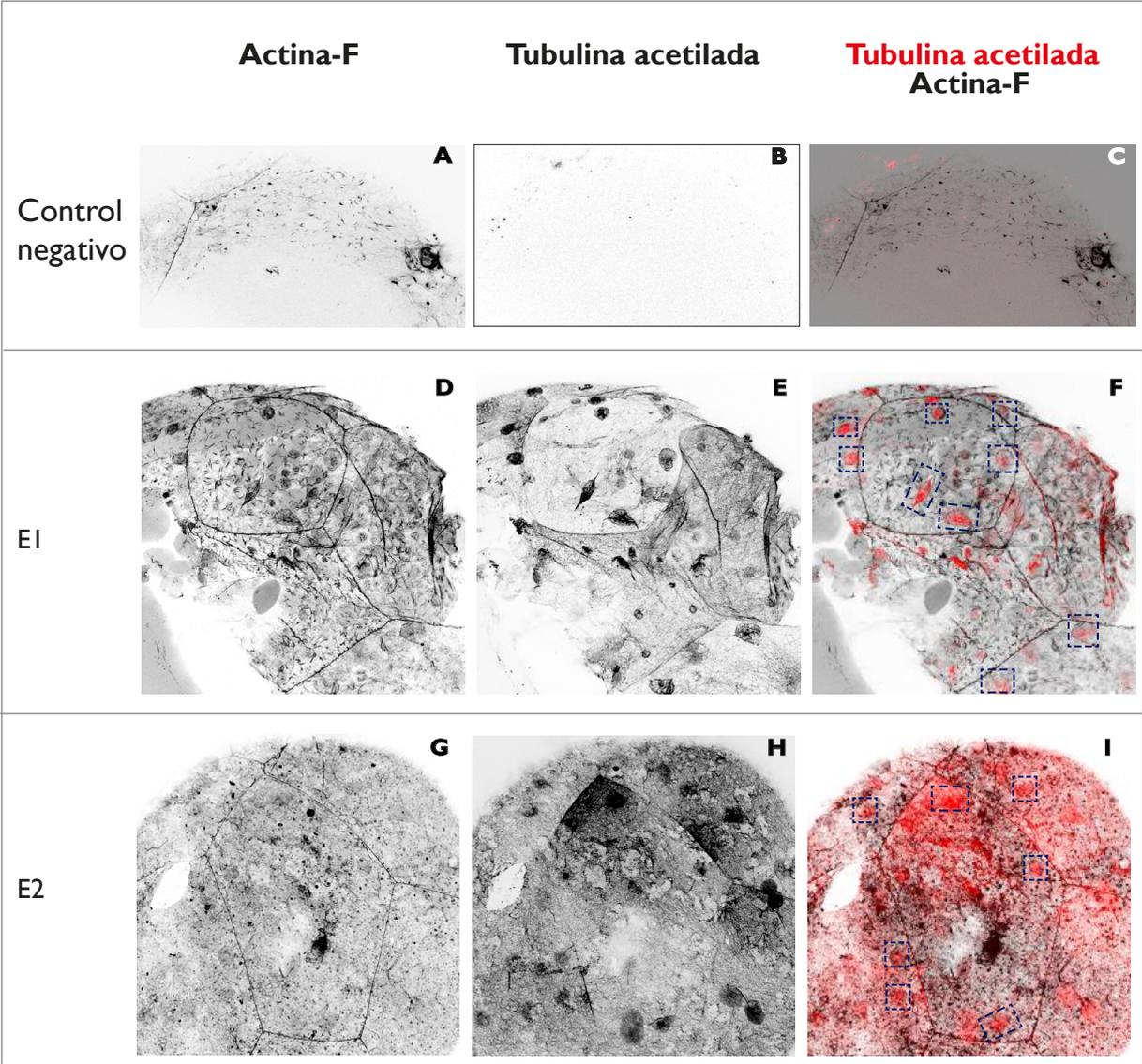
**Figura (R12)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio de diapausa reactivado. Marcado de filamentos de actina con faloidina y tinción de ADN con Hoechst 33342. **A y D** Filamentos de actina. Cabezas de flechas: citoesqueleto cortical de las células de la CCE. Flechas: filamentos de actina. **B y E** Núcleos. Flechas: posibles núcleos rotos o ADN bacteriano. **C y F** Superposición, filamentos de actina (negro) y ADN (azul). Recuadro magenta: blastómeras profundas con morfología redonda. Recuadro naranja: blastómeras profundas con morfología migratoria. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



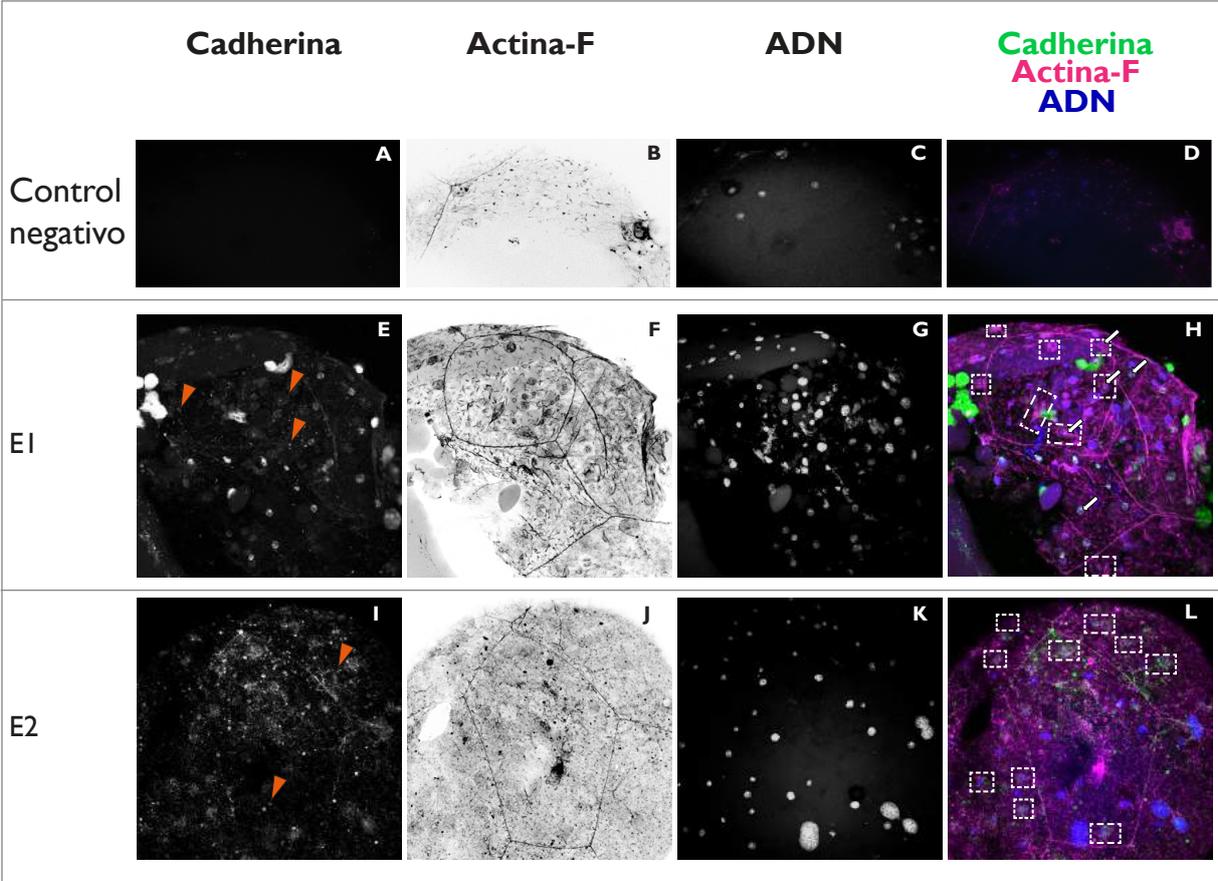
**Figura (R13)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio diapausa reactivada. Inmunomarcaje de tubulina acetilada y tinción de ADN con Hoechst 33342. **A, D y G** Tubulina acetilada. **B, E y H** Núcleos. **C, F e I** Superposición, tubulina acetilada (negro) y ADN (azul). Recuadro magenta: tubulina acetilada localizada en blastómeras profundas de morfología redonda. Recuadro naranja: blastómeras profundas con morfología migratoria. Flechas: tubulina acetilada localizada en núcleos. **A-C** Embrión control. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu$ m.



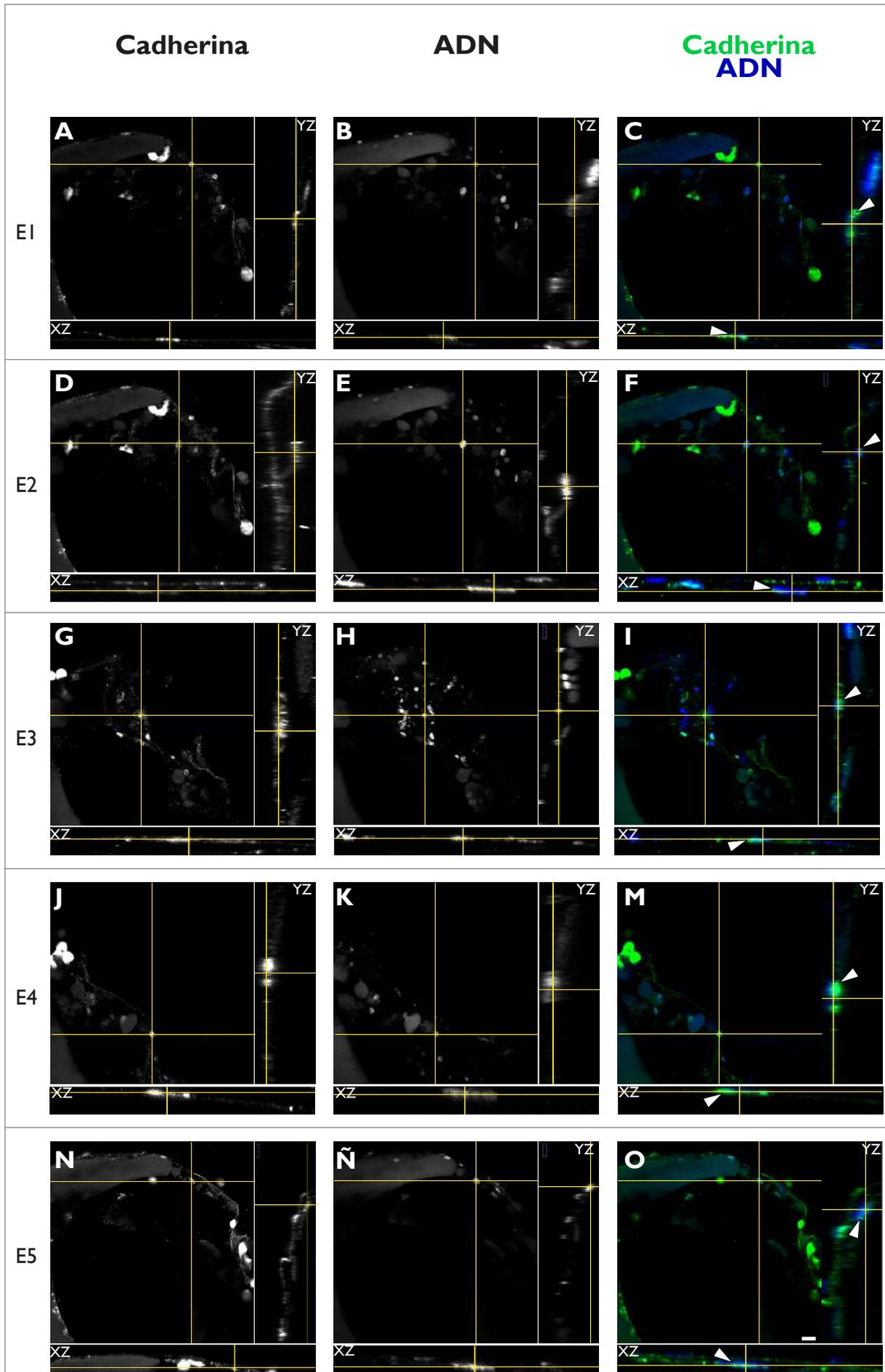
**Figura (R14)** Planos ortogonales generados a partir de Imágenes confocales de embriones *in toto* en el estadio diapausa reactivada. **A, D, G, J y N** Tubulina acetilada. **B, E, H, K y Ñ** Núcleos teñidos con Hoechst 33342. **C, F, I, M y O** Superposición, tubulina acetilada (magenta) y ADN (azul). Cabezas de flechas: tubulina acetilada dentro del núcleo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura (R15)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en estadio de diapausa reactivada. Marcado de filamentos de actina con faloidina e inmunomarcaje de tubulina acetilada. **A, D y G** Filamentos de actina. **B, E y H** Tubulina acetilada. **C, F e I** Superposición, filamentos de actina (negro) y tubulina acetilada (rojo). Recuadros: blastómeras profundas. **A-C** Embrión control negativo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura (R16)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio diapausa reactivada. Inmunomarcaje de cadherinas y tinción de ADN con Hoechst 33342. **A, E e I** Cadherina. Cabezas de flechas: Cadherinas con una distribución puntiforme. **B, F y J** Actina-F. **C, G y K** Núcleos. **D, H y L** Superposición, cadherinas (verde), actina-F (magenta) y ADN (azul). Flechas: cadherina en núcleos. Recuadros: blastómeras profundas. **A-D** Embrión control. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura (R17)** Planos ortogonales generados a partir de Imágenes confocales de embriones *in toto* en el estadio diapausa reactivada. **A, D, G, J y M** Cadherina. **B, E, H, K y N** Núcleos teñidos con Hoechst 33342. **C, F, I, K y Ñ** Superposición, cadherina (verde) y ADN (azul). Cabezas de flechas: cadherina dentro del núcleo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .

## Reagregado

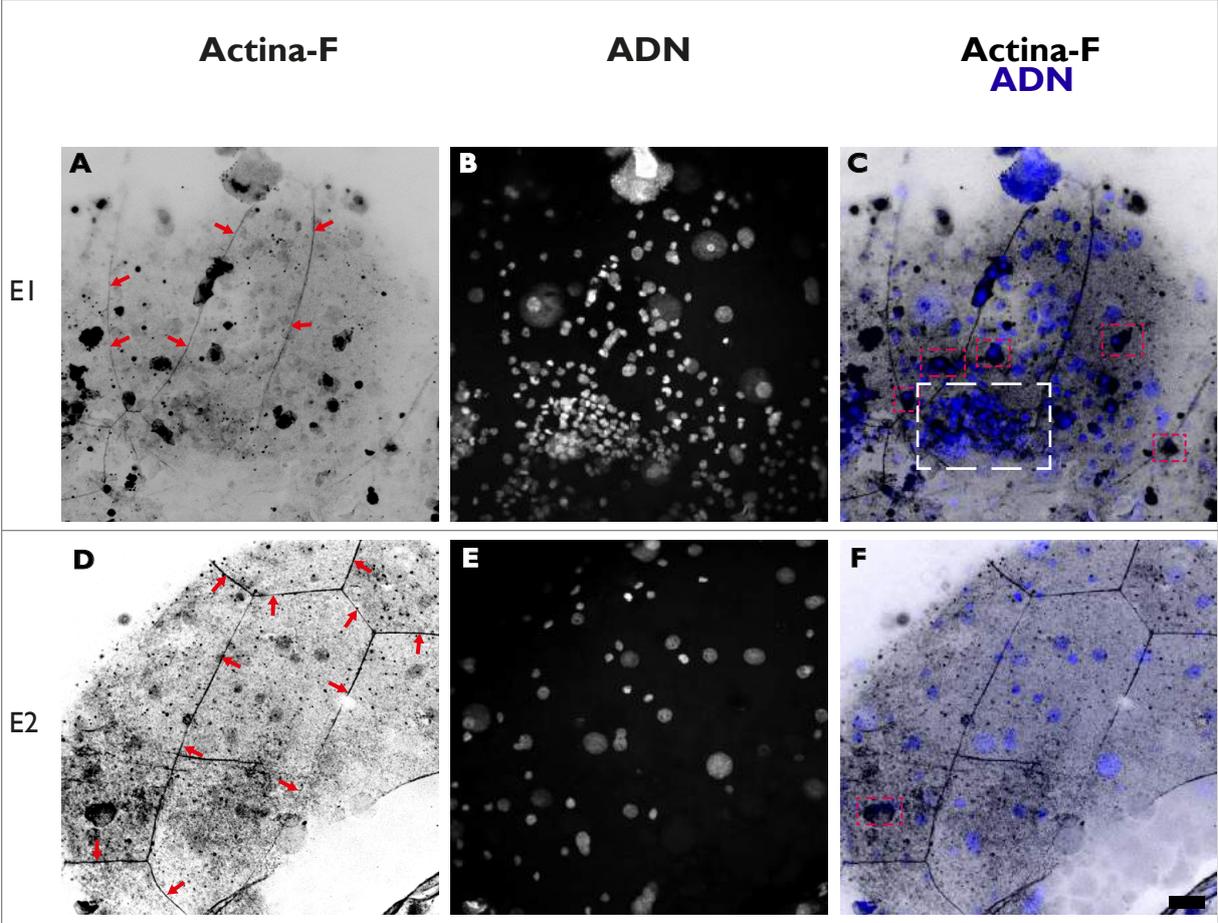
En relación a los filamentos de actina, se visualiza el citoesqueleto cortical de las células de la CCE marcado con flechas en la Figura R18 (A y D). Es posible percibir blastómeras profundas en los recuadros magenta en la Figura R18 C y F, y el reagregado de blastómeras en el recuadro blanco en la Figura R18 C.

En la Figura R19 se observa la tinción de tubulina acetilada, y se distingue el reagregado de blastómeras (ver recuadro en Figura R19 C). Se evidencian microtúbulos en los bordes de la CCE (ver cabezas de flecha Figura R19 A y D, y R21 E) con una aparente distribución similar a la de actina-F en el citoesqueleto cortical. La distribución de haces de microtúbulos acetilados en el citoplasma de las blastómeras profundas no se logra evidenciar como en otros estadios (epibolia y diapausa reactivada), aunque sí se encontró tubulina acetilada en los núcleos (ver flechas en Figura R19 C y F). Se realizó, al igual que el resto de los estadios, un estudio de planos ortogonales de cinco núcleos elegidos al azar, y se pudo observar inmunomarcaje para tubulina acetilada dentro de éstos, similar a la observada en el estadio de epibolia (ver cabezas de flecha en Figura R20 C, F, I, L y Ñ). En uno de los experimentos realizados, si bien no se logró captar el centro del reagregado, fue posible la obtención de imágenes de blastómeras profundas con morfología migratoria (ver recuadros en Figura R21 F). En éstas se visualizó tubulina acetilada localizada en el citoplasma con una acumulación del marcaje en los bordes celulares y en el centro de las células que parecería corresponder a una marca nuclear, aunque en este experimento no se realizó tinción de ADN (ver Figura R21 F).

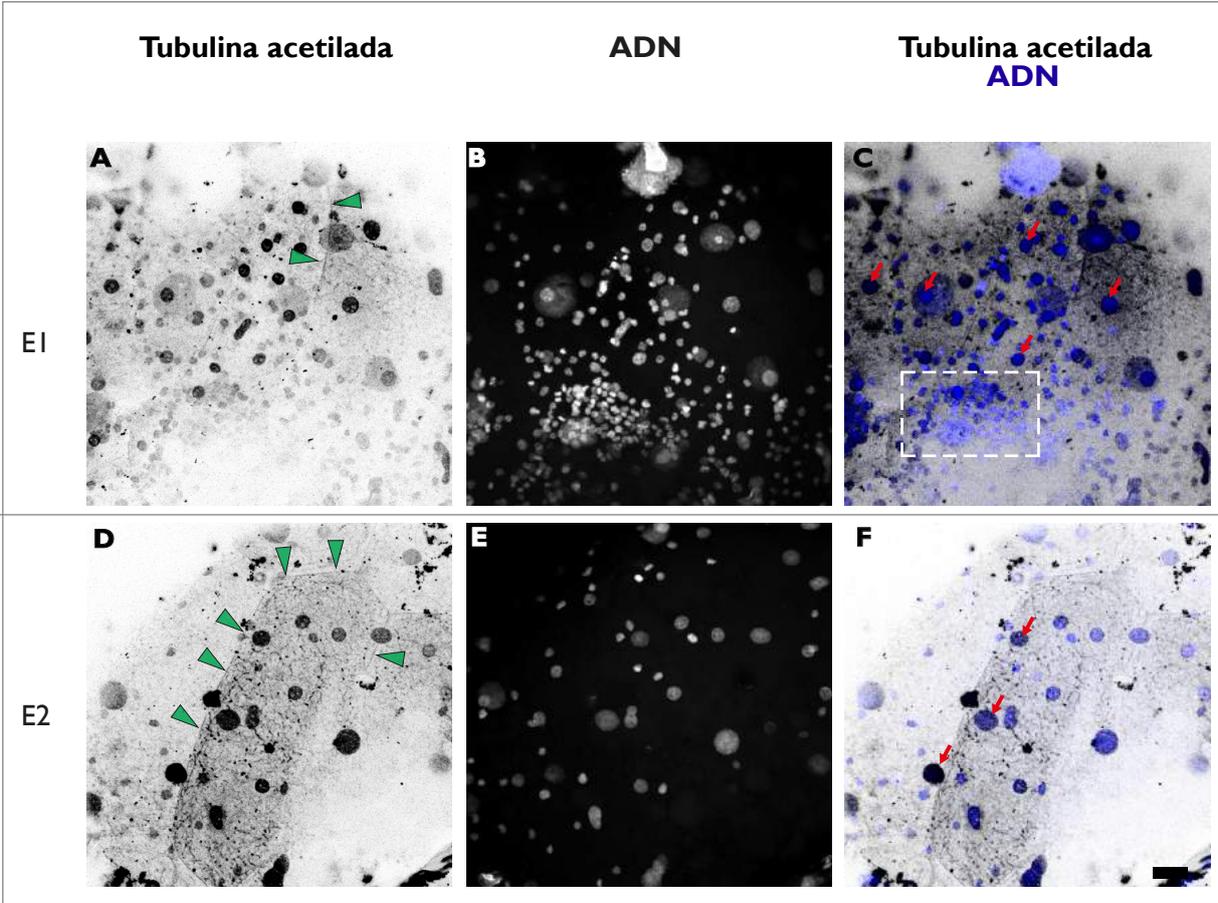
En el análisis de la presencia de cadherina, se observó nuevamente inmunomarcaje distribuido de manera puntiforme en todo el embrión con un aumento de la señal en el reagregado (ver recuadro en Figura R22 D). Asimismo, se encontró cadherina localizada en núcleos en embriones con tinción de ADN (ver flechas en Figura R22 D) y en embriones sin tinción (ver flechas en Figura 24 F). Este hallazgo fue visualizado mediante planos ortogonales, tal como se precedió con el resto de los estadios (ver Figura R23) y se detectó marca distribuida de manera uniforme dentro de los núcleos, similar a la observada en epibolia (ver cabezas de flecha en Figura R23 C, F, I, L y Ñ). En la Figura R24 se evidencia cadherina distribuida de manera puntiforme en el embrión tal como se observó en la Figura 22. El patrón observado sugiere una acumulación de cadherinas sobre las blastómeras migratorias (ver recuadros Figura R24 F) y en los bordes de las células de la CCE (ver cabezas de flecha en Figura R24 F).

Por lo tanto, al igual que en otros estadios, se visualizó tubulina acetilada y cadherina en los núcleos pero con distribución similar a la observada en el estadio de epibolia. La tubulina acetilada, se visualizó en el citoplasma de las blastómeras profundas con morfología migratoria con una acumulación de la marca en los bordes de las células y en el centro (ver recuadros Figura R21 F). Las cadherinas

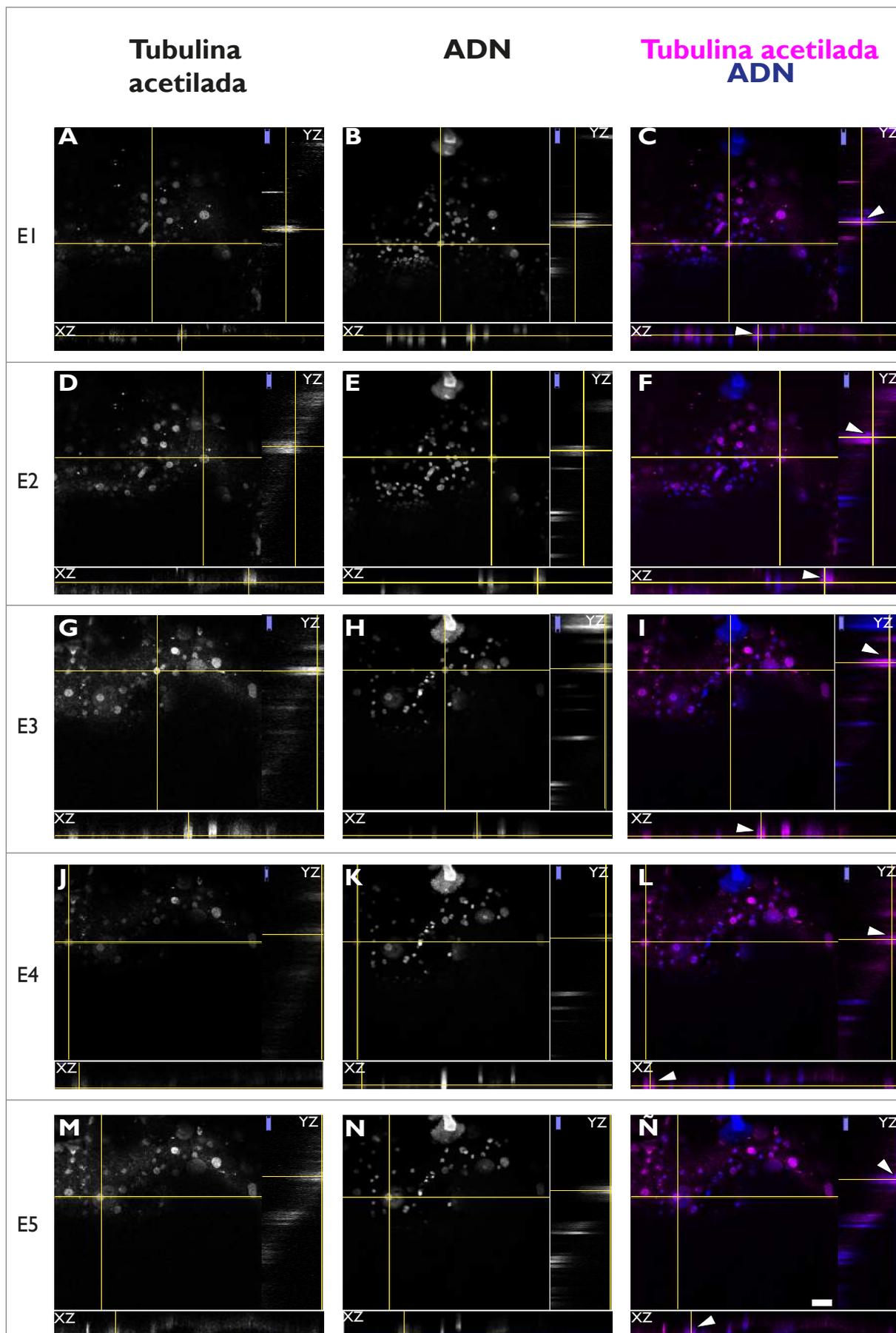
evidenciaron una distribución puntiforme con una aparente acumulación en las blastómeras profundas con morfología migratoria (ver recuadro en Figura R24 F) y en el reagregado (ver recuadro en Figura R22 D).



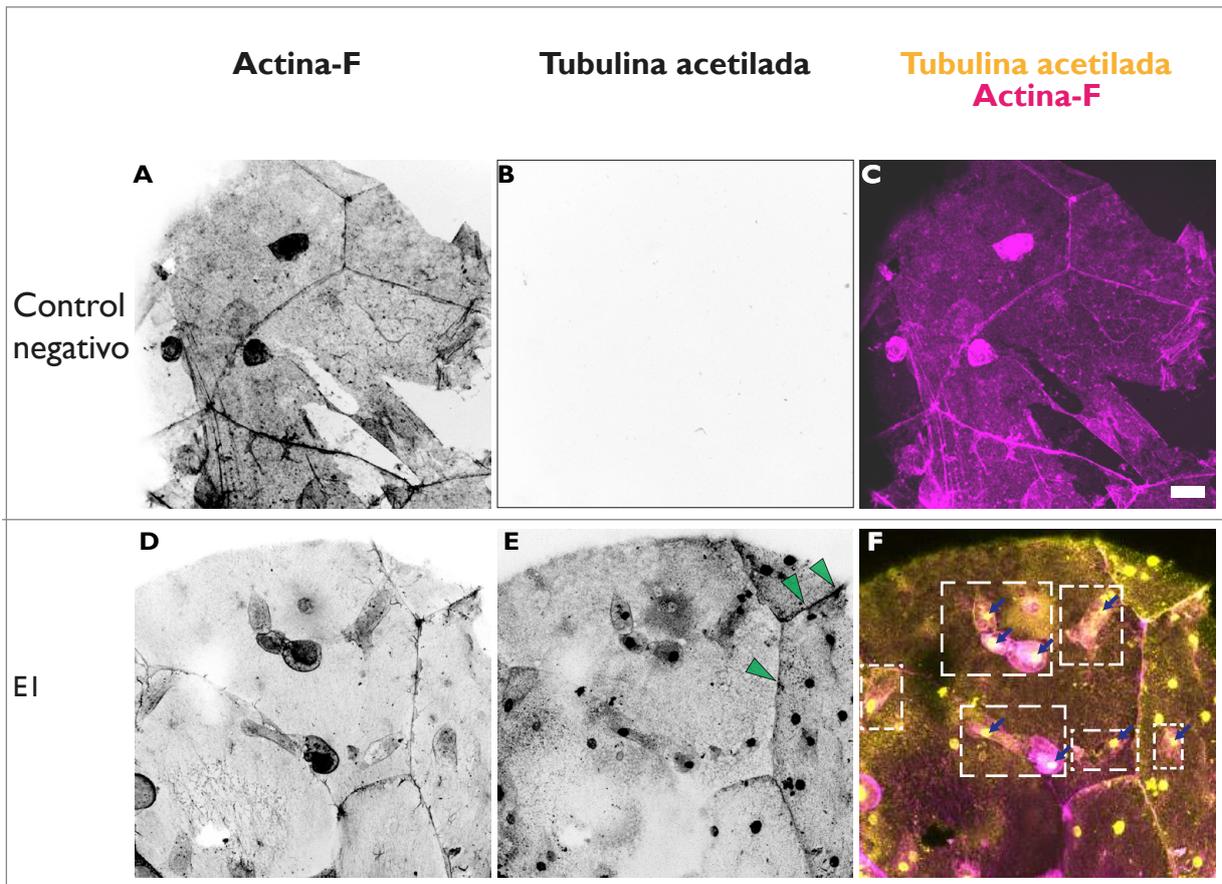
**Figura (R18)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio de reagregado. Marcado de filamentos de actina con faloidina y tinción de ADN con Hoechst 33342. **A y D** Filamentos de actina. Flechas: citoesqueleto cortical de las células de la CCE. **B y E** Núcleos. **C y F** Superposición, filamentos de actina (negro) y ADN (azul). Recuadro magenta: blastómeras profundas. Recuadro blanco: reagregado. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura (R19)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio reagregado. Inmunomarcaje de tubulina acetilada y tinción de ADN con Hoechst 33342. **A y D** Tubulina acetilada. Cabeza de flechas: microtúbulos acetilados en CCE. **B y E** Núcleos. **C y F** Superposición, tubulina acetilada (negro) y ADN (azul). Flechas: tubulina acetilada localizada en núcleos. Recuadro: reagregado. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



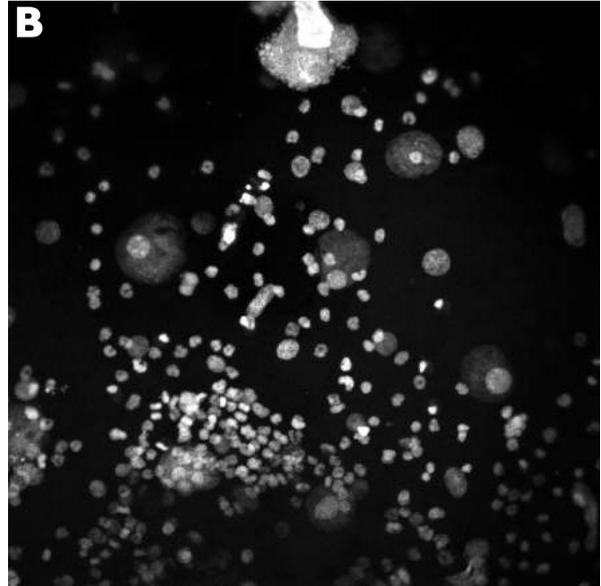
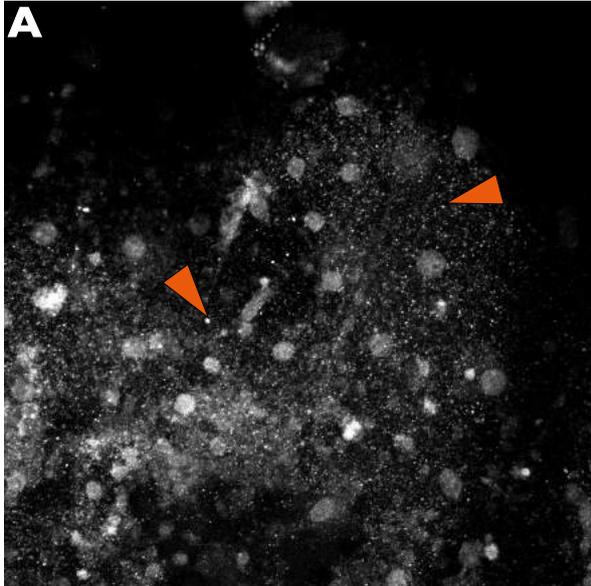
**Figura (R20)** Planos ortogonales generados a partir de Imágenes confocales de embriones *in toto* en el estadio reagregado. **A, D, G, J y M** Tubulina acetilada en embriones y planos ortogonales. **B, E, H, K y N** Núcleos teñidos con Hoechst 33342. **C, F, I, L y Ñ** Superposición, tubulina acetilada (magenta) y ADN (azul). Cabezas de flechas: tubulina acetilada dentro del núcleo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura (R21)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio reagregado. Inmunomarcaje de tubulina acetilada y tinción de actina-F. **A y D** Actina-F. **B y E** Tubulina acetilada. Cabezas de flecha: microtúbulos acetilados en CCE. **C y F** Superposición, tubulina acetilada (amarillo) y actina-F (magenta). Flechas: tubulina acetilada en posibles núcleos. Recuadro: blastómeras profundas. **A-C** Embrión control negativo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .

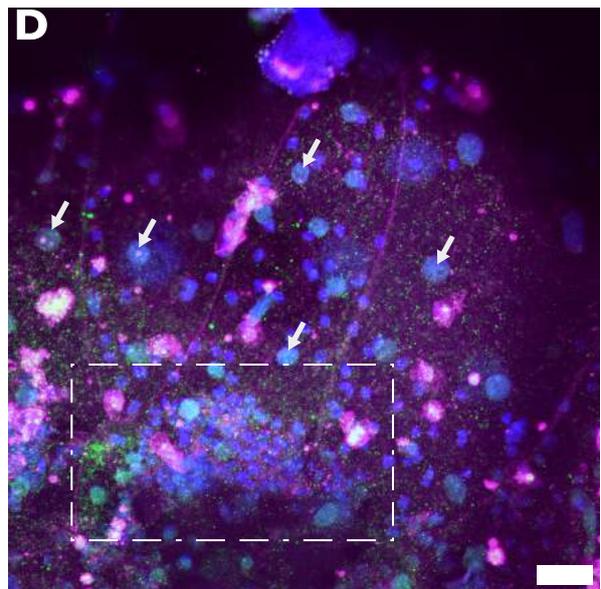
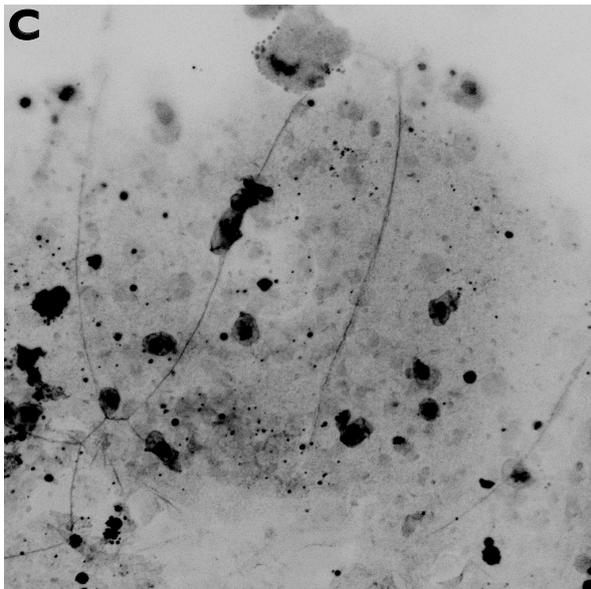
**Cadherina**

**ADN**



**Actina-F**

**Cadherina**  
**Actina-F**  
**ADN**

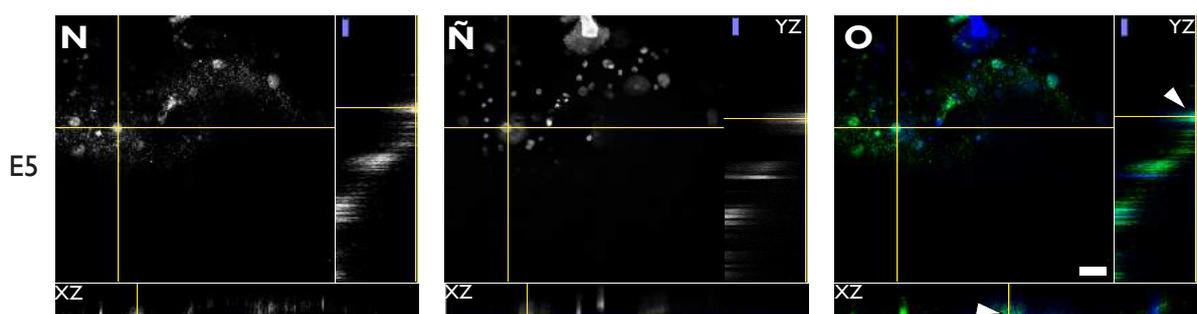
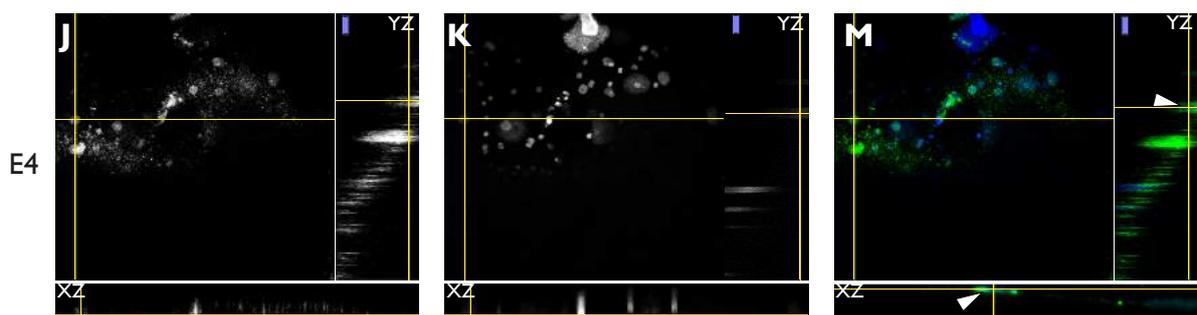
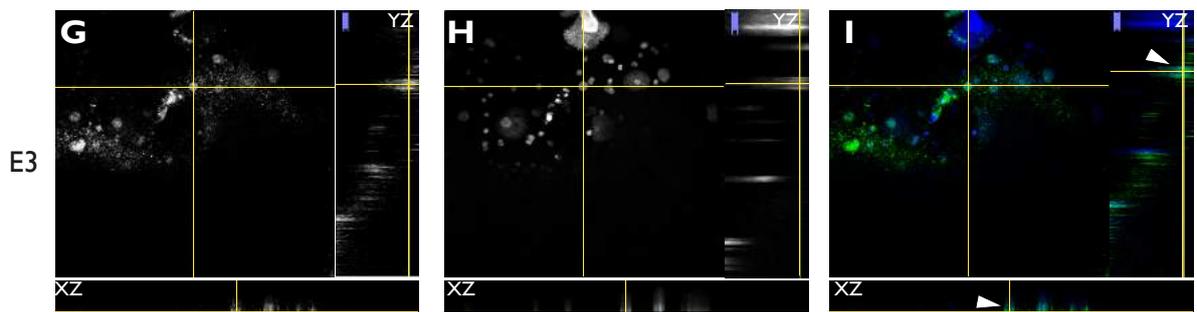
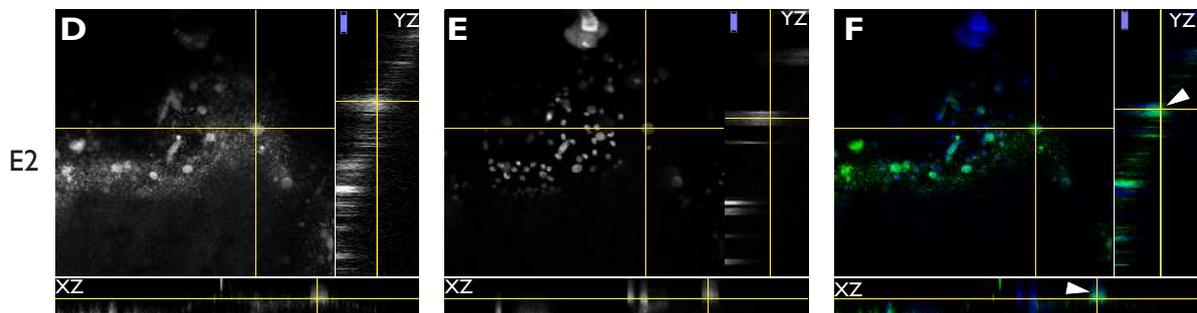
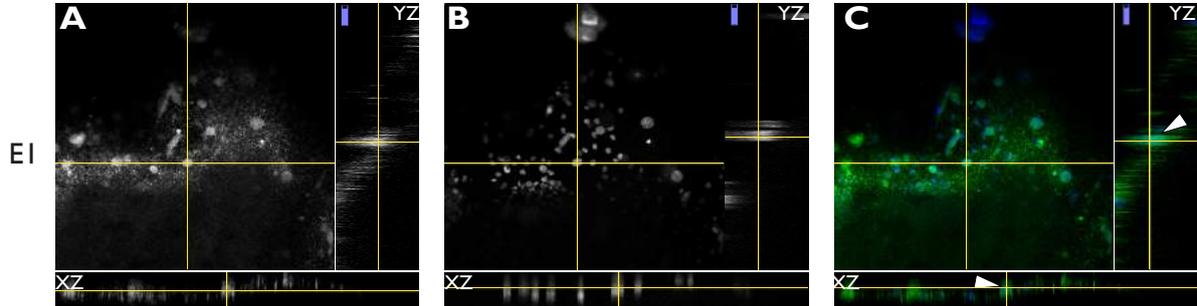


**Figura (R22)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio reagregado. Inmunomarcaje de cadherinas, tinción de ADN con Hoechst 33342 y filamentos de actina con faloidina. **A** Cadherina. Cabezas de flechas: Cadherinas con una distribución puntiforme. **B** Núcleos. **C** Actina-F. **D** Superposición, cadherinas (verde), actina-F (magenta) y ADN (azul). Flechas: cadherina en núcleos. Recuadro: reagregado. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .

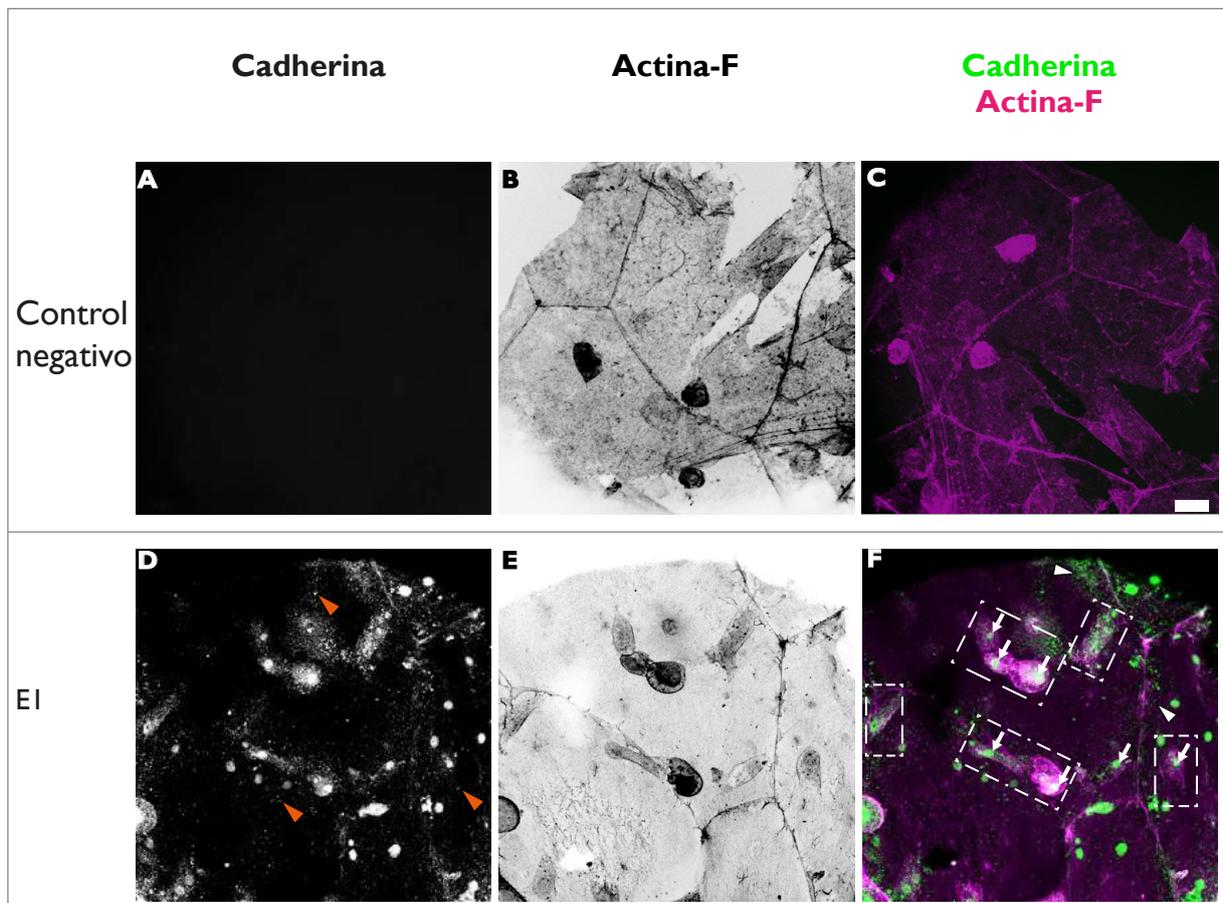
Cadherina

ADN

Cadherina  
ADN



**Figura (R23)** Planos ortogonales generados a partir de Imágenes confocales de embriones *in toto* en el estadio reagregado **A, D, G, J y M** Cadherina en embriones y planos ortogonales. **B, E, H, K y N** Núcleos y planos ortogonales. **C, F, I, L y Ñ** Superposición, cadherina (verde) y ADN (azul). Cabezas de flechas: cadherina dentro del núcleo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .

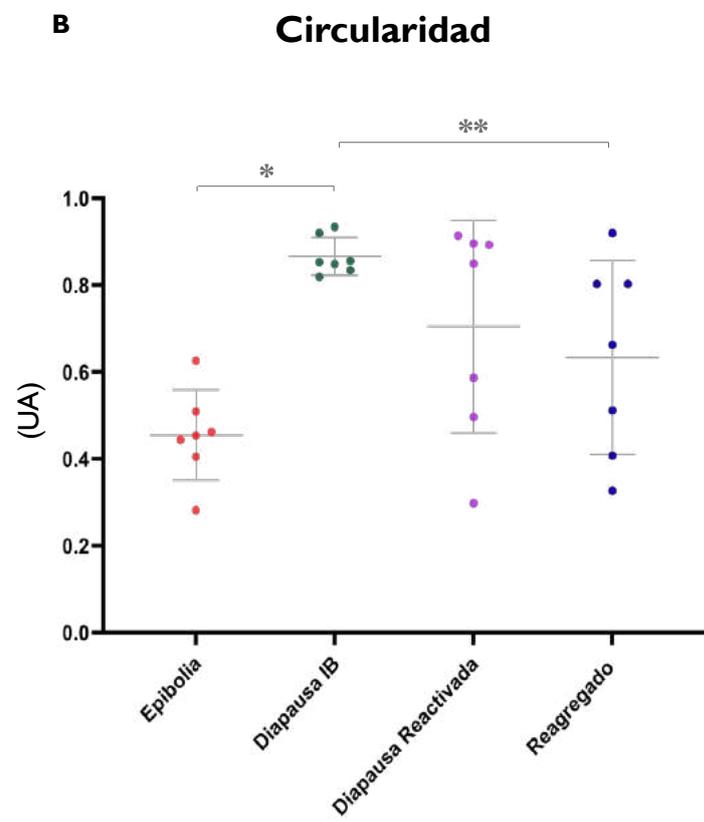
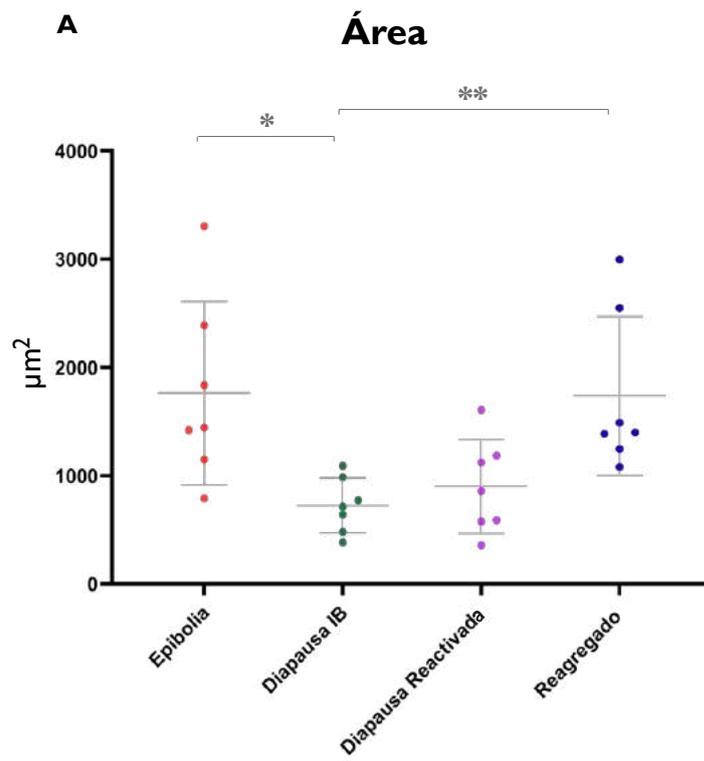


**Figura (R24)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en el estadio reagregado. Inmunomarcaje de cadherinas y tinción de filamentos de actina con faloidina. **A y D** Cadherina. Cabezas de flechas: Cadherinas con una distribución puntiforme. **B y E** Actina-F. **C y F** Superposición, cadherinas (verde) y actina-F (magenta). Recuadros: blastómeras profundas. Cabezas de flecha: cadherinas en citoplasma de células de la CCE. Flechas: cadherina localizada en posibles núcleos. **A-F** Embrión control negativo. E: embrión. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .

## **Área y circularidad de las blastómeras**

La morfología observada con la tinción de actina-F se estudió mediante un análisis de área y circularidad de siete blastómeras profundas por cada estadio. Se observó que el área es mayor durante la epibolia y disminuye durante la diapausa IB alcanzando valores menores al resto de los estadios. Luego comienza a aumentar en el reactivado y en reagregado llega a valores similares a la epibolia (ver Figura R25 A y Tabla R1). Se observa una diferencia estadística entre los resultados de epibolia y diapausa IB, y de esta última con respecto al reagregado.

La circularidad es menor en epibolia con respecto al resto de los estadios y aumenta en la diapausa IB para luego disminuir en estadio reactivado y reagregado (ver Figura R25 B y Tabla R1). Se observa una diferencia estadística entre los resultados de epibolia y diapausa; y diapausa y reagregado, lo que coincide con el cambio de morfología migratoria (epibolia) a redondeada (diapausa IB) para luego recuperar una morfología migratoria nuevamente (reagregado).



**Figura (R25)** Análisis de descriptores de forma: área y circularidad de las blastómeras en estadios de epibolia, diapausa IB, diapausa reactivada y reagregado, n=7. **A** Gráfico de área ( $\mu\text{m}^2$ ). **B** Gráfico de circularidad (UA).

**Tabla R1** Tabla con valores de la media del análisis del área ( $\mu\text{m}^2$ ) y circularidad de siete blastómeras profundas de embriones en estadio de epibolia, diapausa IB, diapausa reactivado y reagregado. UA: unidades arbitrarias.

Blastómeras profundas	Epibolia	Diapausa IB	Diapausa Reactivado	Reagregado
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	1762	723,7	899,4	1763
Circularidad (UA)	0,4546	0,8664	0,7049	0,6337

## Análisis de la morfología nuclear

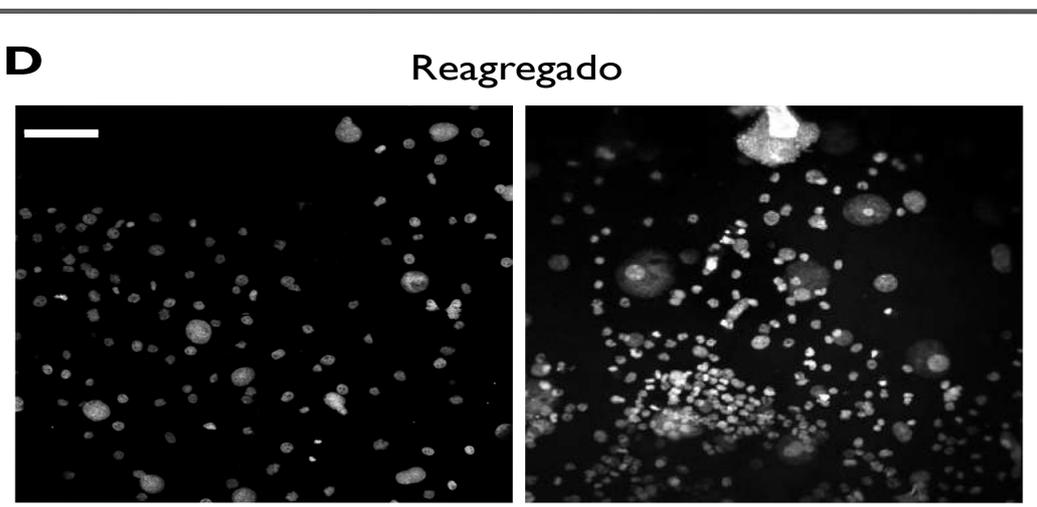
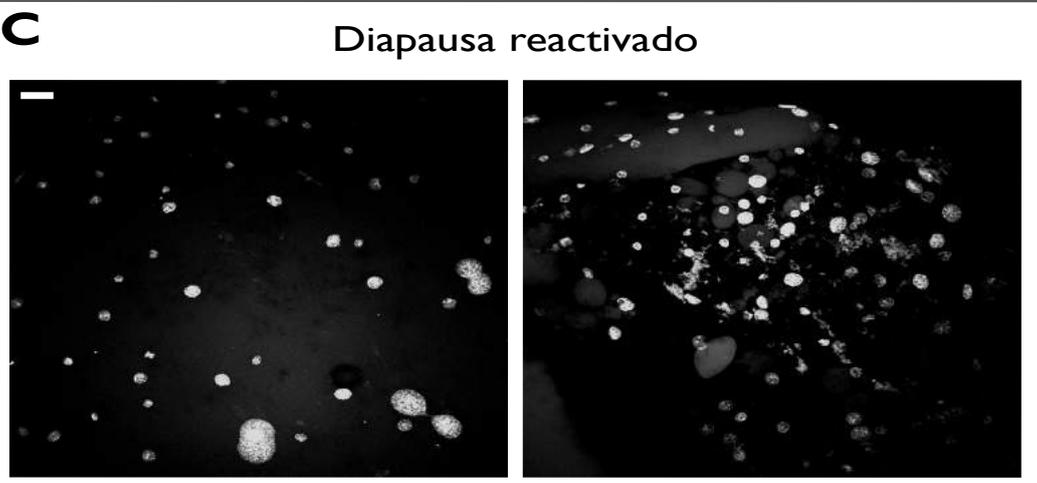
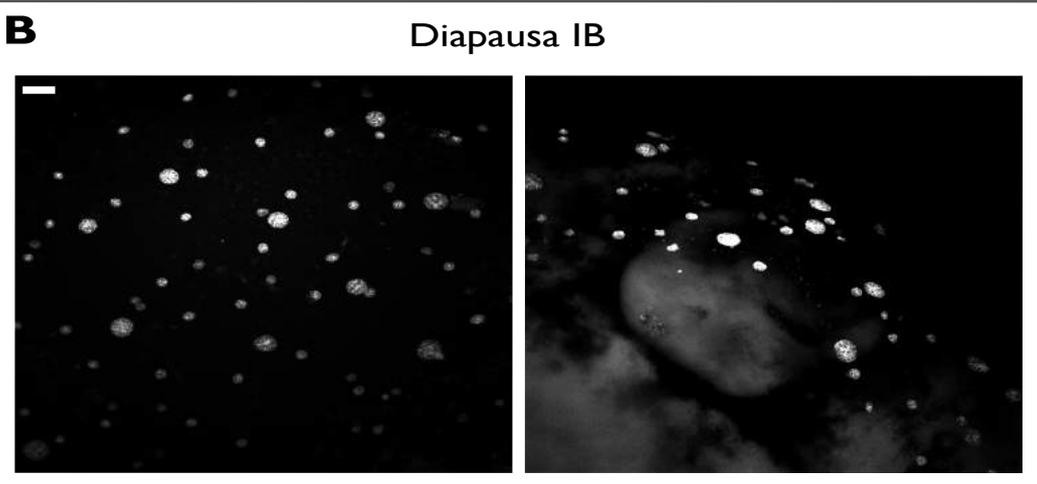
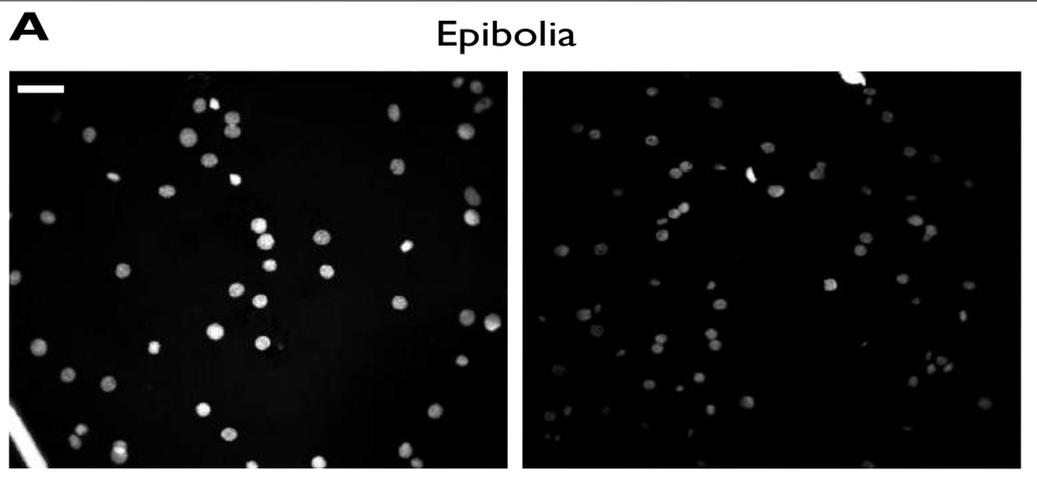
Durante el estudio de los diferentes estadios se observó que las formas y tamaños de los núcleos eran variables (ver Figura R26). Por consiguiente se calculó el área y la circularidad de los mismos mediante el análisis de imágenes de núcleos teñidos con verde de metilo o Hoechst 33342 utilizando el programa FIJI, siendo 1 un círculo perfecto y 0 indica un polígono elongado.

El análisis de los núcleos evidenció un área mayor en el estadio de diapausa IB, que disminuyó en reactivado y epibolia, mostrando una menor área en el reagregado (ver Tabla R2). Los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Mann–Whitney–Wilcoxon ya que no presentaban una distribución normal. Los estadios mostraron valores para áreas significativos entre sí a excepción de los datos para epibolia y diapausa IB. Se distinguen núcleos con áreas particularmente mayores con valores cercanos a los  $1500\mu\text{m}^2$  en el estadio reagregado. También se encontraron núcleos muy pequeños con valores cercanos a los  $10\mu\text{m}^2$  presentes mayormente en el reagregado (ver Figura R27 A). Es importante destacar que este análisis fue realizado a partir de datos en 2 dimensiones (XY) sin tomar en cuenta la tridimensionalidad de las células, por lo cual nuestros resultados no se ajustan a las medidas reales.

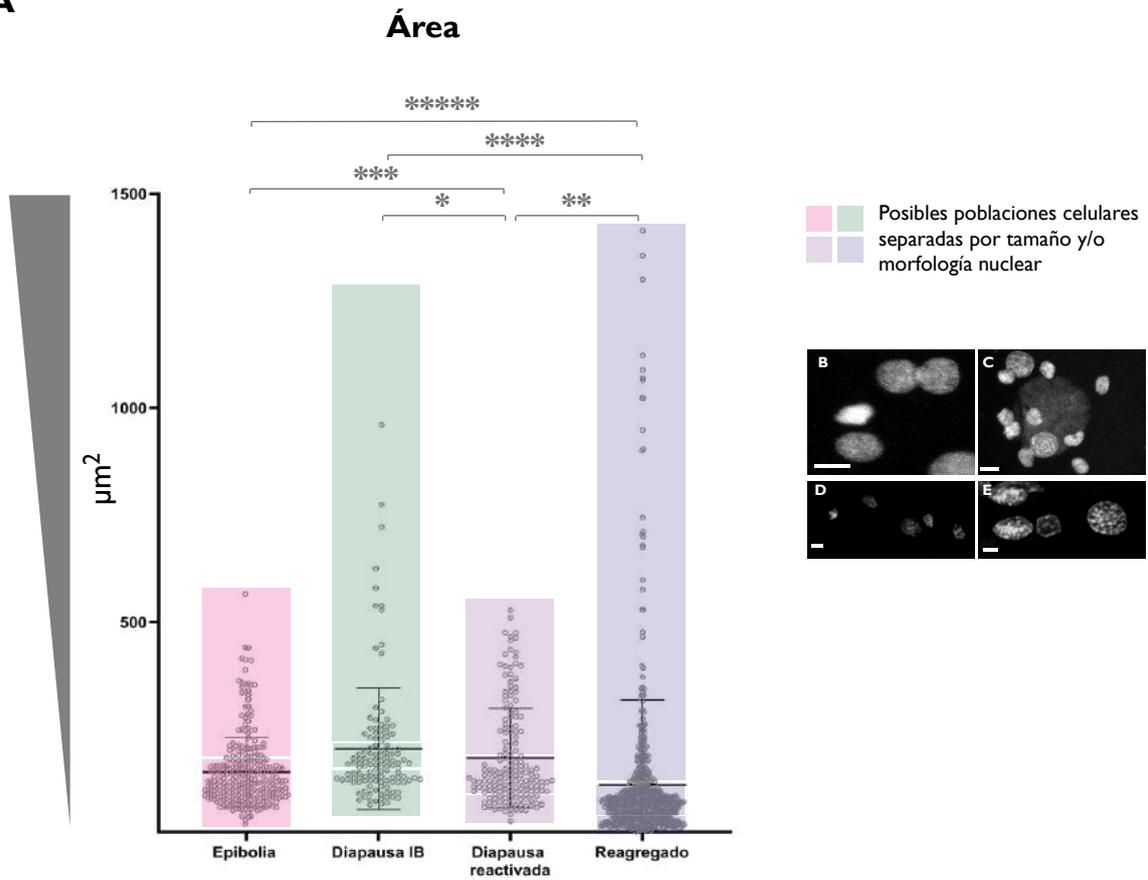
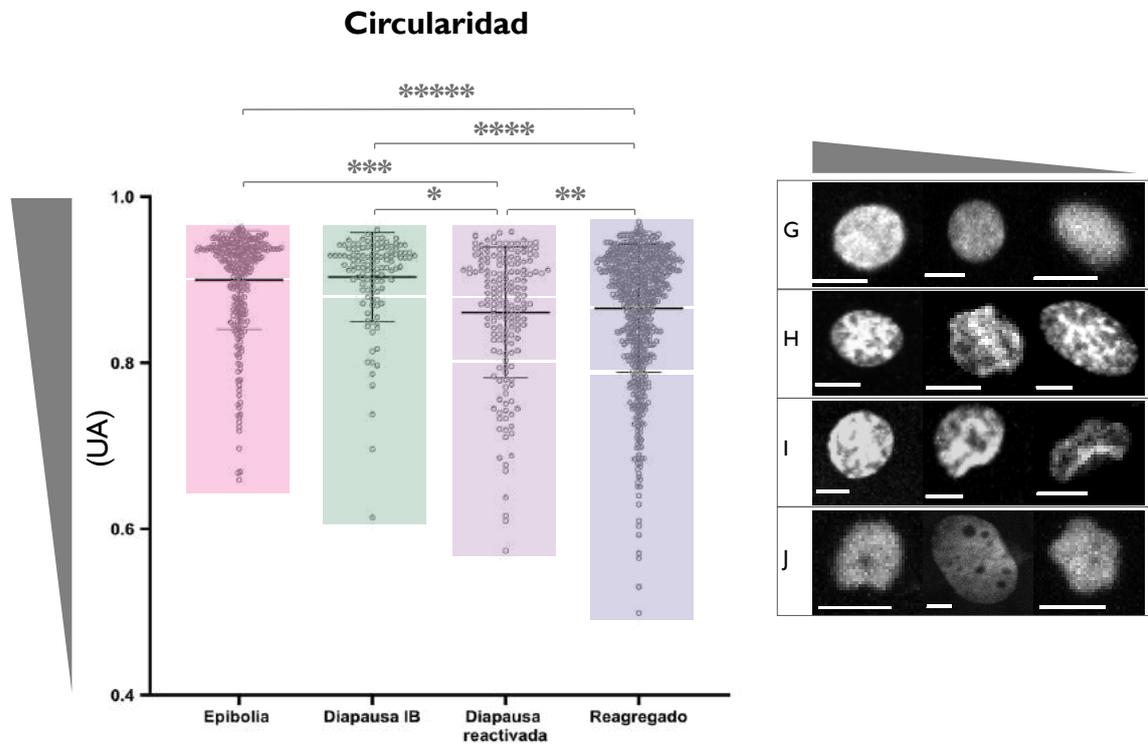
Los análisis de circularidad mostrados en la Figura R27 F evidenciaron que los núcleos menos circulares (los que alcanzaron valores más cercanos al cero) se encuentran en el estadio diapausa reactivado aumentando en el reagregado, luego diapausa IB y por último la epibolia (ver Tabla R2). La epibolia presentó los valores de circularidad más altos. La prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon mostró una diferencia significativa entre los estadios, excepto para epibolia comparado con la diapausa IB.

Estos datos permiten inferir que podrían existir diferentes poblaciones celulares de acuerdo a la morfología de los núcleos. En epibolia, los datos sugieren la distinción de dos poblaciones celulares, una por encima de la media de circularidad y otra con valores por debajo de la misma. En diapausa IB también se evidenciaron dos poblaciones celulares, con un cúmulo de núcleos sobre el valor de la media y el resto con valores menores. En cuanto a la diapausa reactivada, los datos sugieren tres poblaciones, una con valores mayores a la media, otra en una franja entre la media y 0.80, y el resto pertenecería a otra población celular. En el reagregado es posible clasificar tres poblaciones celulares, una de acuerdo a los núcleos que poseen valores de circularidad mayores a la media, otra entre la media y 0.80, y el resto podría pertenecer a otra población.

En suma, de acuerdo a los valores de circularidad analizados por estadio, se sugiere la existencia de dos poblaciones celulares en epibolia y diapausa IB, y tres poblaciones en diapausa reactivado y reagregado.



**Figura (R26)** Imágenes confocales de alta resolución de embriones *in toto* en diferentes estadios. Marcaje de ADN con Hoechst 33342. **A** Embriones en el estadio de epibolia. **B** Embriones en estadio de diapausa IB. **C** Embriones en estadio de diapausa reactivado. **D** Embriones en estadio de reagregado. Barra de escala: 40  $\mu\text{m}$ .

**A****F**

**Figura (R27)** Análisis de descriptores de forma en núcleos de blastómeras en estadio de epibolia, diapausa IB, diapausa reactivada y reagregado teñido con Hoechst 33342. **A** Análisis del área de cada núcleo ( $\mu\text{m}^2$ ) según el estadio del embrión. **B** Núcleos en el estadio epibolia. **C** Núcleos en el estadio diapausa IB. **D** Núcleos en el estadio diapausa reactivada. **E** Núcleos en el estadio reagregado. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ . **F** Estudio de la circularidad ( $4\pi \cdot \text{área} / \text{perímetro}^2$ ) según el estadio del embrión. **G** Núcleos en el estadio epibolia. **H** Núcleos en el estadio diapausa IB. **I** Núcleos en el estadio diapausa reactivada. **J** Núcleos en el estadio reagregado. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

**Tabla R2** Tabla con valores de la media del análisis del área ( $\mu\text{m}^2$ ) y circularidad de los núcleos de embriones en estadio epibolia, diapausa IB, diapausa reactivado y reagregado. UA: unidades arbitrarias.

Núcleos	Epibolia	Diapausa IB	Diapausa Reactivado	Reagregado
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	150,3	204,6	183,2	120,1
Circularidad (UA)	0,9002	0,9064	0,8605	0,8657

## Discusión

---

Uno de los objetivos principales planteados durante este trabajo fue analizar la morfología de las células de embriones de *A.charrua* mediante técnicas de marcaje de componentes estructurales (citoesqueleto) y proteínas de adhesión en estadios de epibolia, reactivado y reagregado. Para dicho análisis se planteó como primer objetivo realizar un ajuste de los protocolos de tinción e inmunodetección.

### Ajuste del inmunomarcaje y tinción fluorescente

En el presente trabajo se logró optimizar el protocolo de inmunodetección para embriones *in toto* de *A.charrua* ya establecido en el laboratorio. Se modificó el tiempo y cantidad de lavados, reactivos y métodos de detección, incorporando el uso de anticuerpos acoplados a moléculas fluorescentes. Se evaluaron diferentes diluciones del anticuerpo primario y diferentes concentraciones de los marcadores fluorescentes: verde de metilo y Hoechst. Esto se realizó con el propósito de marcar los elementos del citoesqueleto y proteínas de adhesión para luego analizar las morfologías celulares de los diferentes estadios.

Con respecto a los lavados, el protocolo original utilizaba el detergente Tween al 1% en PBS, en este trabajo se cambió por Tritón al 1% para lograr una mayor permeabilización, y no se agregó DMSO. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, el tiempo de lavado se modificó a 4 lavados de 1 hora cada uno, y 2 de 30 minutos cada uno.

La incubación con los anticuerpos se realizó primero sin agitación debido a la fragilidad que presentan los embriones decorionados. Sin embargo, el colorante no se distribuía correctamente sobre todo el embrión. Por este motivo, finalmente se optó por realizar incubaciones durante toda la noche con agitación horizontal leve.

La solución de bloqueo en el protocolo inicial constaba de suero fetal 20%+ DMSO 1%+ Tween 0,1% en PBS. Se modificó basándonos en el protocolo de inmunodetección para el pez cebra y se usó albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y Tritón 1% en PBS.

Con respecto al marcador de actina filamentosa (faloidina-TRITC), se realizaron pruebas con diluciones de 1:8000, 1:5000, 1:2500, 1:1500, 1:1000 y 1:500. La dilución que se eligió fue 1:1000, ya que demostró ser la más adecuada para visualizar el citoesqueleto cortical de las células de la CCE compuesto por actina filamentosa. Este marcador se adiciona en la incubación con el anticuerpo

secundario, y los lavados posteriores retiran restos del marcador que no se había unido.

Para el marcador de ADN verde metilo se realizaron pruebas a diluciones de 1:10000, 1:8000, 1:5000 y 1:500. Se seleccionó la dilución 1:10000 ya que es la mayor dilución con la cual es posible evidenciar claramente los núcleos. De igual manera que con la faloidina, el verde de metilo se incluye durante la incubación con el anticuerpo secundario. En algunos casos se utilizó Hoechst 33342 como marcador de ADN en dilución 1:5000.

Con respecto al anticuerpo primario anti-cadherina, se realizaron pruebas a 1:200 y 1:1000. Se utilizó la dilución 1:1000 es la menor concentración con la que se logra un inmunomarcaje adecuado. Cabe destacar que se realizó un BlastX de la secuencia aminoacídica que reconoce el anticuerpo (DYDYLNDWGPRFKKLADMYGGGDD) (Geiger y col., 1990) contra el transcriptoma de *A.charrua* (Schlueb y col., no publicado) y se encontraron seis cadherinas para la cual coincide (ver Tabla D1).

**Tabla D1:** Secuencias reconocidas mediante BlastX de la secuencia de reconocimiento del anticuerpo anti-pan-cadherina versus el transcriptoma de *A.charrua*. UNIPROT: [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org).

Código de secuencia de ARNm	Código UNIPROT	Cadherinas
ACHA01MRNA0037191	P55285	Cadherina-6
ACHA01MRNA0004142	Q91838	Cadherina-20
ACHA01MRNA0003492	P97326	Cadherina-6
ACHA01MRNA0025089	P19534	Cadherina-2
ACHA01MRNA0001816	P55280	Cadherina-6
ACHA01MRNA0012519	P33146	Cadherina-15

El anticuerpo primario anti-tubulina acetilada se utilizó en dilución de 1:200.

Es importante mencionar que, debido a que los embriones decorionados son muy frágiles, puesto que queda expuesta la CCE la cual es extremadamente fina, el número de embriones que resisten el protocolo de inmunodetección y que finalmente lograron ser analizados en este trabajo es bajo. Muchos de los embriones se dañaron debido a la manipulación durante el decorionado o durante el procedimiento de inmunodetección, ya sea en lavados o durante la agitación y fueron descartados. Asimismo, se colocaron cinco embriones por tubo de 1,5 ml durante las inmunomarcaciones, es imprescindible que los embriones dispongan de espacio entre sí, con el fin de evitar el contacto sus CCE y minimizar los daños. Además es importante destacar que previo al comienzo de la epibolia en otros peces

teleósteos no anuales como *Danio rerio* presentan un promedio de 4000 blastómeras (Marrable, 1965), mientras que los embriones de peces anuales se ha registrado un número mucho menor, entre 200 a 1000 para *Astrofundulus* (Wourms, 1972b), de 50 a 350 en *Nothobranchius* (Van Haarlem, 1983) y 100 en *A.viarius* (Arezo y col., 2005). Ésto sumado a que la visualización del embrión fue parcial debido a su disposición en la cámara sobre el portaobjetos, generó que el número de blastómeras profundas observadas por embrión fuera acotado, y en consecuencia para los análisis como lo es el área y circularidad el número utilizado es escaso. Por estos motivos es importante realizar experimentos nuevamente para respaldar los datos aquí obtenidos.

En cuanto a los controles negativos utilizados en este trabajo, se realizaron sin anticuerpos primarios por lo tanto la información obtenida se basa en si el anticuerpo secundario se une de manera inespecífica a estructuras ajenas al anticuerpo primario. Sin embargo, no se conoce la especificidad del anticuerpo primario en los experimentos realizados. Aproximaciones experimentales tales como Western Blot con extractos proteicos de embriones marcando con anticuerpos específicos como por ejemplo cadherinas o tubulina acetilada son necesarios para demostrar la especificidad de los anticuerpos. Además para ésto también se pueden realizar silenciamientos génicos de proteínas de interés con una posterior inmunodetección de las mismas.

## **El rol de la CCE: Citoesqueleto y Cadherinas.**

### Citoesqueleto de la CCE

Los análisis presentados en este trabajo permitieron estudiar tanto la morfología de las blastómeras profundas como la CCE, el citoesqueleto, los núcleos celulares y las cadherinas puesto que se optó por utilizar embriones *in toto*.

La distribución de la actina en la CCE concuerda con lo descrito en otros peces anuales durante la epibolia y el reagregado. Aunque cabe mencionar que en el reagregado la tinción no se realizó de manera adecuada. En la Figura R18 es posible observar puntos fluorescentes que no corresponden con la distribución de los microfilamentos descritos anteriormente, por lo que los datos no son completamente fiables y se necesita replicar los experimentos. Asimismo, se observan núcleos posicionados en los bordes de las células de la CCE que concuerdan con descripciones de Wourms, 1972.

Se reporta por primera vez la disposición del citoesqueleto para el estadio de diapausa IB y de diapausa reactivada. No obstante, durante la diapausa y el reactivado se encontró, además, una distribución de filamentos de actina dispersos en el citoplasma de las células de la CCE no observados en otros estadios. Estudios en insectos correlacionan el estadio de diapausa con un aumento de la expresión

de genes que codifican para la actina. Este hallazgo se asoció también a una redistribución de la actina filamentosa (Kim y col., 2006). Por lo tanto, el aumento de filamentos de actina en la CCE durante la diapausa y el reactivado podría deberse a un aumento de la expresión de actina y en consecuencia a una reorganización de la misma, propio de este estadio de detención del desarrollo. Es importante mencionar que en nuestros experimentos sólo se tomaron imágenes de embriones y no se cuantificó cantidad de la señal. En este sentido, sería muy interesante en un futuro realizar la cuantificación de la expresión de actina con aproximaciones experimentales tales como PCR en tiempo real para evaluar la expresión del gen de actina o cuantificar la cantidad de proteína mediante Western Blot en extractos de embriones.

Los resultados del marcaje de tubulina acetilada muestran una distribución similar a la de actina filamentosa, permaneciendo en los bordes celulares durante la epibolia y reagregado pero con una distribución fibrilar en el citoplasma durante la diapausa y los embriones reactivados. Si bien en peces teleósteos no anuales se ha estudiado la disposición de los microtúbulos durante el desarrollo temprano, la ubicación de los microtúbulos generalmente se restringe a las blastómeras durante las divisiones celulares (en el huso mitótico) y al vitelo durante la epibolia (Topczewski y Solnica-Krezel, 2009). En este sentido, estos resultados representan una novedad.

Como se mencionó en la Introducción, se ha relacionado a la tubulina acetilada con la estabilidad de los microtúbulos *in vivo* e incluso en el protozoo *Tetrahymena thermophila* con la resistencia al frío (Polevoda y Sherman, 2002). También se ha asociado a la tubulina acetilada a un aumento de la flexibilidad de los microtúbulos y a una resistencia mayor al envejecimiento mecánico con respecto a los microtúbulos sin modificaciones (Portran y col., 2017). Por consiguiente, el aumento de microtúbulos acetilados durante la diapausa podría estar relacionado con la resistencia al estrés mecánico. Estos datos fueron obtenidos de cuatro embriones, razón por la cual es necesario realizar más réplicas para confirmar lo observado. Además, observaciones de embriones completos ayudarían a comprender la distribución, así como también manipulaciones génicas de la proteína que no permiten la acetilación, con el fin de comprender su función durante el desarrollo temprano.

### Cadherinas de la CCE

Con respecto a la distribución del inmunomarcaje para cadherinas en CCE, se observó una distribución de la señal en todo el embrión de manera puntiforme en todos los estadios. En concordancia, este mismo patrón se describió para la cadherina-E en *A. nigripinis* durante la epibolia (Reig y col., 2017). Por lo tanto, es posible que la marca observada en nuestros experimentos identifique a la cadherina-E, y que dicha proteína está cumpliendo un rol importante en el movimiento de las células. Además, es posible observar que esta marca se

conserva a lo largo del desarrollo temprano, hasta reagregado. Se visualizó que la marca en el estadio de epibolia se acumula en los bordes de las células de la CCE. Estos resultados guardan relación con lo que describe Reig y col. (2017).

De manera interesante, en diapausa IB no se observa acumulación de señal del anticuerpo, esto puede deberse a que las células durante la diapausa no se estarían expresando cadherinas, las cuales son necesarias para el movimiento de las blastómeras en estadios como la epibolia (Reig y col., 2017). Mientras que en el reactivado sí fue posible observar este fenómeno. Sin embargo, estos datos se basan en la observación de sólo un embrión para cada estadio, por lo que necesitaríamos realizar más experimentos para confirmar los resultados obtenidos.

En relación al estadio de reagregado, nuevamente se distingue la acumulación de inmunomarcaje para cadherina en los bordes celulares y además se observó en un experimento sobre el propio reagregado de blastómeras una mayor cantidad de marca de cadherina en la CCE. Posiblemente, así como en el estadio de epibolia las proteínas de adhesión influyen en la direccionalidad de la migración de las blastómeras (Reig y col., 2017), en el reagregado actuaría de la misma manera. Para entender este mecanismo se podrían realizar bloqueos de la expresión de cadherinas o sobreexpresar un dominante negativo inyectado en blastómeras inmediatamente luego de la dispersión celular, para analizar cómo afecta al reagregado.

## **Blastómeras, citoesqueleto y proteínas de adhesión**

### Blastómeras durante la Epibolia: células migratorias

Los resultados obtenidos en este estadio concuerdan con los observados por Arezo y col. (2005) en donde se describen blastómeras triangulares, elongadas o con formas romboidales, similares a lo que observamos en este trabajo.

La actina filamentosa se encuentra en los bordes celulares. Esta ubicación sugiere que se trataría del citoesqueleto cortical. Según Salbreux y col. (2012) el citoesqueleto cortical se compone de una capa fina de actina debajo de la membrana celular. Cabe aclarar que, si bien en nuestros experimentos no se realizaron tinciones de membrana, por lo que no podemos afirmar que es el citoesqueleto cortical, estos resultados son muy similares a la descripción realizada por Salbreux y col.

Kunwar y col. (2006) describe la disposición de actina-F según diferentes mecanismos de migración. Acorde a nuestros resultados y a la propuesta de los autores, la observación de una acumulación de actina-F en extremos celulares se corresponde con el frente de avance según la dirección de la migración de las células. Por lo tanto, de acuerdo a estos autores y nuestros resultados, la estrategia de migración sería similar a la migración mesenquimal.

Las moléculas de adhesión son importantes para la migración de células con morfología mesenquimal. Si bien no forman conexiones estables entre sí, son capaces de establecer contactos transitorios con células de capas cercanas o a medida que avanzan se aproximan y generan conexiones (Kurosaka y Kashina, 2008). Las moléculas implicadas suelen ser integrinas y cadherinas. La presencia de cadherina-E en células embrionarias durante la epibolia en el desarrollo embrionario ha sido reportado para varios peces teleósteos como por ejemplo *Austriolebias nigripinis*, *Oryzias Latipes* y *Danio Rerio* (Reig y col., 2017; Adachi y col., 2009; Shimizu y col., 2005). En nuestros experimentos durante la epibolia se observó una acumulación de la señal en las blastómeras con respecto al resto del embrión. Por consiguiente, es posible que la marca observada sea específica de este tipo de cadherina, aunque no se logró distinguir si la acumulación se ubica en la membrana plasmática de las blastómeras o de la CCE. Estudios donde se aplique inmunomarcaje específico para cadherinas sobre cortes histológicos podrían ser útiles para distinguir las membranas de las blastómeras de las de la CCE, y por lo tanto resolver su localización a nivel celular y subcelular, así como determinar el subtipo de cadherina presente.

#### Blastómeras durante la Diapausa IB: células redondeadas

Las células redondeadas requieren del citoesqueleto cortical de acto-miosina para mantener su forma y su capacidad para regular la osmolaridad. En circunstancias donde la presión osmótica es baja, el volumen celular suele disminuir y la presión suele ser interna y mediada por el citoesqueleto cortical (Stewart y col., 2011). En peces anuales durante el desarrollo temprano hasta la salida de la diapausa II se ha reportado que el intercambio de iones es mínimo y la osmorregulación ocurre minimizando el intercambio ambiental (Podrabsky y Hand, 2015). Considerando lo planteado anteriormente y que en el presente trabajo se observó actina filamentosa organizada de manera similar a la disposición de la actina cortical, sumado a una disminución en el área de las blastómeras durante la diapausa, planteamos que el citoesqueleto cortical de las blastómeras podría tener un rol importante en la morfología de las células en ese estadio y que la presión osmótica baja afectaría el tamaño celular. La disposición de microtúbulos acetilados en las blastómeras fue similar a la de actina, permaneciendo en los bordes. Del mismo modo en el que quizás en la CCE tiene un rol en el estrés mecánico, en las blastómeras cumpliría una función similar. Es relevante aclarar que los datos obtenidos corresponden a dos embriones y que para el cálculo del área de las blastómeras se utilizaron datos de siete células, sumado a la curvatura del embrión y el hecho de que las medidas se realizaron en dos dimensiones, no descartamos que podría afectar los resultados obtenidos y el cambio podría ocurrir en la morfología y no en el tamaño.

Stewart y col. (2011) describe que, independiente del momento del ciclo celular, las células se redondean, cercanas a ser esféricas, cuando se pierden las adhesiones, y Reig y col. (2017) observaron un fenotipo de blastómera con morfología redondeada cuando se sobreexpresa un dominante negativo para cadherina-E. En la diapausa IB no se observó una acumulación de marcas para cadherinas en las blastómeras, estos resultados guardan relación con lo que sostienen los autores mencionados. En este sentido, estudios de Romney y col. (2017) demostraron que durante la diapausa en el pez anual *Austrofundulus limnaeus* se expresan ARNm de proteínas de adhesión con exones diferentes a aquellos embriones que son de escape (no ingresan en diapausa), lo cual podría generar un procesamiento alternativo que afecte la expresión del gen. Asimismo, se conocen diversos represores de cadherina como Twist, HOXB7, CBF-A y KLF8. La mayoría están involucrados en la transición epitelio-mesénquima y actúan río abajo producto de señales como TGF- $\beta$ , factor nuclear (NF)- $\kappa$ B, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), integrinas e hipoxia (Van Roy y Berx, 2008). Los embriones en diapausa IB se encuentran en hipoxia, por lo que podría estar relacionado. En nuestro laboratorio se realizaron estudios de transcriptómica (Papa y col. no publicado) de embriones durante diapausa IB y algunos de los ARNm que aumentan la expresión en este estadio son Twist, TGF- $\beta$ , (NF)- $\kappa$ B, EGF, FGF e integrinas. Como consecuencia, estas proteínas podrían estar involucradas en la disminución de la expresión de cadherinas durante la diapausa. Cabe destacar que la represión de la cadherina mediada por estas señales generalmente determina un fenotipo mesenquimal, sin embargo, en la diapausa las células se mantienen redondeadas e inmóviles. Igualmente la regulación podría efectuarse a nivel proteico. Diversos reportes han demostrado que tanto la cadherina-E como la -N pueden ser sustratos de proteasas pertenecientes a las familias ADAM y Presenilinas, capaces de cortar en regiones específicas localizadas en el espacio extra- e intracelular y por lo tanto de regular la disponibilidad de cadherinas en la superficie celular (Reiss y col., 2005; Uemura y col., 2006). Ambas proteínas están catalogadas con un aumento de la expresión de ARNm durante la diapausa (Schlueb y col. aún no publicado) de manera que podrían estar relacionadas con la disminución de la expresión en la superficie celular.

Sin embargo, en el estadio de diapausa no se logró observar el grupo de blastómeras característico del fenotipo B. Debido a que solo se adquirieron imágenes de dos embriones, quizás la posición sobre el portaobjetos (cámara) no permitió distinguir el grupo, ya que la cámara que realizamos para el montaje nos permite una visualización parcial del embrión y no total. A futuro se plantea el análisis de más embriones en este estadio con el fin de observar el grupo celular para determinar si poseen o no interacciones entre ellas mediante proteínas de adhesión mediante experimentos de inmunomarcaje para cadherinas en general o distinguiendo cadherinas E o N, o generando embriones transgénicos que expresen proteínas quiméricas acopladas a proteínas fluorescentes.

### Blastómeras durante Diapausa Reactivada y Reagregado

La salida de la diapausa implica que el embrión retorna el desarrollo embrionario. Uno de los objetivos planteados fue visualizar cómo se distribuían los elementos del citoesqueleto y las proteínas de unión luego de la diapausa.

En el embrión reactivado se observaron algunas blastómeras con morfologías redondeadas, similares a las observadas en diapausa, posiblemente un reminiscente del estadio anterior y células con morfología migratoria. Se observa el citoesqueleto de actina con una disposición similar a la observada en epibolia. Sin embargo, para la tubulina acetilada se detectó una acumulación de señal en regiones cercanas al núcleo, posiblemente asociada a microtúbulos acetilados cercanos al centrosoma, estructura que nuclea y organiza los microtúbulos que cumplen diferentes funciones como por ejemplo el huso mitótico (Alberts y col., 2002). De igual manera, se observó señal para tubulina acetilada en los extremos celulares en el embrión reactivado, a diferencia del reagregado en donde la señal es más sutil. La acumulación de tubulina acetilada generalmente ocurre en las protrusiones de membrana de células migratorias. Las quinesinas y dineínas que transportan filamentos intermedios a lo largo de los microtúbulos presentan mayor afinidad por los microtúbulos acetilados o destirosinados, cumpliendo un rol importante en el transporte selectivo de los filamentos intermedios al frente de avance. Perturbaciones en la red de filamentos intermedios puede resultar en la pérdida de direccionalidad y velocidad durante la migración celular (Seetharaman y Etienne-Manneville, 2020). De esta manera, la acumulación observada de tubulina acetilada en los extremos celulares podría indicar el frente de avance. Durante el reagregado las blastómeras convergen hacia un punto en común, por lo que la direccionalidad de la migración es muy importante, y quizás la tubulina acetilada esté implicada en este mecanismo.

La señal fluorescente del inmunomarcaje de las cadherinas en las blastómeras es similar al observado en diapausa I. También es recomendable sumar otras aproximaciones experimentales como la generación de embriones transgénicos que expresen cadherinas acopladas a proteínas fluorescentes e inducir la diapausa. Una vez que se induce la reactivación se coloca el embrión en estadio de diapausa en el microscopio de barrido láser confocal y se adquieren imágenes a intervalos de tiempos determinados en experimentos de *time-lapse*, de manera tal que a medida que retoma el desarrollo por factores como la luz, se obtienen imágenes de lo que ocurre con la dinámica de las cadherinas.

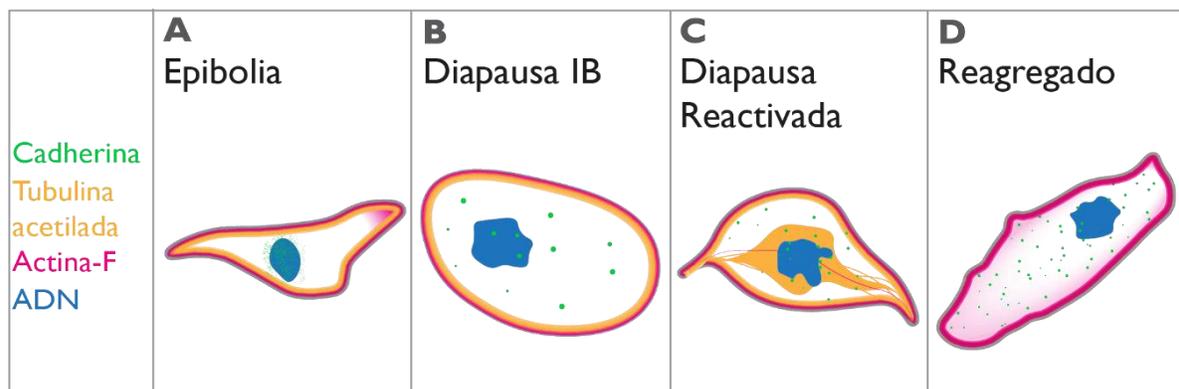
En el reagregado se observaron blastómeras con morfología de células migratorias y se distingue un número superior de núcleos respecto a los estadios anteriores, ambos coinciden con la descripción realizada para este estadio (Pereiro y col., 2017). Cabe destacar que se observó marcate de ADN distribuido en el embrión que podría ser ADN bacteriano, núcleos que se fragmentaron o algún tipo de resto fluorescente. En el experimento que se logró captar el reagregado, la tinción con faloidina-rodamina presentó marcas distribuidas de manera puntiforme en la CCE, esto podría ser producto de falta de lavados o exceso de colorante

durante el procedimiento, así como señal inespecífica por autofluorescencia de los embriones.

No obstante en el reagregado se encontró una acumulación de la señal correspondiente a cadherinas sobre las blastómeras similar a la observada en epibolia (ver Figura R24). Como se mencionó en la Introducción, la expresión dinámica de cadherinas correlacionado con el movimiento celular ha sido observado en diferentes especies en el transcurso del desarrollo. Asimismo se describió un reinicio de la transcripción de cadherina-E en células que experimentan una transición epitelio-mesénquima durante la organogénesis del riñón (Van Roy y Berx, 2008). En este sentido, lo observado en los experimentos podría ser producto de un mecanismo similar y la señal observada ser de cadherina de tipo epitelial.

Posiblemente el aumento de cadherina sobre la superficie de las blastómeras sea paulatino luego de que el embrión entró en diapausa, y por esta razón, la cantidad de marca observada para dicha proteína depende del momento de reactivación-reagregado en que se encontraba el embrión cuando fue procesado. En este contexto sería muy interesante realizar experimentos con embriones transgénicos que expresen cadherinas acopladas a proteínas fluorescentes para poder visualizar *in vivo* la dinámica de las mismas y obtener datos que respalden esta hipótesis.

Cabe aclarar que en el estadio reagregado no se incluyó un control negativo, ya que si bien fue incluido en el experimento, no se adquirieron imágenes del mismo. Por este motivo, los resultados, obtenidos deben ser validados mediante la adquisición de imágenes de los controles que no fueron analizados.



**Figura D2.** Esquema representativo de una blastómera en los cuatro estadios estudiados. Marca de cadherina (verde), tubulina acetilada (amarillo), actina-F (magenta) y ADN (azul). **A** Blastómera en epibolia. **B** Blastómera en Diapausa IB. **C** Blastómera en Diapausa Reactivado. **D** Blastómera en Reagregado

## Señales nucleares de Cadherina y Tubulina acetilada

Como se describió en la Introducción, los microtúbulos acetilados son muy estables y suelen encontrarse en el citoplasma. Sin embargo, encontramos señal fluorescente dentro de los núcleos, en experimentos que presentaban tinción nuclear y en los que carecían de la misma (ver Figura R2 P-R y R21 F). Por este motivo descartamos que estas observaciones se deban al pasaje del canal de adquisición de ADN (alrededor de los 450 nm) al canal de adquisición de tubulina acetilada (alrededor de 530 nm). Estudios en cultivos de células mesangiales del riñón de rata mostraron la presencia de un isotipo de  $\beta$ ii tubulina en el núcleo (Walss y col., 1999). Más aún, existen reportes de tubulina nuclear en células cancerosas incluyendo cáncer de colon, próstata y piel (Yeh y Ludueña, 2004). Por lo que, la presencia de tubulina en el núcleo ha sido reportada, pero no se encontró bibliografía que indicara la presencia de la misma de forma acetilada dentro de núcleos. Asimismo, estudios demuestran que el anticuerpo utilizado en este trabajo para el reconocimiento distingue tubulina acetilada de otras proteínas acetiladas, como por ejemplo histonas acetiladas (ambas acetilaciones son en lisinas) (Wang y col., 2012) y que es específica para microtúbulos acetilados y no reconoce subunidades de  $\alpha$ -tubulina en forma monomérica (Piperino y col., 1987). Sin embargo, en todos los experimentos realizados con inmunomarcación para tubulina acetilada se visualizaron marcas nucleares en todos los estadios estudiados. No obstante, es posible que el anticuerpo esté reconociendo factores de transcripción, receptores nucleares o factores de importación nucleares, que son acetilados en lisinas (Polevoda y Sherman, 2002). En nuestro trabajo no se realizaron pruebas para determinar que en peces anuales el anticuerpo utilizado sólo reconoce microtúbulos acetilados específicamente, por lo que a futuro proponemos identificar y caracterizar la marca, realizando ensayos de fraccionamiento subcelular con fracciones enriquecidas de núcleos mediante la técnica de Western Blot.

De manera interesante, los análisis realizados en el presente trabajo muestran señal de inmunomarcaje para cadherinas dentro de los núcleos en todos los estadios, incluyendo experimentos sin tinción nuclear (ver Figura R4 I-K), por lo que se descarta que sea un pasaje de fluorescencia del rango de color azul (alrededor de 450 nm) al canal de adquisición de fluorescencia del rango verde (530 nm). Como se mencionó anteriormente, las cadherinas E y N son sustrato de proteasas pertenecientes a las familias ADAM y Presenilinas. El fragmento citoplasmático resultante luego del corte proteolítico tiene la capacidad de favorecer la expresión/represión de genes mediante su internalización en el núcleo celular (Reiss y col., 2005; Uemura y col., 2006). Diversos reportes han mostrado la presencia de fragmentos citoplasmáticos de cadherinas E y N en el núcleo de células tumorales (Gumbiner, 2005; Yu y col., 2019). Sin embargo, la participación de este mecanismo durante el desarrollo embrionario sólo se restringe a la migración de células de la cresta neural en aves y anfibios (*Xenopus laevis*) (Reiss y col., 2005; Shoal y col., 2007). En este contexto, nuestra observación constituye una novedad.

También cabe destacar que las marcas nucleares para cadherinas y tubulinas acetiladas se distribuyen de manera homogénea excepto en diapausa I, donde se observó una distribución granular. Posiblemente la redistribución de la marca nuclear durante la diapausa esté asociada a un rearrreglo de la cromatina. Estudios en organismos en diapausa demostraron el rearrreglo de la cromatina en este estadio (Hickner y col., 2015; Hu y col., 2020; Klymenko y Liang, 2012; Qiu y col., 2007; Renfree y Fenelon, 2017; Reynolds, 2017; Reynolds y col., 2019; Yin y Chippendale, 1979).

Las marcas observadas fueron reportadas para todos los núcleos observados, esto incluye los núcleos de las blastómeras como los núcleos pertenecientes a células de la CCE y a la capa sincitial vitelina. Por lo que a futuro, realizar estudios centrados únicamente en las blastómeras es importante para comprender cuál es la función de estas proteínas y cómo afecta en el desarrollo de los peces anuales.

## **Morfología nuclear**

El núcleo es uno de los principales compartimientos intracelulares y parte de su función es contener el material genético. La morfología celular dada por el estado de diferenciación, fase del ciclo celular o si la célula se encuentra migrando activamente se ve reflejada en el núcleo.

Butler y col. (2009) demostraron que las células madre embrionarias humanas pluripotentes e indiferenciadas poseen núcleos de apariencia uniforme, y a medida que las células se diferencian, los núcleos comienzan a cambiar su forma y tamaño. Además mencionan de la existencia de una breve ventana temporal en el desarrollo cuando la célula madre, aún no comprometida a diferenciarse en un cierto tipo celular, experimenta cambios epigenéticos iniciales que conducen al compromiso de un tipo celular. Durante esta ventana es probable que ocurran reordenamientos más marcados o transitorios de la estructura nuclear, la organización del genoma y la modificación de la cromatina. En concordancia, nuestros resultados mostraron una diferencia significativa del área y circularidad de los núcleos entre los estadios analizados. Wagner y Podrabsky (2015) estudiaron los patrones de expresión de genes en *A. limnaeus* y mostraron que durante la epibolia las células embrionarias son pluripotentes, y que durante el reagregado, las blastómeras comienzan a diferenciarse. Por lo tanto, la alta circularidad observada durante la epibolia podría deberse a que son células pluripotentes indiferenciadas, y la disminución de la circularidad durante el reactivado-reagregado, dado por el cambio de morfología, podría reflejar un proceso de diferenciación. El cambio comienza a observarse en el reactivado, por lo que esto podría indicar que la ventana temporal que menciona Butler se ubicaría en este estadio.

Además nuestros resultados de dos posibles poblaciones celulares durante la diapausa concuerdan con estudios de Arezo y col. (2016), en los que estudios de inmunodetección *in toto* muestran una población de células VASA positivas, un marcador de células germinales primordiales. Para estudiar la tercer población celular proponemos a partir de los estudios de morfología nuclear se podrían realizar estudios que utilicen otros marcadores de diferenciación celular que permitan respaldar nuestros resultados y comprender estas poblaciones.

Cabe destacar que como sucedió anteriormente con el estudio de marcas nucleares, los datos obtenidos para área y circularidad no diferencian núcleos de blastómeras de núcleos de CCE o de la capa sincitial vitelina por que las diferentes poblaciones por área y circularidad podrían pertenecer a éstas. Además, las medidas de área y circularidad fueron tomadas a partir de embriones *in toto* realizando la suma de todas adquisiciones en Z. Como no se realizaron modificaciones de imágenes para corregir la orientación de la estructura esférica del embrión al momento de que se adquirieron las imágenes, se obtiene una curvatura inherente del embrión. Lo que puede conducir a tener pequeñas modificaciones en los datos tomados. En este contexto, también aquí proponemos realizar estudios con un mayor enfoque en las blastómeras, realizando manipulación de las imágenes con el fin de lograr la obtención de datos que se acerquen a las medidas reales al analizar las imágenes en tres dimensiones (en este trabajo se realizaron en dos) para comprender los resultados obtenidos.

## Conclusiones

---

En el presente trabajo se logró estandarizar un ajuste exitoso del protocolo de inmunodetección para anticuerpo anti-cadherinas y anticuerpo anti-tubulina-acetilada. También se logró incorporar a dicho protocolo colorantes que permitieron la tinción de actina-F (Faloidina-Rodamina ) y verde de metilo o Hoechst 33342 con los cuales se marcaron los núcleos celulares.

El marcaje de componentes subcelulares de embriones de *A. charrua in toto* permitió observar elementos del citoesqueleto y núcleos de la CCE, blastómeras profundas y CSV. Se observaron filamentos de actina y microtúbulos acetilados pertenecientes a la CCE con una distribución en los bordes celulares durante los estadios de epibolia y reagregado, mientras que para diapausa IB y reactivado se detectó una distribución dispersa en el citoplasma. Este patrón de distribución representa una novedad y es importante destacar que se trata del primer reporte durante estos estadios para estos peces. En cuanto a las cadherinas, presentaron una distribución puntiforme en todo el embrión a lo largo de todos los estadios con una acumulación de señal en los bordes de las células de la CCE. Posiblemente esta marca pertenezca a la cadherina-E, aunque se observa que la marca disminuye durante la diapausa IB, respaldando la hipótesis propuesta sobre la disminución de esta proteína durante este estadio.

En cuanto a las blastómeras profundas, durante la diapausa IB no se observó un rearrreglo del citoesqueleto comparado con la epibolia. En ambos estadios las marcas para actina-F y tubulina acetilada permanecieron en los bordes celulares. Sin embargo, la acumulación de cadherinas sobre las blastómeras disminuyó en este estadio. Este hecho respalda la hipótesis planteada en este trabajo sobre la disminución en este estadio. Aunque los elementos del citoesqueleto no presentaron cambios en la distribución, la morfología de las blastómeras se vio afectada presentando una menor área y mayor circularidad comparado con el resto de los estadios. Asimismo, en el reactivado se logró observar en algunas blastómeras que presentan morfologías migratorias la disposición de los elementos del citoesqueleto diferente al estadio diapáusico, con una distribución a lo largo del eje mayor. Esta observación sugiere que el rearrreglo estaría ocurriendo a la salida de la diapausa, durante el reactivado para dar lugar al desarrollo activo, en conjunto con un aumento del área de las blastómeras y una circularidad menor. Además, si bien no se observó un aumento de cadherinas durante el reactivado, fue posible observar este fenómeno durante el reagregado.

En cuanto a los núcleos celulares, se detectó inmunomarcaje para cadherinas y tubulina acetiladas durante todos los estadios. Posiblemente la marca nuclear para cadherina corresponda al fragmento citoplasmático de la cadherina E

o N. En cambio para la tubulina acetilada, si bien no se encontraron referencias bibliográficas, las marcas nucleares fueron persistentes a lo largo de todos los experimentos en todos los estadios, por lo cual nuestros resultados muestran consistencia. La marca nuclear para ambas proteínas es homogénea durante los estadios de epibolia y reagregado, pero muestra una distribución granular durante la diapausa IB y reactivado. Posiblemente producto de un rearrreglo en la cromatina. Los núcleos mostraron áreas mayores durante la diapausa y menores durante el reagregado. La circularidad de los mismos fue mayor durante la diapausa y menor en el reactivado.

## Perspectivas

---

El ajuste del protocolo involucró un determinado tiempo y las dificultades que presenta la manipulación de embriones de peces anuales como se mencionó anteriormente generó que el número final de embriones analizados por estadio fuera muy bajo. Por este motivo, es necesario repetir los experimentos realizados con un mayor número de embriones para respaldar los resultados obtenidos en este trabajo.

Con el fin de distinguir si la marca de cadherinas observada en la CCE corresponde al tipo Cadherina-E, se propone realizar un inmunomarcaje específico para la misma. Además, realizar un número mayor de experimentos permitiría observar el grupo de células de diapausa IB que en este trabajo no se logró detectar. Resulta interesante proponer una investigación cuya hipótesis sea que la marca nuclear observada durante el desarrollo de *A. charrua* corresponde a fragmentos de N- y/o E-Cadherina que surgen como producto del clivaje de proteas. Para analizar la expresión y localización de cadherina N y E en embriones en etapas de desarrollo activo y detenidos en diapausa I es posible: caracterizar el patrón de expresión de cadherina N y E en embriones fijados en estadios de epibolia, diapausa I y reactivación; caracterizar la identidad y el tamaño del fragmento de cadherina nuclear. Además proponemos analizar la dinámica de expresión *in vivo* de Cadherina N y E en embriones mediante utilización de construcciones fluorescentes con el fin de observar la dinámica del rearreglo de la cromatina.

De acuerdo con los resultados obtenidos, consideramos de gran importancia realizar pruebas para determinar la especificidad del anticuerpo anti tubulina acetilada ya que la marca fue consistente durante todos los experimentos. Es relevante determinar que efectivamente el anticuerpo reconozca esta forma de la proteína.

## Bibliografía

---

- Adachi, T., Sato, C., Kishi, Y., Totani, K., Murata, T., Usui, T., & Kitajima, K. (2009). Membrane microdomains from early gastrula embryos of medaka, *Oryzias latipes*, are a platform of E-cadherin- and carbohydrate-mediated cell-cell interactions during epiboly. *Glycoconjugate Journal*, 26(3), 285–299. <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9184-y>
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, & P. Walter. 2002. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York. 1616 pp.
- 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 viarius*. *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. *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*, 75.
- 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. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24580>
- Butler, J. T., Hall, L. L., Smith, K. P., & Lawrence, J. B. (2009). Changing nuclear landscape and unique PML structures during early epigenetic transitions of human embryonic stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(4), 609–621. <https://doi.org/10.1002/jcb.22183>
- Carter, C. A., & Wourms, J. P. (1991). Cell behavior during early development in the South American annual fishes of the genus *Cynolebias*. *Journal of Morphology*, 210(3), 247–266. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052100305>
- 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.
- Franco, S. J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R., & Huttenlocher, A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nature cell biology*, 6(10), 977-983.
- Geiger, B., Volberg, T., Ginsberg, D., Bitzur, S., & Sabanay, I. (1990). Broad spectrum pan-cadherin antibodies, reactive with the C-terminal 24 amino acid residues of N-cadherin. *Journal of Cell Science*, 97(4), 607–614.
- Gilbert, S. F. y Barresi, M. F.J. (2019). *Developmental Biology*. 12ª edición, Sunderland, MA.

Hand, S. C., Denlinger, D. L., Podrabsky, J. E., & Roy, R. (2016). Mechanisms of animal diapause: recent developments from nematodes, crustaceans, insects, and fish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(11), R1193-R1211.

Hickner, P. V., Mori, A., Zeng, E., Tan, J. C., & Severson, D. W. (2015). Whole transcriptome responses among females of the filariasis and arbovirus vector mosquito *Culex pipiens* implicate TGF- $\beta$  signaling and chromatin modification as key drivers of diapause induction. *Functional and Integrative Genomics*, 15(4), 439–447. <https://doi.org/10.1007/s10142-015-0432-5>

Howes, S. C., Alushin, G. M., Shida, T., Nachury, M. V., & Nogales, E. (2014). Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Molecular Biology of the Cell*, 25(2), 257–266. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-07-0387>

Hu, C. K., Wang, W., Brind'Amour, J., Singh, P. P., Adam Reeves, G., Lorincz, M. C., Alvarado, A. S., & Brunet, A. (2020). Vertebrate diapause preserves organisms long term through Polycomb complex members. *Science*, 367(6480), 870–874. <https://doi.org/10.1126/science.aaw2601>

Kim, M., Robich, R. M., Rinehart, J. P., & Denlinger, D. L. (2006). Upregulation of two actin genes and redistribution of actin during diapause and cold stress in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. *Journal of Insect Physiology*, 52(11–12), 1226–1233. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.09.007>

Klymenko, V. V., & Liang, H. (2012). Chromatin in diapause of the silkworm *Bombyx mori* L.: Thermal parthenogenesis and normal development. *Cell and Tissue Biology*, 6(3), 280–292. <https://doi.org/10.1134/S1990519X12030054>

Kunwar, P. S., Siekhaus, D. E., & Lehmann, R. (2006). In vivo migration: A germ cell perspective. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 237–265. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.103337>

Kurosaka, S., & Kashina, A. (2008). Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 84(2), 102–122. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20125>

Loureiro, M., Borthagaray, A., Hernández, D., Duarte, A., Pinelli, V., & Arim, M. (2015). *Austrolebias* in space: scaling from ponds to biogeographical regions. *Annual fishes: Life history strategy, diversity, and evolution*, 111-132.

Machado, B. E., & Podrabsky, J. E. (2007). Salinity tolerance in diapausing embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* is supported by exceptionally low water and ion permeability. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 177(7), 809–820. <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0177-0>

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

Müsch, A. (2004). Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2003.00149.x>

Myers, G. S. (1952). Annual fishes. *Aquarium J*, 23(7), 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. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.015>

Nogales, E. (2001). Structural insights into microtubule function. In Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure (Vol. 30, Issue 1, pp. 397–420). <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.397>

Nogales, Eva. (2000). Structural Insights Into Microtubule Function. Review Literature And Arts Of The Americas, 277–302.

Papa, N. G., Clivio, G. A., & Montagne, J. (2015). Husbandry, reproduction, and embryo culture of annual fishes under laboratory conditions. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution, 99.

Pereiro, L., Loosli, F., Fernández, J., Härtel, S., Wittbrodt, J., & Concha, M. L. (2017). Gastrulation in an annual killifish: Molecular and cellular events during germ layer formation in *Austrolebias*. Developmental Dynamics, 246(11), 812–826. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24496>

Peters, N. (1963). Embryonale Anpassungen oviparer Zahnkarpfen aus periodisch austrocknenden Gewässern. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie, 48(2), 257-313.

Podrabsky, J. E., & Hand, S. C. (1999). The bioenergetics of embryonic diapause in an annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. Journal of Experimental Biology, 202(19), 2567-2580.

Podrabsky, J.E., Lopez, J.P., Fan, T.W., Higashi, R. y Somero, G.N. (2007). Extreme anoxia tolerance in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: insights from a metabolomics analysis. Journal of Experimental Biology, 210(13): 2253-2266

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

Podrabsky, J. E., & Hand, S. C. (2015). Physiological strategies during animal diapause: Lessons from brine shrimp and annual killifish. Journal of Experimental Biology, 218(12), 1897–1906. <https://doi.org/10.1242/jeb.116194>

Podrabsky, J., Riggs, C., & Wagner, J. (2016). Tolerance of environmental stress. Annual fishes. Life history strategy, diversity, and evolution, 159-184.

Polevoda, B., & Sherman, F. (2002). The diversity of acetylated proteins. Genome Biology, 3(5), 1–6. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-5-reviews0006>

Portran, D., Schaedel, L., Xu, Z., Théry, M., & Nachury, M. V. (2017). Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. Nature Cell Biology, 19(4), 391–398. <https://doi.org/10.1038/ncb3481>

Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P. E., & Zolessi, F. R. (2014). A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. Histochemistry and cell biology, 142(3), 335-345.

Qiu, Z., Tsoi, S. C. M., & MacRae, T. H. (2007). Gene expression in diapause-destined embryos of the crustacean, *Artemia franciscana*. Mechanisms of Development, 124(11–12), 856–867. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.09.001>

Reig, G., Cerda, M., Sepúlveda, N., Flores, D., Castañeda, V., Tada, M., Härtel, S., & Concha, M. L. (2017). Extra-embryonic tissue spreading directs early embryo morphogenesis in killifish. *Nature Communications*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms15431>

Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., De Strooper, B., Hartmann, D., & Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and  $\beta$ -catenin nuclear signalling. *EMBO Journal*, 24(4), 742–752. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600548>

Renfree, M. B., & Fenelon, J. C. (2017). The enigma of embryonic diapause. *Development (Cambridge)*, 144(18), 3199–3210. <https://doi.org/10.1242/dev.148213>

Reynolds, J. A. (2017). Epigenetic Influences on Diapause. In *Advances in Insect Physiology* (1st ed., Vol. 53). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.aip.2017.03.003>

Reynolds, J. A., Nachman, R. J., & Denlinger, D. L. (2019). Distinct microRNA and mRNA responses elicited by ecdysone, diapause hormone and a diapause hormone analog at diapause termination in pupae of the corn earworm, *Helicoverpa zea*. *General and Comparative Endocrinology*, 278, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.09.013>

Romney, A. L., & Podrabsky, J. E. (2017). Transcriptomic analysis of maternally provisioned cues for phenotypic plasticity in the annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *EvoDevo*, 8(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13227-017-0069-7>

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Salazar-Ciudad, I., Jernvall, J., & Newman, S. A. (2003). Mechanisms of pattern formation in development and evolution. In *Development* (Vol. 130, Issue 10, pp. 2027–2037). <https://doi.org/10.1242/dev.00425>

Salbreux, G., Charras, G., & Paluch, E. (2012). Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends in Cell Biology*, 22(10), 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.001>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Seetharaman, S., & Etienne-Manneville, S. (2020). Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends in Cell Biology*, 30(9), 720–735. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.004>

Shimizu, T., Yabe, T., Muraoka, O., Yonemura, S., Aramaki, S., Hatta, K., Bae, Y. K., Nojima, H., & Hibi, M. (2005). E-cadherin is required for gastrulation cell movements in zebrafish. *Mechanisms of Development*, 122(6), 747–763. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.03.008>

Shorthouse, D. P. (2010). SimpleMapp, an online tool to produce publication-quality point maps.

Shoval, I., Ludwig, A., & Kalcheim, C. (2007). Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination. *Development*, 134(3), 491–501. <https://doi.org/10.1242/dev.02742>

Solnica-Krezel, L., & Sepich, D. S. (2012). Gastrulation: Making and shaping germ layers. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(June), 687–717. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154043>

Stewart, M. P., Helenius, J., Toyoda, Y., Ramanathan, S. P., Muller, D. J., & Hyman, A. A. (2011). Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature*, 469(7329), 226–231. <https://doi.org/10.1038/nature09642>

Theveneau, E., & Mayor, R. (2012). Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5), 677–684. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.08.002>

Topczewski, J., & Solnica-Krezel, L. (2009). Cytoskeletal dynamics of the zebrafish embryo. *Essential Zebrafish Methods: Cell and Developmental Biology*, 133.

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. <https://doi.org/10.1002/jez.1402650308>

Uemura, K., Kihara, T., Kuzuya, A., Okawa, K., Nishimoto, T., Ninomiya, H., Sugimoto, H., Kinoshita, A., & Shimohama, S. (2006). Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1. *Neuroscience Letters*, 402(3), 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.04.018>

Van Haarlem, R. (1983). Early ontogeny of the annual fish genus *Nothobranchius*: cleavage plane orientation and epiboly. *Journal of morphology*, 176(1), 31-42.

Van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(23), 3756–3788. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>

Vaz-Ferreira, R. A. U. L., Sierra, B., & Scaglia, S. (1964). Eco-etología de la reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. Apartados de los Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo, 26, 44-49.

Wagner, J. T., & Podrabsky, J. E. (2015). Gene expression patterns that support novel developmental stress buffering in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *EvoDevo*, 6(1), 2.

Wang, G., He, J., Zhao, J., Yun, W., Xie, C., Taub, J. W., Azmi, A., Mohammad, R. M., Dong, Y., Kong, W., Guo, Y., & Ge, Y. (2012). Class I and Class II Histone Deacetylases Are Potential Therapeutic Targets for Treating Pancreatic Cancer. *PLoS ONE*, 7(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052095>

Wourms, J. P. (1964). Comparative observations on the early embryology of *Nothobranchius taeniopygus* (Hilgendorf) and *Aplocheilichthys pumilis* (Boulenger) with special reference to the problem of naturally occurring embryonic diapause in teleost fishes. *Annual Report E Afr Freshwat Fish Res Organ Appendix H*, 84, 68-73.

Wourms, J. P. (1972 a). Developmental biology of annual fishes. I. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi* Dahl. *Journal of Experimental Zoology*, 182(2), 143-167.

Wourms, J. P. (1972 b). Developmental biology of annual fishes. II. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi* Dahl. *Journal of Experimental Zoology*, 182(2), 143-167.

Wourms, J. P. (1972 c). The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 182(3), 389-414.

Yamamoto T. (1967). Medaka. En: Wilt FH, Wessels N, editors. *Methods in developmental biology*. New York: Thomas and Crowell Company. p 101–111.

Yeh, I. T., & Ludueña, R. F. (2004). The  $\beta$ II Isotype of Tubulin Is Present in the Cell Nuclei of a Variety of Cancers. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 57(2), 96–106. <https://doi.org/10.1002/cm.10157>

Yin, C. M., & Chippendale, G. M. (1979). Ultrastructural characteristics of insect corpora allata in relation to larval diapause. *Cell and Tissue Research*, 197(3), 453–461. <https://doi.org/10.1007/BF00233570>

Yu, W., Yang, L., Li, T., & Zhang, Y. (2019). Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Frontiers in Oncology*, 9(October). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00989>