



**Universidad de Chile**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

# **“Estudio de la participación de Cadherina 6 durante la morfogénesis asimétrica del órgano parapineal en pez cebra”**

Memoria para optar al título profesional de  
Bioquímica

**Mercedes Stella Araya Day**

**Directores**

**Dr. Miguel Concha**

Laboratorio de Estudios Ontogénicos  
Biomedical Neuroscience Institute  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

**Dr. Carmen Gloria Lemus**

Laboratorio de Estudios Ontogénicos  
Biomedical Neuroscience Institute  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

**Patrocinante**

**Dr. Alfonso Paredes**

Dpto Bioquímica y Biología molecular  
Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Diciembre, 2023**

*“Impulso, impulso e impulso;  
siempre el creador impulso del mundo.  
(...)  
Siempre una fusión de identidad,  
siempre una distinción  
siempre engendrando la vida.”*

- Walt Whitman

## Agradecimientos

*A mi mamá por acompañarme en los momentos  
más difíciles, y entregarme esperanza y fuerza.*

*A mi papá por enseñarme a ver el mundo con ojos  
curiosos y sobre el poder de la perseverancia.*

*A Mario por entregarme su amor, compañía y  
fortaleza, siendo mi más grande amigo.*

*Gracias a LEO por acogerme durante este proceso  
y ser clave para mi aprendizaje profesional,  
especialmente a Yoya por guiarme estrechamente.*

*Gracias a mis herman@s y amig@s por ser fuente de  
felicidad, cariño e infinitas conversaciones que  
me enseñan sobre la magnitud de la vida.*

Contribuyeron al financiamiento de esta tesis los siguientes proyectos de la Agencia Nacional de Investigación (ANID): FONDECYT 1230919, PIA ACT192015, ACE 210007, NCN19\_170, FONDEQUIP EQM130051 and EQM210020, FONDAP 15150012 y REDÉS170212.

## 1. Índice

|   |      |
|---|------|
| 2. Índice.....  | iv   |
| 3. Índice de figuras.....   | vi   |
| 4. Lista de Abreviaciones.....  | viii |
| 5. Resumen.....   | 1    |
| 6. Abstract.....  | 3    |
| 7. Introducción.....  | 5    |
| 8. Hipótesis y objetivos.....   | 11   |
| 9. Metodología.....   | 12   |
| 8.1 Líneas genéticas y experimentos de pérdida de función génica en pez cebra.....  | 12   |
| 8.2 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....   | 13   |
| 8.3 Inmunofluorescencia indirecta y tinciones fluorescentes.....  | 14   |
| 8.4 Síntesis de sonda de <i>cdh6</i> para hibridación <i>in situ</i> fluorescente.....  | 15   |
| 8.5 Microscopia Confocal.....   | 16   |
| 8.6 Análisis de imágenes y datos.....   | 16   |
| 8.7 Análisis estadísticos.....  | 17   |
| 10. Resultados.....   | 19   |
| 9.1 Resultados Objetivo 1.....  | 19   |
| 9.1.1 Durante el inicio de la morfogénesis asimétrica del OPp, el territorio de las células precursoras derechas aumenta de tamaño, mientras el territorio de las células izquierdas se reduce..... | 20   |
| 9.1.2 Existe mayor expresión de cadherina 6 en las cp-OPp del lado derecho que en lado izquierdo durante la morfogénesis asimétrica del OPp.....  | 22   |
| 9.2 Resultados Objetivo 2.....  | 25   |
| 9.2.1 La disminución de la función de Cdh6, mediada por la inyección de morfolino, altera la asimetría del OPp.....   | 27   |

|  |    |
|--|----|
| 9.2.2 En ausencia de la vía de señalización Nodal en el epítalamo, cadherina 6 se expresa durante todos los estadios analizados de manera más simétrica.....                                   | 30 |
| 9.2.3 En presencia bilateral de Nodal en el epítalamo, cadherina 6 se expresa sólo en los estadios iniciales estudiados.....   | 34 |
| 9.3 Resultados Objetivo 3.....   | 37 |
| 9.3.1 La inyección de MoCdh6 genera un fenotipo caracterizado por un menor tamaño del ojo y cabeza y un tubo vitelínico más delgado y una organización alterada de los ganglios craneales..... | 38 |
| 9.3.2 La disminución de la función de Cdh6, mediada por la inyección de morfolino, altera la asimetría del OPp.....  | 40 |
| 11. Discusión.....   | 45 |
| 12. Conclusión.....  | 51 |
| 13. Proyecciones.....  | 52 |
| 14. Bibliografía.....  | 53 |
| 15. Figuras suplementarias.....  | 56 |

## 2. Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Asimetrías epitalámicas en pez cebra.....  | 5  |
| Figura 2. La morfogénesis del órgano parapineal tiene un origen bilateral, y muestra comportamientos celulares asimétricos.....  | 7  |
| Figura 3. Activación de la vía de señalización Nodal en el epitálamo izquierdo de pez cebra .....  | 8  |
| Figura 4. Antecedentes del laboratorio apuntan a Cadherina 6 como un candidato efector de la vía de señalización Nodal en el epitálamo de pez cebra .....                      | 10 |
| Figura 5. Captura de imágenes del complejo pineal en tres dimensiones utilizando microscopia fluorescente confocal.....  | 15 |
| Figura 6. Expresión de ARNm de <i>cdh6</i> en las cp-OPp durante el inicio de su morfogénesis asimétrica.....  | 20 |
| Figura 7. Análisis del tamaño del territorio que ocupan las células precursoras del órgano parapineal en el tiempo, comparando entre el territorio derecho y el izquierdo..... | 21 |
| Figura 8. Análisis cuantitativo del patrón de expresión espacio-temporal de <i>cdh6</i> en el territorio derecho e izquierdo de las cp-OPp.....                                | 24 |
| Figura 9. Expresión de ARNm de <i>cdh6</i> en las cp-OPp entre las 24 y las 32 hpf en ausencia de la vía de señalización Nodal en el epitálamo.....                            | 25 |
| Figura 10. Expresión de ARNm de <i>cdh6</i> en las cp-OPp desde las 24 hasta las 32 hpf en presencia bilateral de Nodal en el epitálamo.....                                   | 26 |
| Figura 11. Análisis del tamaño del territorio total, derecho e izquierdo que abarcan las cp-OPp, en embriones inyectados con MoSpaw o con MoNtl.....                           | 28 |
| Figura 12. Expresión de <i>cdh6</i> en el territorio de las cp-OPp derecho e izquierdo en embriones sin expresión de Nodal en el epitálamo.....                                | 32 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 13. Índice de asimetría para la concentración de señal de <i>cdh6</i> en embriones sin expresión de Nodal en el epitálamo.....                     | 33 |
| Figura 14. Expresión de <i>cdh6</i> en el territorio derecho e izquierdo de las cp-OPp en embriones con expresión bilateral de Nodal en el epitálamo..... | 35 |
| Figura 15. Índice de asimetría para la concentración de señal de <i>cdh6</i> en embriones con expresión bilateral de Nodal en el epitálamo.....           | 36 |
| Figura 16. Caracterización del fenotipo de embriones inyectados con morfolino contra <i>cdh6</i> a las 24 y 48 hpf.....                                   | 38 |
| Figura 17. Ganglios craneales en embriones con función de Cdh6 disminuida por inyección de morfolino.....   | 39 |
| Figura 18. Esquema de toma de imágenes para el panel de la figura 19.....   | 41 |
| Figura 19. Morfogénesis asimétrica del OPp a las 32hpf en embriones morfantes para Cadherina 6.....   | 42 |

### 3. Lista de Abreviaciones

3D, tridimensional

ANOVA, analysis of variance

AP, alkaline phosphatase

*cdh6*, *cadherina 6*

cp-OPp, células precursoras del órgano parapineal

D, derecha

DIG, digoxigenina

FISH, hibridación *in situ* fluorescente

GFP, green fluorescent protein

Hb, habénula

hpf, horas post fertilización

I, izquierda

IA, índice de asimetría

Ig, inmunoglobulina

IFI, inmunofluorescencia indirecta

KW, prueba de Kruskal-Wallis



Mo-, morfolino

*ntl, no tail*

OPp, órgano parapineal

OP, órgano pineal

PFA, paraformaldehído *spaw, southpaw, proteína relacionada a nodal3 (ndr3)*

#### 4. Resumen

En esta tesis, nos adentramos en los mecanismos celulares y moleculares que subyacen al desarrollo de las asimetrías cerebrales en vertebrados, usando al pez teleosteo cebra (*Danio rerio*) como modelo de estudio. En particular, estudiamos la morfogénesis temprana del órgano parapineal, el primer evento morfológico de asimetría que desencadena una serie de eventos de diferenciación y morfogénesis que establecen un circuito neuronal asimétrico centrado en las neuronas epitalámicas, la región más dorsal del diencéfalo de este animal. Trabajos previos han demostrado que la activación asimétrica de la vía de Señalización Nodal en el epítalamo izquierdo antecede a los eventos de morfogénesis del órgano parapineal y que esto se asocia a comportamientos celulares diferenciales entre las células precursoras parapineales derechas e izquierdas. En este contexto, planteamos la participación de la proteína de adhesión dependiente de calcio Cadherina 6 (Cdh6) como un posible efector río abajo de la vía Nodal en la morfogénesis asimétrica del órgano parapineal, facilitando la compactación de las células precursoras izquierdas y la migración de las células precursoras derechas hacia el lado izquierdo. Para ello utilizamos hibridación *in situ* fluorescente y análisis de imágenes para detectar en forma cuantitativa la expresión *in toto* de *cdh6* durante el desarrollo y, en conjunto con la inyección de oligonucleótidos morfolino antisentido, para investigar la expresión de *cdh6* en condiciones de ausencia y expresión bilateral de Nodal epitalámico. Además, utilizamos la inyección de morfolinós para inducir la pérdida de función de Cdh6 e investigar su efecto en la morfogénesis parapineal. Nuestros resultados demostraron que *cdh6* se expresa en las células precursoras parapineales, siendo en condiciones silvestres mayor en el territorio derecho. Observamos que en ausencia de Nodal epitalámico la expresión de *cdh6* se simetriza, y que en presencia de Nodal epitalámico bilateralmente simétrico, la expresión de *cdh6* se apaga desde las 28 horas post fertilización. Estos resultados indican que la Vía Nodal es necesaria para generar asimetrías en la expresión de *cdh6* en el epítalamo de pez cebra, y sugieren que esto sería mediado por una inhibición o represión de la expresión de *cdh6* en el territorio izquierdo. La pérdida de función de Cdh6 durante el desarrollo resulta en una simetrización de la posición

del órgano parapineal y alteraciones en la organización celular sugerentes de un requerimiento de Cdh6 para mediar los comportamientos asimétricos de los precursores parapineales derechos. En resumen, nuestros hallazgos respaldan la hipótesis de que Cdh6 desempeña un papel fundamental en la morfogénesis asimétrica del órgano parapineal, y sugieren que Cdh6 participaría en la modulación de la migración de las células precursoras derechas hacia la izquierda. Los resultados de esta tesis proporcionan una nueva perspectiva sobre los mecanismos que dan origen a las asimetrías cerebrales en vertebrados.

Palabras Clave:

Cadherina 6, Órgano Parapineal, Morfogénesis Asimétrica, Vía de Señalización Nodal, Pez Cebra.

## 5. Abstract

### **Role of cadherin 6 during asymmetric morphogenesis of the parapineal organ in zebrafish.**

In this thesis, we delve into the cellular and molecular mechanisms underlying the development of brain asymmetries in vertebrates using zebrafish (*Danio rerio*) as a study model. We investigate the early morphogenesis of the parapineal organ, the initial asymmetric morphological event triggering a series of differentiation and morphogenesis events that establish an asymmetric neural circuit centered on the epithalamic neurons, the most dorsal region of this animal's diencephalon. Previous studies have demonstrated that the asymmetric activation of the Nodal Signaling pathway in the left epithalamus precedes the morphogenesis events of the parapineal organ and is associated with differential cellular behaviors between right and left parapineal precursor cells. In this context, we propose the participation of the calcium-dependent adhesion protein Cadherin 6 (Cdh6) as a potential downstream effector of the Nodal pathway in the asymmetric morphogenesis of the parapineal organ, promoting the compaction of left precursor cells and the migration of right precursor cells to the left side. To address this, we employed fluorescent *in situ* hybridization and image analysis to quantitatively detect the *in toto* expression of *cdh6* during development. Additionally, through the injection of antisense morpholino oligonucleotides, we investigated the expression of *cdh6* under conditions of absent and bilaterally symmetric epithalamic Nodal expression. Furthermore, we used morpholino injection to induce the loss of Cdh6 function and explore its effect on parapineal morphogenesis. Our results demonstrated that *cdh6* is expressed in parapineal precursor cells, with wild-type conditions showing higher expression in the right territory. We observed that in the absence of epithalamic Nodal, *cdh6* expression becomes symmetrical, and in the presence of bilaterally epithalamic Nodal, *cdh6* expression is extinguished from 28 hours post-fertilization. These findings indicate that the Nodal pathway is necessary to generate asymmetries in *cdh6* expression in the zebrafish epithalamus, suggesting that this occurs through inhibition or repression of *cdh6* expression in the left territory. Loss

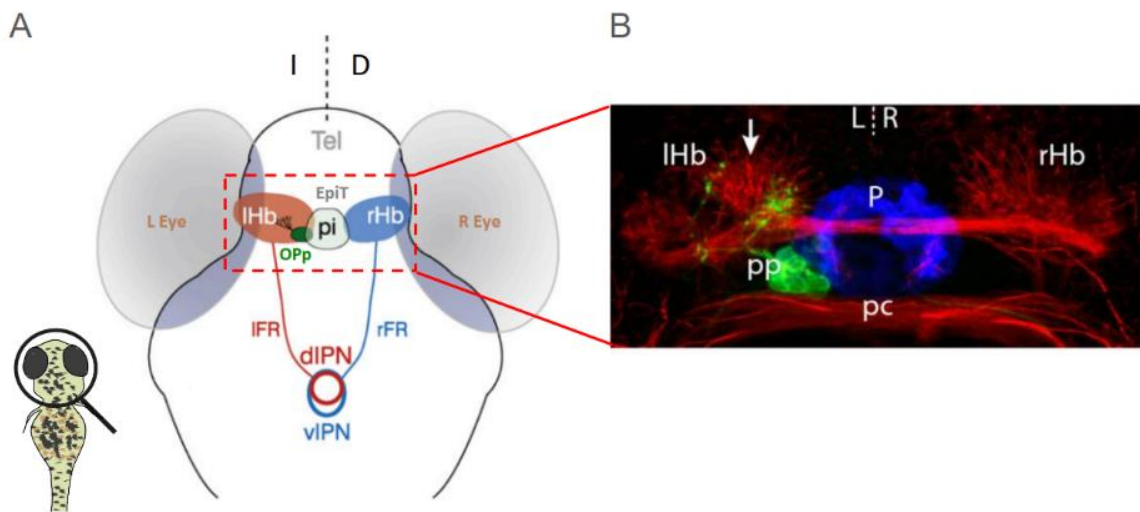
of Cdh6 function during development results in a symmetrization of the parapineal organ position and alterations in cellular organization, suggestive of a requirement for Cdh6 in mediating the asymmetric behaviors of right parapineal precursors. In summary, our findings support the hypothesis that Cdh6 plays a fundamental role in the asymmetric morphogenesis of the parapineal organ, suggesting that Cdh6 is involved in modulating the migration of right precursor cells to the left. The results of this thesis provide a new perspective on the mechanisms underlying brain asymmetries in vertebrates.

Keywords:

Cadherin 6, Parapineal Organ, Asymmetric Morphogenesis, Nodal Signaling Pathway, Zebrafish.

## 6. Introducción

El estudio de la asimetría del sistema nervioso ha dejado en evidencia que parte de ella se establece durante el desarrollo embrionario, como consecuencia de factores genéticos y ambientales [1]. Sin embargo, los mecanismos morfogenéticos operantes, así como las implicaciones conductuales y evolutivas de las asimetrías, son sólo parcialmente conocidos. Una región de cerebro de vertebrados en que han sido ampliamente descritas las asimetrías es el epitálamo. El epitálamo, de ubicación dorsal en el diencefalo, está compuesto estructuralmente por dos núcleos habenuares (o habénulas), izquierda (I) y derecha (D); y por el complejo pineal, constituido por el órgano pineal (OP) y el órgano parapineal (OPp) (figura 1).



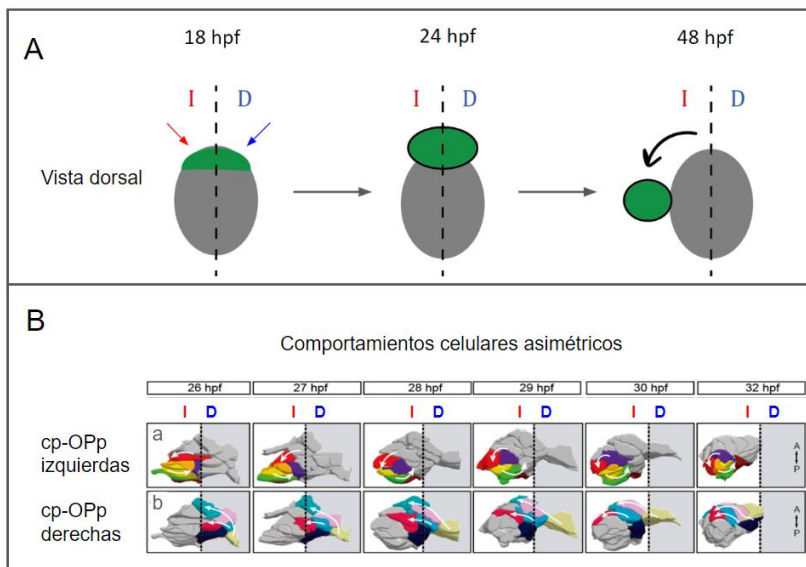
**Figura 1. Asimetrías epitalámicas en pez cebra.** (A) Esquema del epitálamo de pez cebra a las 72 hpf. Vista dorsal. Órgano pineal (pi) ubicado sobre la línea media. Órgano parapineal (OPp) a la izquierda del epitálamo, proyectando sus axones hacia la habénula subyacente. Habénula izquierda en rojo (IHb) proyectando hacia el núcleo interpeduncular (IPN) de manera dorsal y ventral. Habénula derecha en azul (rHb) proyectando hacia el IPN de manera ventral. Esquema extraído de Concha *et al.* [4]. (B) Imagen del epitálamo. Inmunohistoquímica contra tubulina acetilada (rojo) muestra una mayor densidad de neuropila en la habénula izquierda (flecha). Embrión transgénico Tg(*FoxD3:GFP*), marcando fluorescentemente la pineal (en azul) y la parapineal (verde). Imagen de Bianco *et al.* [5].

Pez cebra (*Danio rerio*) es el modelo animal más utilizado para el estudio de las asimetrías epitalámicas. Esta especie destaca por la facilidad para un acercamiento desde los genes al comportamiento (*bottom up*) [2]. Esto, gracias a que (i) presenta asimetrías epitalámicas conspicuas establecidas durante el desarrollo; (ii) la transparencia de los embriones permite visualizar *in vivo* la morfogénesis asimétrica del epitalamo; (iii) está secuenciado su genoma y ofrece ventajas para la manipulación genética, permitiendo explorar el rol de los genes en el proceso de asimetría/lateralidad; y (iv) facilita la realización de aproximaciones experimentales que vinculan fisiología y comportamiento con el nivel más estructural de la asimetría.

Las principales asimetrías epitalámicas en pez cebra son la ubicación al lado izquierdo del OPp, lo cual da paso al desarrollo de diferencias que presenta la habénula izquierda con respecto a la derecha. Entre estas últimas destacan diferencias en el tamaño y organización de la neuropila, la expresión de marcadores moleculares, y la conectividad dorsal-ventral (D-V) de las proyecciones eferentes I-D en el núcleo interpeduncular (IPN) [3, 4] (figura 1). Ambas asimetrías, del OPp y la habénular, además de estar relacionadas entre sí, se relacionan con la expresión asimétrica de la vía de señalización comandada por el factor transformante  $\beta$  Nodal. Ésta, se expresa de manera exclusiva al lado izquierdo, determinando que el OPp se ubique a este lado y, consecuentemente, el desarrollo de las características propias de la habénula izquierda [6].

El OPp tiene un origen bilateral a partir del complejo pineal [6] (figura 2A). Las células precursoras del OPp (cp-OPp), que se encuentran ubicadas en el tercio

anterior del complejo pineal a las 24 horas post fertilización (hpf), se reorganizan y forman un núcleo independiente que a las 38 hpf se localiza en el lado izquierdo [6, 7]. Durante el proceso de morfogénesis asimétrica (26 - 32 hpf), las cp-OPp se evaginán desde el techo del diencéfalo con una ligera inclinación hacia la izquierda (24-28 hpf). Esto se acompaña de comportamientos celulares diferenciales I-D, con una compactación de las células del lado izquierdo y el movimiento de las células del lado derecho hacia la izquierda por sobre la línea media. En su conjunto, estos comportamientos conducen a la formación de una estructura supra-celular tipo roseta en el lado izquierdo (32 hpf), que dará paso a la formación de un OPp separado del OP (38 hpf) (figura 2B) [8].



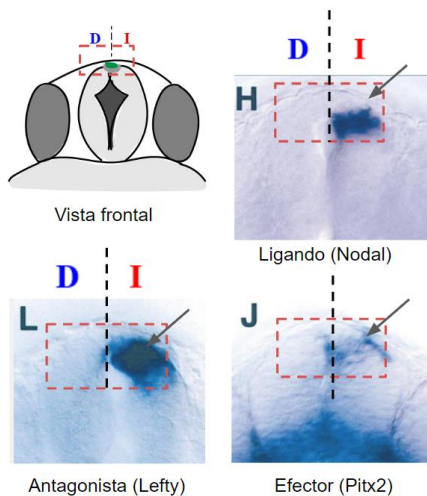
**Figura 2. La morfogénesis del órgano parapineal tiene un origen bilateral, y muestra comportamientos celulares asimétricos.**

(A) Esquema del complejo pineal a las 18, 24 y 48 hpf. En verde las cp-OPp, ubicadas en el tercio anterior del complejo pineal (18 hpf). A las 24 hpf el neuroepitelio comienza a evaginarse

para formar un primordio único que migrará al lado izquierdo del epitálamo (48 hpf). El órgano pineal en gris. (B) En embriones con expresión asimétrica de Nodal, se observan comportamientos celulares asimétricos. Las cp-OPp izquierdas (a) se compactan y reordenan mientras que las derechas (b) migran por sobre la línea media envolviendo a las izquierdas. A las 32 hpf se observa una estructura supra-celular tipo roseta al lado izquierdo del epitálamo anterior. Vista dorsal. I: izquierda. D: derecha. Línea media: línea segmentada negra.



El ligando Nodal ha sido descrito por cumplir múltiples funciones durante el desarrollo embrionario de varias especies, actuando como un morfógeno durante la determinación de los ejes del cuerpo e influyendo el patrón I-D de los órganos internos [9]. En pez cebra existen tres parálogos del gen Nodal que corresponden a *cyclops* (*cyc*), *squint* (*sqt*) y *southpaw* (*spaw*) [10]. A partir de las 18 hpf, en el epítalamo izquierdo se puede observar la expresión de *cyc*, junto al inhibidor y efector de la vía de señalización *lefty* y *pitx2*, respectivamente [7, 11] (figura 3).



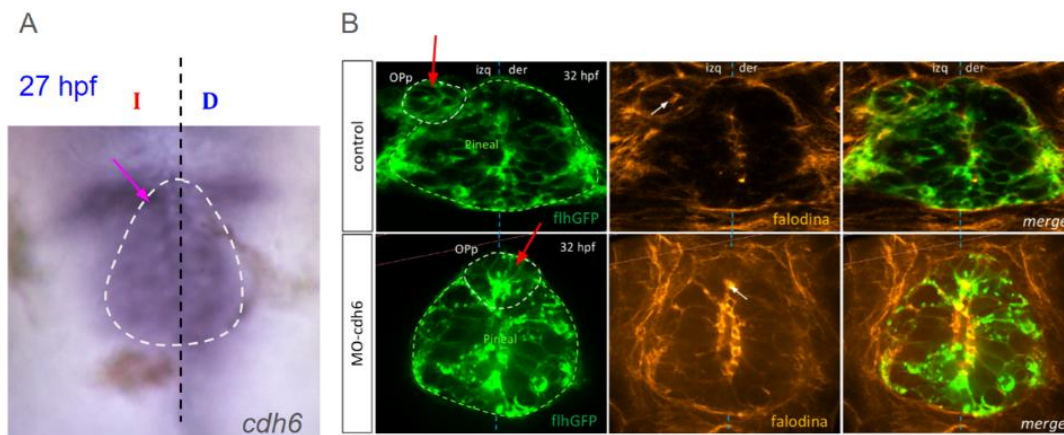
**Figura 3. Activación de la vía de señalización Nodal en el epítalamo izquierdo de pez cebra.** (A) Imágenes en vista frontal del tubo neural a la altura de las cp-OPp. Se observa la marca cromogénica de la hibridación *in situ* convencional (flecha) para distintos componentes de la vía Nodal (ligando, antagonista y efector) a las 22 hpf. Imágenes de Concha *et al.* [7]. I: izquierda. D: derecha. Línea media: línea segmentada negra. En cuadro segmentado rojo la región más dorsal del tubo neural, correspondiente al epítalamo.

Estos componentes se expresan en el epítalamo izquierdo en el 95% de la población, mediando el proceso de morfogénesis asimétrica de OPp hacia esa dirección [7]. Por otro lado, en el 5% de los individuos donde Nodal se expresa a la derecha, el OPp se ubica a este lado, invirtiendo también la lateralidad de la asimetría habenular. Tanto la pérdida de expresión de Nodal en el epítalamo, utilizando morfolino antisentido contra *southpaw* (MoSpaw), como la presencia de Nodal bilateralmente simétrica en el epítalamo, utilizando morfolino contra *no tail* (MoNtl), generan la randomización de la lateralidad de OPp, ubicándose en un 50% de los casos hacia la izquierda y en el otro 50% hacia la derecha [7]. Más allá del efecto final, el fenotipo generado por el

MoSpaw produce que las cp-OPp formen una evaginación simétrica (sin la inclinación hacia la izquierda observada en la condición silvestre) que da paso a una estructura tipo roseta simétrica, formando, a las 38 hpf, un OPp simétrico. Por otro lado, el fenotipo generado por MoNtl también produce un OPp que se ubica en la línea media a las 32 hpf. Sin embargo, su organización celular es menos simétrica comparado al OPp del MoSpaw [8]. En conclusión, en ambos casos se pierde la lateralidad y asimetría inicial otorgada por la vía de señalización Nodal, quedando aún por ser dilucidado(s) el(los) mecanismo(s) celular(es) por el(los) cual(es) ocurre la compactación y migración celular que dan origen a la roseta asimétrica, además de su relación con la vía Nodal.

Un buen candidato para participar en los procesos de morfogénesis asimétrica del OPp son las moléculas de adhesión de la familia de las cadherinas [12]. En particular, cadherina 6 (Cdh6) ha sido descrita en numerosas conductas celulares incluyendo (i) adhesión (su función más conocida), (ii) migración (durante la transición epitelio/mesenquimal), (iii) organización supra-celular (descrito para el desarrollo de neuroepitelios), (iv) contracción celular (al estar asociada a actina), y otras [13, 14]. En pez cebra, Cdh6 se ha asociado al desarrollo de nefrones, retina y ganglios de la línea craneal y lateral [15, 16, 17]. Además, se ha observado que su expresión se encuentra regulada espacio-temporalmente durante el desarrollo del sistema nervioso, incluyendo el epítalamo [18]. En nuestro laboratorio, se ha observado que *cdh6* se expresa en el epítalamo dorsal de embriones de pez cebra, coincidiendo temporalmente con el proceso de morfogénesis asimétrica del OPp y

mostrando un patrón espacial aparentemente asimétrico que podría corresponder al territorio donde se expresa Nodal (figura 4A).



**Figura 4. Antecedentes del laboratorio apuntan a Cadherina 6 como un candidato efector de la vía de señalización Nodal en el epitálamo de pez cebra.** (A) Marca cromogénica de hibridación *in situ* convencional utilizando sonda específica contra *cdh6*. Expresión aparentemente asimétrica en el epitálamo anterior a las 27 hpf, coincidiendo espaciotemporalmente con la morfogénesis temprana del órgano parapineal. Vista dorsal. Línea recta segmentada: línea media. Línea segmentada blanca indicando la posible silueta del complejo pineal. (B) Pérdida de función de Cdh6 utilizando morfolino anti-sentido contra *cdh6*. Se muestra la roseta sobre la línea media a las 32 hpf (flecha roja). El órgano pineal y las células precursoras del OPp en verde gracias al transgén *flh::GFP*. Filamentos de actina en naranja. Flecha blanca indicando acumulación de actina en el centro de la roseta. Vista dorsal. I: izquierda. D: derecha.

Por otro lado, experimentos preliminares de la pérdida de función génica de *cdh6*, utilizando morfolinos antisentido, muestran que a las 32 hpf los embriones tienen un OPp aún en la línea media, apuntando a una importancia crítica de *cdh6* en el proceso de morfogénesis asimétrica del OPp (figura 4B). Sin embargo, el detalle de la ventana temporal y territorio preciso de expresión de *cdh6* con respecto al desarrollo del complejo pineal, su relación con la expresión de la vía de señalización Nodal, y el tipo de conducta celular que se encontraría favoreciendo, aún se desconocen. Considerando los antecedentes, se plantea la siguiente hipótesis y objetivos.

## 7. Hipótesis y objetivos

### Hipótesis:

Cadherina 6 participa de la morfogénesis asimétrica del órgano parapineal en pez cebra, favoreciendo la compactación de las células precursoras izquierdas y la migración por sobre la línea media de las células precursoras derechas hacia el lado izquierdo.

### Objetivo general:

Determinar la participación de Cadherina 6 durante la morfogénesis asimétrica del órgano parapineal en pez cebra.

### Objetivos específicos:

1. Caracterizar la expresión espacial y temporal de *cadherina 6* en el epitálamo dorsal de embriones silvestres de pez cebra, en relación con el territorio de las células precursoras del órgano parapineal.
2. Determinar el patrón de expresión espacio-temporal de *cadherina 6* en el epitálamo de embriones de pez cebra en condiciones donde la vía de señalización de Nodal está ausente o es bilateralmente simétrica.
3. Determinar si Cadherina 6 es necesaria para la morfogénesis asimétrica del órgano parapineal y, en específico, para la compactación de las células precursoras izquierdas y la migración de las células precursoras derechas hacia la izquierda

## 8. Materiales y métodos

### 8.1 Líneas genéticas y experimentos de pérdida de función génica en pez cebra

Para visualizar *in vivo* el desarrollo del OPp, utilizamos la línea transgénica Tg(*flh*::GAP43-eGFP), abreviado como Tg(*flh*::GFP), que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) en la membrana de las células del complejo pineal bajo el promotor del gen *flh* [20].

Para modificar la expresión asimétrica de la vía de señalización Nodal en el epítalamo, utilizamos procedimientos de pérdida de función génica utilizando oligonucleótidos antisentidos del tipo morfolino para *southpaw* (*nodal related 3, ndr3*, [19]) y *no-tail* (*Ntl*, [20]), inyectándolos en estadio de una célula. El morfolino contra *southpaw* (MoSpaw) inhibe la expresión de la vía de señalización Nodal en el epítalamo, mientras que el morfolino contra *No-tail* (MoNtl) genera su expresión bilateral. Para alterar la función de *Cdh6* inyectamos morfolino contra de *cdh6* (MoCdh6) en estadio de una célula, tal como lo describe Liu *et al.* [17]. Para verificar que los morfolinicos estaban haciendo efecto, en cada conjunto de embriones con los que se trabajó, se dejó un grupo de embriones para observar el fenotipo esperado a las 24 y/o 48 hpf. Para los embriones inyectados con MoSpaw, se cuantificó la dirección de la asimetría del corazón a nivel poblacional [21]. Para los embriones inyectados con MoNtl, se verificó la presencia de una cabeza normal y sana, somitas anormales y una prominente reducción del largo de la cola [22]. Para los embriones MoCdh6, se verificó la presencia de un tubo vitelínico delgado y cabeza y ojos

pequeños [17]. Embriones de la misma camada sin inyectar se utilizaron como controles.

Todos los embriones se mantuvieron a 28,5°C en medio E3 con ciclos de luz y oscuridad de 12 y 12 horas, siguiendo protocolos estándares. Realizamos la clasificación por morfología y edad (horas post fertilización, hpf) [23].

## **8.2 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)**

Se fijaron embriones de una misma camada a las 24, 26, 28, 30 y 32 hpf con PFA 4%. Luego, se realizó FISH en embriones completos (*in toto*) [24]. Para esto, lavamos y deshidratamos los embriones en concentraciones crecientes de metanol, para almacenarlos a -20°C durante la noche. El segundo día, los rehidratamos, lavamos y permeabilizamos con proteinasa K. Luego de esto, se volvieron a fijar en PFA 4% por 20 min y a lavar. Finalmente, se preincubaron los por 2 horas a 65°C en medio de hibridación hyb+ con sulfato dextrano e incubaron, durante toda la noche a 65°C, con una sonda específica contra *cdh6* y marcada con digoxigenina (DIG). Al tercer día, lavamos los embriones y bloqueamos por dos horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, incubamos los embriones en una nueva solución de bloqueo con un anticuerpo anti-DIG-AP (1:5000) (AP, del inglés *alkaline phosphatase*), manteniéndolos a 4°C durante la noche. El cuarto día, lavamos los embriones y los pasamos a placas de revelado. Allí se preincubaron en SB8.2 y posteriormente con el medio de revelado (Fast Blue 0,25 mg/mL Naftol 0,25 mg/mL), el que permite detectar la sonda a través del anticuerpo con actividad enzimática. Renovamos el medio hasta observar el proceso de cromogénico en los embriones de distintos estadios. Detuvimos el proceso en todos los embriones al mismo tiempo

utilizando TNT. Luego de esto se realizó la inmunofluorescencia contra GFP (ver punto 8.3).

### **8.3 Inmunofluorescencia indirecta y tinciones fluorescentes**

Realizamos inmunofluorescencia indirecta (IFI) y tinciones fluorescentes *in toto* para revelar el contexto celular en embriones inyectados con MoCdh6 y además en los embriones en los que se realizó FISH.

Dado que durante el protocolo de FISH los embriones Tg(*flh::GFP*) perdían su fluorescencia, utilizamos el anticuerpo contra GFP (anti-Green Fluorescent Protein, Chemicon) para su detección. Además, utilizamos Hoechst 33342 para marcar fluorescentemente los núcleos celulares.

Para embriones MoCdh6, hicimos inmunocitoquímica contra laminina (anti-laminina Ig-Rabbit, Sigma) y las tinciones fluorescentes para los filamentos de actina (Faloidina-ALEXA-568, Invitrogen), y los núcleos celulares (Hoechst 3334, Molecular Probes). Los embriones se fijaron a las 32 hpf con PFA al 4%.

Con el objetivo de observar los ganglios craneales en embriones inyectados con MoCdh6 utilizamos anticuerpos contra tubulina acetilada (anti-tubulina acetilada Ig-Mouse, Sigma). Los embriones se fijaron con PFA al 4% a las 32 hpf.

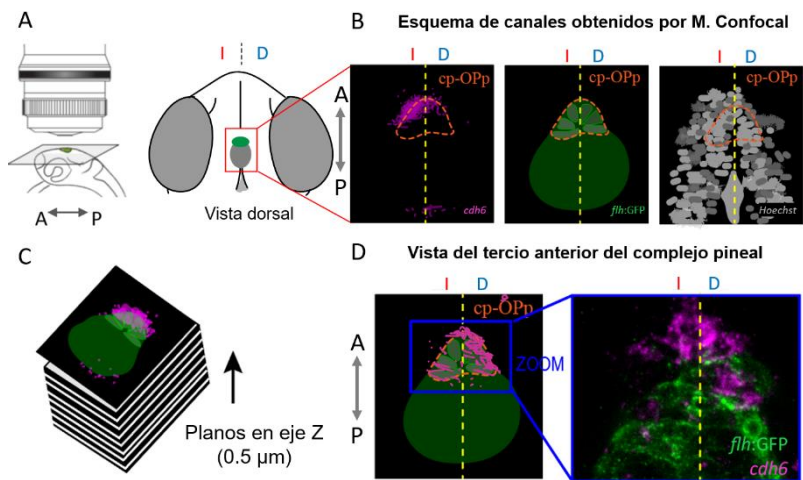
El protocolo combinado de IFI y tinción fluorescente utilizado fue el siguiente: lavar con PBT (PBS más tritón al 0,1%), permeabilizar con Proteinasa K según estadio bloquear por 2 horas a temperatura ambiente e incubar con los anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. Al día siguiente, repetimos el procedimiento de lavado, bloqueo e incubación, esta vez con el anticuerpo secundario (AlexaFluor

488 Anti-Mouse Invitrogen, AlexaFluor 647 Anti-Rabbit Invitrogen y/o AlexaFluor 568 Anti-Mouse Invitrogen) y las tinciones fluorescentes.

En los embriones a los que se le realizó FISH, no fue necesario permeabilizar.

#### 8.4 Síntesis de la sonda de *cdh6* para la hibridación *in situ* fluorescente

Sondas antisentido contra *cdh6* marcadas con digoxigenina fueron generadas por transcripción *in vitro* con la enzima SP6 a partir del plásmido pCRII-TOPO (Invitrogen), el cual fue linealizado con la enzima *NotI*.



**Figura 5. Captura de imágenes del complejo pineal en tres dimensiones utilizando microscopia fluorescente confocal.** (A) Esquema de montaje del embrión transgénico Tg(*flh::GFP*) (izquierda) para la toma de imágenes en vista dorsal (derecha). (B) Obtención de tres señales fluorescentes, en

canales independientes, luego de la FISH, IFI y tinción fluorescente: (1) *cdh6* (en magenta, izquierda), (2) transgén Tg(*flh::GFP*) (en verde, medio) y (3) núcleos (en gris, derecha). (C) Esquema de la toma de imágenes en planos del eje Z con 0.5 μm de distancia para análisis tridimensional. En el esquema se muestra la señal *cdh6* y *anti-GFP* unida para el mismo plano, realizado en la posterior manipulación de imágenes. (D) Magnificación de la zona demarcada de la imagen del complejo pineal completo (izquierda) para analizar únicamente el territorio de las cp-OPp (derecha).



## 8.5 Microscopia Confocal

Para obtener imágenes de microscopía en 3 dimensiones (3D) trabajamos con el microscopio Leica HCS-LSI. Se utilizó el objetivo 63X W/N.A 1.2 para la observación del complejo pineal desde una vista dorsal y el objetivo 5X para la visualización de los ganglios craneales, montado los embriones de lado (figura 5A). Todos los embriones se montaron utilizando agarosa de bajo punto de fusión al 1% diluida en E3 y las imágenes se capturaron utilizando un intervalo en el eje z de 0,5  $\mu\text{m}$  (figura 5C).

## 8.6 Análisis de imágenes y datos

Para cuantificar la señal de *cdh6* en el territorio de las cp-OPp a partir de las FISH con IFI diseñamos un protocolo de segmentación a partir de la marca de membrana y núcleos celulares (figura 5). Primero, trazamos la línea media considerando el reordenamiento apical de las células del tercio anterior del complejo pineal, permitiendo separar el territorio izquierdo y derecho de las cp-OPp. Seguimos los núcleos celulares desde su comienzo hasta su desaparición para determinar los planos, en el eje z, conteniendo las cp-OPp. En cada uno de estos planos, se seleccionó el área para el territorio derecho e izquierdo de las cp-OPp delimitadas por las membranas celulares y la línea media anteriormente trazada. Luego, se sumaron las áreas izquierdas o derechas de cada embrión, para obtener tanto el área total acumulada izquierda y derecha del OPp. Además, se calculó la suma de todas las áreas, izquierdas y derechas, como el área total de OPp.

En cada una de las áreas seleccionadas, cuantificamos la cantidad de señal de *cdh6* (U.A.) producto de la FISH. A partir de estos dos datos, área total izquierda

o derecha y cantidad de señal de *cdh6* izquierda o derecha, calculamos la “concentración” de señal de *cdh6* en cada territorio (U.A./ $\mu\text{m}^2$ ). Para poder comparar estadísticamente, normalizamos las concentraciones restándoles la concentración de la señal de fondo (inespecífica) del mismo embrión, obteniendo así las concentraciones corregidas izquierda y derecha.

Calculamos el índice de asimetría con las concentraciones de señal de *cdh6*, el cual corresponde a la diferencia de las concentraciones de señal (derecha menos izquierda) en la suma de ambas. Para este cálculo no utilizamos las concentraciones corregidas para evitar una sobre estimación de las diferencias. Además, se excluyeron del análisis los embriones cuyas concentraciones corregidas fueran cercanas a cero, considerando que dichos embriones no expresan *cdh6* en las cp-OPp. Para todo el análisis de imágenes utilizamos el software FIJI. Para el análisis y cálculo de los datos extraídos, utilizamos Excel.

## **8.7 Análisis estadístico**

Se realizaron pruebas de normalidad para una muestra pequeña (prueba Shapiro-Wilk,  $\alpha=0,05$ ) y homogeneidad de varianza (Prueba de Bartlett o Prueba F) en todas las poblaciones a analizar. Según estos resultados se determinó el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas en los siguientes análisis.

Comparamos una muestra contra cero utilizando la prueba t de una muestra (paramétrico) o prueba Wilcoxon de una muestra (no paramétrico). Comparamos dos poblaciones dependientes utilizando la prueba t de muestras pareadas (paramétrico) o la prueba de Wilcoxon (no paramétrico). En el caso de dos

poblaciones independientes, utilizamos las pruebas estadísticas prueba t de muestras no-pareadas (paramétrico) o la prueba de Mann-Whitney (no paramétrico). Al tratarse de más de dos poblaciones utilizamos la prueba de análisis de varianza de una sola vía (ANOVA, del inglés Análisis of Variance) (paramétrico) o la prueba de Kruskal-Wallis (KW, no paramétrico).

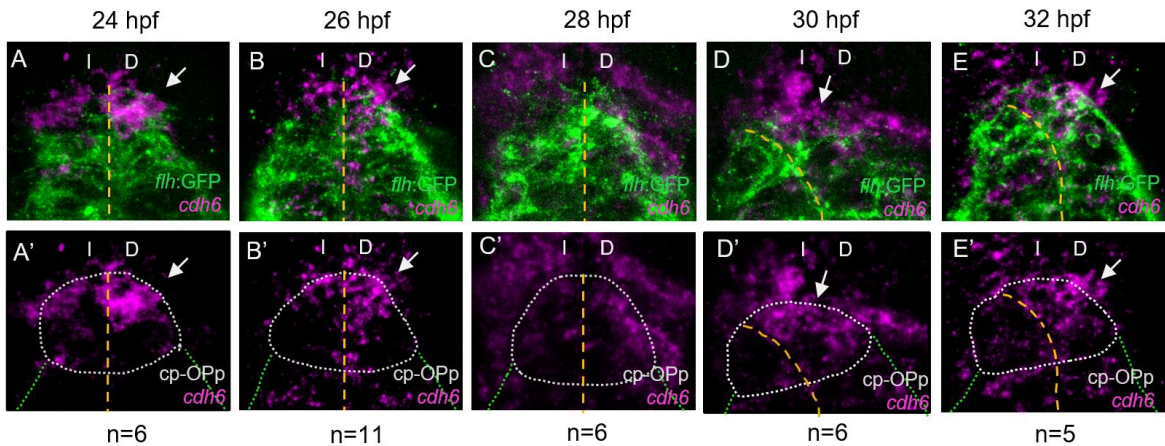
Para todos estos análisis, como para la elaboración de los gráficos, trabajamos con el programa Graphpad Prism 7.

## 9. Resultados

### 9.1 Objetivo 1: Caracterizar la expresión espacial y temporal de cadherina 6 en el epítalamo dorsal de embriones silvestres de pez cebra, en relación con el territorio de las células precursoras del OPp.

Para estudiar la expresión espacial y temporal de *cadherina 6*, detectamos la expresión de ARN mensajero (ARNm) de *cadherina 6* mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés fluorescent *in situ* hybridization). Luego de esto, se realizó una inmunofluorescencia indirecta (IFI) contra GFP y tinciones fluorescentes *in toto* para detectar la expresión del transgén *flh::GFP*. La combinación de ambos protocolos nos permitió observar la expresión de *cdh6* con relación al territorio de las cp-OPp, el cual corresponde al tercio más anterior y dorsal del complejo pineal. Ambas señales fluorescentes fueron capturadas en 3D utilizando microscopia confocal. Estos análisis se realizaron durante el establecimiento de la asimetría del OPp, entre las 24 y 32 hpf (figura 6).

En la secuencia de imágenes de la figura 6 podemos observar que la señal de *cdh6* fue mayor en el territorio derecho de las cp-OPp, comparado con el territorio izquierdo, en todos los estadios analizados, a excepción de las 28 hpf donde la señal en ambos lados bajó considerablemente (figura 6C y 6C').



**Figura 6. Expresión de ARNm de *cdh6* en las cp-OPp durante el inicio de su morfogénesis asimétrica.** (A-E) Imágenes en vista dorsal del tercio anterior del complejo pineal (verde), obtenidas por microscopía confocal en embriones transgénicos Tg(*flh*::GFP) entre las 24 y las 32 hpf. Además, se muestra la señal detectada para *cdh6* (magenta). (A'-E') Se muestra sólo la señal de *cdh6* (magenta) delimitando el territorio parapineal (línea punteada blanca: cp-OPp), según la marca de *flh*::GFP. Se nota una mayor expresión de *cdh6* al lado derecho (flecha blanca), a excepción del tiempo 28 hpf donde la señal baja considerablemente en intensidad en ambos lados. Línea segmentada amarilla: línea media. D: derecha. I: izquierda. Se indica el número de embriones (n) utilizado para el análisis cuantitativo.

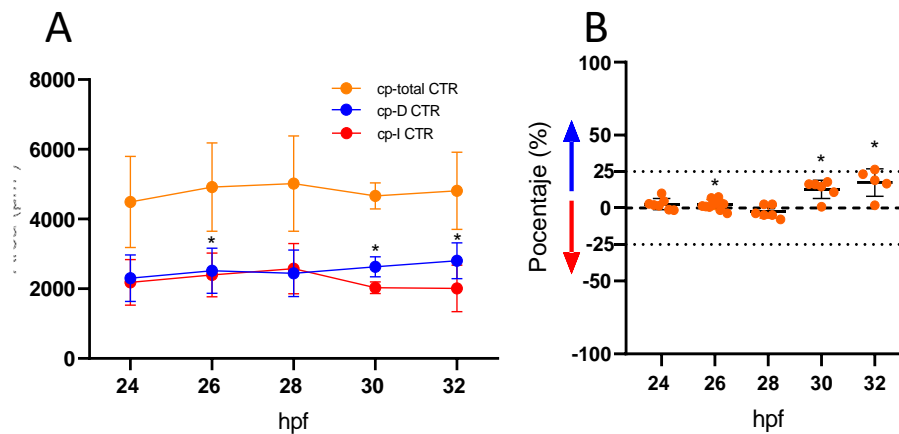
Para caracterizar estadísticamente el patrón espacio-temporal de *cdh6*, primero analizamos el tamaño del territorio de las cp-OPp derechas e izquierdas y, posteriormente, la señal de *cdh6* en estos territorios.

### 9.1.1 Durante el inicio de la morfogénesis asimétrica del OPp, el territorio de las células precursoras derechas aumenta de tamaño, mientras el territorio de las células izquierdas se reduce.

El análisis del tamaño del territorio del OPp se realizó considerando la sumatoria de las áreas del lado derecho e izquierdo en cada plano en los que se

observaron cp-OPp. La suma de ambos lados se consideró como el área acumulada total del territorio OPp (ver Materiales y Métodos, sección 8.6; figura 5).

Determinamos que existía una gran variabilidad en el tamaño del territorio de las cp-OPp en todos los estadios (figura 7A, curva naranja). No detectamos diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tiempos (ANOVA,  $P > 0,05$ ).



**Figura 7. Análisis del tamaño del territorio que ocupan las células precursoras del órgano paraxial en el tiempo, comparando entre el territorio derecho y el izquierdo.** (A) Gráfico mostrando las áreas del territorio total cp-OPp (naranja), del territorio derecho (azul) y del izquierdo (rojo) en el tiempo (hpf). Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas entre los territorios derecho e izquierdo de un mismo estadio, según prueba t pareada ( $P < 0,05$ ). (B) Gráfico del porcentaje de diferencia entre el tamaño derecho e izquierdo de un mismo embrión, según los diferentes estadios. Un valor positivo indica que el territorio derecho es mayor que el izquierdo. Los asteriscos (\*) señalan que la diferencia de territorios es diferente significativamente de cero, según la prueba t de una muestra ( $\alpha = 0,05$ ). Las barras corresponden a la desviación estándar.

Tampoco existían diferencias estadísticamente significativas en los territorios derechos o izquierdos a lo largo del tiempo (ANOVA,  $P > 0,05$ ) (figura 7A, curva azul y roja, respectivamente). Sin embargo, al comparar las áreas del lado derecho versus las del izquierdo de un mismo estadio, determinamos que existían diferencias significativas a las 26, 30 y 32 hpf (Prueba t Pareada,  $P < 0,05$ ). El

territorio derecho era un 2,5% más grande que el izquierdo a las 26 hpf, un 12,8% a las 30 hpf y un 17,5% a las 32 hpf (figura 7B). A las 24 y 28 hpf no existió diferencias significativas entre ambos lados (Prueba t de una muestra,  $\alpha=0,05$ ).

Concluimos que, si bien a nivel poblacional los tamaños del territorio de las cp-OPp derechas e izquierdas no cambiaban en el tiempo, debido a la variabilidad entre embriones, los resultados nos indican que a nivel individual el territorio derecho aumentó su tamaño mientras que el izquierdo disminuyó en los últimos estadíos analizados.

### **9.1.2 Existe mayor expresión de *cadherina 6* en las cp-OPp del lado derecho que en lado izquierdo durante la morfogénesis asimétrica del OPp.**

Realizamos este análisis calculando la concentración de señal de *cdh6* en los territorios de las cp-OPp izquierdas y derechas. Para poder comparar entre embriones, calculamos las concentraciones de señal corregidas, las cuales fueron normalizadas por la señal de fondo (inespecífica) de cada embrión (ver Materiales y Métodos, sección 8.6).

En las imágenes capturadas por microscopía de fluorescencia confocal, observamos que la señal de *cdh6* estaba presente en todos los estadíos, disminuyendo considerablemente a las 28 hpf (figura 6). Según el análisis cuantitativo, la concentración de señal de *cdh6*, en los territorios derechos e

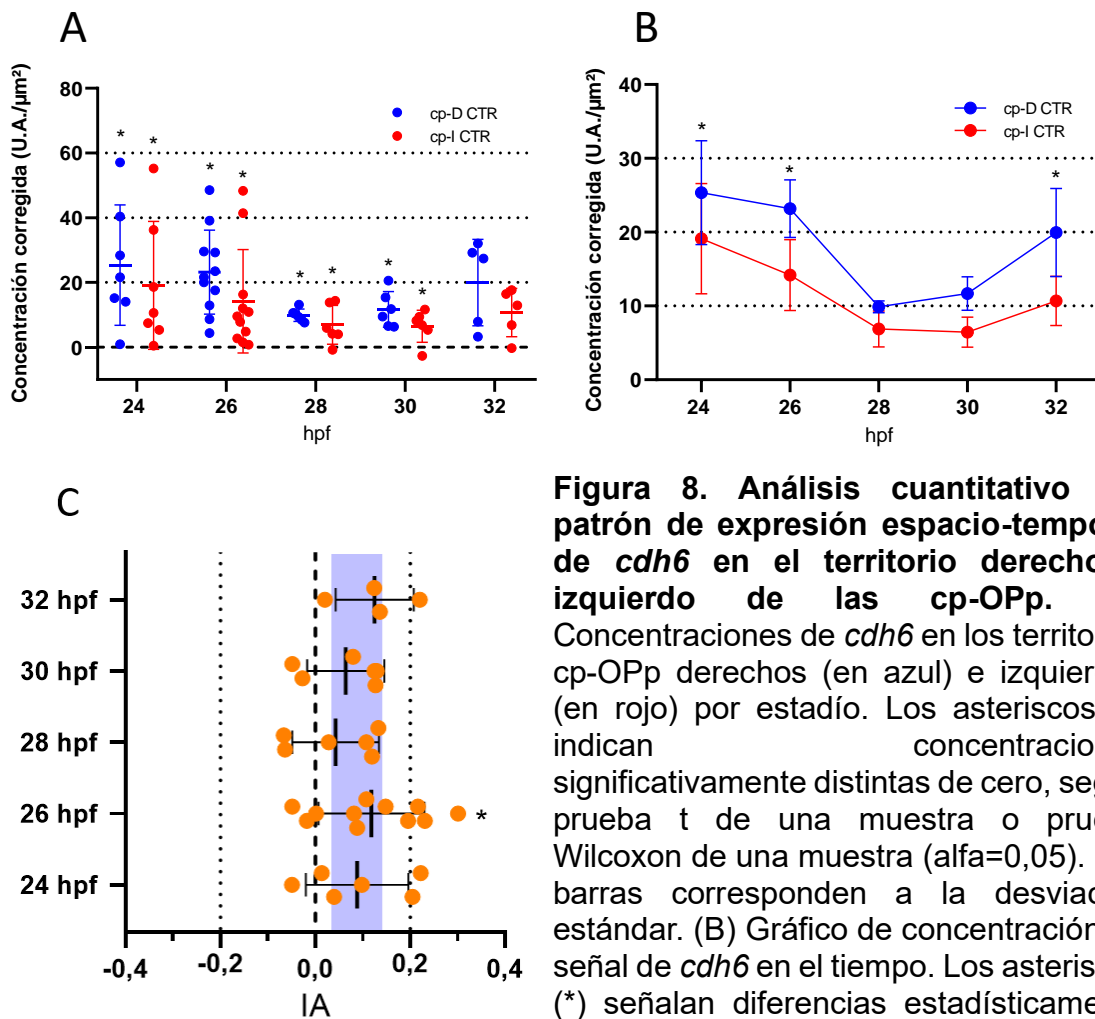
izquierdos, fue diferente de cero en todos los tiempos analizados, a excepción de las 32 hpf (prueba t de una muestra o prueba Wilcoxon de una muestra,  $\alpha=0.05$ ) (figura 8A).

No se observaron diferencias significativas al analizar los datos en el tiempo. Sin embargo, a las 28 hpf se detectó una disminución en la concentración de señal de *cdh6* en ambos territorios (figura 8B). Luego de esto, comenzó a aumentar.

Para determinar si la expresión de *cdh6* era asimétrica, comparamos la concentración de señal total de *cdh6* entre el territorio izquierdo y derecho del OPp en cada embrión y calculamos su índice de asimetría (ver Materiales y Métodos, sección, sección 8.6). Si este valor es positivo quiere decir que existe una asimetría direccional hacia la derecha y si es negativo, quiere decir que existe una asimetría direccional hacia la izquierda. Si bien a las 24, 26 y 32 hpf las concentraciones de señal de *cdh6* izquierdas y derechas eran diferentes de manera estadísticamente significativa (prueba t pareada o prueba Wilcoxon pareada,  $p>0.05$ ) (figura 8B), a partir del índice de asimetría, precisamos que únicamente a las 26 hpf existía asimetría direccional hacia el lado derecho (prueba t de una muestra o prueba Wilcoxon de una muestra,  $\alpha=0.05$ ) (figura 8C). A pesar de esto, existió una tendencia poblacional por una mayor concentración de señal de *cdh6* en el territorio derecho versus el izquierdo en todos los estadios (figura 8C, banda azul).



A partir de estos resultados concluimos que *cdh6* se expresa en las cp-OPp durante las 24 y 32 hpf, disminuyendo momentáneamente a las 28 hpf. Además, los datos nos sugieren que existe una asimetría direccional en la expresión de *cdh6*, siendo mayor en el territorio derecho de las cp-OPp.



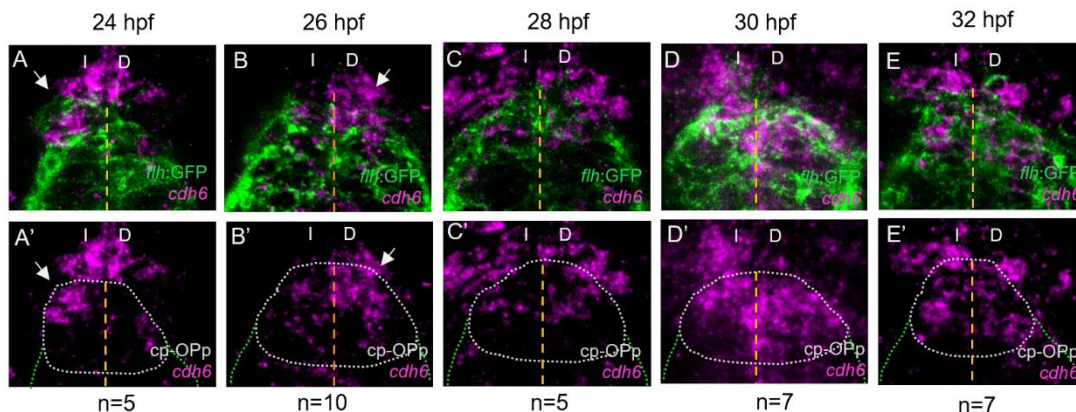
**Figura 8. Análisis cuantitativo del patrón de expresión espacio-temporal de *cdh6* en el territorio derecho e izquierdo de las cp-OPp.** (A) Concentraciones de *cdh6* en los territorios cp-OPp derechos (en azul) e izquierdos (en rojo) por estadio. Los asteriscos (\*) indican concentraciones significativamente distintas de cero, según prueba t de una muestra o prueba Wilcoxon de una muestra (alfa=0,05). Las barras corresponden a la desviación estándar. (B) Gráfico de concentración de señal de *cdh6* en el tiempo. Los asteriscos (\*) señalan diferencias estadísticamente significativas entre territorios izquierdo y

derecho del mismo estadio, según prueba t pareada o prueba Wilcoxon pareada ( $p < 0,05$ ). Las barras corresponden a el error estándar. (C) Índice de asimetría (IA), calculado a partir de la concentración de señal de *cdh6*, por estadio. La franja celeste contiene la media y mediana de todas las poblaciones, señalando una mayor concentración de *cdh6* en las cp-OPp derechas. Los asteriscos (\*) señalan poblaciones significativamente diferentes de cero, según prueba t de una muestra o prueba Wilcoxon de una muestra (alfa=0,05). Las barras corresponden a la desviación estándar.

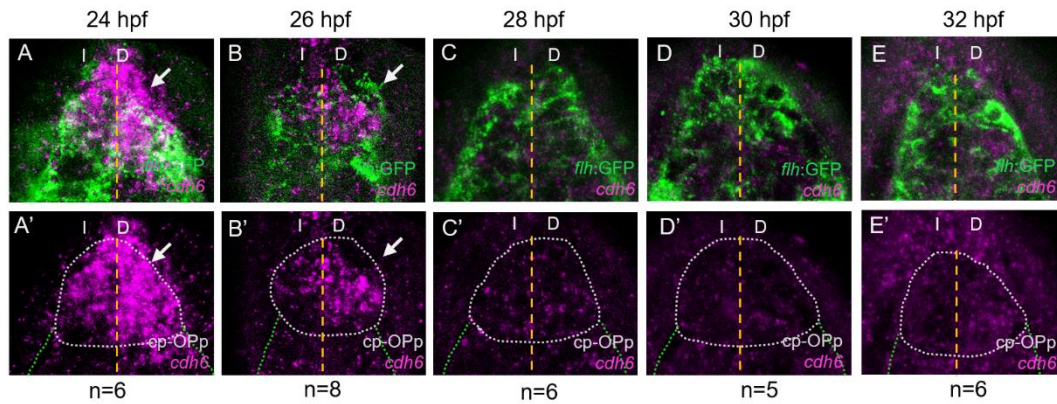
## 9.2 Objetivo 2: Determinar el patrón de expresión espaciotemporal de *cadherina 6* en el epítalamo de embriones de pez cebra en condiciones donde la vía de señalización de Nodal está ausente o es bilateralmente simétrica.

Para determinar si el patrón de expresión espaciotemporal de *cdh6* descrito en condiciones silvestres cambia al alterar la expresión asimétrica de vía de señalización Nodal en el epítalamo, utilizamos embriones Tg(*flh::GFP*) con la expresión epitalámica de Nodal ausente o bilateral, mediante la inyección de morfolino para Spaw (MoSpaw) o para No-tail (MoNtl), respectivamente (ver Materiales y Métodos, sección 8.1).

Realizamos el mismo protocolo experimental que en el objetivo 1, combinando FISH para *cdh6* con IFI contra GFP y tinciones fluorescentes en embriones entre 24 y 32 hpf (figuras 9 y 10).



**Figura 9. Expresión de ARNm de *cdh6* en las cp-OPp entre las 24 y las 32 hpf en ausencia de la vía de señalización Nodal en el epítalamo.** Imágenes de microscopía confocal de embriones transgénicos Tg(*flh::GFP*) inyectados con MoSpaw. Vistas dorsales. (A-E) Imágenes de vista dorsal del tercio anterior del complejo pineal (verde) y la señal detectada por FISH para *cdh6* (magenta). (A'-E') Se muestra sólo la señal de *cdh6* (magenta) delimitando el territorio de las cp-OPp (línea punteada blanca: cp-OPp). Se observó que inicialmente existe una expresión asimétrica de *cdh6* (flecha blanca), y desde las 28hpf ésta se volvió simétrica. Línea segmentada amarilla: línea media. D: derecha. I: izquierda.



**Figura 10. Expresión de ARNm de *cdh6* en las cp-OPp desde las 24 hasta las 32 hpf en presencia bilateral de Nodal en el epítalamo.** (A-E) Imágenes en vista dorsal del tercio anterior del complejo pineal (verde), obtenidas por microscopía confocal en embriones transgénicos Tg(*flh::GFP*) inyectados con MoNtl, desde las 24 hasta las 32 hpf. Además, se muestra la señal detectada para *cdh6* (magenta). (A'-E'). Se muestra sólo la señal de *cdh6* (magenta) delimitando el territorio de las cp-OPp (línea punteada blanca: cp-OPp). Existió una mayor expresión de *cdh6* en el territorio cp-OPp derecho a las 24 y 26 hpf (flecha blanca). A partir de las 28 hpf, no se observó expresión de *cdh6* en las cp-OPp. Línea segmentada amarilla: línea media. D: derecha. I: izquierda.

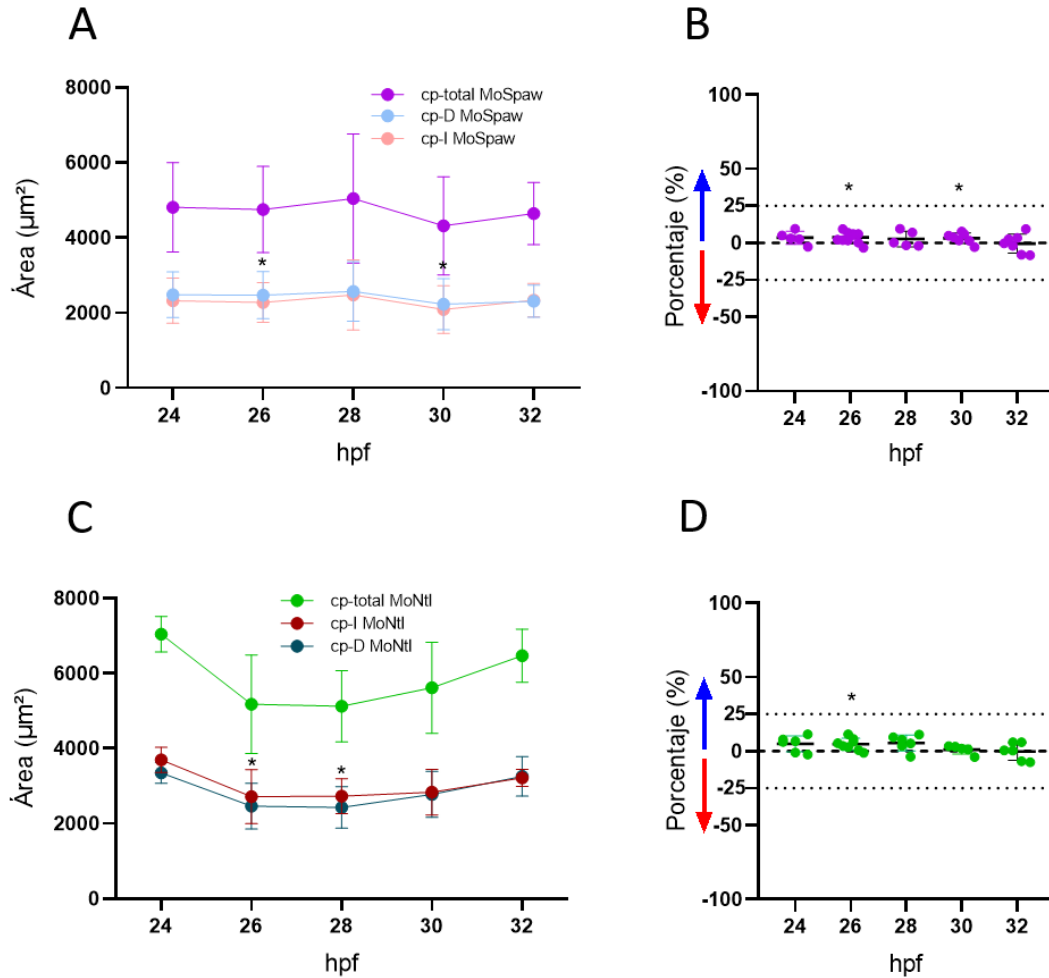
En ausencia de expresión de Nodal epitalámico, observamos que *cdh6* se expresaba tanto en las cp-OPp derechas como izquierdas en todos los tiempos analizados (figura 9). A diferencia de los grupos controles, en los cuales la mayor parte de los embriones expresó una mayor cantidad de *cdh6* en el territorio derecho, en los embriones MoSpaw encontramos casos con una mayor señal de *cdh6* en el territorio izquierdo, derecho o simétricos. Este patrón lo observamos en los distintos estadios analizados. Se observó, sobre todo a partir de las 28 hpf, que la diferencia de señal entre ambos lados fue aparentemente menor que en los embriones controles.

En las cp-OPp de embriones con expresión bilateral de Nodal, observamos que *cdh6* se expresaba únicamente a las 24 y 26 hpf (figura 10). Además, en estos dos estadios, la señal de *cdh6* fue mayor en el territorio derecho.

A partir de estas observaciones, decidimos analizar cuantitativamente el tamaño del territorio izquierdo y derecho de las cp-OPp, así como la señal de *cdh6* en éstos. Comparamos los resultados con embriones de la misma camada sin inyección de morfolino y, por lo tanto, sin afectación de la vía de señalización Nodal en el epitálamo.

**9.2.1 En embriones con ausencia de la expresión de la vía de señalización Nodal en el epitálamo, el tamaño del territorio derecho e izquierdo de las cp-OPp es similar en todos los estadios.**

Al igual que en el objetivo 1, calculamos y analizamos el tamaño del territorio izquierdo y derecho de las cp-OPp. La suma de ambos territorios corresponde al tamaño total del territorio de las cp-OPp. Esto se realizó para en embriones inyectados con MoSpaw o con MoNtl y sus respectivos controles.



**Figura 11. Análisis del tamaño del territorio total, derecho e izquierdo que abarcan las cp-OPp, en embriones inyectados con MoSpaw o con MoNtl.** (A,B) embriones MoSpaw (A) Gráfico mostrando las áreas del territorio total de las cp-OPp (en morado), del territorio derecho (en celeste) y del izquierdo (en rosado), en el tiempo. (\*) diferencias estadísticamente significativas entre los territorios derecho e izquierdo de un mismo estadio, según prueba t pareada o prueba Wilcoxon ( $P < 0.05$ ). (B) Gráfico del porcentaje de diferencia entre el tamaño derecho e izquierdo de un mismo embrión MoSpaw, según los diferentes estadios. Un valor positivo indica que el territorio derecho es mayor que el izquierdo. (\*) Diferente significativamente de cero, según la prueba t de una muestra o la prueba Wilcoxon de una muestra ( $\alpha = 0.05$ ). (C,D) Embriones MoNtl (C) Gráfico mostrando las áreas del territorio total de las cp-OPp (en verde), del territorio derecho (en turquesa) y del izquierdo (en burdeo). (\*) Ondican diferencias estadísticamente significativas entre los territorios derecho e izquierdo de un mismo estadio, según prueba t pareada o prueba Wilcoxon ( $P < 0.05$ ). (D) Gráfico del porcentaje de diferencia entre el tamaño derecho e izquierdo de un mismo embrión MoNtl, según los diferentes estadios. (\*) Es diferente significativamente de cero, según la prueba t de una muestra ( $\alpha = 0.05$ ). Las barras corresponden a la desviación estándar.

Determinamos que, en los embriones MoSpaw, el tamaño del OPp total fue muy variable de embrión a embrión y que, además, no cambiaba en el tiempo (prueba Kruskal-Wallis,  $P < 0,05$ ) (figura 11A, recta morada). Tampoco cambió el tamaño de los territorios izquierdos y derechos del OPp (figura 11A, recta rosada y celeste) (ANOVA,  $P > 0,05$ ). Si bien los promedios del territorio izquierdo y derecho fueron muy similares en cada estadio, a las 26 y 30 hpf el territorio derecho era significativamente mayor que el izquierdo (prueba t pareada o prueba Wilcoxon,  $P > 0,05$ ), siendo un 3,7% y un 3,3% más grande, respectivamente (figura 11A). Estos resultados contrastaron con los embriones controles, donde el territorio derecho fue un 2,5%, 12,8% y 17,5% más grande que el izquierdo a las 26, 30 y 32 hpf, respectivamente (figura 11B). Es decir, las diferencias detectadas en embriones inyectados con MoSpaw fueron menores que las de embriones controles, y estas no aumentaron en los últimos estadios.

Por otro lado, en embriones MoNtl, también el tamaño del OPp fue muy variable de embrión a embrión (figura 11C, en verde). En este caso, los análisis estadísticos señalan que el tamaño del OPp cambió en el tiempo, así como el territorio derecho e izquierdo (prueba de Kruskal-Wallis,  $P < 0,05$ ) (figura supl. 1A, 1C y 1E). Obtuvimos el mismo resultado para el territorio total e izquierdo de los embriones controles, descartando un fenotipo específico de los embriones MoNtl (prueba de Kruskal-Wallis,  $P < 0,05$ ) (figura supl. 1B, 1D y 1F).

También en embriones MoNtl, los tamaños izquierdos y derechos de un mismo estadio fueron similares (figura 11C, en burdeo y turquesa). A pesar de esto, a las 26 y 28 hpf el territorio derecho fue mayor que el izquierdo de manera

estadísticamente significativa (prueba t pareada o prueba Wilcoxon,  $P < 0,05$ ). Al comparar los territorios de un mismo embrión, encontramos que únicamente a las 26 hpf el territorio derecho era 4,7% significativamente más grande (prueba t de una muestra,  $\alpha = 0$ ) (figura 11D). Estos resultados contrastan con sus embriones controles, donde el territorio derecho de las cp-OPp fue un 6,5% y un 22,7% más grande a las 30 y 32 hpf (figura suplementaria 2E).

Los resultados indican que, en ausencia o presencia bilateral de Nodal, el territorio de las cp-OPp izquierdo y derecho mantenían un tamaño similar a través de los estadios analizados. Al comparar con embriones que expresan Nodal asimétrico, concluimos que, a las 30 y 32 hpf, se pierde el aumento de tamaño del territorio derecho y la disminución del territorio izquierdo.

### **9.2.2 En ausencia de la vía de señalización Nodal en el epitálamo, *cadherina 6* se expresa durante todos los estadios analizados de manera más simétrica.**

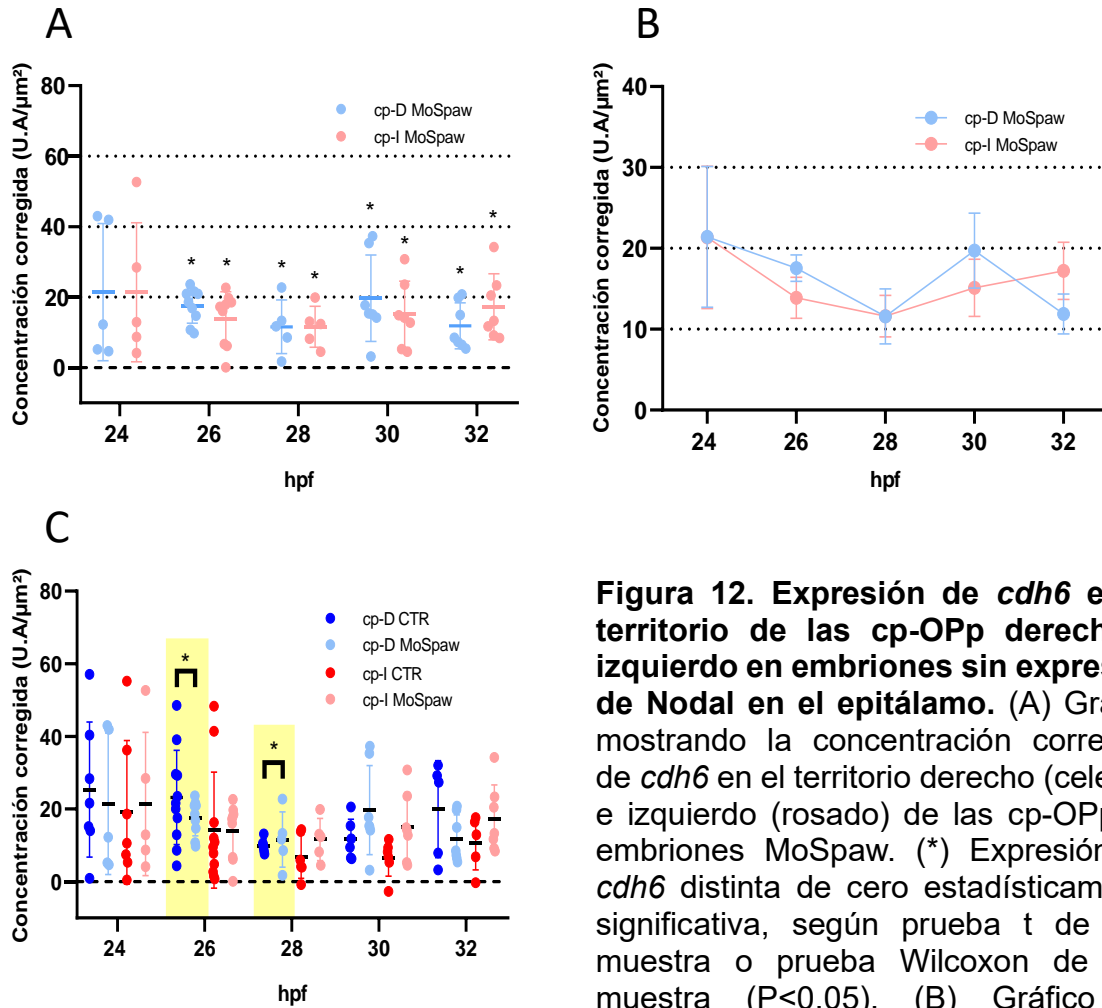
Realizamos este análisis calculando la concentración corregida de señal de *cdh6* en los territorios de las cp-OPp izquierdas y derechas en embriones MoSpaw y sus controles, utilizando la misma metodología que en el objetivo 1.

En ausencia de la expresión de la vía de señalización Nodal en el epitálamo, determinamos que *cdh6* se expresaba de manera estadísticamente significativa distinta de cero en ambos territorios, tanto el derecho como el izquierdo y en casi todos los tiempos analizados, ya que a las 24 hpf la concentración no fue distinta de

0 (figura 12A) (prueba t de una muestra o prueba Wilcoxon de una muestra,  $\alpha=0,05$ ). Al igual que en los controles, no existieron cambios estadísticamente significativos de las concentraciones de señal de *cdh6* entre los tiempos analizados (ANOVA o prueba de Kruskal-Wallis,  $P>0,05$ ). Sin embargo, en embriones MoSpaw, no observamos la caída de concentración de señal dramática a las 28 hpf. Siendo inicialmente las concentraciones menores, similares a la concentración del lado izquierdo control, estas describían una curva más plana en el tiempo (figura 12B y 8B, figuras supl. 3A y 3B). Esto fue avalado por los datos, ya que al comparar entre embriones control y MoSpaw en un mismo estadio, a las 26 y 28 hpf la expresión de *cdh6* fue significativamente menor en el territorio derecho de los embriones inyectados con MoSpaw que en los controles (prueba t no pareada o prueba Mann-Whitney,  $P<0,05$ ) (figura 12C).

Para analizar la asimetría I-D de la expresión de *cdh6*, realizamos comparaciones pareadas entre los embriones inyectados con MoSpaw y además calculamos el índice de asimetría. Observamos que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de señal de *cdh6* izquierdas y derechas (prueba t pareada o prueba Wilcoxon,  $P<0,05$ ) (figura 12B) y tampoco existieron diferencias significativas del índice de asimetría de cada estadio contra cero (figura 13A) (prueba t de una muestra,  $\alpha=0$ ). Asimismo, el índice de asimetría fue estadísticamente menor a las 26 y 32 hpf en embriones inyectados con MoSpaw que en los controles (prueba t no pareada o prueba Mann-Whitney,  $P<0,05$ ) (figura 13B).



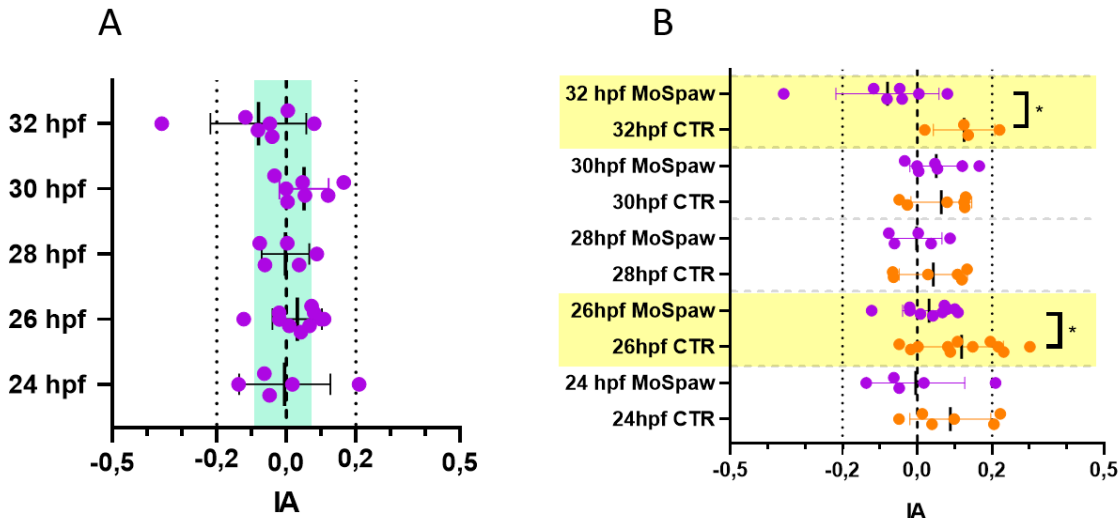


**Figura 12. Expresión de *cdh6* en el territorio de las cp-OPp derecho e izquierdo en embriones sin expresión de Nodal en el epitalamo.** (A) Gráfico mostrando la concentración corregida de *cdh6* en el territorio derecho (celeste) e izquierdo (rosado) de las cp-OPp de embriones MoSpaw. (\*) Expresión de *cdh6* distinta de cero estadísticamente significativa, según prueba t de una muestra o prueba Wilcoxon de una muestra ( $P < 0,05$ ). (B) Gráfico de concentración corregida en el tiempo

(24-32 hpf). No existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones izquierdas y derechas de un mismo estadio, según prueba t pareada o prueba Wilcoxon ( $P < 0,05$ ). (C) Comparación de la concentración corregida de *cdh6* en territorios izquierdos y derechos entre embriones MoSpaw (rosado y celeste) y sus controles (rojo y azul). (\*) Diferencias estadísticamente significativas entre territorios izquierdos o derechos de embriones MoSpaw y control, según prueba t no pareada o prueba Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ), resaltadas en amarillo. Barra negra, promedio. Las barras de colores, desviación estándar.

Al analizar cada caso de la población, determinamos que en algunos embriones la expresión de *cdh6* era mayor en el territorio derecho y en otros en el izquierdo, así como otros teniendo una expresión bastante simétrica. Este resultado se diferenció de los embriones control, donde existió una marcada tendencia en la

dirección de la asimetría hacia el lado derecho en todos los tiempos analizados (comparar rango banda celeste en figura 13A y 8C).



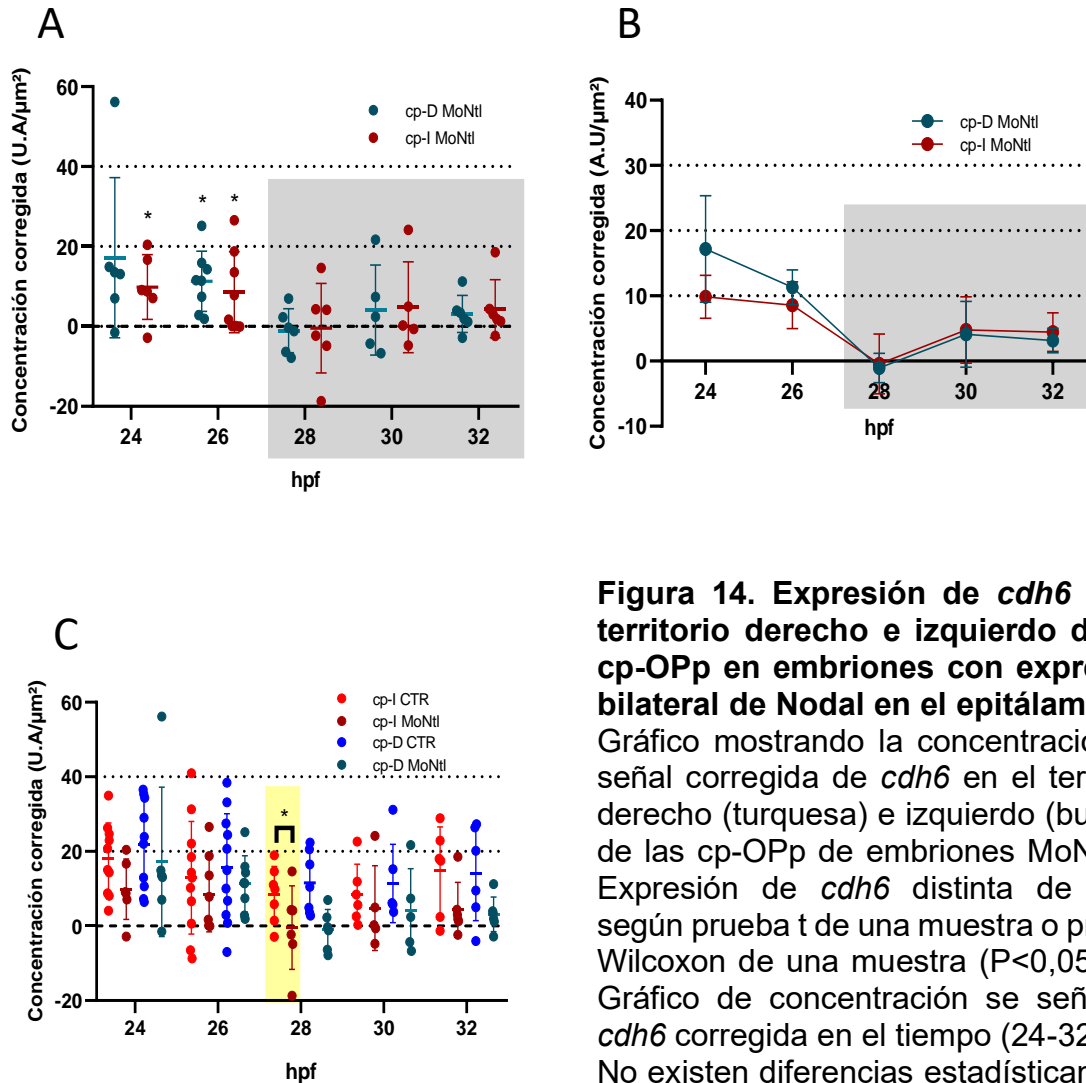
**Figura 13. Índice de asimetría para la concentración de señal de *cdh6* en embriones sin expresión de Nodal en el epitalamo.** (A) Gráfico de índice de asimetría para embriones MoSpaw de distintos estadíos (24-32 hpf). No existen diferencias estadísticamente significativas con cero para ningún estadío, según la prueba t de una muestra ( $P < 0,05$ ). La franja celeste contiene la media y mediana de todas las poblaciones analizadas. (B) Comparación de índices de asimetría entre embriones MoSpaw (en morado) y sus controles (en naranja), para cada estadío. Los asteriscos (\*) señalan diferencias estadísticamente significativas, según prueba t no pareada o prueba Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ), resaltado en amarillo. Las barras corresponden a la desviación estándar.

Concluimos que, en embriones sin expresión de Nodal en el epitalamo, a pesar de que *cdh6* se expresa durante la morfogénesis temprana del OPp en ambos territorios, esta expresión varía menos en el tiempo, es más simétrica entre I-D y similar a la concentración del lado izquierdo control, por lo que sería menor que en la condición silvestre.

### **9.2.3 En presencia bilateral de Nodal en el epítalamo, *cadherina 6* se expresa sólo en los estadios iniciales estudiados.**

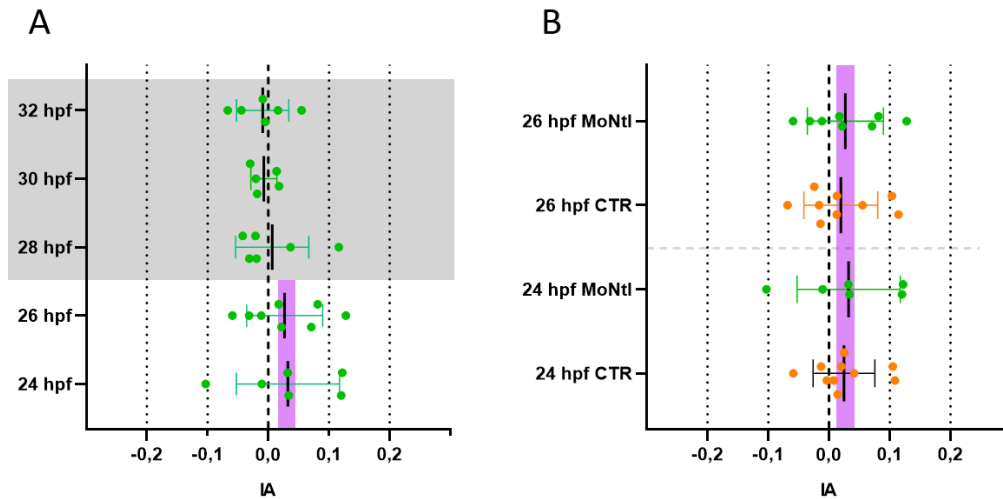
Nuevamente, pero esta vez para los embriones MoNtl y sus controles, realizamos análisis cuantitativos de la expresión de *cdh6* calculando la concentración de señal corregida en el territorio derecho e izquierdo de las cp-OPp desde las 24 a 32 hpf, utilizando la misma metodología que en el objetivo 1.

En los embriones con presencia bilateral de Nodal, la expresión de *cdh6* cambió en el tiempo en ambos territorios (prueba de Kruskal-Wallis,  $P < 0,05$ ). Observamos que la expresión de *cdh6* se apagó a partir de las 28 hpf hasta las 32 hpf (figura 14A), ya que solo fue estadísticamente distinta de cero a las 24 y 26 hpf (prueba t de una muestra o prueba Wilcoxon de una muestra,  $P < 0,05$ ). Este resultado contrastó con los embriones control, donde existió expresión de *cdh6* en todos los estadios analizados (figura supl. 2C). Al comparar las concentraciones de señal corregidas de los embriones MoNtl y controles, estas fueron diferentes significativamente a las 28 hpf para el territorio derecho (prueba t no pareada o prueba Mann-Whitney,  $P < 0,05$ ) (figura 14C). La concentración de *cdh6* en todos los estadios, comparando entre territorios derechos e izquierdos de las cp-OPp, fue menor en los embriones MoNtl que en los controles (figura 14C, figura supl. 2D, 3C y 3D).



**Figura 14. Expresión de *cdh6* en el territorio derecho e izquierdo de las cp-OPP en embriones con expresión bilateral de Nodal en el epítalamo.** (A) Gráfico mostrando la concentración de señal corregida de *cdh6* en el territorio derecho (turquesa) e izquierdo (burdeo) de las cp-OPP de embriones MoNtl. (\*) Expresión de *cdh6* distinta de cero, según prueba t de una muestra o prueba Wilcoxon de una muestra ( $P < 0,05$ ). (B) Gráfico de concentración se señal de *cdh6* corregida en el tiempo (24-32 hpf). No existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones

izquierdas y derechas de un mismo estadío, según prueba t pareada o prueba Wilcoxon ( $P < 0,05$ ). (C) Gráfico mostrando la concentración de señal corregida de *cdh6* en territorios izquierdos y derechos de embriones MoNtl (rosado y celeste) y sus controles (rojo y azul). (\*) Diferencias estadísticamente significativas entre territorios izquierdos o derechos de embriones MoNtl y control, según prueba t no pareada o prueba Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ) (resaltado en amarillo). Las barras negras y de colores corresponden al promedio y a la desviación estándar, respectivamente.



**Figura 15. Índice de asimetría para la concentración de señal de *cdh6* en embriones con expresión bilateral de Nodal en el epitálamo.** (A) Gráfico de índice de asimetría para embriones MoNtl de distintos estadios (24-32 hpf). No existen diferencias estadísticamente significativas con cero para ningún estadio, según la prueba t de una muestra ( $P < 0,05$ ). El rectángulo gris engloba a los estadios 28-32 hpf, señalando ausencia de expresión de *cdh6* en el territorio de las cp-OPp. La franja lila contiene la media y mediana de las 24 y 26 hpf. (B) Comparación de índices de asimetría entre embriones MoNtl (en verde) y sus controles (en naranja), para las 24 y 26 hpf. No existen diferencias estadísticamente significativas, según prueba t no pareada o prueba Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ). La franja lila engloba la media y mediana de todas las poblaciones analizadas. Las barras corresponden a la desviación estándar.

Nos preguntamos si la expresión de *cdh6* era asimétrica a las 24 y 26 hpf en los embriones MoNtl. La comparación entre las concentraciones de señal de *cdh6* derechas versus izquierdas no arrojó diferencias estadísticamente significativas para ningún tiempo (prueba t pareada o prueba Wilcoxon,  $P < 0,05$ ) (figura 14B). Tampoco así al calcular el índice de asimetría (prueba t de una muestra,  $\alpha = 0$ ) (figura 15A). Sin embargo, observamos que la mayoría de los embriones presenta una leve mayor expresión de *cdh6* en el territorio derecho. El mismo comportamiento se observó en los embriones control, y en ambos casos no fue distinta de cero (prueba t de una muestra,  $P < 0,05$ ) (figura supl. 2E). Así mismo, al comparar los índices de asimetría entre las poblaciones control y MoNtl de un mismo

estadío, no detectamos diferencias estadísticas (prueba t no pareada o prueba Mann-Whitney,  $P < 0,05$ ) (figura 15B).

Concluimos que, en embriones con expresión bilateral de Nodal en el epítalamo, *cdh6* se expresa únicamente a las 24 y 26 hpf, y a un menor nivel que sus controles. En los otros estadios (28, 30 y 32 hpf), la expresión de *cdh6* se apaga.

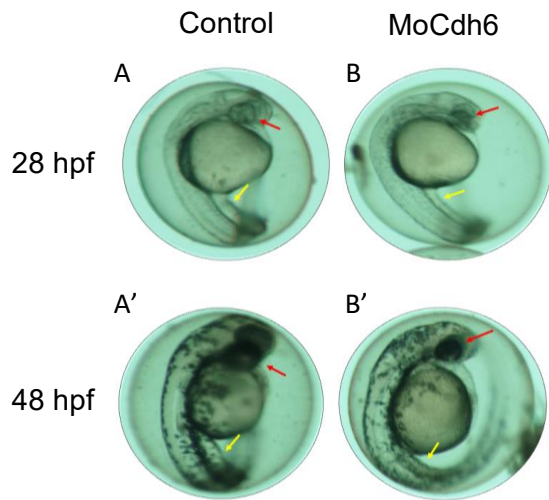
### **9.3 Objetivo 3: Determinar si Cadherina 6 es necesaria para la morfogénesis asimétrica del órgano parapineal y, en específico, para la compactación de las células precursoras izquierdas y la migración de las células precursoras derechas hacia la izquierda.**

Para determinar si Cdh6 está implicada en la morfogénesis asimétrica del OPp, analizamos la estructura del OPp a las 32 hpf, es decir, una vez que es evidente su asimetría morfológica, tanto en embriones controles como en embriones inyectados con morfolino para *cdh6* (MoCdh6). Para esto, realizamos ensayos de inmunofluorescencia indirecta para detectar la expresión de laminina y tinciones fluorescentes para describir la distribución de actina y de los núcleos en embriones Tg(*flh::GFP*).

Para validar el efecto del MoCdh6 inyectado, estudiamos su fenotipo *in toto* bajo lupa comparándolo con el descrito por Liu *et al.* [17] y analizamos la morfología general de los ganglios craneales, ya que se ha descrito que Cdh6 es necesario para su desarrollo normal. Utilizamos embriones de la misma camada como controles.

### 9.3.1 La inyección de MoCdh6 genera un fenotipo caracterizado por un menor tamaño del ojo y cabeza y un tubo vitelínico más delgado y una organización alterada de los ganglios craneales.

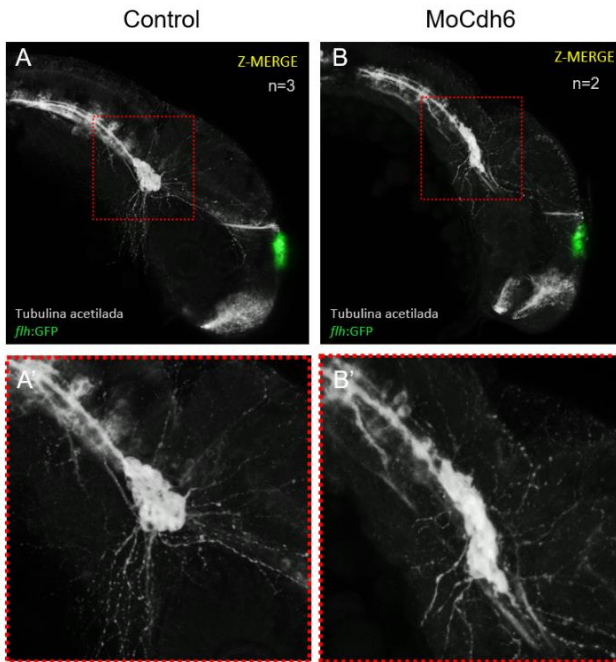
Analizamos las características morfológicas tanto en embriones controles como en inyectados con MoCdh6 a las 28 y 48 hpf (figura 16). En ambos estadios, los embriones morfantes tenían un menor tamaño del ojo y de la cabeza con respecto a los embriones controles. Además, los embriones MoCdh6 tenían un tubo vitelínico más delgado que los controles. Ambos efectos fueron más evidentes a las 48 hpf. Estas características coinciden con las descritas en Liu *et al.* [17]. No observamos malformaciones o muerte celular (necrosis) del cerebro de los embriones en desarrollo, lo que indica que la cantidad morfolino inyectado estaba bajo el límite de toxicidad.



**Figura 16. Caracterización del fenotipo de embriones inyectados con morfolino contra *cdh6* a las 24 y 48 hpf.**

(A-A') Embriones sin inyección de morfolino, es decir, con función silvestre de Cdh6 (control). Fotos las 24 (A) y 48 (A') hpf. (B-B') Embriones con inyección de MoCdh6 en estadio de una célula, es decir, con función disminuida de Cdh6 (MoCdh6). Fotos a las 24 (B) y 48 (B') hpf. Flechas rojas apuntando a los ojos. Flechas amarillas apuntando a los tubos vitelínicos. En embriones con inyección de MoCdh6 se observa un menor tamaño de la cabeza y ojos, además de un tubo vitelínico más delgado, en comparación con los embriones control.

Para describir y comparar la estructura general del ganglio craneal, se fijaron embriones controles y MoCdh6 a las 32 hpf y se les realizó una IFI contra tubulina acetilada (figura 17).



**Figura 17. Ganglios craneales en embriones con función de Cdh6 disminuida por inyección de morfolino.** Planos laterales de embriones de 32 hpf. (A-A') Embrión Tg(*flh*::GFP) (en verde) con función silvestre de Cdh6. En gris, resultado de la inmunofluorescencia indirecta para tubulina acetilada mostrando los ganglios craneales (rectángulo línea punteada roja). Plano detalle en A'. Se muestra organización celular compacta, formando estructura oval. (B-B') Embrión transgénico Tg(*flh*::GFP) (en verde) con función disminuida de Cdh6 por inyección de morfolino antisentido contra ARNm de *cdh6*. En gris, resultado de la inmunofluorescencia indirecta para tubulina acetilada mostrando los ganglios craneales (rectángulo línea punteada roja). Plano detalle en B'. Se observa ganglio craneal con forma alargada y con falta de integridad.

tubulina acetilada mostrando los ganglios craneales (rectángulo línea punteada roja). Plano detalle en B'. Se observa ganglio craneal con forma alargada y con falta de integridad.

Observamos que en los embriones control los ganglios craneales formaron una estructura piriforme. Las proyecciones salían del clúster con una estructura tipo radial, generando ramificaciones durante su trayectoria. Algunas, las más anteriores, seguían hacia dorsal y ventral la forma oval del ojo. Por otro lado, observamos que los ganglios craneales de embriones MoCdh6 se encontraban desorganizados, formando una estructura más delgada y lineal (se perdió la forma tipo trapezoide). La misma ubicación del clúster se encontró evidentemente más separada de la comisura posterior del ojo. Finalmente, las proyecciones axonales



perdían su organización en la trayectoria de las ramificaciones y, aparentemente, presentaban un menor número de estas. Estos resultados concordó con los descritos en Liu *et al.* [17]; sugiriendo una cantidad de MoCdh6 inyectado consistente con la disminución de función de Cdh6.

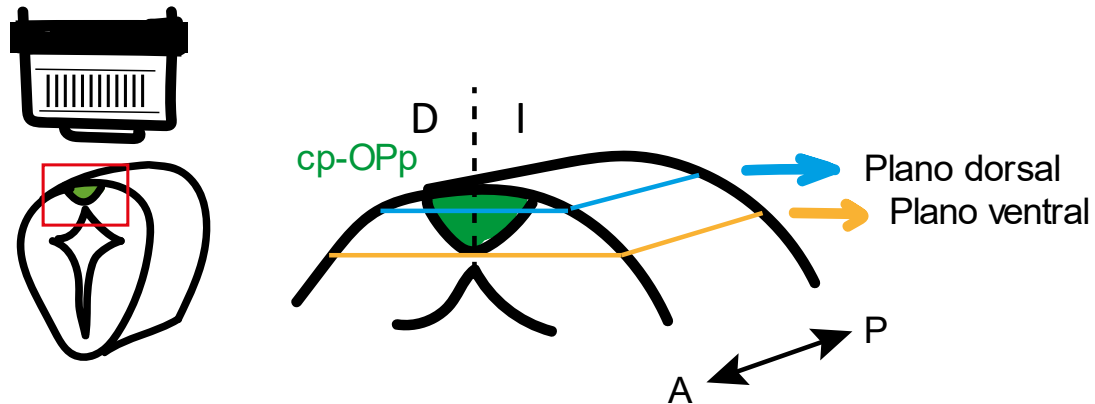
Los resultados de la observación del fenotipo y de la organización de los ganglios craneales permiten deducir que la función de Cdh6 se encuentra alterada por la cantidad de morfolino inyectado, de manera reproducible y específica.

### **9.3.2 La disminución de la función de Cdh6, mediada por la inyección de morfolino, altera la asimetría del OPp.**

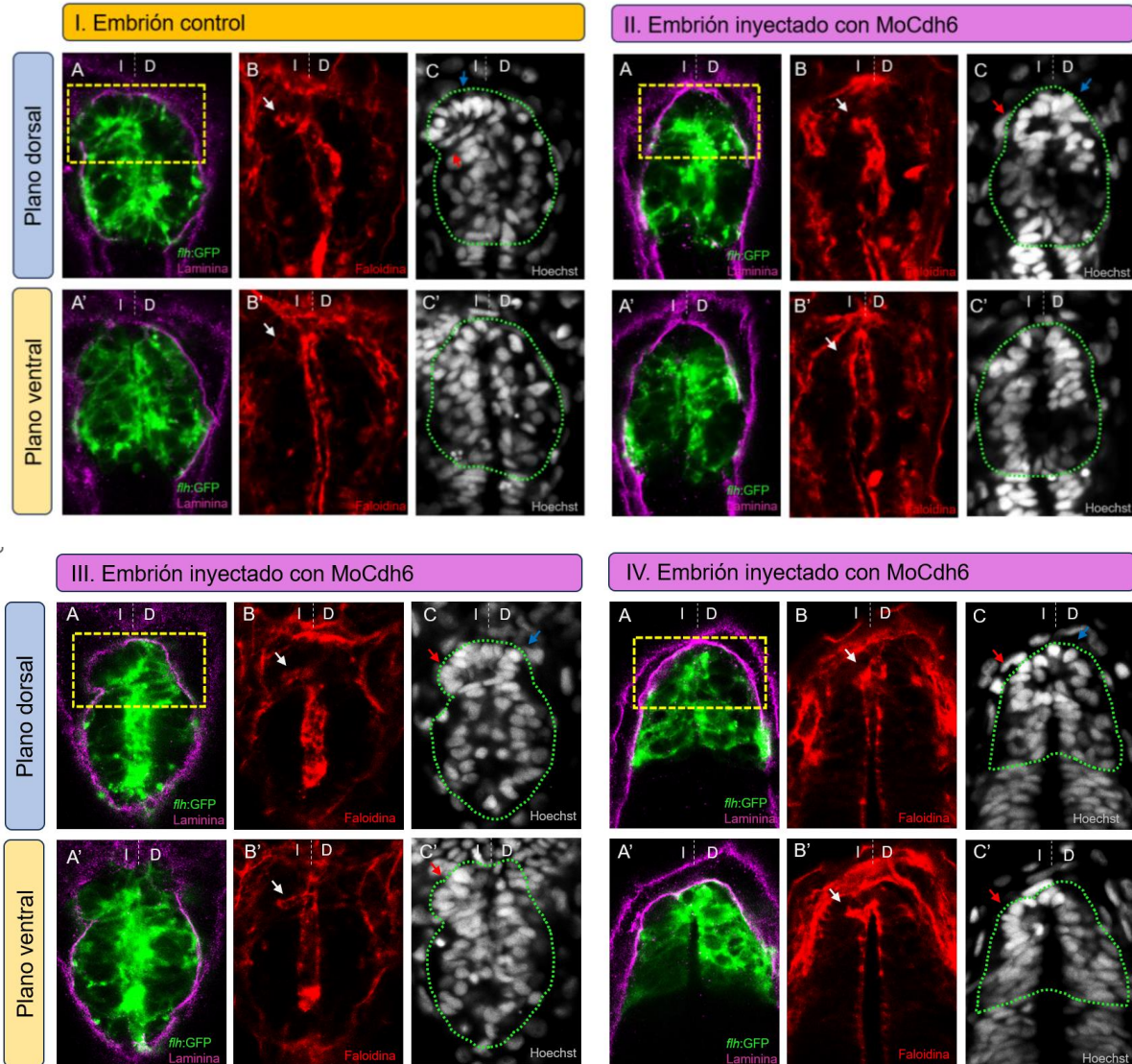
Para evaluar la presencia de asimetrías estructurales del OPp en embriones morfantes de Cdh6, evaluamos si a las 32 hpf el OPp presentaba las características asimétricas descritas como resultado de la compactación de las cp-OPp del lado izquierdo y del movimiento de las cp-OPp derechas hacia la izquierda, es decir, que se forme un núcleo con una organización supracelular tipo roseta adyacente al lado izquierdo de la línea media.

Para esto, estudiamos embriones Tg(*flh*:GFP) de 32 hpf controles y morfantes para Cdh6 mediante microscopia confocal (figura 18 y 19). Analizamos el reordenamiento los núcleos celulares con relación a la marca de actina, ya que para formar la estructura tipo roseta los núcleos se reordenan alrededor de una acumulación de actina que se ubica al lado izquierdo de la línea media. Además,

estudiamos la deposición de laminina, componente de la matriz extracelular, la cual recubre el OPp delineando su forma y ubicación a nivel supracelular con relación a la línea media.



**Figura 18. Esquema de toma de imágenes para el panel de la figura 19.** Figura del tubo neural en vista frontal-lateral, mostrando la toma de imágenes de microscopía confocal para generar una vista dorsal del complejo pineal. Imágenes capturadas en plano más dorsal en celeste (figura 18 A-C). Imágenes capturadas en plano más ventral en amarillo (figura 19 A'-C'). Tercio anterior del complejo pineal, donde se ubican las cp-OPp, en anterior.



**Figura 19. Morfogénesis asimétrica del OPp a las 32hpf en embriones morfantes para Cadherina 6.** Imágenes de microscopía confocal mostrando el complejo pineal en embriones Tg (*flh:GFP*) (verde). (A-C) Plano dorsal. (A'-C') Plano ventral. Inmunohistoquímicas para los filamentos de actina (en rojo), laminina (en magenta) y núcleos celulares (en gris). La línea punteada blanca indica la línea media. El recuadro en línea punteada amarilla (en A), señala el tercio anterior del complejo pineal, donde se ubica la roseta. La flecha blanca (en B) señala la acumulación de actina del centro de la roseta. La línea punteada verde (en C y C') dibuja la silueta del complejo pineal. La flecha azul (en D y/o D') señala organización de los núcleos en torno a la acumulación de actina para las cp-OPp derechas. La flecha roja (en C y/o C') señala organización de los núcleos en torno a la acumulación de actina para las cp-OPp izquierdas. (I) Panel de imágenes para embrión control, sin inyección de morfolino. (II-IV) Paneles de imágenes para tres casos de embriones inyectados con MoCdh6, con sutiles diferencias entre ellos. D: derecha. I: izquierda. Vista dorsal.

En los embriones controles (figura 19.I), se observó la estructura tipo roseta ubicada completamente al lado izquierdo de la línea media. Así mismo, la acumulación de laminina alrededor de la roseta evidenció claramente la posición asimétrica con respecto a la línea media y que no se había despegado aún del resto del complejo pineal (figura 19.I A). Observamos que la acumulación de actina también se encontraba en el lado izquierdo, reordenándose (figura 19.I B). Los núcleos se ordenaron alrededor de un punto de acumulación de actina (figura 19.I B-C). No se observaron células del OPp al lado derecho de la línea media. Se observó que los núcleos celulares del lado izquierdo adyacentes al borde OPp/complejo pineal están más cercanos entre sí, dando un aspecto general asimétrico a la estructura tipo roseta que formara el OPp. Esta organización se observó solo en los planos más dorsales del complejo pineal (comparar figura 19.I A-C con 19.I A'-C')

En embriones morfantes de Cdh6 observamos un fenotipo común con diferencias sutiles (figura 19.II-IV). Seleccionamos tres embriones distintos para analizar. En el primer caso morfante (figura 19.II A-C), la estructura supracelular tipo roseta se ubicó sobre la línea media (ver laminina en figura 18.II A). Si bien hay núcleos formando la roseta en el lado derecho, no se observó una organización simétrica entre las células de ambos lados (figura 19.II C). La acumulación de actina del centro de la roseta se ubicó ligeramente en el lado izquierdo (figura 19.II B). Esta organización se observó solo en los planos más dorsales del complejo pineal (comparar figura 19.II A-C con 19.II A'-C'). En el segundo embrión, observamos una roseta sobre la línea media con una forma asimétrica (figura 19.III A-C). La principal

diferencia con el primer embrión se observó en un plano dorsal (figura 19.III A'-C'). Mientras los núcleos del lado izquierdo de la roseta seguían organizados en torno a esta, los de la derecha no lo hacían (figura 19.II C'). Además, se mantuvo aún la acumulación de actina ligeramente al lado izquierdo del epítalamo (figura 19.II B'). En un plano dorsal del tercer embrión analizado, se observó nuevamente una estructura tipo roseta sobre la línea media y, en este caso, con una forma altamente simétrica (ver laminina, figura 19.IV A). La acumulación de actina se observó sobre la línea media y los núcleos celulares en el lado derecho e izquierdo estaban organizados en torno a esta (figura 19.IV B-C). En un plano más ventral, la acumulación de actina se encontró desplazada ligeramente hacia la izquierda y únicamente se veían los núcleos celulares izquierdos organizados en torno a esta.

Concluimos que en el morfante de *Cdh6* no está alterada la formación de la estructura supracelular tipo roseta del OPp, sin embargo, ésta es más simétrica que en los controles, ya que se ubica sobre la línea media, pero aún se observan células al lado derecho lo cual sugiere que las cp-OPp derechas aún no han migrado por sobre la línea media. Además, algunas características asimétricas se mantienen ya que, al observar la distribución de los núcleos celulares, los del lado izquierdo se ven más cercanos entre sí que los del lado derecho, generando una tendencia de la organización general hacia el lado izquierdo.

## 10. Discusión

La asimetría es una característica conservada en los seres vivos vertebrados y establecida en parte durante el desarrollo embrionario, manifestada estereotípicamente en órganos como el corazón, el intestino y el cerebro [1]. En esta tesis, trabajamos con pez cebra (*Danio rerio*) buscando comprender los mecanismos celulares que llevan al establecimiento de las asimetrías en el epitálamo, una región del cerebro que presenta asimetrías estructurales que son altamente conservadas entre especies y que se desarrollan de manera secuencial.

El primer evento morfológico de asimetría en el epitálamo corresponde a la morfogénesis asimétrica del órgano parapineal [2]. Durante este proceso, las células precursoras del órgano parapineal (cp-OPp), conformadas por células izquierdas y derechas del tercio anterior del complejo pineal, se evaginan inclinándose hacia el lado izquierdo (24-28 hpf) dando paso a una estructura supracelular tipo roseta a este mismo lado (28-32 hpf) [8]. Para formar este núcleo, las cp-OPp derechas migran por sobre la línea media hacia el lado izquierdo, mientras las cp-OPp izquierdas se compactan; organizando las caras apicales en un punto central en común. La activación asimétrica de la vía de señalización Nodal, únicamente en el epitálamo izquierdo, está mediando ambos mecanismos celulares (movimiento y compactación). De este modo, los embriones con ausencia de Nodal en el epitálamo pierden los comportamientos celulares de las cp-OPp izquierdas y derechas, formándose un OPp con una roseta centrada en la línea media a las 32 hpf [8].

Se desconocen los mecanismos celulares que la expresión asimétrica de Nodal está modulando río abajo. En esta tesis, determinamos que la expresión de ARNm *cdh6* es regulada en parte por la vía de señalación Nodal, haciendo que sea asimétrica y con mayor expresión en el territorio de las cp-OPp derechas.

Al caracterizar la expresión de *cdh6* temporalmente, determinamos que se expresaba en las cp-OPp de manera dinámica entre las 24 y 32 hpf, disminuyendo fuertemente a las 28 hpf y comenzando a aumentar a partir de las 30 hpf. Esto nos sugiere que Cdh6 podría tener una función en el periodo inicial de la formación de OPp, cuando los precursores se encuentran a ambos lados de la línea media, y otro luego que el núcleo comienza a adquirir una morfología tipo roseta ubicándose solo al lado izquierdo.

El análisis realizado en embriones con expresión bilateral de Nodal en el epitalamo, sugiere que la expresión de *cdh6* está siendo negativamente regulada por la vía de señalización Nodal desde las 28 hpf hasta al menos las 32 hpf. Por otro lado, en ausencia de Nodal epitalámico, *cdh6* se expresó en los territorios cp-OPp siguiendo un patrón bastante simétrico. Si bien detectamos embriones con expresión asimétrica de *cdh6*, la cuantificación de ésta nos reveló que las diferencias son menores que en la condición silvestre. Por otro lado, el análisis a través de fotografías (estáticas) no nos permitió evaluar si la expresión de *cdh6* era mayor en el mismo territorio a través del tiempo o si, más bien, oscilaba azarosamente entre el lado izquierdo y derecho. A pesar de esto, logramos determinar que poblacionalmente, en embriones sin expresión de Nodal en el

epitálamo, *cdh6* era menos dinámica a través del tiempo. Particularmente, no se observó la caída de expresión a las 28 hpf.

En su conjunto, los resultados de ausencia y expresión bilateral de Nodal en el epitálamo sugieren que la vía de señalización Nodal estaría regulando negativamente la expresión de *cdh6* durante las 24-32 hpf y, de esta forma, mediando su expresión asimétrica hacia el lado derecho en embriones silvestres; que es, justamente, el patrón de expresión observado. Para confirmar estas conclusiones, es necesario hacer experimentos adicionales donde por un lado se analice la expresión y distribución de la proteína de Cdh6 en estos estadios, y por otro se evalúe el comportamiento de expresión de *cdh6* en el epitálamo en condiciones experimentales complementarias a las usadas en esta tesis, como la inhibición farmacológica de la vía de señalización Nodal y su sobre expresión ectópica utilizando un receptor constitutivamente activo de la vía [10][25].

*cdh6* ha sido documentada por expresarse ya desde las 18 hpf en el epitálamo de pez cebra, es decir, al comienzo de la activación de la vía de señalización Nodal [18]. Además, nosotros observamos que a las 24 y 26 hpf existían embriones con expresión atípicamente alta de *cdh6*, destacándose del resto de la población. A partir de esto, creemos la posibilidad de que *cdh6* pudo haber alcanzado mayores niveles de expresión en tiempos previos. Estos casos atípicos corresponderían a embriones con un perfil de expresión retrasado. Con estas interrogantes, creemos necesario en el futuro caracterizar la expresión de *cdh6* en etapas más tempranas, desde las 18 hasta las 24 hpf.



Para comprender el rol de Cdh6 en la morfogénesis asimétrica del OPp, hicimos experimentos de pérdida de función de esta proteína y analizamos la posición y organización en roseta de las células del OPp. En estos embriones, observamos que el OPp y la organización tipo roseta tenía una ubicación simétrica sobre la línea media, aunque internamente las células del OPp adoptaban una disposición asimétrica reflejada en la posición de sus núcleos, con los núcleos de las células izquierdas adoptando posiciones más cercanas entre sí que aquellos de la derecha. Estos resultados sugieren dos cosas. Primero, que Cdh6 sería necesaria para el posicionamiento asimétrico del OPp, al menos en etapas tempranas. Y segundo, que existiría una pérdida en etapas tempranas del comportamiento celular característico de las cp-OPp derechas (su migración hacia la izquierda) y no así, al menos no completamente, el de las izquierdas (su compactación). A partir de estos resultados, planteamos que Cdh6 podría estar mediando el proceso de migración de las cp-OPp derechas por sobre la línea media y, probablemente, favoreciendo mecánicamente al grado de compactación de las cp-OPp izquierdas, un fenómeno que debería corroborarse en el futuro mediante estudios dinámicos de microscopía confocal usando el Tg(*flh*::GFP). Apoyando esta idea, Cdh6 ha sido descrita por estar posibilitando la migración de las crestas neurales en pez cebra [13] y, en este mismo trabajo, hemos determinado que su expresión era justamente mayor en el territorio derecho cp-OPp.

La diferencia entre el fenotipo celular obtenido tras la pérdida de función de Cdh6 (OPp de localización en línea media con una roseta organizada en forma asimétrica) con aquel observado en la ausencia de señalización Nodal en el

epitálamo (OPp de localización en línea media con una roseta organizada simétricamente), nos indican la existencia de otros componentes río abajo de la señalización Nodal, independientes de *Cdh6*, que estarían participando de la morfogénesis asimétrica del OPp, en particular de los comportamientos de compactación celular en el lado izquierdo. Sugerimos que río abajo de la vía de señalización Nodal en las cp-OPp se estarían regulando procesos de compactación celular, posiblemente mediados por moléculas de adhesión célula-célula o de la matriz extracelular, tal como ya ha sido descrito para la morfogénesis asimétrica del tubo intestinal del pez cebra [26]. De esta manera, la activación asimétrica de Nodal podría estar cambiando las propiedades mecánicas del territorio izquierdo con respecto al derecho. Esta posibilidad, junto a los resultados de esta tesis, nos podrían permitir especular sobre la posible secuencia de eventos que gatillarían la morfogénesis asimétrica del OPp. En un comienzo, la expresión asimétrica de la vía de señalización Nodal en el lado izquierdo del epitálamo induciría la compactación de las cp-OPp izquierdas a través de fenómenos de adhesión y/o cambios en la matriz extracelular, lo que modificaría sus propiedades mecánicas volviendo este territorio más rígido. En paralelo, la señalización Nodal reprimiría la expresión de *cdh6* en las cp-OPp izquierdas, generando una asimetría I-D donde las cp-OPp tendrían una expresión relativamente más alta de *cdh6*, que le permitiría mediar un proceso similar a una transición epitelio-mesenquimal, donde las células activarían su migración hacia y por sobre las cp-OPp. Este movimiento direccional sería promovido, y posiblemente gatillado, por las propiedades mecánicas más rígidas del territorio cp-OPp izquierdo. Aquí surge una interrogante. ¿Por qué en ausencia de señalización Nodal en el epitálamo, donde los niveles de *Cdh6* son altos a ambos

lados, las cp-OPp derechas e izquierda no activan la migración y se entremezclan en la línea medía? Una posible explicación sería que en esa condición no existe compactación asimétrica y por lo tanto las propiedades mecánicas del territorio serían homogéneas, no siendo posible el gatillo de la migración. Esta secuencia hipotética de morfogénesis asimétrica del OPp aun siendo plausible y atractiva, deberá ser verificada experimentalmente en el futuro.

## 11. Conclusión

Considerando la hipótesis de que “Cadherina 6 participa en la morfogénesis asimétrica del órgano parapineal en pez cebra, favoreciendo la compactación de las células precursoras izquierdas y la migración de las células precursoras derechas por encima de la línea media hacia el lado izquierdo”, concluimos que los resultados obtenidos respaldan dicha hipótesis. Sin embargo, son necesarios futuros experimentos para confirmar tanto la expresión asimétrica de la proteína como su función en las cp-OPp (ver Proyecciones, sección 12).

Los resultados obtenidos sugieren que la expresión de *cdh6* es inhibida por la señalización Nodal, que se expresa más en las cp-OPp derechas y que Cdh6 funcionalmente estaría mediando el comportamiento diferencial de estas células, es decir, su migración hacia el lado izquierdo; posiblemente influenciando el proceso de compactación de las células izquierdas. Más importante aún, a través de los diferentes experimentos con morfolidos, se refuerza la idea que activación asimétrica de la vía de señalización Nodal es necesaria para mediar la expresión asimétrica de distintos componentes río abajo, siendo uno de ellos Cdh6, lo que permite el desarrollo correcto y asimétrico del OPp.

Estos resultados sitúan a Cdh6 en un nuevo rol en la morfogénesis asimétrica del OPp y refuerzan la idea de que las cadherinas, conocidas como moléculas de adhesión, pueden estar mediando comportamientos de migración celular. Finalmente, los resultados contribuyen a revelar uno de los mecanismos río abajo de Nodal durante el establecimiento de asimetrías izquierda-derecha, contribuyendo al escaso estado del arte en este tema.

## 12. Proyecciones

Habiéndose basado todos los experimentos en el ARNm de *cdh6*, se hace necesario observar la localización funcional de Cdh6 (como proteína) y cuantificar su expresión asimétrica. Además, para corroborar y esclarecer el posible papel de esta proteína en la migración celular, es necesario realizar un seguimiento *in vivo* de la morfogénesis asimétrica mediante microscopía confocal abrogando la función de Cdh6 y analizar la afectación de los comportamientos celulares asimétricos. Finalmente, habiendo sugerido la existencia de otros mecanismos río abajo de Nodal, será necesario examinar otras moléculas de adhesión celular, así como componentes de la matriz extracelular, que puedan estar bajo el control de la vía de señalización Nodal. Proyectamos buscar genes que codifiquen para estos componentes mediante experimentos de transcriptómica diferencial entre los territorios izquierdos y derechos de las cp-OPp.

### 13. Bibliografía

- [1] Concha, M. L., & Wilson, S. W. (2001). Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *Journal of anatomy*, 199(Pt 1-2), 63–84.
- [2] Concha M. L. (2004). The dorsal diencephalic conduction system of zebrafish as a model of vertebrate brain lateralisation. *Neuroreport*, 15(12), 1843–1846.
- [3] Kuan, Y. S., Gamse, J. T., Schreiber, A. M., & Halpern, M. E. (2007). Selective asymmetry in a conserved forebrain to midbrain projection. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 308(5), 669–678.
- [4] Concha, M. L., Signore, I. A., & Colombo, A. (2009). Mechanisms of directional asymmetry in the zebrafish epithalamus. *Seminars in cell & developmental biology*, 20(4), 498–509.
- [5] Bianco, I.H., Carl, M., Russell, C. et al. Brain asymmetry is encoded at the level of axon terminal morphology. *Neural Dev* 3, 9 (2008).
- [6] Concha, M. L., Russell, C., Regan, J. C., Tawk, M., Sidi, S., Gilmour, D. T., Kapsimali, M., Sumoy, L., Goldstone, K., Amaya, E., Kimelman, D., Nicolson, T., Gründer, S., Gomperts, M., Clarke, J. D., & Wilson, S. W. (2003). Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality. *Neuron*, 39(3), 423–438.
- [7] Concha, M. L., Burdine, R. D., Russell, C., Schier, A. F., & Wilson, S. W. (2000). A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron*, 28(2), 399–409.
- [8] Lemus, C.G., Jara, J., Reig, G., Palma K., Härtel, S., & Concha M.L. (2022). Nodal directs the asymmetry of the parapineal organ in zebrafish embryo. *Article in preparation*.
- [9] Signore, I. A., Palma, K., & Concha, M. L. (2016). Nodal signalling and asymmetry of the nervous system. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 371(1710), 20150401.
- [10] Noël, E. S., Verhoeven, M., Lagendijk, A. K., Tessadori, F., Smith, K., Choorapoikayil, S., den Hertog, J., & Bakkers, J. (2013). A Nodal-independent and tissue-intrinsic mechanism controls heart-looping chirality. *Nature communications*, 4, 2754.
- [11] Liang, J.O., Etheridge, A., Hantsoo, L., Rubinstein, A.L., Nowak, S.J., Izpisua Belmonte, J.C., and Halpern, M.E. (2000) Asymmetric Nodal signaling in the zebrafish diencephalon positions the pineal organ. *Development*. 127(23):5101-5112.
- [12] Angst, B. D., Marcozzi, C., & Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of cell science*, 114(Pt 4), 629–641.

- [13] Clay, M. R., & Halloran, M. C. (2014). Cadherin 6 promotes neural crest cell detachment via F-actin regulation and influences active Rho distribution during epithelial-to-mesenchymal transition. *Development*, 141(12), 2506–2515.
- [14] Hiraga, K., Inoue, Y. U., Asami, J., Hotta, M., Morimoto, Y., Tatsumoto, S., Hoshino, M., Go, Y., & Inoue, T. (2020). Redundant type II cadherins define neuroepithelial cell states for cytoarchitectonic robustness. *Communications biology*, 3(1), 574.
- [15] Kubota, F., Murakami, T., Mogi, K., & Yorifuji, H. (2007). Cadherin-6 is required for zebrafish nephrogenesis during early development. *The International journal of developmental biology*, 51(2), 123–129.
- [16] Liu, Q., Londraville, R., Marrs, J. A., Wilson, A. L., Mbimba, T., Murakami, T., Kubota, F., Zheng, W., & Fatkins, D. G. (2008). Cadherin-6 function in zebrafish retinal development. *Developmental neurobiology*, 68(8), 1107–1122.
- [17] Liu, Q., Dalman, M. R., Sarmah, S., Chen, S., Chen, Y., Hurlbut, A. K., Spencer, M. A., Pancoe, L., & Marrs, J. A. (2011). Cell adhesion molecule cadherin-6 function in zebrafish cranial and lateral line ganglia development. *Developmental dynamics*. 240(7), 1716–1726.
- [18] Liu, Q., Liu, B., Wilson, A. L., & Rostedt, J. (2006). Cadherin-6 message expression in the nervous system of developing zebrafish. *Developmental dynamics*, 235(1), 272–278.
- [19] Kushawah, G., Hernandez-Huertas, L., Abugattas-Nuñez Del Prado, J., Martinez-Morales, J. R., DeVore, M. L., Hassan, H., Moreno-Sanchez, I., Tomas-Gallardo, L., Diaz-Moscoso, A., Monges, D. E., Guelfo, J. R., Theune, W. C., Brannan, E. O., Wang, W., Corbin, T. J., Moran, A. M., Sánchez Alvarado, A., Málaga-Trillo, E., Takacs, C. M., Bazzini, A. A., Moreno-Mateos, M. A. (2020). CRISPR-Cas13d Induces Efficient mRNA Knockdown in Animal Embryos. *Developmental cell*, 54(6), 805–817.e7.
- [20] Regan, J. C., Concha, M. L., Roussigne, M., Russell, C., & Wilson, S. W. (2009). An Fgf8-dependent bistable cell migratory event establishes CNS asymmetry. *Neuron*, 61(1), 27–34.
- [21] Ahmad, N., Long, S., & Rebagliati, M. (2004). A southpaw joins the roster: the role of the zebrafish nodal-related gene southpaw in cardiac LR asymmetry. *Trends in cardiovascular medicine*, 14(2), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2003.11.001>
- [22] Nasevicius, A., Ekker, S. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 26, 216–220 (2000).
- [23] Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), 253–310.

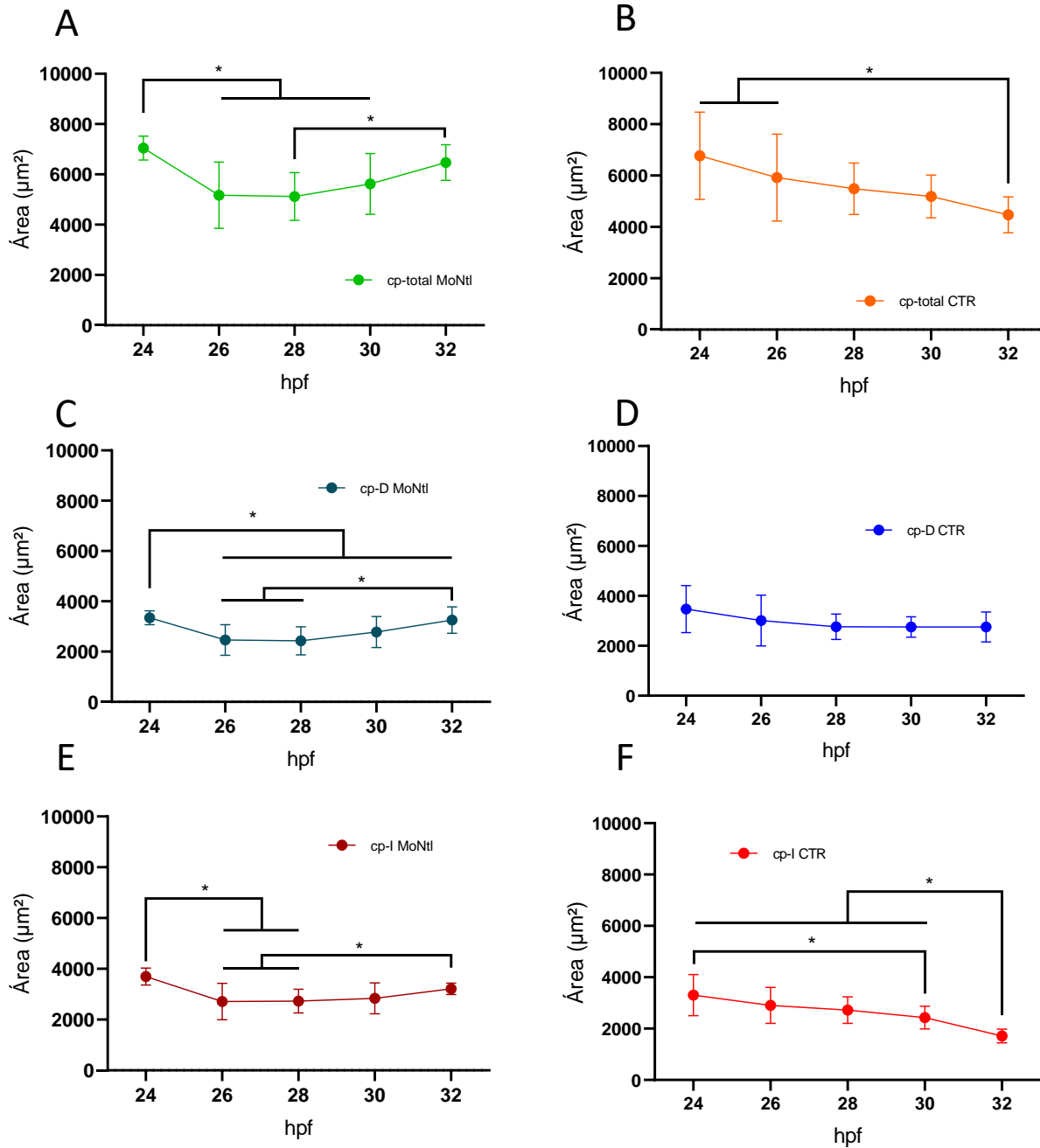
[24] Lauter, G., Söll, I. & Hauptmann, G. Two-color fluorescent in situ hybridization in the embryonic zebrafish brain using differential detection systems. *BMC Dev Biol* 11, 43 (2011).

[25] Aoki, T. O., Mathieu, J., Saint-Etienne, L., Rebagliati, M. R., Peyri ras, N., & Rosa, F. M. (2002). Regulation of nodal signalling and mesendoderm formation by TARAM-A, a TGFbeta-related type I receptor. *Developmental biology*, 241(2), 273–288.

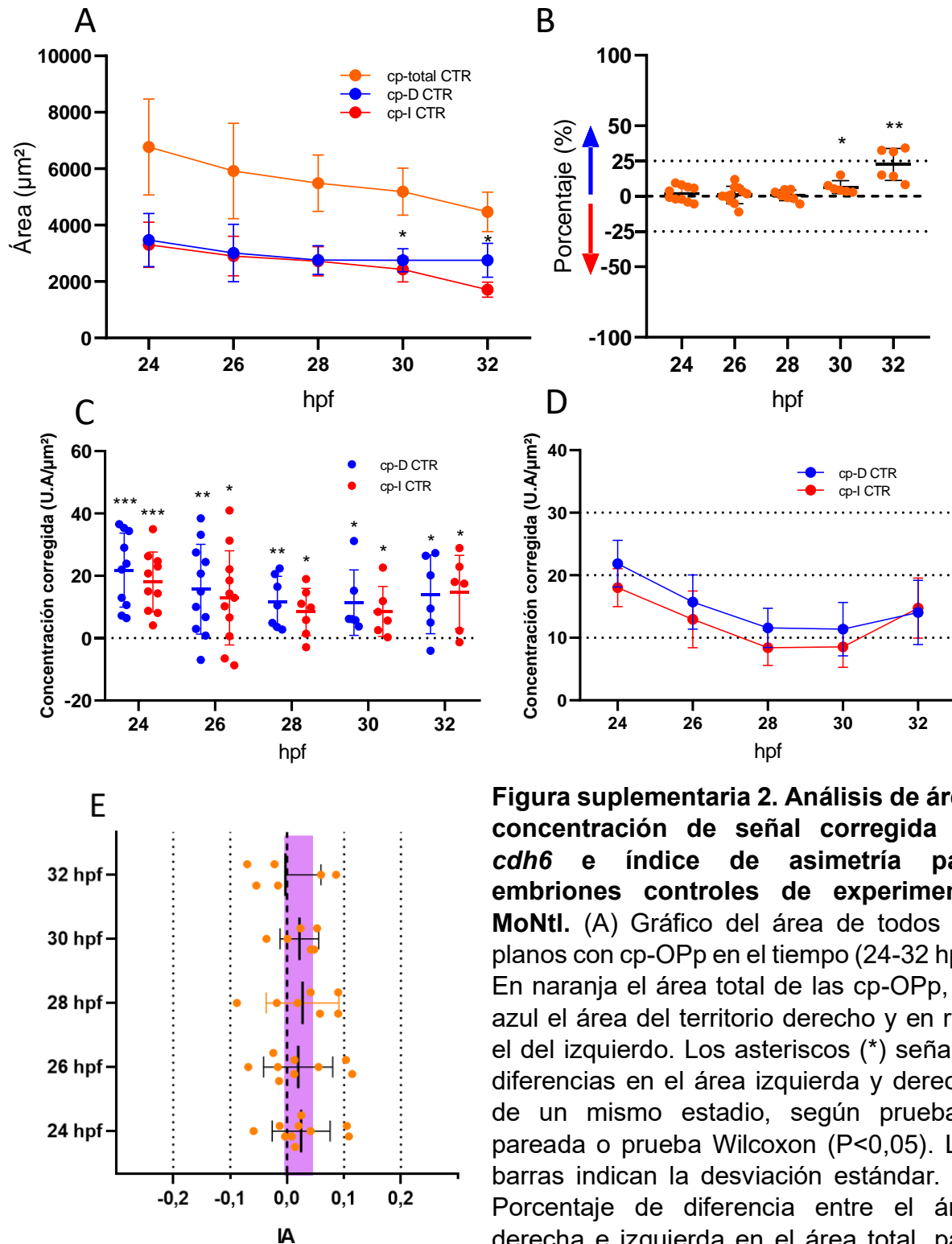
[26] Kurpios, N. A., Iba nes, M., Davis, N. M., Lui, W., Katz, T., Martin, J. F., Izpisua Belmonte, J. C., & Tabin, C. J. (2008). The direction of gut looping is established by changes in the extracellular matrix and in cell:cell adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(25), 8499–8506.



## 14. Figuras suplementarias

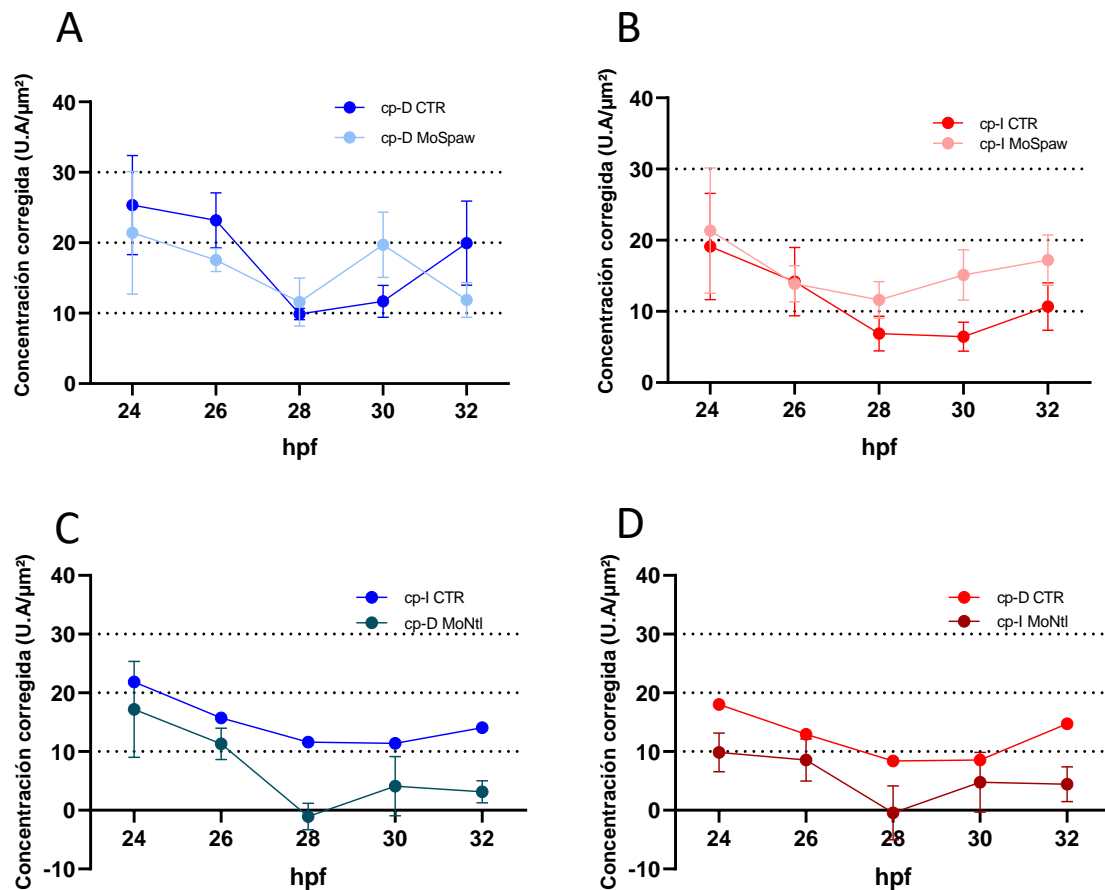


**Figura suplementaria 1. Área total, izquierda y derecha para las cp-OPp de embriones MoNtl y sus controles.** (A, C, E) Áreas para embriones MoNtl: (A) total cp-OPp, (C) territorio derecho y (E) territorio izquierdo. (B, D, F) Áreas para los embriones control: (B) total cp-OPp, (D) territorio derecho y (F) territorio izquierdo. Los asteriscos (\*) señalan diferencias estadísticamente significativas según prueba t no pareada o prueba Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ), para las secuencias temporales con test de ANOVA o Kruskal-Wallis positivas ( $P < 0,05$ ). Las barras indican la desviación estándar.



**Figura suplementaria 2. Análisis de área, concentración de señal corregida de *cdh6* e índice de asimetría para embriones controles de experimento MoNtl.** (A) Gráfico del área de todos los planos con cp-OPp en el tiempo (24-32 hpf). En naranja el área total de las cp-OPp, en azul el área del territorio derecho y en rojo el del izquierdo. Los asteriscos (\*) señalan diferencias en el área izquierda y derecha de un mismo estadio, según prueba t pareada o prueba Wilcoxon ( $P < 0,05$ ). Las barras indican la desviación estándar. (B) Porcentaje de diferencia entre el área derecha e izquierda en el área total, para los diferentes estadios. Los asteriscos (\*) señalan diferencias estadísticamente significativas con cero, según prueba t de una muestra o prueba Wilcoxon de una muestra ( $\alpha = 0,05$ ). Las barras indican la desviación estándar. (C) Gráfico de puntos de concentración de señal corregida de *cdh6* para territorio izquierdo y

derecho cp-OPp desde las 24 hasta las 32 hpf. Los asteriscos (\*) señalan diferencia estadísticamente significativa contra cero, según prueba t de una muestra o prueba Wilcoxon de una muestra (alfa=0,05). Las barras indican la desviación estándar. (D) Gráfico mostrando curva de concentración de señal corregida de *cdh6* en el territorio derecho e izquierdo de las cp-OPp en el tiempo. No hay diferencias significativas entre las concentraciones izquierdas y derechas de un mismo estadio, según prueba t pareada o prueba Wilcoxon ( $P < 0,05$ ). Las barras indican el error estándar. (E) Índice de asimetría calculado con las concentraciones de señal izquierdas y derechas de *cdh6*. En Lila englobando las medias y mediana de todos los estadios. No hay diferencias significativas con cero para ningún estadio, según prueba t de una muestra. Las barras indican la desviación estándar.



**Figura suplementaria 3. Comparación de concentraciones de señal de *cdh6* entre embriones controles y morfantes en territorios izquierdos y derechos de las cp-OPp** (A-B) Concentración de señal corregida de *cdh6* en el tiempo para embriones MoSpaw y sus controles, del territorio derecho de las cp-OPp (A) e izquierdo (B). (C-D) Concentración de señal corregida de *cdh6* en el tiempo para embriones MoNtl y sus controles, del territorio derecho cp-OPp (C) e izquierdo (D). Las barras representan el error estándar.