



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

LAS NADPH OXIDASAS Y SU POSIBLE PAPEL EN LA REGULACIÓN DE LA  
DINÁMICA DE LOCALIZACIÓN DE LA E-CADHERINA EN EL DESARROLLO  
EMBRIONARIO TEMPRANO DEL PEZ CEBRA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
LIBB. ARLEN RAMÍREZ CORONA

TUTOR PRINCIPAL:  
DR. ENRIQUE SALAS VIDAL  
[Instituto de Biotecnología UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DR. LUIS CARDENAS TORRES  
[Instituto de Biotecnología UNAM](#)  
DR. JULIO MORÁN ANDRADE  
[Instituto de Fisiología Celular UNAM](#)

Cuernavaca. Marzo, Diciembre, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

Se agradece el apoyo brindado al presente proyecto a las siguientes instituciones, unidades, laboratorios, colaboradores y técnicos:

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Instituto de Biotecnología (IBt) UNAM.

CONACyT, Número de apoyo 720706.

Laboratorio 15, IBt UNAM.

Dra. Hilda Lomelí Buyoli, Dr. Enrique Salas Vidal, Dra. Denhi Schnabel Peraza, M. en C. Javier Méndez Cruz, a la M. en C. Laura Ramírez Ángeles, M. en C. Dulce I. Benítez Pacheco.

Dr. Mario A. Mendieta Serrano.

Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada UNAM.

Dr. Arturo Pimentel Cabrera, Q.F.B Xóchitl Alvarado Affantranger, Dr. Andrés Saralegui y al Dr. Christopher D. Wood.

Unidad de Docencia y Formación de Recursos Humanos y Unidad de Biblioteca, IBt UNAM.

Gloria Villa Herrera, Lic. J. Antonio Bolaños Guillen e Ing. Jalil Saab Hassanille. B.A. Dip.Lib. A.L.A. Shirley Elizabeth Ainsworth y L.I. Jesús Omar Arriaga Pérez.

Unidad de Secuenciación, IBt UNAM.

Unidad de Cómputo, IBt UNAM.

M.C. Arturo Ocádiz Ramírez, M.E.M. David Santiago Castañeda Carreón, M. en T.I. Juan Manuel Hurtado Ramírez y Ing. Roberto Pablo Rodríguez Bahena.

Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IN210316 y IN212820. Beca PAPIIT de obtención de grado de maestría del proyecto IN212820.

## Dedicatorias

*A mis padres, Alex y Pili, por su amor, aliento y apoyo incondicional.*

*A mi hermano, Andrés, por ser mi compañero de vida y ejemplo a seguir.*

*A mi tía Rosarito, por haberme dado un hogar lejos de casa.*

*A Emiliano, mi mejor amigo, por su amor y su fe en mí.*

*A mis amigos de la maestría, por haber compartido esta etapa juntos.*

*A Lila, por haber sido mi compañera en momentos difíciles.*

*Gracias.*

## Resumen

Las especies de oxígeno reactivas (EOR) a concentraciones fisiológicas están involucradas en la regulación de procesos celulares como la proliferación, la muerte celular, la migración y la adhesión, entre otras. Estos procesos celulares son esenciales en la coordinación de la morfogénesis embrionaria durante el desarrollo temprano en animales. La epibolia, el primer movimiento morfogenético que se lleva a cabo por los embriones de pez cebra consiste en la migración masiva de los blastómeros desde la región animal hacia el polo vegetal. Es durante este proceso que las capas del blastodermo se adelgazan, se expanden y envuelven al vitelo.

Existe mucha información que describe los componentes celulares y moleculares que participan en el comienzo y progresión de la epibolia. No obstante, los mecanismos por los cuales las EOR podrían modular las respuestas celulares que son esenciales para la progresión de la epibolia durante el desarrollo del pez cebra aún no se ha estudiado a profundidad.

Nuestro grupo ha descrito previamente que la producción de EOR por las NADPH oxidasas (Nox) es esencial para la progresión de la epibolia. Cuando los embriones de etapas tempranas se tratan con el inhibidor de las Nox, el VAS2870, se observa un retraso en la migración de ambas capas del blastodermo, hay cambios en el patrón de localización de la E-cadherina en las células de la capa envolvente y se produce la letalidad embrionaria dentro de las primeras 24 h de desarrollo.

En este proyecto encontramos que al tratar simultáneamente a los embriones con VAS2870 y Dynasore, un inhibidor de la endocitosis mediada por la dinamina, se rescata el patrón de localización de la E-cadherina, así como la supervivencia de los embriones a las 24 y 48 h de desarrollo.

Estos resultados nos dan nueva información para dilucidar cuáles son las vías por las cuales las EOR regulan el desarrollo normal en etapas tempranas.

# Contenido

Agradecimientos.....	2
Dedicatorias.....	3
Resumen.....	4
Abreviaturas .....	7
1. Introducción.....	9
1.1. <i>Especies de oxígeno reactivas y las Nox</i> .....	9
1.2. <i>Desarrollo embrionario del pez cebra</i> .....	12
1.3. <i>El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encuentra involucrado en la progresión de la epibolia y la gastrulación en el pez cebra</i> .....	15
1.4. <i>La E-cadherina</i> .....	19
1.5. <i>La E-cadherina, la adhesión celular y su dinámica de localización</i> .....	20
1.6. <i>La E-cadherina y el desarrollo embrionario del pez cebra</i> .....	23
2. Justificación.....	26
3. Hipótesis.....	26
4. Objetivo general .....	26
4.1. <i>Objetivos particulares</i> :.....	27
5. Materiales .....	27
5.1. <i>Líneas de Peces</i> .....	27
5.2. <i>Medios para embriones</i> .....	27
5.3. <i>Medios de cultivo y reactivos</i> .....	28
5.4. <i>Inhibidores</i> .....	28
5.5. <i>Soluciones y buffers</i> .....	28
5.6. <i>Anticuerpos para Inmunofluorescencias (IF), Western Blot (WB) y colorantes</i> .....	30
5.7. <i>Kits</i> .....	31
5.8. <i>Microscopía</i> .....	31
5.9. <i>Equipo de laboratorio</i> .....	31
5.10. <i>Otros materiales y reactivos</i> .....	32
5.11. <i>Software</i> .....	32
6. Métodos.....	33
6.1. <i>Obtención de embriones</i> .....	33
6.2. <i>Tratamientos con inhibidores</i> .....	33
6.3. <i>Inmunofluorescencia</i> .....	33
6.4. <i>Análisis de Imágenes</i> .....	36
6.5. <i>Ensayo de Supervivencia</i> .....	36
6.6. <i>Resumen de embriones y células analizadas por experimento</i> .....	37

6.7. Análisis estadísticos.....	38
7. Resultados .....	39
7.1. Los cambios en la señal de la E-cad causada por la inhibición de las Nox se rescatan por el tratamiento con Dynasore.....	39
7.2. Las modificaciones en las estructuras con F- actina causadas por la inhibición de las Nox se rescatan por el tratamiento con Dynasore.....	44
7.3. Los cambios en la morfología de las células de la EVL causados por la inhibición de las Nox se rescatan por el tratamiento con Dynasore.....	48
7.4. Tratamiento con Dynasore rescata la supervivencia de embriones tratados con el inhibidor de la actividad catalítica de las Nox.....	50
8. Discusión .....	53
8.1. La inhibición de la actividad de la dinamina 2 rescata la disrupción en la dinámica de localización de la E-cadherina ocasionada por la falta de actividad de las Nox.....	54
8.2. La polimerización de la F-actina se encuentra regulada por las EOR producidas por las Nox y la dinamina 2 .....	56
8.3. Las EOR producidas por las Nox y la actividad de la dinamina 2 podría tener efectos sobre la división celular en el desarrollo del pez cebra.....	58
8.4. La interacción entre el producto de las Nox y la endocitosis durante la epibolia regula el desarrollo y promueve la supervivencia .....	61
8.5. La inhibición catalítica de las Nox tiene efectos diferentes en las distintas capas celulares embrionarias durante la epibolia.....	63
9. Conclusiones .....	64
10. Perspectivas .....	65
11. Referencias.....	68
12. Anexos.....	80
Anexo 1. Cuantificación del tamaño de las vesículas de E-cad en las células del EVL.....	80
Anexo 2. Inmunofluorescencia para evaluar a la E-cadherina y al citoesqueleto de actina en embriones tratados con 75 $\mu$ M de Dynasore.....	81
Anexo 3. Western blot para evaluar a la E-cadherina y a la $\beta$ -catenina.....	88
Anexo 4. Inmunofluorescencia para evaluar el patrón de localización de la E-cadherina en la etapa de 500 a 1000 células .....	92
Anexo 5. Inmunofluorescencia para evaluar a la localización subcelular de la $\beta$ -catenina en embriones de 500 a 1000 células y en la etapa de 50-60 % epibolia .....	96
Anexo 6. Ensayo de gota colgante para evaluar la cohesividad de las células del blastodermo.....	99
Anexo 7. Secuencias de E-cadherina.....	104
Anexo 8. Secuencias de Cdc25.....	106

## Abreviaturas

$\beta$ -cat	$\beta$ -catenina
$\cdot$ OH	Radica hidroxilo
$^1$ O <sub>2</sub>	Oxígeno siglete
AP-2	Complejo protéico adaptador 2/ <i>Adaptor protein complex 2</i>
BSA	Albumina de suero bovino/ <i>Bovine serum albumin</i>
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
Cdc25	Fosfatasa Ciclo de división celular 25/ <i>Cell division cycle 25 phosphatase</i>
Cdh1	Cadherina 1
Cdk1	Ciclina dependiente de cinasa 1/ <i>Cyclin dependent kinase 1</i>
CK2	Cinasa de la caseína 2
CM-H2DCFDA	Clorometil-2',7'-diclorodihidro-fluoresceína diacetato
CME	Endocitosis Mediada por Clatrina/ <i>Clathrin Mediated Endocytosis</i>
CYBA/P22phox	Cadena alfa del citocromo b-245/ <i>Cytochrome b-245 alpha chain</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCF	Forma oxidada del CM-H2DCFDA
DCL	Células de la capa profunda/ <i>Deep Cell Layer</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
Duox	Oxidasa dual/ <i>Dual oxidase</i>
EC	Dominio de E-cadherina
E-cad	E-cadherina
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal/ <i>Epidermal growth factor receptor</i>
eNOS	NO sintasa de óxido nítrico endotelial
Eomesa	Eomesodemina A/ <i>Eomesodermin A</i>
EOR	Especies de Oxígeno Reactivas
EpCAM	Molécula de adhesión celular epitelial/ <i>Epithelial cellular adhesion molecule</i>
EPS15	Substrato 15 del receptor del factor de crecimiento epidermal/ <i>Epidermal growth factor receptor substrate 15</i>
Erk 2	Cinasa regulada por señales extracelulares 2/ <i>Extracellular signal-regulated kinase 2</i>
ESCRT	Complejo de Clasificación Endosomal Requerido para el Transporte/ <i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
EVL	Células de la capa envolvente/ <i>Enveloping Layer</i>
GSK3 $\beta$	Cinasa de la glicógeno sintasa 3 beta/ <i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico
HGF-Met	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos Met/ <i>Hepatocyte grow factor receptor Met</i>
HOCl	Ácido hipoclorórico
hpf	Horas post fertilización
HRP	Peroxidasa de rábano/ <i>Horseradish peroxidase</i>
MDM2	Homólogo de doble minute 2 de ratón/ <i>Mouse double minute 2 homolog</i>
Mxtx2	Gen Homeobox tipo mixto/ <i>Mix-type homeobox gene</i>



NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ncf1/p47	Factor citosólico de neutrófilos 1/ <i>Neutrophil cytosolic factor 1</i>
ncf2/p67	Factor citosólico de neutrófilos 2/ <i>Neutrophil cytosolic factor 2</i>
Nox	NADPH Oxidasa
NOXA1	Activador 1 de la NADPH oxidasa/ <i>NADPH oxidase activator 1</i>
NOXO1	Organizador 1 de la NADPH oxidasa/ <i>NADPH oxidase organizer 1 (noxo1a/noxo1b)</i>
O <sub>2</sub>	Dioxígeno
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ion superóxido
O <sub>3</sub>	Ozono
PFA	Paraformaldehído
PKC	Proteína cinasa C
Pou5f1	Dominio Pou clase 5, factor transcripcional 1/ <i>Pou Domain, class 5, transcription factor 1</i>
Rac1	Substrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionada a Ras/ <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
rcf	fuerza centrífuga relativa
RO <sup>•</sup>	Alcoxilo
RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Peroxilo
SFB	Suero fetal bovino
SFKs	Familia de Src cinasas/ <i>Src family kinases</i>
SOD	Superóxido dismutasa
WT	Cepa silvestre/ <i>Wild type</i>
YSL	Sincicio de la célula del vitelo / <i>Yolk syncytial layer</i>

# 1.Introducción

## 1.1. Especies de oxígeno reactivas y las Nox

En 1954 se describió por primera vez la presencia de radicales libres en algunos sistemas biológicos al ser observados en una gran variedad de tejidos de animales y plantas (Commoner et al., 1954). Algunos radicales libres forman parte de un grupo de moléculas derivadas de la reducción parcial del dioxígeno ( $O_2$ ), conocidas como especies de oxígeno reactivas (EOR).

Desde su descubrimiento se consideraron a los radicales libres y a las EOR como agentes de daño implicados en distintas patologías (Halliwell & Gutteridge, 1985). Estos estudios se enfocaron en estudiar los efectos que las EOR tenían sobre las células en un contexto de estrés oxidante, proceso en el cual los compuestos oxidantes generados rebasan la capacidad de los sistemas antioxidantes (Lushchak, 2014). Hoy en día se sabe que las EOR son compuestos que se producen en condiciones fisiológicas y que la señalización redox mediada por estas moléculas participa en regular las respuestas celulares en contextos no patológicos como en el envejecimiento, la respuesta inmune y la fertilidad (Bardaweel et al., 2018; Sies, 2017).

Las EOR que se producen en condiciones fisiológicas por sistemas biológicos incluyen al ion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), el peroxilo ( $RO_2^{\cdot}$ ) y el alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ ) (Bardaweel et al., 2018; Bedard & Krause, 2007). Existen varias vías responsables de la producción de estas EOR en las células. Una, es como subproductos de la respiración celular aerobia y otros procesos metabólicos oxidantes realizados en organelos como la mitocondria, los peroxisomas y el retículo endoplásmico (Covarrubias *et al.*, 2008; Hernández-García *et al.*, 2010). Otra vía de producción es por la acción de enzimas especializadas, un ejemplo de estas son las NADPH oxidasas (NOX), las cuales son enzimas transmembranales que producen algunas EOR a partir del  $O_2$  de forma regulada.

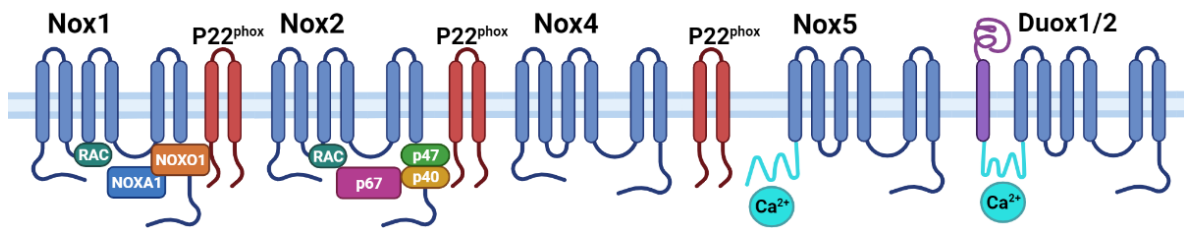
Las NOX están compuestas por un dominio catalítico y subunidades accesorias que fungen como organizadoras o activadoras. Estas enzimas transfieren electrones provenientes del NADPH citoplasmático al O<sub>2</sub> para reducirlo parcialmente y formar O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, el cual a su vez puede dismutar en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fagosomas y/o en el espacio extracelular (Bedard & Krause, 2007). Se ha encontrado expresión de las NOX tanto en mamíferos como en otros vertebrados en distintos puntos de la ontogenia de los diferentes organismos y en tejidos diversos como en el sistema vascular, en gónadas, en el musculo liso, tejido epitelial, tejido nervioso, células endoteliales y fibroblastos (Aguirre and Lambeth, 2010; Weaver, Leung and Suter, 2016).

En mamíferos se han identificado siete enzimas homólogas pertenecientes a la familia de las NOX, así como algunas variantes de procesamiento de mRNA alternativo (*splicing* en inglés) (Bedard & Krause, 2007). En esta familia se encuentran aquellas que requieren de la subunidad CYBA/P22phox para su activación (NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4) y aquellas que son reguladas por Ca<sup>2+</sup> (NOX5, DUOX1 y DUOX2). La proteína P22phox es una subunidad pequeña que se asocia a la membrana y estabiliza a la enzima NOX. De igual manera, en el caso de NOX1, NOX2 y NOX3 la CYBA/P22phox sirve para reclutar a las subunidades reguladoras (Aguirre & Lambeth, 2010).

Desde un punto de vista estructural, las Nox se pueden dividir en tres subfamilias. La primera subfamilia está compuesta por NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4, las cuales están conformadas únicamente por dos dominios: un dominio transmembranal N-terminal, que es el sitio catalítico conformado por dos grupos hemo, y un dominio de deshidrogenasa en el C-terminal el cual se asocia a FAD y NADPH. La segunda subfamilia integrada por NOX5 presenta un dominio adicional tipo EF de unión a Ca<sup>2+</sup> y se regula tanto con Ca<sup>2+</sup> como por la proteína cinasa C (PKC). Por último, la tercer subfamilia compuesta por DUOX1 y DUOX2 tiene, además del dominio de mano EF y activación por Ca<sup>2+</sup>, un dominio en el extremo N-terminal que es homólogo al de las hemoperoxidasas (Aguirre & Lambeth, 2010).

Las NOX1 a 5 producen  $O_2^{\cdot-}$  el cual es convertido en  $H_2O_2$  de forma espontánea o por acción de la superóxido dismutasa (SOD). Por otra parte, DUOX 1 y 2 pueden convertir al  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  de forma directa por su dominio de peroxidasa (Ameziane-El-Hassani et al., 2005).

En el genoma del pez cebra se han descrito a seis genes Nox: *nox1*, *nox2*, *nox4*, *nox5*, *duox1* y *duox2* (Kawahara et al., 2007; Trubiroha et al., 2018; Weaver et al., 2016). También se ha observado la transcripción de las subunidades organizadoras *cyba/p22phox*, *ncf1/p47*, *noxo1a* y *noxo1b* y las subunidades activadoras *ncf2/p67* y *nox1* (López Lomas, 2019). Como en el caso de las NOX de humano, Nox1, Nox2 y Nox4 del pez cebra se asocian con la subunidad organizadora Cyba/P22phox. Nox1 se asocia además con Noxo1, Noxa1 y la GTPasa pequeña Rac1. Nox2 se asocia por otro lado con la Ncf1/p47, Ncf2/p67 y la GTPasa pequeña Rac (Fig. 1) (Aguirre & Lambeth, 2010; Niethammer et al., 2009).



**Figura 1. Familia de las Nox presentes en el pez cebra.** Nox 1, 2 y 4 se muestran asociadas a P22phox. Nox1 y 2 presentan además unidades reguladoras y activadoras asociadas. Nox5 presenta un sitio de unión a  $Ca^{2+}$ , al igual que Duox1 y Duox2 y además un dominio de peroxidasa N-terminal expuesto al medio extracelular (Niethammer et al., 2009). Figura realizada con el software de BioRender (Aoki, 2017).

Aun cuando el  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  producidos por estas enzimas tienen una vida media relativamente corta en comparación con otras moléculas, 1  $\mu s$  y 1 ms respectivamente (Reth, 2002), se ha descrito que estas moléculas tienen un papel importante en la regulación de distintos procesos celulares *in vivo* e *in vitro*. El  $H_2O_2$  y otras EOR son capaces de interactuar y oxidar biomoléculas como proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos, afectando su estructura o su función (Bedard & Krause, 2007; Bienert et al., 2006; Halliwell & Whiteman, 2004). Es por esta característica que las EOR se han relacionado con la modulación de la

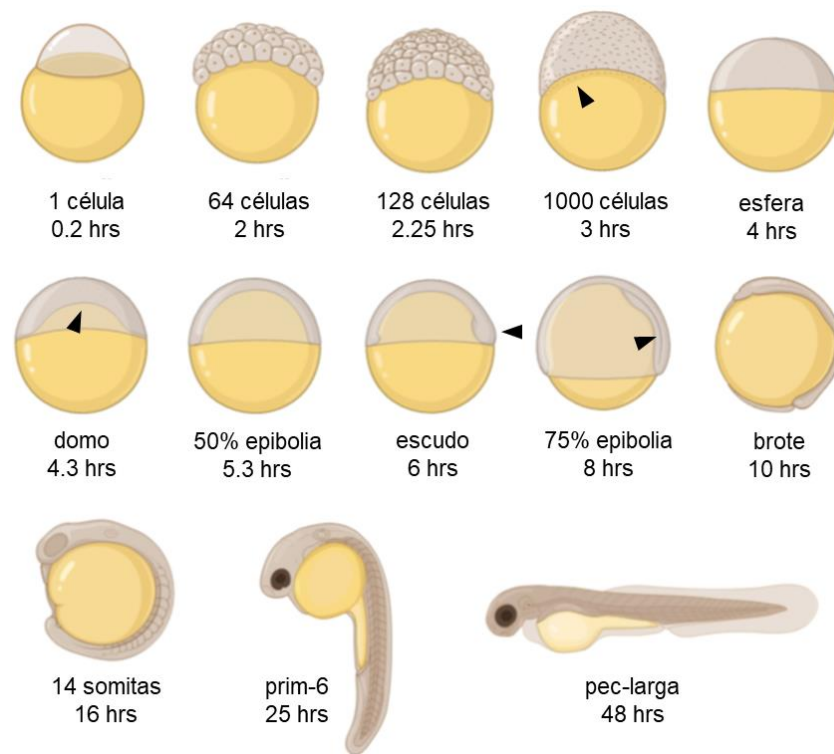
expresión de distintos genes, así como con la regulación del comportamiento celular como la inhibición o la inducción de la proliferación, la diferenciación celular, la migración y la apoptosis (Al-Mehdi et al., 2012; Fogarty et al., 2016; Hernández-García et al., 2010; Hurd et al., 2012; Owusu-Ansah & Banerjee, 2009; Salas-Vidal et al., 1998). De igual manera, las EOR pueden participar de forma directa en otros procesos, ya que se ha observado que el  $H_2O_2$  funciona como un quimioatrayente para células del sistema inmune en señal de daño (Niethammer et al., 2009).

Dado que las EOR producidas por las Nox son capaces de modular una gran cantidad de respuestas celulares específicas en diferentes contextos y su dinámica de producción y difusión generan gradientes en distintos tejidos, se ha propuesto que el  $H_2O_2$  funciona como una molécula de señalización o morfógeno (Covarrubias et al., 2008; Hernández-García et al., 2010; Ray, Huang and Tsuji, 2012). Por ello nos enfocamos en estudiar el papel que puede tener el  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  en contextos fisiológicos, además de que nos preguntamos cuáles son las vías que se regulan por ellos durante el desarrollo embrionario utilizando al pez cebra como modelo de estudio.

## 1.2. Desarrollo embrionario del pez cebra

El pez cebra (*Danio rerio*) es un teleósteo tropical de agua dulce popularmente utilizado como modelo animal para estudiar el desarrollo embrionario de vertebrados. El pez cebra se adoptó como un modelo biológico por varias cualidades: su crianza y reproducción en el laboratorio es relativamente fácil y económica, comparados con otros modelos animales; tienen una alta tasa de fecundidad ya que en una sola cruce las hembras son capaces de desovar decenas de embriones (Eaton & Farley, 1974); los adultos alcanzan la madurez sexual a los tres meses de edad y el desarrollo temprano es relativamente rápido, ya que los primordios de los principales órganos se establece alrededor de las 24 h (Kimmel et al., 1995). Otra ventaja que tiene el pez cebra es que el desarrollo embrionario es externo y el corion y los embriones son transparentes, lo que permite observar el desarrollo de tejidos y órganos con facilidad, al igual que generar líneas

transgénicas con marcadores fluorescentes para células o proteínas específicas es un proceso relativamente sencillo (Gilbert, 2013; Nasiadka & Clark, 2012).



**Figura 2. Desarrollo embrionario del pez cebra.** Las puntas de flecha denotan características morfológicas clave para identificar las etapas. Punta de flecha en 1000 células señala los núcleos liberados en el vitelo. Punta de flecha en domo señala ascenso del vitelo. Punta de flecha en escudo denota el escudo embrionario. Punta de flecha en 75 % de epibolia señala el surco de Brachet, la división entre el hipoblasto y el epiblasto. Algunas etapas se omitieron para simplificar la figura. Modificada de Kimmel et al., 1995 y realizada con el software de BioRender (Aoki, 2017).

El desarrollo embrionario del pez cebra inicia aproximadamente 20 min después de haberse llevado a cabo la fertilización externa del ovocito (Fig. 2). Tras la fecundación, corrientes citoplasmáticas provocan la segregación del citoplasma de la primera célula del vitelo, el componente nutritivo del ovocito. Esta primera célula origina al blastodisco y especifica al polo animal del embrión y también determina al polo vegetal en la región opuesta en la cual se localiza el vitelo (Fuentes & Fernández, 2010; Kimmel et al., 1995).

El blastodisco posteriormente pasa por una etapa de divisiones celulares rápidas y sincronizadas, manteniéndose sobre el vitelo. Esta etapa de divisiones sucesivas dura aproximadamente 2 h después de la fertilización (2 hpf). A las 2.25

hpf, el embrión entra en el periodo de blástula durante el cual los blastómeros se establecen como blastodermo. A las 3 hpf se lleva a cabo un cambio en el embrión denominado transición de blástula media, etapa del desarrollo en la cual se activa la transcripción del genoma embrionario. Esta transición se lleva a cabo cuando el blastodermo del embrión está conformado por alrededor de 1000 células. Es también en esta etapa de 1000 células que el vitelo se convierte en el sincicio de la célula del vitelo (YSL por sus siglas en inglés *yolk syncytial layer*), célula multinucleada formada tras la liberación de núcleos de las células del blastodermo marginal al vitelo (Kimmel et al., 1995; Lepage & Bruce, 2010).

En la etapa de esfera, alrededor de las 4 hpf, el embrión presenta tres linajes celulares distintos. Sobre la superficie de la YSL, la cual se estableció en etapas anteriores, se encuentran las células de la capa profunda (DCL por sus siglas en inglés *deep cell layer*), células redondas que se encuentran laxamente asociadas entre sí y con mucho espacio intersticial. Sobre las DCL se encuentran las células de la capa envolvente (EVL por sus siglas en inglés *enveloping layer*), células delgadas y alargadas las cuales forman una monocapa de tipo epitelial que recubre y protege al blastodermo. En el borde del blastodermo las células de la EVL se encuentran fuertemente asociadas con la YSL mediante uniones estrechas (Lepage et al., 2014).

Es a las 4.3 hpf que comienza un proceso de reorganización de la distribución de las células del blastodermo (Kimmel et al., 1995). Esta reorganización se logra gracias al primer movimiento morfogenético realizado por el embrión conocido como epibolia. La epibolia consiste en la migración en masa de las células del blastodermo, el cual se adelgaza por la intercalación radial de los blastómeros de la DCL y se extiende sobre la superficie del vitelo, recubriendo esta estructura desde el polo animal hasta el polo vegetal (Gilbert, 2013; Lepage & Bruce, 2010). El proceso de epibolia se encuentra coordinado por los núcleos de la YSL, los cuales inician y determinan la dirección de la migración celular a través de la acción concertada de su red de filamentos de actina y microtúbulos (Behrndt et al., 2012; Solnica-Krezel & Driever, 1994).

Esta migración en masa, junto con los otros movimientos propios de la gastrulación, culminan con el recubrimiento total del vitelo por las células del blastodermo y como resultado de estos movimientos de migración e intercalación celular, así como de internalización en la región del escudo, se derivan las primeras 2 capas celulares en el embrión: el epiblasto en la capa más superficial (ectodermo) y el hipoblasto (mesendodermo) que contacta al sincicio del vitelo (Kimmel et al., 1995; Lepage & Bruce, 2010; Warga & Kimmel, 1990).

### *1.3. El $H_2O_2$ se encuentra involucrado en la progresión de la epibolia y la gastrulación en el pez cebra*

La epibolia es un proceso complejo en el cual participan una gran variedad de factores transcripcionales, cinasas, cambios en la dinámica del citoesqueleto, morfógenos y proteínas de adhesión celular que coordinan y promueven su progresión durante el desarrollo temprano del pez cebra.

Dentro de los factores transcripcionales importantes se encuentran las proteínas de herencia materna Pou5f1 y Eomesa, las cuales están involucradas con la iniciación de la epibolia (Lepage & Bruce, 2010). Eomesa participa en la intercalación radial de las células del epiblasto y también activa al factor transcripcional de expresión cigótica Mtx2, el cual regula genes involucrados en la formación y el funcionamiento de la red de microtúbulos y filamentos de actina de la YSL (Bruce et al., 2005; Wilkins et al., 2008). El factor Pou5f1 también participa en la progresión de la epibolia al estar involucrado en la organización de los microtúbulos de la YSL, así como dinámica de localización de la E-cad (Lachnit et al., 2008; Song et al., 2013).

Otro proceso que participa en la iniciación, progresión y culminación de la epibolia es la adhesión celular. En el pez cebra existen varias familias de proteínas de adhesión celular que están implicadas en el desarrollo temprano y en la morfogénesis del embrión. Estas proteínas incluyen las proteínas priónicas, cadherinas, protocadherinas y EpCAM entre otras (Aamar & Dawid, 2008; Angst et



al., 2001; Carreira-Barbosa et al., 2009; Málaga-Trillo et al., 2009; Schnell et al., 2013).

En otros grupos nunca ha sido estudiado el papel que pueden tener las EOR como elementos reguladores de la epibolia y la gastrulación. Recientemente fue en nuestro grupo donde se identificó por primera vez al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un factor crítico para la progresión de la epibolia (Mendieta-Serrano et al., 2019). En este trabajo evaluaron si existía una producción importante de EOR durante el desarrollo embrionario temprano del pez cebra y, de ser así, si esta producción tenía una dinámica o un patrón discreto en distintas regiones del embrión.

Para ver este patrón de producción de EOR se utilizó el compuesto clorometil-2',7'-diclorodihidro-fluoresceína diacetato (CM-H<sub>2</sub>DCFDA), el cual al ser oxidado se convierte en el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) el cual emite a 525 nm al ser excitado con una longitud de onda de 488 nm (Halliwell & Whiteman, 2004). Con este compuesto se logró ver *in vivo* el estrés oxidante y se observó una acumulación importante de DCF en el espacio extracelular ubicado entre las DCL y en una cavidad con forma de anillo localizada en el frente de migración de las DCL durante la epibolia. Este patrón de localización sugería que hay EOR que se producen durante esta etapa y podrían participar en la progresión de la epibolia.

Una vez que se detectó esta producción y acumulación de EOR se indagó cuál era el mecanismo de su producción durante la epibolia y si la familia de enzimas Nox estaba involucrada en este proceso. En el laboratorio se encontró evidencia de la expresión de las distintas Nox, así como de distintas subunidades reguladoras, durante el desarrollo embrionario temprano del pez cebra. En etapas tempranas, de 8 a 16 células y en esfera, se encontró expresión de *nox1* y *duox1*. En etapas posteriores, en escudo y a las 24 h de desarrollo, se encontró mRNA de *nox1*, *nox2*, *nox5* y *duox1* (datos no publicados de Javier Méndez Cruz y Denhi Schnabel Peraza). Por otro lado, la subunidad reguladora *p22phox* también mostró expresión desde etapas tempranas, de ocho a 16 células y hasta las 24 h, así también como

*p47*, *noxo1a*, *noxo1b* y *noxa1* (datos no publicados de Javier Méndez Cruz; López Lomas, 2019).

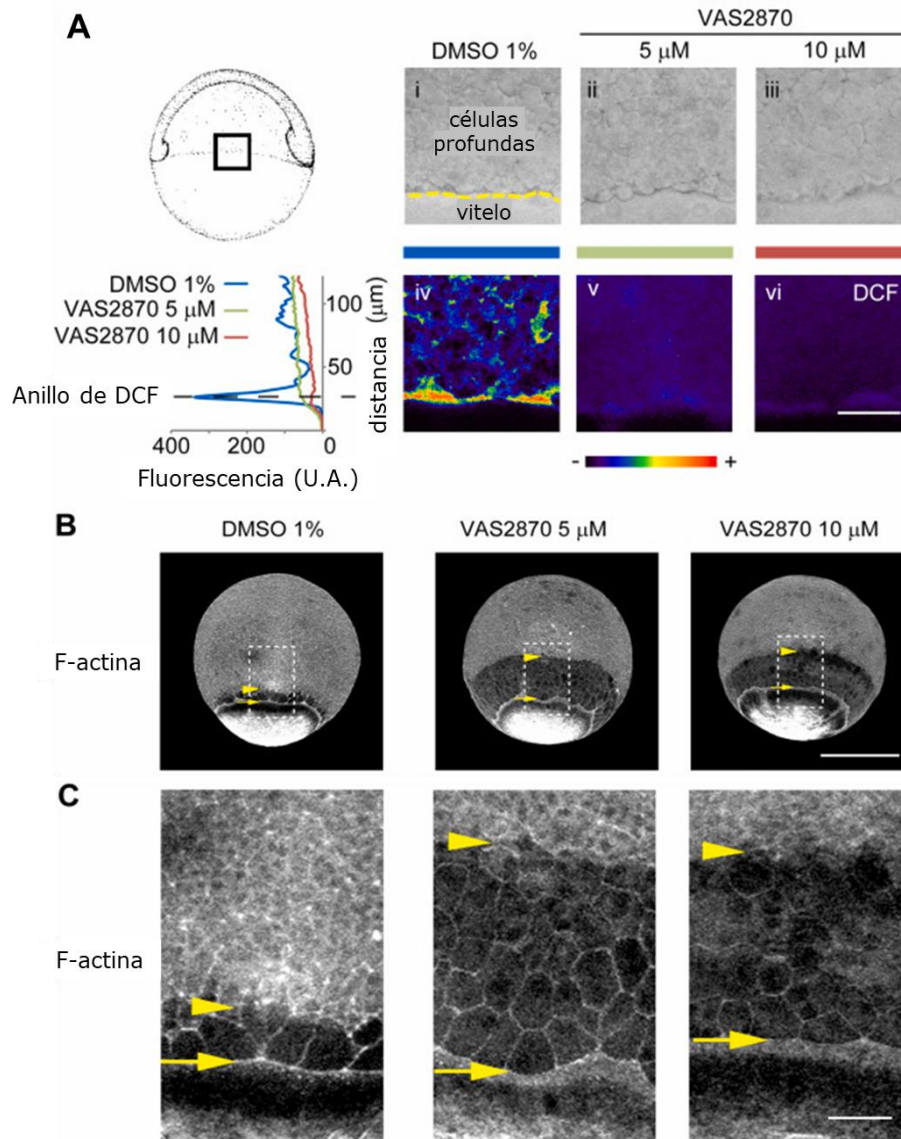
Para probar si la producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  por las Nox participan en la oxidación del DCF, se incubó a los embriones con el fármaco VAS2870, el cual es un inhibidor general de la actividad de las Nox (ten Freyhaus et al., 2006). Este tratamiento resultó en una disminución en el nivel de intensidad de DCF (Fig. 3A), el cual indicaba una disminución en la formación de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  tanto en el espacio intersticial de las DCL como en el frente de migración, así como también en el citoplasma de las células del blastodermo. Estos resultados indican que las Nox se encuentran involucradas en la producción de las EOR observadas durante la epibolia.

Se probó también si la disminución de los productos catalíticos de las Nox durante la epibolia tenía algún efecto sobre este proceso morfogénico. Lo que se observó fue que el VAS2870 provocó un retraso en la progresión de la epibolia, siendo la capa profunda la que tuvo un mayor retraso en el avance sobre el vitelo (Fig. 3B y C). Estos resultados indican que el  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  producidos por parte de las Nox son esenciales para la progresión de la epibolia.

Para comprobar que los efectos observados por el tratamiento con el VAS2870 fueron ocasionados por la inhibición de la actividad catalítica de las Nox y no por un posible efecto inespecífico del fármaco, se realizaron tratamientos con  $H_2O_2$ . Este compuesto es el producto final de las Duox y de la transformación del  $O_2^{\cdot-}$  producido por las demás Nox por acción de la SOD. Se encontró que los tratamientos con  $H_2O_2$  rescataron el retraso en la progresión de la epibolia en las células de la DCL provocado por la exposición al VAS2870 (Mendieta-Serrano et al., 2019). Estos resultados corroboran que el  $H_2O_2$  participa en la progresión de la epibolia.

Por otra parte, en experimentos donde se incubaron embriones en presencia de  $H_2O_2$  exógeno, se observó que éstos completaban el proceso de epibolia más rápido que embriones control (Mendieta-Serrano et al., 2019). Falta caracterizar si

este fenómeno fue ocasionado por una inducción temprana de la epibolia o si fue porque la motilidad celular se encuentra modificada.



**Figura 3. La actividad de las Nox se requiere para la generación de EOR y para la migración de las células de la capa profunda durante la epibolia en el pez cebra.** **A:** Embriones incubados por 1 h con el inhibidor general de las Nox VAS2870 muestran una disminución significativa de los niveles de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en las células de la capa profunda y en el frente de migración. (i, ii, iii) muestran imágenes del campo claro y (iv, v, vi) muestran las imágenes correspondientes de los tratamientos adquiridas en el confocal. **B:** La progresión de la epibolia se ve afectada por el VAS2870 ya que las células de la capa profunda no migran de forma adecuada. Recuadros de líneas punteadas denotan el área ampliada en **C** del frente de migración. **C:** La F-actina también se ve afectada en los embriones tratados con VAS2870. Flechas y puntas de flecha denotan la separación entre el frente de migración y el borde de la capa profunda. Los núcleos de las células se marcaron con DAPI y faloidina marca a la F-actina en los bordes de las células. Barra de escala de 50 μm. Tomado y modificado de Mendieta-Serrano *et al.*, 2019.

Ya que se encontró que el  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  son esenciales para la progresión de la epibolia, se quiso investigar cuál era el mecanismo mediante el cual estas EOR se encuentran regulando este proceso y cuáles podrían ser los blancos directos o indirectos de estas moléculas. Existen en la literatura varios reportes de genes que al ser afectados alteran la progresión de la epibolia: el mutante Half baked, el alelo hipomórfico *cdh1<sup>rk3</sup>*, morfolinis contra *cdh1*, mutante del factor Pou5f1/Oct4, morfolinis contra *Prp1* y morfolinis contra *Src's* (Babb & Marrs, 2004; Kane et al., 2005; Málaga-Trillo et al., 2009; Sempou et al., 2016; Shimizu et al., 2005; Song et al., 2013). En estos modelos, el gen o la proteína que se encuentra directa o indirectamente afectada es la E-cadherina, proteína clave durante el desarrollo embrionario para la morfogénesis de distintos tejidos y órganos, así como en la regulación de la motilidad celular de la epibolia (Babb & Marrs, 2004; Halbleib & Nelson, 2006).

#### 1.4. La E-cadherina

Las cadherinas son una familia de glicoproteínas transmembranales que participan en la adhesión celular dependiente de  $Ca^{2+}$ . Existen cinco subfamilias de cadherinas las cuales están compuestas por las cadherinas Tipo I, las Tipo II, las cadherinas desmosomales (desmocollinas y desmoglobinas), las protocadherinas y las moléculas relacionadas a cadherina (Van Roy & Berx, 2008). La E-cadherina (E-cad), inicialmente conocida como uvomorulina, es una cadherina del Tipo I y es codificada por el gen *cdh1* en el pez cebra (Angst et al., 2001).

La E-cad se sintetiza en el retículo endoplasmático como un precursor inmaduro de 140 kDa, el cual se localiza posteriormente en vesículas en el citoplasma. Este precursor inmaduro es procesado en el Golgi por la furina, una enzima perteneciente a la familia de convertasas de proteínas (Geng et al., 2012). La furina realiza un corte proteolítico en el extremo N-terminal de la E-cad y la convierte a su forma madura de 120 kDa, la cual se transloca a la membrana plasmática para llevar a cabo su función como proteína de adhesión (Ozawa & Kemler, 1990).

En las células, la E-cad madura se encuentra en las uniones adherentes llevando a cabo interacciones célula-célula en el espacio extracelular. Estas uniones se logran mediante su dominio extracelular o ectodominio, compuesto de cinco repeticiones EC en tándem (EC1-EC5) y cuatro sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (Kane et al., 2005; Van Roy & Berx, 2008). En el dominio EC5, la E-cad presenta además cuatro cisteínas conservadas que también se encuentran involucradas en la adhesión y permiten la agregación celular (Ozawa et al., 1990).

Durante muchos años se consideraba que las interacciones formadas por la E-cad eran únicamente del tipo trans-homotípicas entre células que expresaban la misma proteína, pero en años recientes se ha descrito que la E-cad puede también formar uniones adherentes con otros miembros de la familia de las cadherinas como la N-cadherina (Labernadie et al., 2017; Perez-Moreno et al., 2017).

A continuación del ectodominio, la E-cad presenta un único dominio transmembranal y un dominio citoplasmático. El dominio intracelular se encuentra dividido en dos regiones: el yuxtamembranal, el cual presenta sitios de unión a la p120-catenina, y la región de unión a  $\beta$ -catenina. El dominio citoplasmático también presenta sitios de unión para la  $\alpha$ - y  $\gamma$ -catenina, las cuales junto con la  $\beta$ -catenina son esenciales en el funcionamiento de la E-cad ya que participan en asociar a las uniones adherentes con el citoesqueleto de actina. Esta unión con el citoesqueleto estabiliza y da resistencia a las uniones adherentes (Brandes et al., 2014; Hoschuetzky et al., 1994; Kane et al., 2005; Van Roy & Berx, 2008; Xiao et al., 2007).

### *1.5. La E-cadherina, la adhesión celular y su dinámica de localización*

La E-cad se asocia a la  $\beta$ -catenina en etapas tempranas de su biosíntesis y ambas proteínas se translocan a la membrana como un complejo (Fig. 4). La p120-catenina y la  $\alpha$ -catenina por otro lado, se asocian con el dominio citoplasmático de la E-cad una vez que la región de pro-proteína se escinde por la furina y el complejo de E-cad/ $\beta$ -catenina se encuentran cerca de la membrana. La p120-catenina también acelera su transporte hacia la membrana al interactuar con cinecinas y

protege a la E-cad recién sintetizada de entrar a la vía de reciclaje de vesículas y ser degradada (Van Roy & Berx, 2008; Xiao et al., 2007).

Además de la asociación con distintas proteínas, la acción de cinasas citoplasmáticas como las Src cinasas (SFKs) Fyn y Yes, así como por el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)- Met, la CK2 y la GSK3  $\beta$ , también participan en la regulación de la estabilidad de las uniones adherentes al generar diferencias en el estado de fosforilación de tanto la E-cad como de la  $\beta$ -catenina y en consecuencia, modificar la estabilidad del complejo de adhesión en la membrana (Huber & Weis, 2001; Jose Piedra et al., 2003; José Piedra et al., 2001; Van Roy & Berx, 2008).

La E-cad presenta en el dominio citoplasmático, además de sitios de unión a cateninas, una repetición de tres tirosinas conservadas, las cuales son sensibles a fosforilación por SFKs y HGF-Met. Existen reportes de que la fosforilación de E-cad por parte de las SFKs y HGF-Met promueven su asociación con Hakai, una E3 ubiquitin-ligasa. Esta interacción lleva a la endocitosis y degradación de la E-cad (Fujita et al., 2002). No obstante, la unión de la p120-catenina compite con esta fosforilación y bloquea la endocitosis de la E-cad por la vía dependiente de clatrina y dinamina (Davis et al., 2003; Ishiyama et al., 2010; Miyashita & Ozawa, 2007). Las SFKs, HGF-Met y EGFR también son responsables de la fosforilación de tirosinas en la  $\beta$ -catenina, modificación que disminuye su afinidad por E-cad y  $\alpha$ -catenina, debilitando el complejo de las uniones adherentes (Hoschuetzky et al., 1994; Jose Piedra et al., 2003; José Piedra et al., 2001).

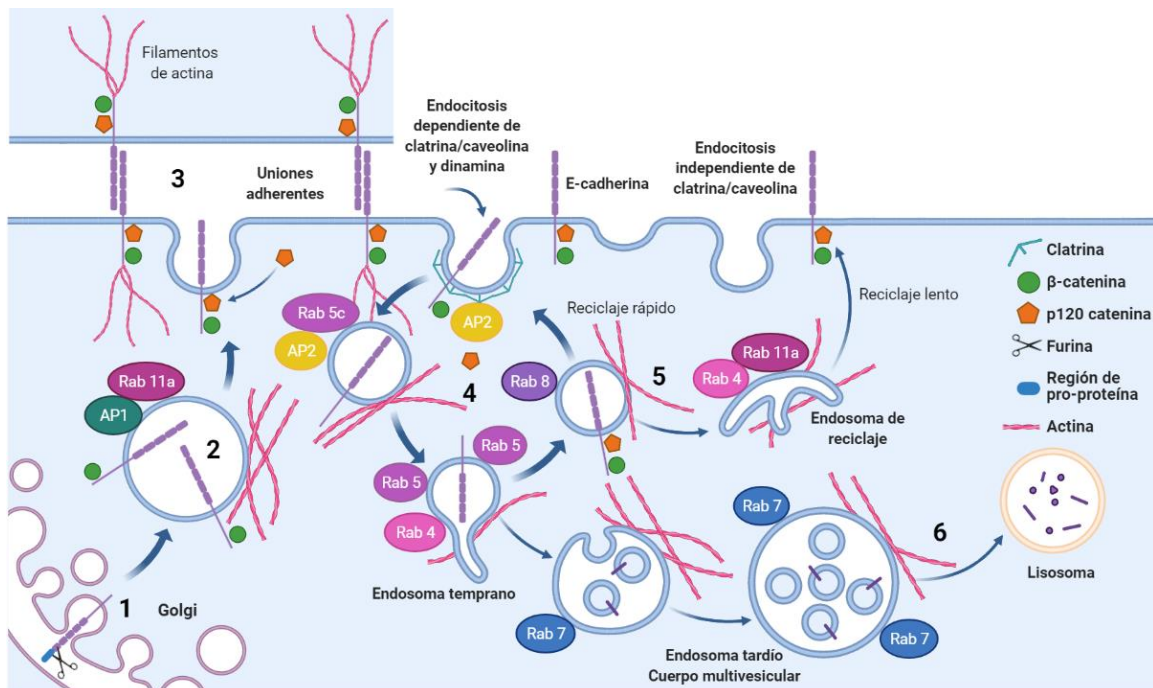
Al contrario de las modificaciones inducidas por las SFKs y HGF-Met, la fosforilación de las tirosinas en E-cad por acción de la CK2 y la GSK3 $\beta$  promueven la afinidad por  $\beta$ -catenina y estabilizan el complejo de adhesión (Huber & Weis, 2001).

Una vez anclada en la membrana, la E-cad tiene una dinámica de recambio importante y la regulación de la estabilidad de las uniones adherentes se logra por la modulación de la endocitosis y degradación de la E-cad (Fig. 4) (Van Roy & Berx,

2008). Para removerse de la membrana, la E-cad puede asociarse con las proteínas NUMB, EPS15 y AP-2 y endocitarse en vesículas recubiertas de clatrina y escindidas de la membrana por la actividad de la dinamina (Corallino et al., 2015; Song et al., 2013). Esta endocitosis dependiente de AP-2, clatrina y dinamina puede inhibirse por la p120-catenina (Davis et al., 2003; Ishiyama et al., 2010; Miyashita & Ozawa, 2007).

Ya dentro del citoplasma, las vesículas cargadas de E-cad pueden tener varios destinos. Si la E-cad endocitada se fosforiló por las SFKs y ubiquitinada por MDM2 y Hakai, estas vesículas se dirigirán a la vía de degradación lisosomal, ya que además las SFKs activan a las GTPasas Rab5 y Rab7, proteínas involucradas en la degradación por lisosoma. La E-cad también puede degradarse por la vía proteasomal (Fujita et al., 2002; Lepage et al., 2014; Van Roy & Berx, 2008).

Otro destino alternativo a la degradación es su reciclaje, proceso que junto a la síntesis *de novo* transporta la E-cad de vuelta a la membrana. Esto se logra por la asociación de las vesículas que contienen E-cad con endosomas tempranos asociados a Rab4 y vesículas enriquecidas en Rab11a, proteínas que señalizan para la reintegración a la membrana plasmática (Lepage et al., 2014).



**Figura 4. Dinámica de localización de la E-cad.** 1: Procesamiento de la E-cad en el Golgi por la furina. 2: Transporte a la membrana y asociación con  $\beta$ -catenina. 3: Estabilización del complejo de adhesión en la membrana y formación de uniones adherentes con la participación del citoesqueleto de actina. 4: Endocitosis mediada por clatrina y dinamina remueve a la E-cad de la membrana plasmática. 5: Reciclaje de endosomas regresan a la E-cad a la membrana. 6: Degradación de endosomas cargados de E-cad por la vía del lisosoma. Figura hecha con BioRender (Aoki, 2017). Modificada de Xiao *et al.*, 2007.

### 1.6. La E-cadherina y el desarrollo embrionario del pez cebra

La E-cad durante el desarrollo temprano del pez cebra se puede observar primero en el embrión como proteína y mRNA de herencia materna que son depositados en el ovocito previo a la fertilización. Una vez realizada la transición de blástula media se puede observar también como mRNA y proteína, pero ahora son productos de la transcripción y traducción cigótica (Babb *et al.*, 2001; Babb & Marrs, 2004).

En uno de los primeros reportes se describió que durante la epibolia la *e-cad* presenta un patrón de expresión diferencial, a nivel de mRNA, entre los dos linajes celulares del blastodermo. Durante esta etapa se observó que las células del EVL presentan un nivel de expresión mayor al de las células de la DCL (Kane *et al.*, 2005). La E-cad en ambos linajes se puede observar en vesículas citoplasmáticas y en las interfases entre células (Babb & Marrs, 2004). Además de la diferencia de intensidad entre linajes celulares, la distribución subcelular de la E-cad durante la progresión de la epibolia también cambia. Antes del inicio de la epibolia, en la etapa de esfera, la E-cad se observa en la membrana y en vesículas citoplasmáticas mientras que en etapas más avanzadas, a las 6 y 8 hpf, la distribución pareciera ser principalmente citoplasmática dentro de vesículas (Song *et al.*, 2013).

La adhesión celular también varía durante el proceso de epibolia y se sabe que la dinámica de la E-cad también se modifica en esta etapa, ya que alrededor de la etapa de 30 % de epibolia hay una disminución en la expresión de E-cad en las células de la DCL (Kane *et al.*, 2005). Esta disminución sugiere que se requiere una fluidización de las DCL para que éstas puedan llevar a cabo la migración hacia el polo vegetal (Petridou *et al.*, 2019).



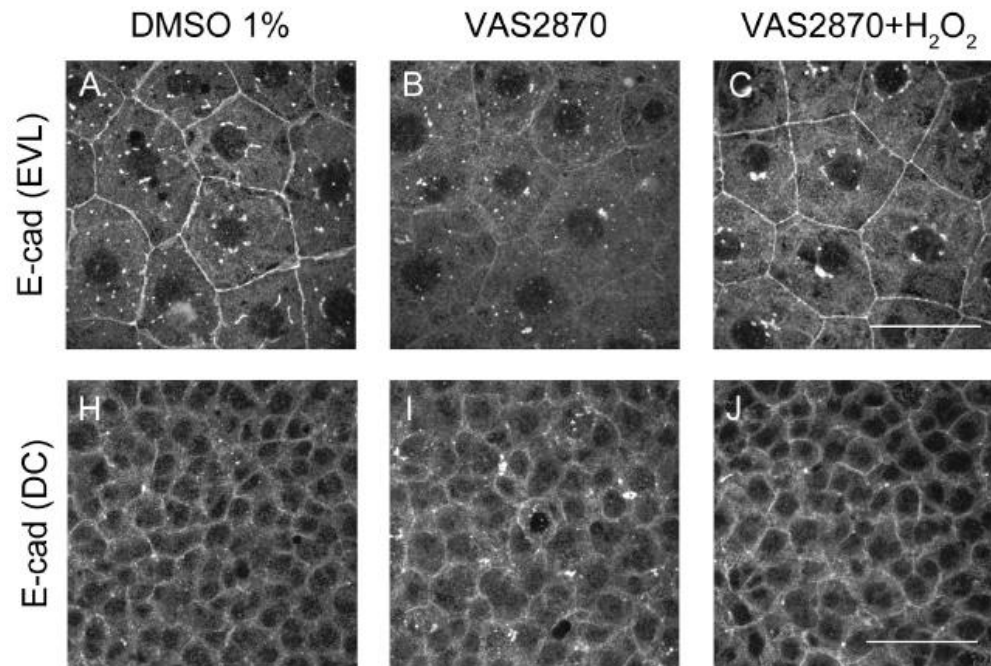
En muchos de los modelos mutantes o con pérdida de función de distintos genes descritos previamente que presentan un retraso en la epibolia, la E-cad mostró alteraciones en su dinámica de localización y maduración en las células del blastodermo (Kane et al., 2005; Málaga-Trillo et al., 2009; Sempou et al., 2016; Song et al., 2013). En estos trabajos se observó que la forma funcional de 120 kDa se encontraba disminuida (Málaga-Trillo et al., 2009), y además se encontró una modificación en su dinámica de estabilidad en la membrana y su endocitosis (Sempou et al., 2016; Song et al., 2013). Cuando se emplearon morfolinis contra la E-cad, estos produjeron un fenotipo hipomórfico y un retraso en la epibolia de las células de la DCL, así como alteraciones en la interacción entre las células de la EVL y la DCL tanto en pez cebra (Babb & Marrs, 2004; Shimizu et al., 2005) como en el desarrollo de otros peces modelo de estudio (Reig et al., 2017).

Finalmente, durante la epibolia las células de la DCL llevan a cabo un proceso de intercalación gracias al cual algunas células que se ubican en regiones más profundas del blastodermo modifican su posición, lo que adelgaza al blastodermo y les permite entrar en contacto con las células de la EVL. En los modelos con la pérdida de función de la E-cad, se observó que se afecta la intercalación radial de las células del epiblasto y la interacción entre las células de la EVL y de la DCL, la cual es importante para la adecuada progresión de la epibolia (Kane et al., 2005).

Existe mucha información sobre la regulación transcripcional de la E-cad, así como de su procesamiento postraduccional y de su transporte hacia y desde la membrana. Por otra parte, los mecanismos que regulan la dinámica de localización de la E-cad y su relación con las EOR no habían sido exploradas hasta ahora.

En el laboratorio se evaluó si el VAS2870 afecta la dinámica de localización celular de la E-cad durante la epibolia (Mendieta-Serrano et al., 2019). Mediante análisis de inmunofluorescencia y microscopía confocal se logró observar una disrupción en la distribución de la E-cad en las células de la EVL en presencia del VAS2870 (Fig. 5B). En estas células se observó que la señal de la E-cad en la membrana celular es más tenue. De igual manera se encontró una disminución en la cantidad de vesículas citoplasmáticas positivas para la proteína.

Por otro lado, al cuantificar la intensidad de la señal de E-cad en las células de la DCL en los embriones tratados con VAS2870 las diferencias no fueron significativas (Fig. 5I). Los fenotipos observados en las células del blastodermo se revirtieron al incubar a los embriones con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo cual indica que el producto de la actividad catalítica de las Nox es el responsable de la variación en la dinámica celular de la E-cad (Fig. 5C).



**Figura 5. La inhibición de las Nox afecta la distribución de la E-cad en los márgenes y vesículas de las células de la EVL.** La E-cad se visualizó mediante microscopía confocal. **A:** Las series se obtuvieron del polo animal de embriones en etapa de 70% de epibolia. **B:** El tratamiento con 10  $\mu$ M de VAS2870 afecta la distribución de la E-cad. **C:** el tratamiento simultáneo con VAS2870 y 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restaura el patrón de E-cad en los bordes celulares y el citoplasma. **H-J:** La E-cad se visualizó por inmunolocalización en células de la DCL en embriones control (**H**), tratados con VAS2870 (**I**) y VAS2870 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**J**). No se observaron diferencias significativas entre grupos. Barra de escala 50  $\mu$ m. Modificado de Mendieta-Serrano *et al.*, 2019.

Debido a que se encontró una disminución significativa en la señal para la E-cad en las células de la EVL, se realizó un Western blot para ver a la proteína en extractos totales de embrión. No se encontró una disminución en la cantidad de E-cad inmadura correspondiente a la banda de 140 kDa en embriones tratados con VAS2870 y tampoco se observaron variaciones en embriones tratados con

VAS2870 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado, no se pudo resolver la banda de E-cad madura de 120 kDa.

Por otra parte, ya que se observó una disminución de la señal de E-cad en las células de la EVL, se realizaron ensayos de gota colgante para evaluar si los cambios de localización de la E-cad afectan la capacidad de agregación celular (Mendieta-Serrano et al., 2019). Embriones en etapa de esfera se disgregaron mecánicamente y se sembraron en gotas de medio adicionadas con VAS2870. Lo que se observó en este experimento fue que al incubar a las células en presencia del inhibidor no se formaron cúmulos de agregados celulares en la base de la gota a las 8 h de incubación, lo que sugiere que el VAS2870 inhibe la capacidad de agregación celular. No se realizaron ensayos de rescate utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por lo que queda pendiente analizar si la adición de este compuesto revierte este fenómeno o si acelera la agregación a mayores concentraciones.

## 2. Justificación

Ya que en el laboratorio se encontró evidencia de que al inhibir la actividad de las Nox se provoca una disminución en la señal de la E-cad en las células del blastodermo, así como una disminución en la capacidad de las células para agregarse, el presente proyecto busca ahondar en el entendimiento del mecanismo por el cual las EOR producidas por las Nox afectan la dinámica de localización de la E-cadherina.

## 3. Hipótesis

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afecta los mecanismos responsables de regular la localización y la estabilidad de la E-cad durante el desarrollo temprano del pez cebra.

## 4. Objetivo general

Caracterizar el efecto que tiene la inhibición de la formación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la dinámica de recambio de la E-cad mediada por endocitosis en embriones de pez cebra durante la epibolia y gastrulación.

#### 4.1. Objetivos particulares:

1. Evaluar si los cambios en la dinámica de localización de la E-cad en el citoplasma y membrana ocasionados por la inhibición catalítica de las Nox se revierten con la inhibición de la endocitosis.
2. Evaluar si los efectos en la estructura del citoesqueleto de actina ocasionados por la inhibición de las Nox se revierten por la inhibición de la endocitosis.
3. Evaluar si la inhibición de la endocitosis modifica la supervivencia de embriones con inhibición catalítica de las Nox.

### 5. Materiales

#### 5.1. Líneas de Peces

Nombre	Fuente
AB	Cepa obtenida del Zebrafish International Resource Centre (ZIRC) (zebrafish.org)
WT lab	Derivada de peces obtenidos en un acuario local, posteriormente criados y mantenidos en el bioterio del instituto de biotecnología de la UNAM

#### 5.2. Medios para embriones

Stock	Receta
<b>Medio ERM</b> (Westerfield, 2007)	
Hank's Stock 1	8 g NaCl 0.4 g KCl Llevar a 100 ml con H <sub>2</sub> O
Hank's Stock 2	0.358 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhídrido 0.6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Llevar a 100 ml con H <sub>2</sub> O
Hank's Stock 4	0.72 g CaCl <sub>2</sub> Llevar a 50 ml con H <sub>2</sub> O
Hank's Stock 5	1.23 g MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O Llevar a 50 ml con H <sub>2</sub> O
Hank's Stock 6 (Preparar fresco)	0.35 g NaHCO <sub>3</sub>

	Llevar a 10 ml con H <sub>2</sub> O
Embryo Rearing Medium (ERM)1x	1 ml Stock 1 0.1 ml Stock 2 1 ml Stock 4 1 ml Stock 5 1 ml Stock 6 0.24 g de HEPES Ajustar pH a 7.2, llevar a 100 ml con H <sub>2</sub> O
<b>Medio para anestesiar (Westerfield, 2007)</b>	
Stock de Tricaína	400 mg de tricaína en polvo (Sigma E10521) 97.9 ml de agua destilada ~2.1 ml de 1 M Tris (pH 9). Ajustar pH a ~7
Solución de tricaína de trabajo	4.2 ml de solución stock de tricaína 100 ml de ERM

### 5.3. Medios de cultivo y reactivos

Reactivo	Compañía
Leibovitz's L-15	Thermofisher (11415064)
Pen Strep glutamine (100X)	Gibco (10378-016)
Suero fetal bovino (SFB)	Gibco (26140-079)

### 5.4. Inhibidores

Substancia	Marca	Solución stock	Solución de trabajo
VAS2870	Sigma-Aldrich (SML0273)	13 mM en DMSO al 100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 µM en L15 con 15 % SFB (v/v)</li> <li>• 10 µM en L15 con 15 % SFB (v/v)</li> <li>• 10 µM en ERM</li> </ul>
Dynasore	Sigma-Aldrich (D7693)	10 mg/ml en DMSO 100 %	75 µM en ERM

### 5.5. Soluciones y buffers

Nombre	Receta
<b>Preparación de muestras para Western Blot (Link et al., 2006)</b>	

Buffer desvitelinizante	55 mM NaCl 1.8 mM KCl 1.25 mM NaHCO <sub>3</sub>
Buffer de lavados	110 mM NaCl 3.5 mM KCl 2.2 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM Tris HCl (pH 8.5)
Buffer de lisis de proteínas (Mendieta-Serrano et al., 2019).	25 mM Tris (pH 7.4) 2 mM EDTA 1 tableta de Complete mini EDTA-free Protease inhibitor mix (Roche, 11836170001) 0.125 % (v/v) de detergente IGEPAL Llevar a 10 ml con H <sub>2</sub> O
Buffer de carga 4x	62 mM Tris (pH 6.8) 2.3 % (p/v) SDS 10 % (v/v) Glicerol 5 % (v/v) β-Mercaptoetanol 0.1 % (p/v) Azul de bromofenol Llevar a 10ml con H <sub>2</sub> O
<b>SDS-PAGE</b>	
Buffer 4x Gel concentrador	0.5 M Tris 0.4 % (p/v) SDS Llevar a 100 ml con H <sub>2</sub> O, ajustar pH a 8.8 con HCl
Buffer 4x Gel separador	1.5 M Tris 0.4 % (p/v) SDS Llevar a 100 ml con H <sub>2</sub> O, ajustar pH a 8.8 con HCl
Buffer de corrida	250 mM Tris 1.99 M Glicina 1 % (p/v) SDS Llevar a 500 ml con H <sub>2</sub> O
<b>Western Blot</b>	

Buffer de transferencia	250 mM Tris 192 mM Glicina 20 % (v/v) Metanol Llevar a 500 ml con H <sub>2</sub> O
Solución de Bloqueo	5 % (p/v) de leche descremada en polvo (Carnation) en TBST
TBS 10X	200 mM Tris 1.5 M NaCl Levar a 500 ml con H <sub>2</sub> O, ajustar pH a 7.5
TBST	TBS 1x y 0.5 % (v/v) Tween 20
<b>Inmunofluorescencia</b> (Mendieta-Serrano et al., 2013)	
PFA	PBS 1X pH 7.2 4 % (p/v) de Paraformaldehído
Buffer de Bloqueo	PBS 1X pH 7.2 0.1 % (p/v) BSA 1 % (v/v) Tritón 100x
Agarosa de bajo punto de fusión	PBS 1X pH 7.2 1 % (p/v) de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma Aldrich A9414)

### 5.6. Anticuerpos para Inmunofluorescencias (IF), Western Blot (WB) y colorantes

<b>Anticuerpos Primarios</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Compañía</b>	<b>Dilución IF</b>	<b>Dilución WB</b>
E-cadherina	BD Biosciences (610182)	1:250	1:3000
Erk 2	Santa Cruz Biotechnologies (sc-1647)	-	1:3000
β-catenina	Sigma-Aldrich (C2206)	1:250	1:4000

<b>Anticuerpos Secundarios IF</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Compañía</b>	<b>Dilución</b>
Goat anti-mouse Alexa 647	Molecular Probes (A2135)	1:100

<b>Anticuerpos Secundarios WB</b>
-----------------------------------

<b>Nombre</b>	<b>Compañía</b>	<b>Dilución</b>
Goat anti-mouse HRP	Santa Cruz Biotechnologies (sc-2055)	1:5000
Goat anti rabbit HRP	Santa Cruz Biotechnologies (sc-2004)	1:5000

<b>Colorantes</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Compañía</b>	<b>Dilución</b>
Faloidina Alexa 488	Molecular Probes (A12379)	1:100
DAPI	Invitrogen (D3571)	1:3000
Sytox Green	Invitrogen (S7020)	1:30 en ERM

### 5.7. Kits

<b>Nombre</b>	<b>Compañía</b>
Kit LumiGLO 20x	Cell Signaling (7003S)

### 5.8. Microscopía

<b>Nombre</b>	<b>Compañía</b>
Microscopio estereoscópico SMZ800	Nikon
Confocal Invertido FV100 Objetivos 10X, 20X, 60X	Olympus
Confocal Invertido Zeiss Observer Z.1 Objetivos 10X, 20X, 60X	Zeiss
Sistema de disco giratorio 3I Marianas	Intelligent Imaging Innovations
Unidad CSU-W1	Yokogawa Electric
Cámara iXon EMCCD	Andor Technology

### 5.9. Equipo de laboratorio

<b>Nombre</b>	<b>Especificación</b>	<b>Compañía</b>
Incubadora Incufridge	RS-IF-202	Revolutionary Science
Eppendorf BioPhotometer	6131	Eppendorf
Centrifugadora	5418	Eppendorf



Lector de placas iMark Microplate Absorbance Reader	1681130	Bio-Rad
Centrifugadora refrigerada	5415 R	Ependorff
Cámara de transferencia húmeda Mini Protean Tetra Cell	552BR	Bio-Rad
Fuente de poder Power Pac Basic	041BR64656	Bio-Rad

#### 5.10. Otros materiales y reactivos

Nombre	Compañía
Bradfort	Bio-Rad (5000006)
Peso molecular Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad (161-0374)
Membrana de Nitrocelulosa	Bio-Rad (162-0115)
Acrilamida 30 %	Sigma-Aldrich (A3574)
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich (276855)
Solución de Ponceau	Sigma-Aldrich (P7170)
Tween 20	Sigma-Aldrich (P7949)
Tritón X-100	Sigma-Aldrich (X100)
Casetes para embeber en parafina	Simport (M480-2)
Silicón 100 % Acético	Sista (F109)
Cubre objetos de 20x50	Fisher (12-548-5M)
Agarosa de bajo punto de fusión	Sigma-Aldrich (A9414)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich (H1009)
Placas de cultivo celular de 48 pozos	Nest Biotechnology (748001)
Placas de cultivo celular 35mm	Corning (430165)
Película fotográfica Kodak Biomax XAR Film	Sigma-Aldrich (F5388-50EA)
Pipetas de transferencia	Sarstedt (86.1171.001)

#### 5.11. Software

Nombre	Compañía
ImageJ	National Institute of Health, USA
Microsoft Office 2008 (Word, Excel)	Microsoft
ZEN 2012	Zeiss (Göttingen, Germany)
GraphPad Prism 7.00	GraphPad software Inc

## 6. Métodos

### 6.1. *Obtención de embriones*

Peces adultos de la cepa WT lab y AB se separaron en grupos de machos y hembras en cajas para cruza la noche anterior a la cruza. Al inicio de la fase de luz del día siguiente la separación se removió y la caja se inclinó para proveer un área de poca agua donde se llevó a cabo la cruza. Los embriones se removieron 5 min después de haberse llevado a cabo la ovoposición para permitir la fertilización de los ovocitos. Los embriones se lavaron con agua de acuario, se colocaron en cajas Petri y se incubaron a 28 °C hasta que alcanzaron la etapa de desarrollo deseada. Las etapas del desarrollo se determinaron por criterios morfológicos con base en criterios descritos en la literatura (Kimmel et al., 1995).

### 6.2. *Tratamientos con inhibidores*

Con el fin de llevar a cabo la inhibición farmacológica de las Nox y de la dinamina para evaluar su efecto durante el desarrollo temprano del pez cebrá se realizaron incubaciones con medio adicionado con los inhibidores. El procedimiento se basó en el descrito por Niethammer, Mendieta-Serrano y Sempou (Mendieta-Serrano et al., 2019; Niethammer et al., 2009; Sempou et al., 2016) con algunas modificaciones.

Embriones en etapa de esfera se separaron en grupos de diez en placas de 48 pozos con medio ERM (Westerfield, 2007). Se les retiró el medio y se les agregó 300 µl a cada pozo de ERM con DMSO al 1 % como control, 10 µM de VAS2870 en DMSO al 1 %, 10 µM de VAS2870 con 75 mM de Dynasore en DMSO 1 % o 75 mM de Dynasore en DMSO 1 %. Los embriones se incubaron posteriormente a 28 °C hasta que alcanzaron la etapa de 50 % a 60 % epibolia y posteriormente se procesaron para inmunofluorescencia.

### 6.3. *Inmunofluorescencia*

Para poder ver la distribución de la E-cad y del citoesqueleto de actina en los embriones tratados farmacológicamente se realizaron tinciones de embriones

completos mediante inmunofluorescencia. El procedimiento se basa en el descrito previamente por Mendieta-Serrano y colaboradores con algunas modificaciones (Mendieta-Serrano et al., 2013, 2019). Una vez que los embriones alcanzaron la etapa de 60 % de epibolia, se retiró el medio y se fijaron toda la noche a 4°C con 300 µl por cada pozo de paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS.

Al día siguiente se removió el PFA y los embriones se lavaron tres veces con agitación ligera por 5 min a temperatura ambiente (T.A.) con 300 µl por pozo de buffer de bloqueo. Los embriones posteriormente se transfirieron a una placa de 35 mm con buffer de bloqueo para ser decorionados a mano utilizando pinzas de relojero bajo un estereoscopio; una vez decorionados se volvieron a colocar en grupos de diez embriones por pozo en cajas de 48 pozos. Los embriones se lavaron nuevamente tres veces con agitación ligera por cinco min a T.A. con 300 µl de buffer de bloqueo por pozo. Posteriormente, los embriones se bloquearon durante 4 h con 300 µl de buffer de bloqueo por pozo con agitación ligera a T.A. por 6 h. El anticuerpo primario se diluyó en buffer de bloqueo a la concentración mencionada en las tablas de materiales y los embriones se incubaron en 250 µl de la solución de anticuerpo primario toda la noche a 4 °C con agitación ligera.

Al día siguiente se removió la mayor cantidad de solución con anticuerpo y se lavaron tres veces con agitación ligera por 5 min a T.A. con 300 µl por pozo de buffer de bloqueo. El anticuerpo secundario acoplado a Alexa 647 se diluyó en buffer de bloqueo a la concentración mencionada en las tablas de materiales y los embriones se incubaron en 250 µl de la solución de anticuerpo por 8 h a 4 °C con agitación ligera.

Posteriormente se removió la mayor cantidad de solución con anticuerpo secundario y se lavaron los embriones tres veces con agitación ligera por 5 min a T.A. con 300 µl por pozo de buffer de bloqueo. Para ver al citoesqueleto de actina se utilizó faloidina acoplada al fluoróforo Alexa 488, la cual se diluyó a una concentración de 1:100 en buffer de bloqueo. Los embriones se incubaron en 250 µl de la solución de faloidina toda la noche a 4 °C con agitación ligera.

Al día siguiente se removió la mayor cantidad de solución con faloidina y se lavaron tres veces con agitación ligera por 5 min a T.A. con 300 µl por pozo de buffer de bloqueo. Posteriormente se incubaron por 1 h a T.A. con 300 µl por pozo de buffer de bloqueo con DAPI (1:3000) para poder ver a los núcleos. Tras esta tinción, los embriones se lavaron tres veces con agitación ligera por cinco min a T.A. con 300 µl por pozo de buffer de bloqueo.

Una vez finalizado el protocolo de inmunofluorescencia, los embriones se montaron en placas de montaje elaboradas en el laboratorio utilizando silicón, casetes para embeber muestras en parafina y cubreobjetos de vidrio (Mendieta-Serrano et al., 2013, 2019). Se colocó un embrión en cada pozo con el polo animal de cara al cubreobjetos y se montaron con 12 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8% en ERM calentada a 42°C. Una vez montados los embriones en las placas se llenaron con glicerol al 100 % para transparentar a los embriones y se guardaron a 4°C hasta que se llevaron al microscopio confocal.

Las series se adquirieron usando el objetivo 60x (Apertura numérica de 1.3, inmersión en aceite) en el microscopio confocal invertido Olympus del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del IBT. Alternativamente se utilizó un sistema de disco giratorio (Intelligent Imaging Innovations) acoplado a un microscopio Zeiss (Zeiss Observer Z.1 Invertido) y una unidad CSU-W1 (Yokogawa Electric) con el objetivo 60x (Apertura numérica de 1.4, inmersión en aceite). Las series se adquirieron con cámara iXon EMCCD (Andor Technology).

Con el objetivo de 60x con apertura numérica de 1.4 se cuenta con alrededor de 300 µm de distancia de trabajo entre el plano de enfoque y la superficie de la lente del objetivo. Si nuestras muestras se encontraran despegadas del cubreobjetos no se podrían observar en foco y toda la información se perdería al no poder ser captada por el sistema de detección del microscopio. Es por esta distancia de trabajo tan pequeña que fue muy importante durante este proyecto estandarizar que las muestras se montaran lo más pegadas al cubreobjeto como fuera posible, de esta manera se pudieron adquirir series abarcando todo el blastodermo y el inicio del vitelo de todos los embriones adquiridos.

#### 6.4. Análisis de Imágenes

Con el objeto de cuantificar las diferencias observadas en los patrones de localización de la E-cad y del citoesqueleto de actina, así como los cambios en la intensidad de fluorescencia las imágenes adquiridas en el microscopio confocal se analizaron utilizando el programa Fiji de Image J (Schindelin et al., 2012). Utilizando el canal en el cual se adquirió la señal de actina se realizaron proyecciones de intensidad promedio de los cortes en donde se visualizaban las células de la EVL. Con estas proyecciones se utilizó el filtro *Unsharp* y el plugin *Morphological segmentation* para generar una máscara del borde de las células. Con esta máscara se seleccionaron las regiones de interés y se cuantificaron el área de las células, las puncta de actina y las vesículas de E-cad en imágenes de la máxima proyección de las células de la EVL con el plugin *Analyse particles*. También con las máscaras generadas se cuantificó la intensidad de la señal de E-cad y de actina en los bordes celulares.

El mismo protocolo de segmentación de bordes celulares se utilizó en secciones de la DCL para evaluar la señal de E-cad y de actina en los bordes celulares.

#### 6.5. Ensayo de Supervivencia

Embriones en etapa de esfera se separaron en tres grupos de 10 embriones en placas de 48 pozos con medio ERM (Westerfield, 2007). Se les retiró el medio y se les agregó 300  $\mu$ l de ERM con DMSO al 1 % como control, o 10  $\mu$ M de VAS2870 en DMSO al 1 %, o 10  $\mu$ M de VAS2870 con 75 mM de Dynasore en DMSO al 1 %, o 75 mM de Dynasore en DMSO al 1 %. Los embriones se incubaron con los inhibidores a 28 °C por 24 h y posteriormente se les cambió el medio con inhibidores por ERM nuevo y se decorionaron.

Las larvas sobrevivientes a las 24 h de tratamiento se contaron y colocaron en placas de 35 mm con una cama de agarosa al 1 % preparada con ERM. Las larvas se anestesiaron utilizando ERM con tricafina para inmovilizarlas y permitir la adquisición de fotografías de su morfología general. Las larvas se pasaron

posteriormente a placas de 35 mm con ERM nuevo para remover la tricaina y se volvieron a incubar a 28 °C por otras 24 h para evaluar la supervivencia 48 h después de haber recibido el tratamiento con fármacos. Las larvas nuevamente se contaron y fotografiaron en las mismas placas de agarosa en ERM con tricaina preparado al momento.

#### 6.6. Resumen de embriones y células analizadas por experimento.

En la siguientes tablas se resume el número de embriones analizados (n= embriones) por cada serie de tratamientos realizados (N= repeticiones de cada experimento), así como el número de células que se incluyeron en la medición de los distintos parámetros evaluados en este proyecto. Las tablas 1 y 2 hacen referencia a los embriones analizados mediante inmunofluorescencia (N= 3) y la tabla 3 incluye a los embriones analizados durante los ensayos de supervivencia a las 24 h (N=15) y 48 h (N=15).

**Tabla 1: Número de células y embriones analizados por experimento**

Experimento	DMSO 1 %		VAS2870 10 µM		VAS2870 10 µm Dynasore 75 µM	
	No. de Embriones	No. de Células	No. de Embriones	No. de Células	No. de Embriones	No. de Células
Vesículas de E-cad en EVL	22	120	23	106	24	159
Tamaño de vesículas	22	120	23	106	24	159
E-cad en bordes de EVL	22	-	24	-	27	-
E-cad en bordes de DCL	18	-	22	-	23	-
Puncta en EVL	20	115	23	70	26	100
Actina en bordes de EVL	24	-	24	-	26	-
Actina en bordes de DCL	18	-	22	-	23	-
Células multinucleadas 1000 células	32	817	29	491	23	530
Células multinucleadas 50-60% epibolia	26	275	30	243	33	331
Área celular	22	132	28	142	29	191

**Tabla 2: Número de células y embriones analizados por experimento**

Experimento	DMSO 1 %		Dynasore 75 $\mu$ M	
	No. de Embriones	No. de Células	No. de Embriones	No. de Células
Vesículas de E-cad en EVL	14	152	14	176
E-cad en bordes de EVL	13	-	14	-
E-cad en bordes de DCL	13	-	12	-
Puncta en EVL	13	134	13	162
Actina en bordes de EVL	13	-	14	-
Actina en bordes de DCL	13	-	12	-
Células multinucleadas 50-60 % epibolia	14	214	14	258
Área celular	14	151	14	176

**Tabla 3: Número de embriones analizados por experimento**

Experimento	DMSO 1 %	VAS2870 10 $\mu$ M	VAS2870 10 $\mu$ M Dynasore 75 $\mu$ M	Dynasore 75 $\mu$ M
	No. de Embriones	No. de Embriones	No. de Embriones	No. de Embriones
Supervivencia 24 h	450	450	330	450
Supervivencia 48 h	450	450	270	300

### 6.7. Análisis estadísticos.

Se utilizó el Software GraphPad Prism para realizar los análisis y las gráficas. En este proyecto no se hicieron análisis estadísticos previos para determinar la n de embriones a analizar por tratamiento ni se realizó una limpieza posterior de los datos una vez obtenidos para eliminar datos atípicos (*outliers*). El número de embriones por tratamiento y de repeticiones de tratamiento fueron las mismas que las realizadas por Mendieta-Serrano et al., 2019.

A todos los datos obtenidos de todos los parámetros analizados en este proyecto se les hizo la prueba estadística D'Agostino para determinar si la distribución de los datos era normal. Los datos obtenidos para los tratamientos con DMSO, VAS2870 y Dynasore no presentaron una distribución normal, por lo que para evaluar diferencias en su variabilidad se realizó la prueba de ANOVA no paramétrica, Kluskal-Wallis. Posteriormente se empleó la prueba *post hoc* de Dunn para comparar los grupos de tratamientos entre ellos y determinar si las diferencias observadas son estadísticamente significativas. Para el caso de los datos obtenidos

de los tratamientos con DMSO y Dynasore se realizó la prueba de *t* de Student en el caso de tener una distribución normal y la prueba de U de Mann-Whitney en caso de no tener una distribución normal. Los datos fueron presentados en con gráficos de caja y bigotes donde se grafica la  $Q_1$  (el 25 % de los datos), la mediana y la  $Q_2$  (el 75 % de los datos). Los bigotes muestran el rango de las muestras, es decir, del mínimo al máximo.

## 7. Resultados

### *7.1. Los cambios en la señal de la E-cad causada por la inhibición de las Nox se rescatan por el tratamiento con Dynasore*

Gracias al trabajo realizado por Mendieta-Serrano y colaboradores sabemos que la E-cad se deslocaliza en embriones que presentan la inhibición farmacológica de las Nox y éstos sufren un retraso en la epibolia. Otro modelo que presenta tanto el retraso en la epibolia como una deslocalización de la E-cad membranal es el modelo de embriones morfantes para la proteína priónica 1 (Prp1) involucrada en la adhesión celular (Málaga-Trillo et al., 2009; Sempou et al., 2016). En ese trabajo se reportó que al tratar embriones morfantes para Prp1 con un inhibidor de la actividad de GTPasa de la dinamina, el Dynasore, no solo se rescataba la localización celular de la E-cad sino que también en estos embriones tratados se logró rescatar el retraso en la epibolia (Sempou et al., 2016).

Con base en este reporte nos preguntamos si la inhibición de la dinamina por medio del tratamiento con Dynasore es capaz de rescatar los efectos del tratamiento con el inhibidor general de las Nox, el VAS2870.

En los embriones fijados al 60 % de epibolia tratados con DMSO al 1 % se observó una distribución membranal y citoplasmática de la E-cad en las células de la EVL y en las de la DCL (Fig. 6A, A'). En contraste, el tratamiento con 10  $\mu$ M de VAS2870 ocasionó la pérdida de la señal de E-cad en la membrana de las células de la EVL, así como una disminución de las vesículas positivas a E-cad en su citoplasma (Fig. 6E). No obstante, las DCL no se ven afectadas (Fig. 6E'). Estos resultados replican los resultados previamente obtenidos por Mendieta-Serrano.



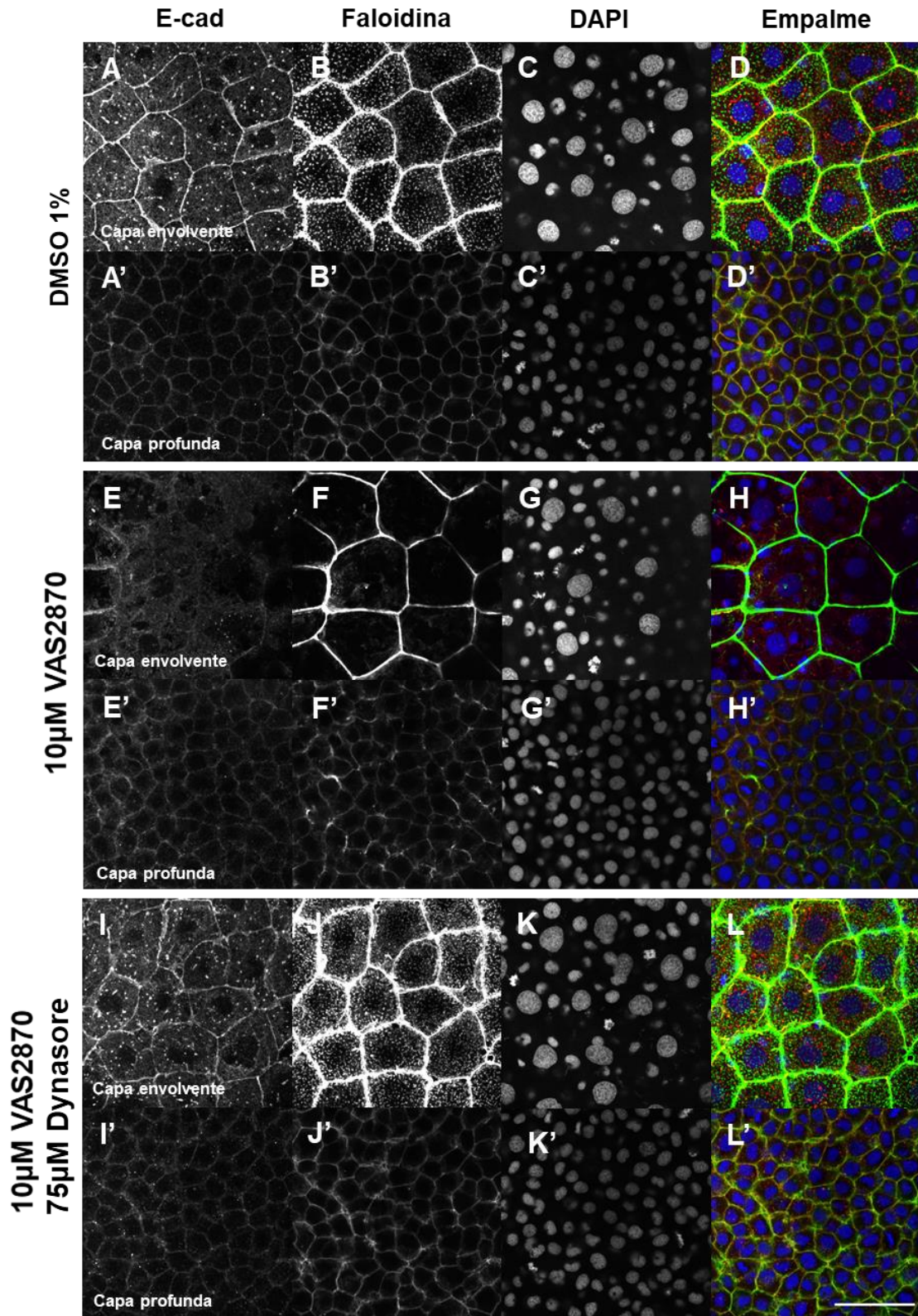


Figura 6. Los cambios en la localización de la E-cad y en el citoesqueleto de actina ocasionados por la inhibición de las Nox se revierten por la inhibición de la endocitosis.

Inmunofluorescencia para E-cad y el citoesqueleto de actina en embriones control, tratados con 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870 o con 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870 más 75  $\mu\text{M}$  de Dynasore en la etapa de esfera. **A-L**: Señal de E-cad en las células de la capa envolvente (**A, E, I**) y en las células de la capa profunda (**A', E', I'**). Señal de actina en las células de la capa envolvente (**B, F, J**) y en las células de la capa profunda (**B', F', J'**). Señal de DAPI en las células de la capa envolvente (**C, G, K**) y en las células de la capa profunda (**C', G', K'**). Ambos niveles del blastodermo se adquirieron de un mismo embrión por cada tratamiento. Los núcleos se tiñeron empleando DAPI. Empalme muestra los tres canales juntos en pseudocolores. E-cadherina, rojo. F-actina, verde. DNA, azul. Barra de escala de 50  $\mu\text{m}$ .

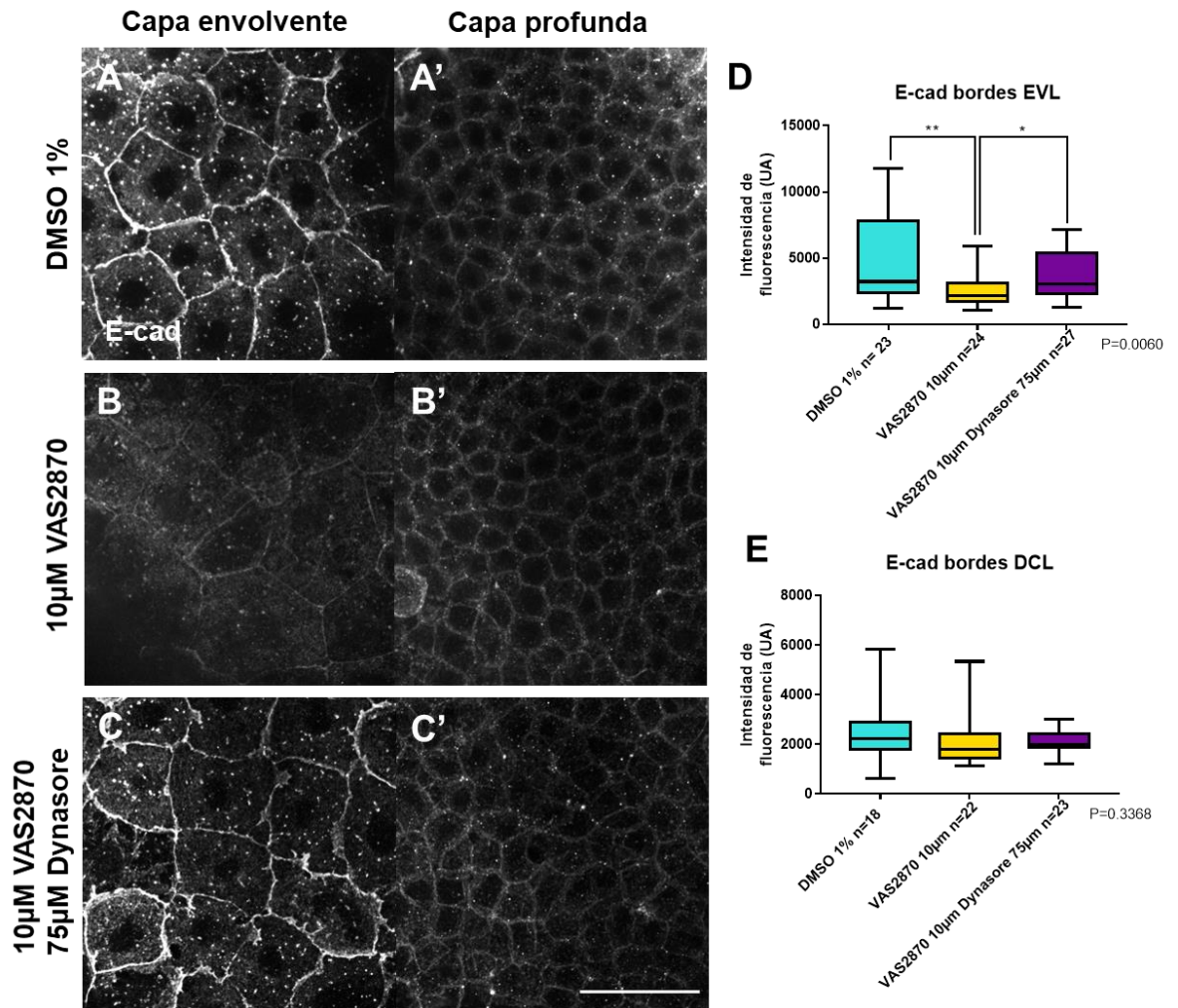
Por otra parte, cuando los embriones con VAS2870 se trataron simultáneamente con el inhibidor de la dinamina Dynasore, la localización de la E-cad se rescata y nuevamente es visible la señal fluorescente en la membrana y en las vesículas citoplasmáticas (Fig. 6I). El tratamiento con VAS2870 y Dynasore no pareció tener un efecto visible sobre las células de la DCL (Fig. 6I').

También se realizaron tratamientos únicamente utilizando al Dynasore a una concentración de 75  $\mu\text{M}$  (Anexo 2) y la localización observada coincide con la localización en embriones control tanto en las membranas celulares como en vesículas citoplasmáticas, por lo que el tratamiento con Dynasore no parece tener un efecto significativo sobre los parámetros evaluados (Fig. sup. 2).

Tras observarse las diferencias en la distribución de E-cad, se cuantificó la intensidad de fluorescencia en los bordes celulares (Fig. 7), así como el número y tamaño de las vesículas positivas a E-cad en las células de la EVL (Fig. 8, Fig. sup. 1).

El tratamiento con VAS2870 cambió el patrón de distribución de la señal de E-cad en la membrana de las células de la EVL (Fig. 6E, 7B). Utilizando el programa Fiji de Image J se cuantificó la intensidad de la señal en los bordes celulares tanto de las células de la EVL como las de la DCL y se encontró que la señal disminuye significativamente en las EVL al tratar con 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870 (Fig. 7B, D). Por otra parte, cuando se realiza el tratamiento simultáneo con VAS2870 y 75  $\mu\text{M}$  de Dynasore, la señal en las membranas de las EVL aumentó alcanzando un nivel similar al observado en los embriones control (Fig. 7C, D). En contraste, cuando se analizó la intensidad de fluorescencia en las células de la DCL no se encontraron

diferencias significativas entre los tratamientos de VAS2870 y VAS2870 con Dynasore en comparación con el control de DMSO (Fig. 7E).

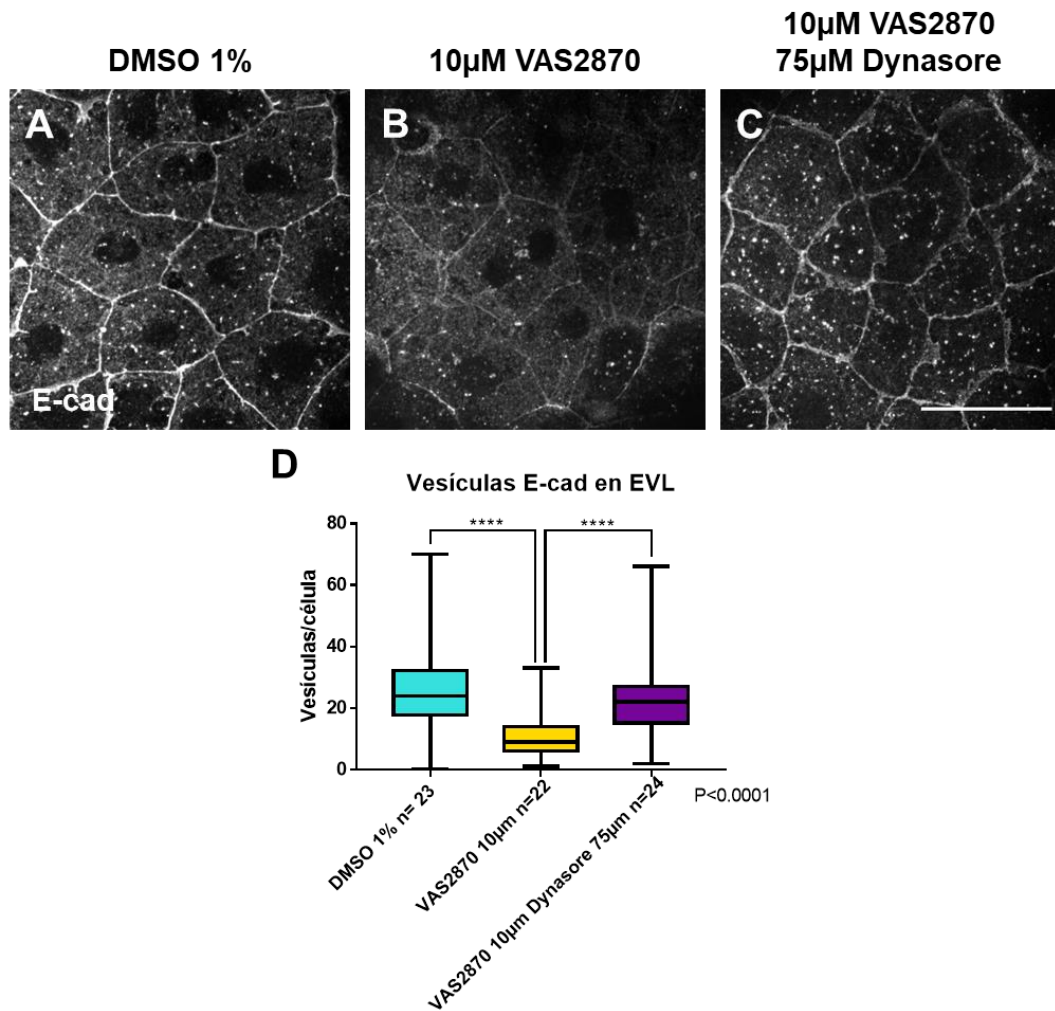


**Figura 7. La inhibición de la endocitosis rescata los cambios en la localización de la E-cad en la membrana de las células de la EVL.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a E-cad en las membranas celulares. **A-C:** Señal de E-cad en las células de la capa envolvente (**A**, **B**, **C**) en las células de la capa profunda (**A'**, **B'**, **C'**). Ambos niveles se adquirieron en un mismo embrión por cada tratamiento. Barra de escala de 50 µm. **D:** Intensidad de la fluorescencia en los bordes de las células del EVL. \*\* p value = 0.0073, \* p value = 0.0458. **E:** Intensidad de fluorescencia en los bordes de las células de la DCL. p value= 0.3368. Los bigotes muestran el rango de los datos.

La cuantificación de la señal de E-cad en embriones tratados únicamente con Dynasore 75 µM reveló que la inhibición de la dinamina 2 no tuvo ningún efecto en su intensidad ni en su distribución a comparación del control (Fig. sup. 3) por lo que

el rescate observado al tratar con VAS2870 y Dynasore no fue ocasionado por algún artefacto causado por el inhibidor de la dinamina 2.

Se cuantificó también número de las vesículas positivas a E-cad para evaluar cambios en su distribución en el citoplasma en las células de la EVL (Fig. 8).



**Figura 8. La inhibición de la endocitosis rescata el número de vesículas de E-cad en las células de la EVL. A, B, C:** localización de E-cad en células de la EVL vistas mediante inmunotinción. Barra de escala de 50 μm. **D:** cuantificación de vesículas positivas a E-cad en las células de la EVL. p value <0.0001. Los bigotes muestran el rango de los datos.

Las células de la EVL en embriones control presentan numerosas vesículas positivas a la E-cad distribuidas en todo el citoplasma, por lo que también se analizó el efecto de los inhibidores sobre posibles cambios en la abundancia de estas vesículas (Fig. 6A y Fig. 8A). En los embriones con VAS2870 el número de vesículas

por célula disminuyó significativamente (Fig. 6E y 8B), observando  $25 \pm 12$  vesículas por célula en los controles a  $10 \pm 6$  vesículas por célula tratada con inhibidor de las Nox (Fig. 8D). Por otro lado, el tratamiento simultáneo de VAS2870 con Dynasore reestableció el número de vesículas por célula (de  $10 \pm 6$  a  $22 \pm 10$ ) y rescata el fenotipo ya que es muy parecido al grupo control (Fig. 8C y D).

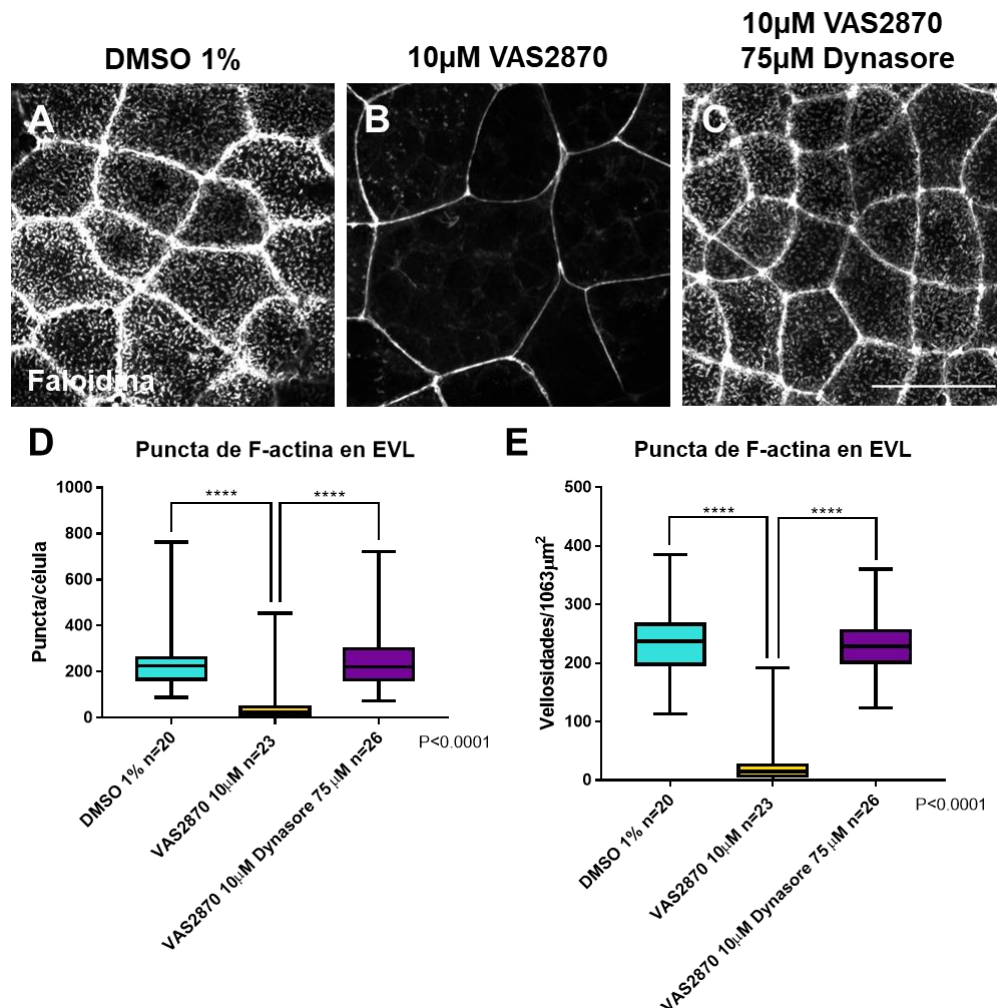
Por otro lado, la cuantificación del número de las vesículas positivas a E-cad en embriones tratados únicamente con Dynasore reveló que la diferencia de  $35 \pm 22$  vesículas en el control contra  $30 \pm 20$  en el tratamiento es significativa (Fig. sup. 3). No obstante, esta diferencia no es tan pronunciada como la observada al tratar con VAS2870. Esta disminución puede deberse a la habilidad parcial de las células para formar vesículas por la inhibición de la dinamina por el Dynasore.

### *7.2. Las modificaciones en las estructuras con F-actina causadas por la inhibición de las Nox se rescatan por el tratamiento con Dynasore*

Otro elemento analizado en las inmunofluorescencias fue el citoesqueleto de actina. Para esta tinción se utilizó a la faloidina, toxina derivada del hongo *Amanita phalloides* la cual se une a los filamentos de actina y los estabiliza, acoplada al fluoróforo Alexa 488 (J. A. Cooper, 1987).

En los embriones del pez cebra las células del EVL dan origen al peridermo, capa epitelial escamosa que recubre al embrión completo (Kimmel et al., 1990). En la zona apical del peridermo se puede observar un dominio de protrusiones cortas de F-actina que organiza una capa de glucanos, la cual hidrata y protege de patógenos y daños físicos al epitelio. Estas protrusiones apicales son conocidas como microcrestas, las cuales están compuestas de una red ramificada de F-actina y queratina (Depasquale, 2018). Las microcrestas comienzan como punta de F-actina visibles en la superficie de las células del EVL en la etapa de 50 % de epibolia. Posteriormente a las 12 hpf, estas punta se comienzan a elongar y forman a las microcrestas que son visibles de forma conspicua a las 48 hpf en un patrón que asemeja una huella dactilar (Pinto et al., 2019).

En los embriones control tratados con DMSO se observó una distribución uniforme de punta de F-actina sobre la superficie de las células de la EVL, así como los bordes de las células bien marcados (Fig. 6B, 9A). Cuando los embriones se trataron con 10  $\mu$ M de VAS2870, las punta de F-actina se perdieron (Fig. 6F, 9B) y la morfología de las células se afecta tal como se observó en el caso de las células de embriones tratados durante la etapa de 500-1000 células (Anexo 4). Sin embargo, cuando se realizó el tratamiento simultáneo de VAS2870 con 75  $\mu$ M de Dynasore la distribución de punta en las células de la EVL se rescató y las células presentaron una morfología igual a las células control (Fig. 6J, 9C).



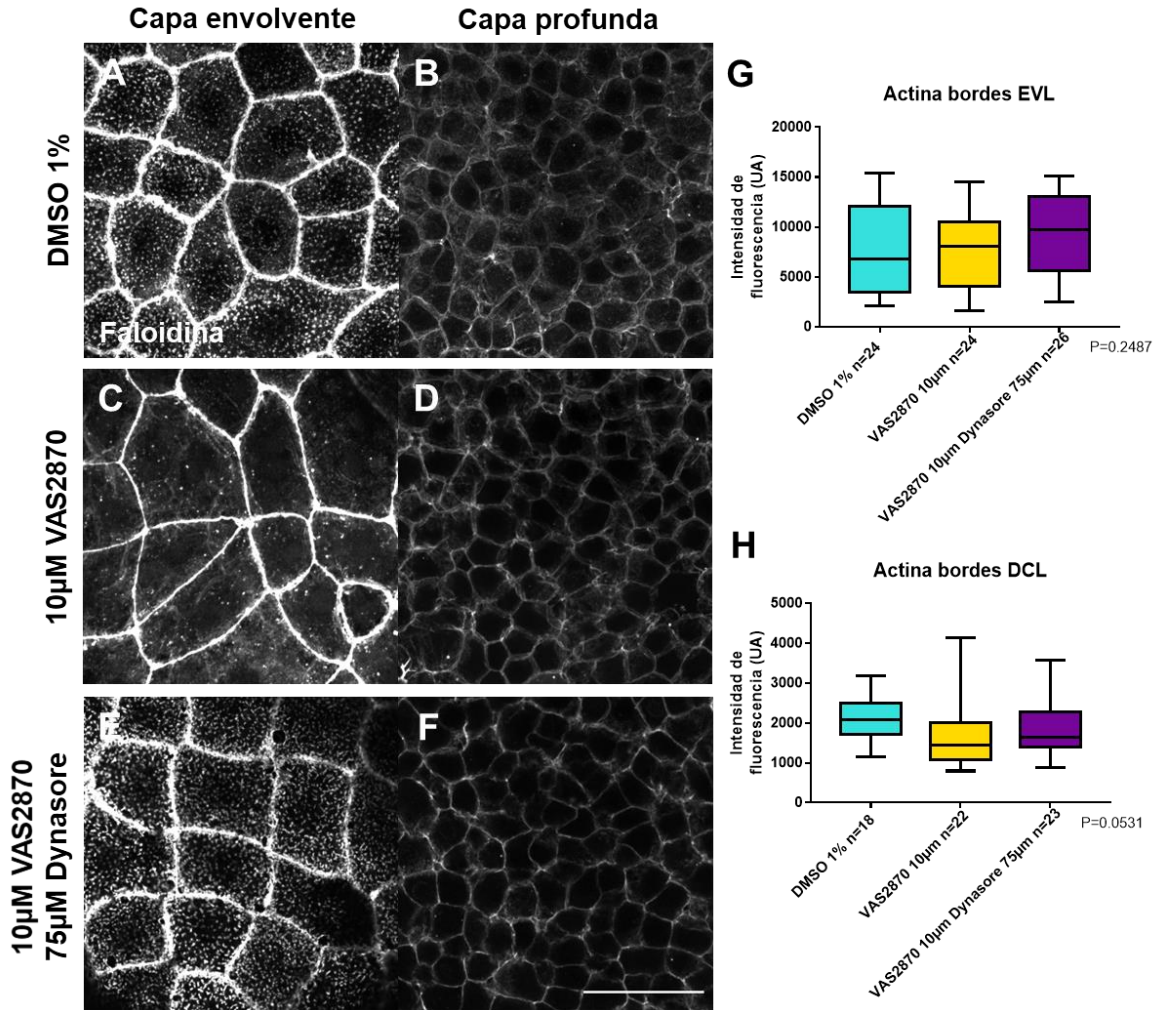
**Figura 9. La inhibición de la endocitosis rescata el número de punta de F-actina en la superficie de las células de la EVL. A, B, C:** localización de F-actina en células de la EVL determinada mediante la unión de faloidina acoplada a Alexa 488. Barra de escala de 50  $\mu$ m. **D:** Cuantificación de punta por célula completa. **E:** Cuantificación de punta por cada 1063  $\mu$ m<sup>2</sup> de superficie celular. p value <0.0001. Los bigotes muestran el rango de los datos.

Utilizando el software de Image J se cuantificaron las puncta de F-actina en las células de la EVL que se observan completas en las series de cortes adquiridos (Mendieta-Serrano et al., 2019). Cuando se cuantificó el número de puncta por célula (Fig. 9D) se encontró que el promedio para el control era de  $233 \pm 96$  puncta, mientras que para las células tratadas con VAS2870 el promedio era de  $49 \pm 82$  puncta. Esta disminución fue estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Kluskal-Wallis. Por otra parte, cuando los embriones se trataron simultáneamente con Dynasore y VAS2870, el promedio fue de  $242 \pm 108$ , y no mostró diferencias significativas con el control, lo cual indica que el número de puncta promedio en las células de la EVL se recuperó al inhibir a la dinamina.

Cuando las puncta se cuantificaron en función del área de las células (Fig. 9E), tomando  $1063 \mu\text{m}^2$  como el área promedio de una célula control, los datos siguieron el mismo patrón. El control presentó un promedio de  $237 \pm 57$  puncta, mientras que las células tratadas con VA2870 presentaban  $27 \pm 37$  puncta y en contraste las células de embriones tratados simultáneamente con VA2870 y Dynasore tuvieron en promedio  $227 \pm 41$  puncta. La disminución por el tratamiento con VA2870 fue estadísticamente significativa y al comparar a los embriones con el tratamiento simultáneo con Dynasore y VAS2870 la diferencia con respecto al control no fue significativa.

La cuantificación de las puncta de F-actina en embriones tratados únicamente con Dynasore reveló que el número de puncta por célula entre el control,  $185 \pm 79$ , y el tratamiento,  $165 \pm 65$ , no variaban significativamente (Fig. sup 4). Cuando la cuantificación se hizo con puncta por el área promedio de las células esta diferencia sí fue significativa al haber  $188 \pm 39$  puncta en el control y  $198 \pm 40$  en los tratamientos. Este aumento en relación con el área se podría deber a que la falta de endocitosis estabiliza a las puncta las cuales pueden tener una presencia más dinámica en la membrana de células control.

De manera semejante a la E-cad, se cuantificó la intensidad de la señal fluorescente de faloidina en los bordes tanto de las células de la capa envolvente (Fig.10G) como de las células de la capa profunda (Fig. 10H).



**Figura 10. La inhibición de las Nox y de la endocitosis no tienen efecto sobre la malla cortical de actina de los blastómeros.** Intensidad de fluorescencia en los bordes de las células de la EVL y DCL. **A, C, E:** localización de F-actina en células de la EVL determinadas mediante la unión de faloidina acoplada a Alexa 488. Barra de escala de 50 μm. **B, D, F:** actina en células de la DCL. **G:** Cuantificación de la intensidad de señal fluorescente en los bordes de la EVL. p value= 0.2487. **H:** Cuantificación de la intensidad de señal en los bordes de la DCL. p value= 0.0531. Los bigotes muestran el rango de los datos.

No se encontraron diferencias en la intensidad de la señal de actina en los bordes de las células de la EVL en embriones tratados con VAS2870 a comparación con el control, ni en el grupo tratado tanto con VAS2870 como con Dynasore. De igual manera, no parecen haber diferencias en la intensidad de señal en los bordes de las células de la DCL.



Nuevamente, la misma cuantificación de la intensidad de la señal fluorescente de faloidina en los bordes tanto de las células de la EVL como de las células de la DCL en embriones tratados únicamente con Dynasore 75  $\mu$ M no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. sup. 4). Esto indica que el tratamiento con Dynasore no tiene un efecto sobre la malla cortical de actina.

### *7.3. Los cambios en la morfología de las células de la EVL causados por la inhibición de las Nox se rescatan por el tratamiento con Dynasore*

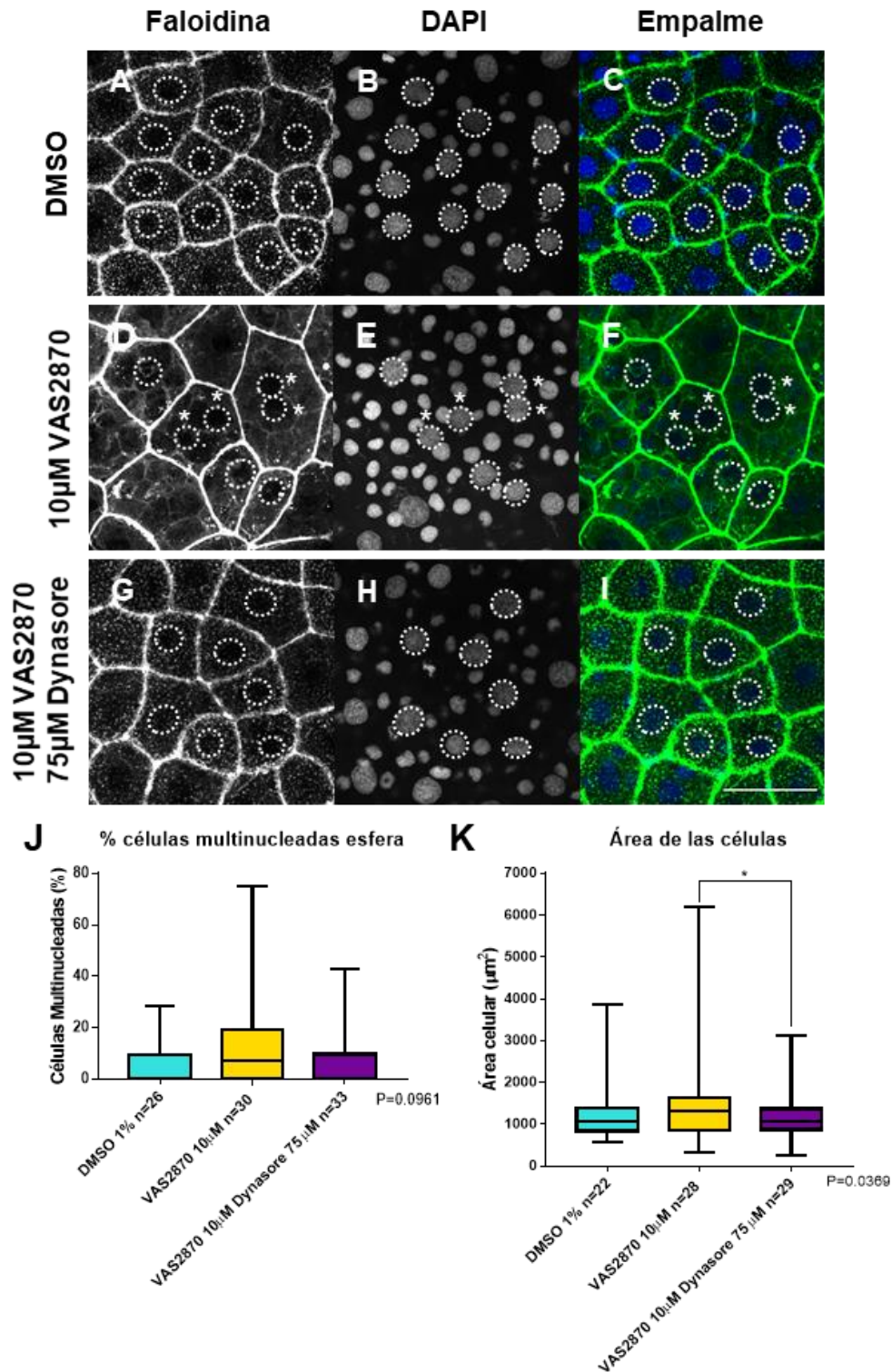
En un primer grupo de experimentos donde se realizaron tratamientos con el VAS2870 antes de la etapa de 1000 células y se analizaron posteriormente en la etapa de 50-60 % de epibolia (Anexo 4), se observó un gran número de células multinucleadas, las cuales presentaban desde dos núcleos por célula hasta cinco, aunque el número más común era de dos núcleos por célula (Fig. sup. 10).

Al observar los embriones de experimentos subsecuentes tratados con los inhibidores en la etapa de esfera y que se analizaron en la etapa de 50-60 % de epibolia, además de las diferencias en la distribución de E-cad y F-actina, se identificaron también las mismas diferencias en la morfología de las células de la EVL ya que mostraron la presencia de múltiples núcleos (Fig. 11).

Los porcentajes de células multinucleadas por embrión entre los distintos grupos de tratamientos no fueron significativamente diferentes entre ellos, pero muestran una tendencia clara ya que, al tratar con el vehículo de DMSO, el porcentaje promedio de células multinucleadas por serie adquirida fue de 2.2 %. Por otra parte, el tratamiento con VAS2870 aumentó la cantidad de células multinucleadas a 30.2 %, presentando entre dos y tres núcleos por célula. Cuando los embriones recibieron el tratamiento simultáneo de VAS2870 con Dynasore el porcentaje de células multinucleadas disminuyó a 1.1 %, rescatando el fenotipo de las células control (Fig. 11J).

En los tratamientos donde se utilizó al Dynasore de manera individual se observó también un 2.1 % de células multinucleadas en el control y un 1.1 % en el grupo tratado con Dynasore (Fig. sup. 5), por lo que no hay diferencias significativas

cuando se utiliza al Dynasore de manera aislada sobre el número de núcleos en una célula. Es importante mencionar que en ninguno de los grupos de tratamientos se observaron células multinucleadas en la DCL de los embriones evaluados.



**Figura 11. La inhibición de la endocitosis revierte los cambios en la morfología de las células de la EVL ocasionados por la inhibición de las Nox.** Presencia de células multinucleadas en la EVL en embriones tratados con 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870 y 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870 con 75  $\mu\text{M}$  de Dynasore en la etapa de esfera. **A-I:** Inmunotinción con faloidina acoplada a Alexa 488 para delimitar bordes celulares y DAPI para marcar núcleos. Los núcleos de células completas se encuentran bordeados por líneas punteadas. Las células multinucleadas se encuentran denotadas por asteriscos. Barra de escala de 50  $\mu\text{m}$ . **J:** Porcentaje de células completas multinucleadas por tratamiento. P value= 0.0961. **K:** Área de células de la EVL en embriones tratados con DMSO 1 %, 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870 y 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870. \* p value= 0.0369. Los bigotes muestran el rango de los datos.

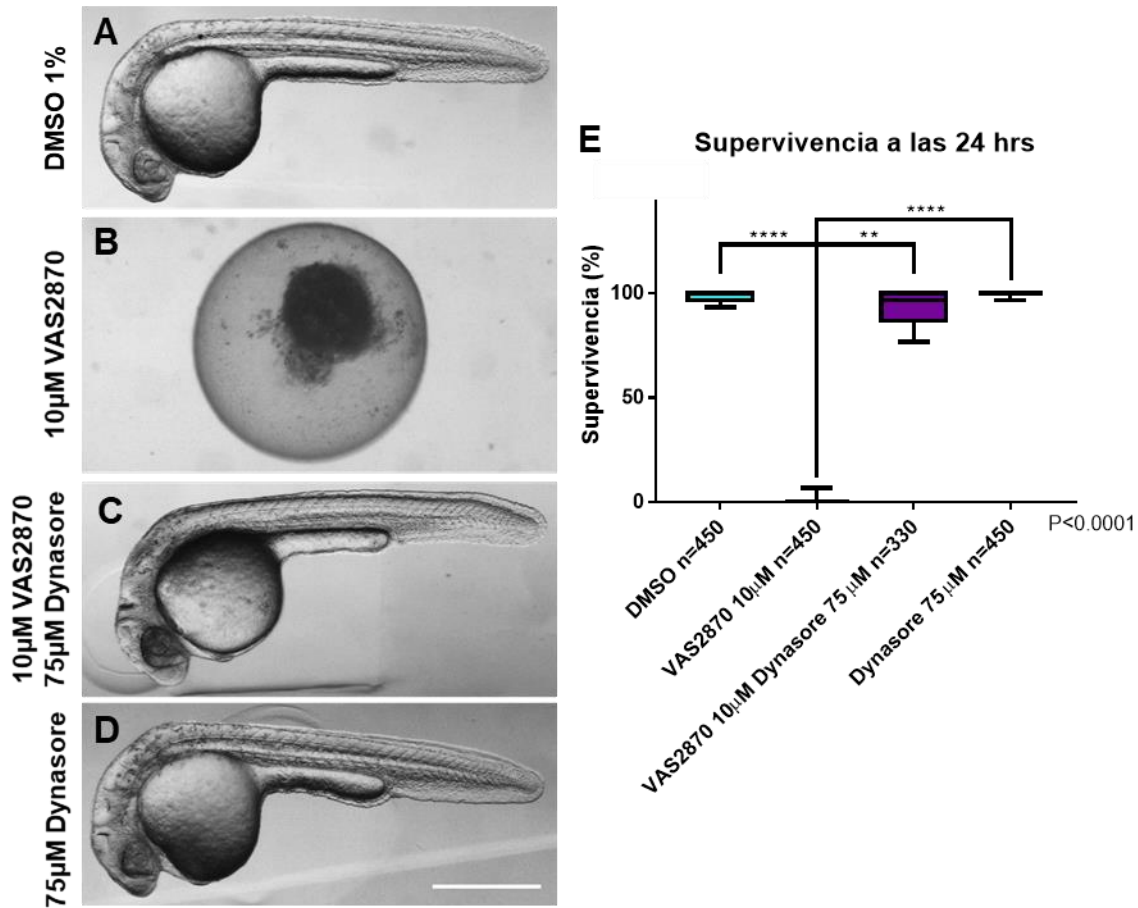
Otra diferencia que observamos en la morfología de las células tratadas con los inhibidores fue el tamaño de las EVL (Fig. 11K). Las células control tienen un área promedio de  $1150 \pm 430.7 \mu\text{m}^2$ . Al ser tratadas con VAS2870, el área promedio aumentó a  $1362 \pm 753.2 \mu\text{m}^2$ . Esta diferencia no fue significativa, pero marca una tendencia claramente al aumento del área de las células tratadas con el inhibidor de las Nox. Por otra parte, el tratamiento simultáneo de VAS2870 con Dynasore regresó el área promedio de las células a  $1158 \pm 441.2 \mu\text{m}^2$ , disminuyendo de forma significativa y rescatando el fenotipo control.

Por otra parte, en los tratamientos donde se utilizó al Dynasore de manera individual (Anexo 2) las células del tratamiento control presentaron un área de  $697.6 \pm 303.4 \mu\text{m}^2$  mientras que en el grupo tratado con Dynasore fue de  $608.3 \pm 257.4 \mu\text{m}^2$  (Fig. sup. 5). Aun cuando esta diferencia de aproximadamente  $90 \mu\text{m}^2$  resultó ser significativa, no es tan dramática como el aumento de casi  $200 \mu\text{m}^2$  observado en el tratamiento con VAS2870 (Fig. 11K). Concluimos que el rescate del área al tratar simultáneamente a las células con VAS2870 y Dynasore no se debe a algún artefacto ocasionado por este último.

#### *7.4. Tratamiento con Dynasore rescata la supervivencia de embriones tratados con el inhibidor de la actividad catalítica de las Nox*

Como se encontró que el tratamiento simultáneo del inhibidor de las Nox VAS2870 con Dynasore rescataba la distribución de la E-cad, las punta de actina, la morfología de las células de la EVL (presente tesis) y el avance de la epibolia (datos de Javier Méndez Cruz), se quiso evaluar si el Dynasore rescataba la

letalidad embrionaria que genera el tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870 a las 24 h después de la fertilización (Mendieta-Serrano et al., 2019).

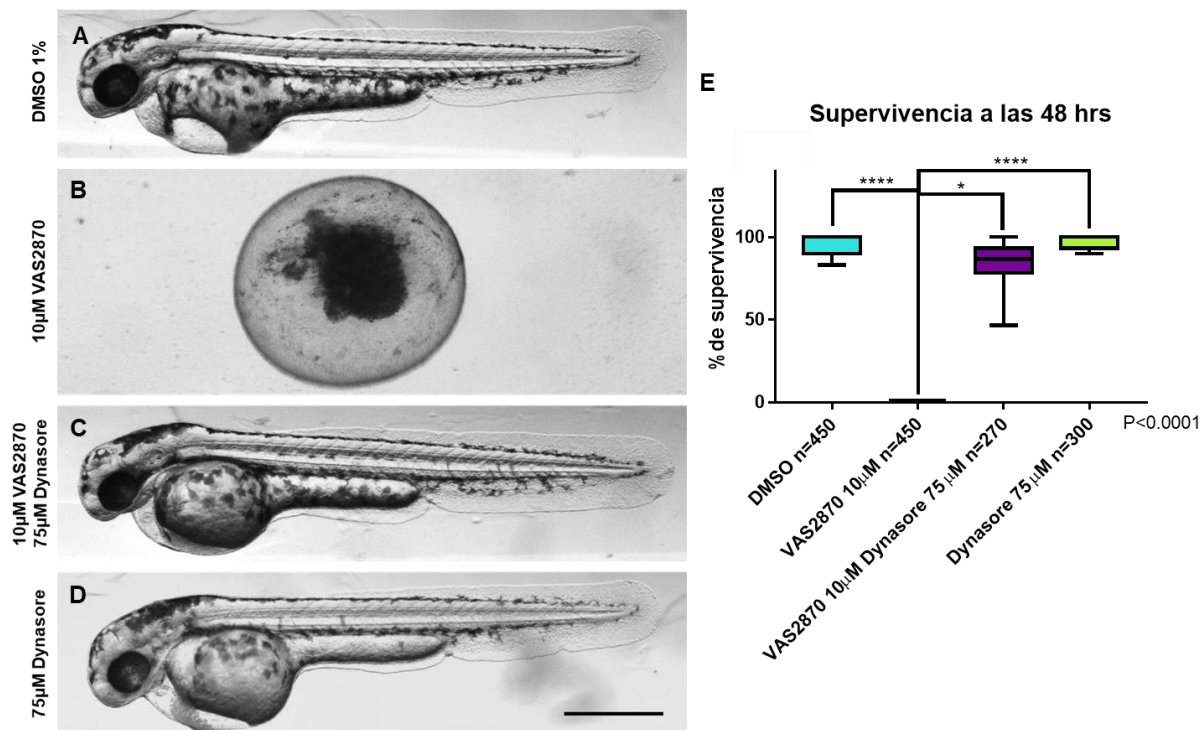


**Figura 12. La supervivencia de embriones tratados con VAS2870 a las 24 h es rescatada con la inhibición de la endocitosis.** **A:** embrión a las 24 h de tratamiento con DMSO al 1 %. **B:** embrión muerto dentro del corion a las 24 h de tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870. **C:** embrión a las 24 h de tratamiento con 75  $\mu\text{M}$  de Dynasore y 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870. **D:** embrión a las 24 h de tratamiento con 75  $\mu\text{M}$  de Dynasore. Barra de escala de 0.5 mm. **E:** Gráfica con los porcentajes de supervivencia a las 24 h de los distintos tratamientos. \*\*\*\* p value <0.0001. \*\* p value =0.0094. Bigotes muestran el rango de los datos.

Los embriones tratados con 1 % de DMSO por 24 h tuvieron una tasa de supervivencia del 98.7 % del total (Fig. 12A). Por otra parte, ninguno de los embriones tratados con 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870 sobrevivió hasta las 24 h de desarrollo, prácticamente el 100 % murieron antes de completar la epibolia. Se observó una supervivencia del 0.5 % y la mayoría de los embriones en este grupo morían alrededor de la etapa de 90 % de epibolia (Fig. 12B). En cambio, cuando los

embriones recibieron el tratamiento simultáneo de Dynasore con VAS2870 tuvieron una tasa de supervivencia del 91.8 % (Fig. 12C). Finalmente, el tratamiento por 24 h con Dynasore resulta en una supervivencia del 99.6 %, muy similar al control de DMSO. Este último tratamiento nos dice que las condiciones y la concentración en las que utilizamos al Dynasore no tiene efectos graves en la tasa de endocitosis ya que no genera defectos en el desarrollo normal de los embriones. Finalmente, con respecto a la morfología de los embriones, no se lograron observar diferencias a simple vista entre los embriones controles y los tratados con ambos inhibidores (Fig. 12A-D).

La supervivencia y morfología de los embriones tratados con los inhibidores se analizaron también después de 48 h de iniciado el tratamiento (Fig. 13).



**Figura 13. La supervivencia de embriones tratados con VAS2870 a las 48 h es rescatada con la inhibición de la endocitosis.** **A:** larva a las 48 h de tratamiento con DMSO al 1 %. **B:** restos de embrión muerto aún dentro del corion a las 48 h después del tratamiento con 10 µM de VAS2870. **C:** larva a las 48 h de tratamiento con 75 µM de Dynasore y 10 µM de VAS2870. **D:** larva a las 48 h de tratamiento con 75 µM de Dynasore. Barra de escala de 0.5 mm. **E:** Porcentajes de supervivencia a las 48 h de los distintos tratamientos. \*\*\*\* p value < 0.0001. \* p value = 0.0321 Bigotes muestran el rango de los datos.

Los embriones que se trataron con 1 % de DMSO tuvieron una tasa de supervivencia del 95.9 % en promedio a las 48 h. Los embriones que recibieron el tratamiento simultáneo de Dynasore con VAS2870 tuvieron una tasa de supervivencia del 83.7 % en promedio y el tratamiento únicamente con Dynasore produjo una supervivencia del 97.3 % (Fig. 13A). Con respecto a la morfología de las larvas, nuevamente no se pudieron observar diferencias a simple vista entre los tratamientos con los inhibidores y el control con DMSO (Fig.13A, C y D).

## 8. Discusión

En el artículo publicado en 2019 por Mendieta-Serrano y colaboradores se describió por primera vez el patrón de acumulación de EOR en el desarrollo temprano del pez cebra y cómo la actividad catalítica de las Nox era esencial para la progresión de la epibolia y la supervivencia embrionaria. También se describió que la ausencia de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  producidos por las Nox modifica el patrón de localización de la E-cadherina y la presencia de estructuras positivas a F-actina en las células de la EVL (Mendieta-Serrano et al., 2019). En el presente proyecto se lograron replicar los resultados correspondientes a los cambios en la E-cad y al citoesqueleto de actina al tratar con el VAS2870 (Fig. 6).

Por las similitudes observadas entre nuestro fenotipo obtenido tras las inhibición de las Nox y el fenotipo observado por Sempou y colaboradores, donde la localización de E-cad y la progresión de la epibolia se rescataban al tratar a los embriones carentes de Prp1 con el inhibidor de la dinamina (Sempou et al., 2016), fue que en este proyecto se evaluó si existe alguna relación entre las EOR y la endocitosis.

Para evaluar si los cambios en el patrón de localización de E-cadherina observada en la EVL en nuestros embriones se recuperaba también con la inhibición de la endocitosis, se realizaron tratamientos simultáneos con VAS2870 y Dynasore. El Dynasore es un inhibidor farmacológico no competitivo de la actividad de GTPasa de la dinamina, el cual bloquea la escisión de vesículas endocíticas de la membrana

plasmática. Este fármaco es capaz de inhibir la actividad de la dinamina 1, la dinamina 2 y la dinamina mitocondrial Drp1 (Macia et al., 2006).

### *8.1. La inhibición de la actividad de la dinamina 2 rescata la disrupción en la dinámica de localización de la E-cadherina ocasionada por la falta de actividad de las Nox*

En este proyecto se observó que el tratamiento simultáneo con VAS2870 y Dynasore rescata de manera significativa la señal membranal de la E-cad en las células de la EVL (Fig. 6 y 7), al igual que el número de vesículas positivas a E-cad en las mismas células (Fig. 6 y 8). Estos resultados sugieren que en ausencia del  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  ocasionada por la inhibición farmacológica de las Nox se está generando un aumento en la tasa de endocitosis que están llevando a cabo las células de la EVL.

Ya que tanto el Dynasore como el  $H_2O_2$  (Mendieta-Serrano et al., 2019) rescatan los cambios sobre la E-cad, pensamos que el posible blanco de las EOR producidas por las Nox es la dinamina 2, o en su defecto, alguna proteína que se encuentre río arriba. La dinamina es una proteína perteneciente a una superfamilia de GTPasas las cuales participan en distintos procesos celulares donde hay eventos de remodelación de la membrana plasmática, como en la citocinesis y en la fusión y fisión de vesículas y organelos grandes (Ramachandran & Schmid, 2018). En el genoma del pez cebra existen anotados 5 genes de dinamina, *dnm1a*, *dnm1l*, *dnm2a*, *dnm2b*, *dnm3a*, y el homólogo *opa1* (Arribat et al., 2019; Ferg et al., 2007; Gibbs et al., 2013; Yang et al., 2019). Se ha identificado también que la presencia de las dos isoformas de la dinamina 2 son esenciales para el desarrollo y la supervivencia de los embriones de pez cebra (Gibbs et al., 2013).

En la literatura se reporta que la dinamina es sensible a la regulación redox, ya que presenta una cisteína conservada (C607) la cual es sensible a la S-nitrosilación causada por la interacción con la sintasa endotelial de NO (eNOS). Esta nitrosilación causa un aumento en la tasa de autoensamblaje de la dinamina, en su actividad de GTPasa y facilita su redistribución en distintas regiones en la

membrana (Wang et al., 2006). A pesar de que no se ha reportado que esta cisteína sea modificada por  $H_2O_2$  o  $O_2^{\cdot-}$  directamente, existen GTPasas como las Rho GTPasas que pueden ser blanco tanto de NO como  $H_2O_2$ , por lo que la dinamina podría ser sensible a modificaciones redox por varias EOR (Chandra et al., 2012; MacKay et al., 2017; Sauzeau et al., 2000).

Nosotros hipotetizamos que en nuestro modelo el tratamiento de los embriones con el inhibidor de las Nox produce un aumento en la tasa endocítica en las células de la EVL ocasionada por la disminución del  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$ . La dinamina está involucrada en la entrada de vesículas por la vía de endocitosis mediada por clatrina (CME por sus siglas en inglés), la cual constituye alrededor del 95 % del total del flujo endocítico, por lo que un aumento en el índice de endocitosis por esta vía tendría un efecto significativo en la entrada de numerosas moléculas (Bitsikas et al., 2014; Macia et al., 2006). La inhibición de la dinamina 2 por acción del Dynasore es suficiente para revertir el fenotipo ocasionado por el VAS2870 y devolver el proceso endocítico a sus niveles endógenos.

Nuestros resultados se suman a los reportes previos que relacionan a las EOR con la regulación el flujo endocítico, donde se observó que el NO producido por la eNOS es capaz de regular el tráfico vesicular (Matsushita et al., 2003; Randriamboavonjy et al., 2004) y otros más donde un aumento en el  $H_2O_2$  resulta en la inhibición de la endocitosis del receptor de leptina y del EGFR en fibroblastos (De Wit et al., 2000; Wit et al., 2001).

Con respecto a la disminución en el número de vesículas positivas a E-cad en las células de la EVL (Fig. 6 y 8) existen reportes donde las Rabs, GTPasas que se asociadas a endosomas, también están sujetas a una regulación por cambios redox (Ferro et al., 2012). El cambio en la cantidad de vesículas en el citoplasma en los embriones tratados con VAS2870 habla de una redistribución en el flujo de los elementos una vez endocitados hacia vías de reciclaje o de degradación por la ausencia de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$ . Experimentos más específicos dirigidos a evaluar ambas vías son necesarios para determinar el destino de las vesículas que se pierden del citoplasma.



Por otra parte, cuando se realizó la cuantificación del número de vesículas positivas a E-cad en embriones tratados únicamente con Dynasore se reveló que la disminución con respecto al control era significativa (Fig. sup. 3). Esta disminución de vesículas en el citoplasma es esperada ya que las células presentan una habilidad significativamente reducida de separar a las vesículas endocíticas de la membrana plasmática por la inhibición de la dinamina 2. No obstante, la disminución en la cantidad de vesículas al tratar únicamente con Dynasore no fue tan pronunciada como la observada al tratar con VAS2870 (Fig. 6 y 8). Estos resultados indican que el rescate de las vesículas que se pierden tras la inhibición de las Nox se debe a la inhibición de la dinamina 2 y no a algún efecto inespecífico que podría estar teniendo el Dynasore.

### *8.2. La polimerización de la F-actina se encuentra regulada por las EOR producidas por las Nox y la dinamina 2*

Los filamentos de actina, junto con los microtúbulos y los filamentos intermedios, conforman al citoesqueleto de las células y contribuyen a determinar la morfología celular, participan en la citocinesis, en la endocitosis y en el tráfico vesicular, en la motilidad y la adhesión celular (Pollard & Cooper, 2009). En este proyecto nos enfocamos en analizar en los embriones dos estructuras compuestas por F-actina: la malla cortical de actina, la cual se encuentra asociada a la membrana plasmática y le da a las células su morfología global (Chalut & Paluch, 2016), y los precursores de las microcrestas (Depasquale, 2018). Las microcrestas son protrusiones cortas de F-actina y queratina que en etapas posteriores a las 24 h organizan la capa de glucanos, la cual constituye a la mucosa del peridermo. Durante el proceso de gastrulación se pueden observar punta de F-actina en la superficie de las células de la EVL, las cuales corresponden a los precursores de las microcrestas (Pinto et al., 2019).

Los resultados obtenidos en este proyecto, y que replican aquellos obtenidos previamente en el laboratorio (Mendieta-Serrano et al., 2019), apuntan a que la ausencia de las EOR producidas por las Nox tiene un efecto negativo sobre la capacidad de polimerización de la actina, ya que el tratamiento con VAS2870

disminuye la formación de las puncta de F-actina (Fig. 6 y 9). No obstante, la malla cortical de actina no se ve afectada (Fig. 10).

La actina presenta metioninas y de cinco a seis cisteínas conservadas, las cuales se pueden modificar dependiendo del estado redox de la célula, y pueden sufrir cambios como la oxidación, la nitrosilación, nitración, glutationilación y carbonilación (Dalle-Donne et al., 2002; Milzani et al., 2000; Terman & Kashina, 2013). En particular la Cys-374 es el aminoácido más susceptible a cambios redox (Wilson et al., 2016). Estas modificaciones causadas por agentes oxidantes son capaces de inhibir la polimerización de la actina globular, así como dismantelar las estructuras de la actina polimerizada.

Aparte de nuestros resultados, existen más trabajos donde se observa que existe una relación entre las EOR y la polimerización de la actina. Se ha reportado que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduce la habilidad de la actina globular unida a Ca<sup>2+</sup> de polimerizarse (Feuer & Molnar, 1948; Wong et al., 2015). De igual manera, en neutrófilos el NO es un factor capaz de controlar la formación de citonemas, un tipo de filopodio especializado para producir contactos de larga distancia con substratos, otras células o bacterias en neutrófilos.

Por otro lado, la actina también se asocia con proteínas que están sujetas a la regulación redox por cisteínas clave y que son capaces de regular su polimerización y despolimerización. Tal es el caso de la cofilina, el complejo Arp2/3 y la proteína Mical por mencionar algunas (Behring et al., 2020; Grintsevich et al., 2016; Hung et al., 2011).

Es por esta información que al inhibir a las Nox con el VAS2870 los cambios observados sobre las puncta en las células de la EVL pueden ser por modificaciones redox directamente sobre la actina o también sobre algún regulador río arriba.

Cuando en este proyecto se trató simultáneamente a los embriones con VAS2870 y Dynasore, los precursores de F-actina de las microcrestas se recuperaron sobre la superficie de las células de la EVL (Fig. 6 y 9). Este resultado

indica que no solo las EOR tienen efectos sobre el citoesqueleto de actina. La dinamina, además de su papel en la formación de estructuras vesiculares durante la endocitosis, también se encuentra relacionada con procesos de remodelación del citoesqueleto de actina al ser capaz de interactuar con proteínas de unión a actina como la cortactina, participar en la formación de cometas de actina en macropinosomas, en la expansión celular y al afectar la formación de podosomas, filopodios y citonemas (Macia et al., 2006; Ochoa et al., 2000; Orth et al., 2002).

En el caso particular de los citonemas, los cuales ya se mencionó son afectados por el NO, se encontró que el tratamiento de neutrófilos con Dynasore resulta en la formación de citonemas de forma espontánea en regiones cercanas al núcleo. No obstante, la inhibición farmacológica de la sintasa de NO no permite la formación de estos citonemas inducidos por el Dynasore (Galkina et al., 2015). Esto apunta a que existe una relación entre la dinamina y el NO en la regulación de formación de estructuras celulares donde participa el citoesqueleto de actina.

En nuestro trabajo observamos una dinámica similar, donde la disminución de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  por la inhibición de las Nox previene la formación de punta de F-actina. Por otra parte, la adición del Dynasore recupera la capacidad de polimerización de la actina, lo que nos provee de otro ejemplo donde se observa nuevamente la relación entre la dinamina, las EOR y el citoesqueleto de actina.

### *8.3. Las EOR producidas por las Nox y la actividad de la dinamina 2 podría tener efectos sobre la división celular en el desarrollo del pez cebra*

En este proyecto se observaron efectos en la morfología general de las células de la EVL en embriones tratados con el inhibidor de las Nox. Estas células presentaron áreas más grandes que el área de células control, así como la presencia de células con múltiples núcleos, presentando 2 y hasta 5 núcleos. Estas aberraciones sugieren que la ausencia de las EOR producidas por las Nox está afectando al ciclo celular y a la citocinesis. Existen además reportes donde se ha observado la presencia de reguladores claves de este proceso que son sensibles a cambios redox.

Uno de estos reguladores clave del ciclo celular que presenta regulación redox es la fosfatasa Cdc25 (Savitsky & Finkel, 2002). Cdc25 se encarga de desfosforilar a Cdk1, lo cual activa al complejo de ciclina B/Cdk1 y este complejo a su vez induce la entrada a mitosis (Perdiguero & Nebreda, 2004). Cdc25 presenta dos cisteínas, la C330 y la C377, las cuales son sensibles a cambios redox y participan en la inactivación de su actividad de fosfatasa durante el ciclo celular, así como en su interacción con la proteína 14-3-3 y su degradación en caso de estrés ambiental (Han et al., 2018; Savitsky & Finkel, 2002). Durante el desarrollo embrionario temprano de *Xenopus* existe una oscilación en la producción de EOR mitocondriales la cual empata con la oscilación del ciclo celular y con la activación de Cdc25 (Han et al., 2018). Esto sugiere que existe una estrecha relación entre la regulación de Cdc25, el ciclo celular y las EOR durante el desarrollo temprano.

En el genoma del pez cebra se encuentran anotadas dos isoformas de Cdc25, las isoformas Cdc25 b y Cdc25 d (Dalle Nogare et al., 2007). En este proyecto se analizó la secuencia de Cdc25 b y se encontró que las cisteínas clave para la regulación redox en humano, C330 y C377, se encuentran conservadas en el pez cebra (Anexo 8). Esta evidencia sugiere que Cdc25 podría estar relacionado con los fenómenos que observamos en este proyecto.

Un segundo elemento esencial para la citocinesis que está sujeto a regulación redox es el citoesqueleto de actina. La citocinesis inicia con la contracción de la membrana plasmática por acción de un anillo de actina y miosina II, lo que genera el ingreso del surco de división. Una vez establecido el ingreso del surco, el desensamblaje del citoesqueleto es necesario para la absición del puente intercelular que une a las dos células hijas por acción del Complejo de Clasificación Endosomal Requerido para el Transporte (ESCRT por sus siglas en inglés) (Green et al., 2012). En el caso de los filamentos de actina, se ha identificado que éstos se despolimerizan en el sitio de absición por acción de la monooxigenasa Mical. Mical oxida a la F-actina lo que ocasiona que los filamentos se desestabilicen y despolimericen (Frémont et al., 2017).

En nuestros embriones, la aparición de múltiples núcleos en las células del EVL pueden indicar fallas en la despolimerización de la actina al remover a las EOR producidas por las Nox, lo cual prevendría la absición del puente intracelular. El aumento en el área de las células tratadas con VAS2870 también apoyan la propuesta de que persiste de la unión de las dos células hijas una vez llevada a cabo la cariocinesis.

Una propuesta alternativa que podría estar causando los defectos en la citocinesis de las células de la EVL puede ser el cambio en la tasa endocítica ocasionada por la inhibición de las Nox. Se ha reportado que durante el desarrollo temprano del pez cebra existe en los blastómeros un proceso de endocitosis elevada que involucra vesículas de clatrina y caveolina, ambas dependientes de dinamina para su escisión de la membrana plasmática. Esta endocitosis se observa específicamente en los surcos de división durante su iniciación. Cuando se inhibe la CME se observa la aparición de células multinucleadas y sincicios, así como blastómeros que pierden el contacto con el resto del blastodermo (Feng et al., 2002). Estos resultados demuestran que la endocitosis es esencial para la correcta citocinesis y la estabilidad del blastodermo.

Reportes en *Drosophila* y *Dictyostelium discoideum* donde mutantes del homólogo de la dinamina y la clatrina afectan al proceso de celularización y citocinesis respectivamente (Swanson & Poodry, 1981; Wienke et al., 1999), así como en *S. cerevisiae* donde se identificó una mutante que presenta defectos tanto en la endocitosis como en la citocinesis (Naqvi et al., 2001) apuntan a que existe importante relación de regulación entre estos dos procesos.

Aun cuando en nuestro modelo pasa lo contrario a lo descrito en el trabajo de Feng, ya que hipotetizamos que en nuestros embriones hay un aumento en la endocitosis en vez de una inhibición, los cambios en la división celular podrían ser causados por cambios en la vía de señalización de algún factor clave para la citocinesis. La entrada de receptores y sus ligandos de forma regulada al interior de las células está relacionada con la CME (Bitsikas et al., 2014; Macia et al., 2006). Algunas de las vías de señalización relacionadas con la endocitosis son las

cascadas de señalización de receptores de tirosina cinasa, receptores tipo Toll, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Wnt, BMPs y Notch (Miaczynska et al., 2004; Platta & Stenmark, 2011).

Otro resultado que obtuvimos y que podría apoyar esta propuesta es que el tratamiento únicamente con Dynasore resulta en células más pequeñas que las observadas en el control (Fig. sup. 5H). En este caso, la inhibición de la entrada de distintas moléculas del espacio extracelular estaría afectando vías de señalización ligados a la interfase, que es la etapa del ciclo celular donde se observa crecimiento. Las células tratadas con Dynasore podrían estar entrando a mitosis de forma prematura resultando en células más pequeñas. Se requieren más experimentos dirigidos a evaluar cambios en el ciclo celular para obtener más información.

#### *8.4. La interacción entre el producto de las Nox y la endocitosis durante la epibolia regula el desarrollo y promueve la supervivencia*

Quizás el resultado más relevante obtenido en este proyecto es el relacionado con los ensayos de supervivencia. En el laboratorio previamente se observó que el 100 % de los embriones tratados continuamente con VAS2870 a partir de la etapa de esfera morían alrededor de la etapa de 90% de epibolia, y que los embriones que fueron tratados con un pulso de 1 h solamente tenían una tasa de supervivencia del 10 a 20 %, pero estos embriones sobrevivientes presentaban defectos importantes en el cerebro, ojos, vesícula ótica y en la extensión de la cola lo cual ocasionaba una reducción en el eje axial del embrión. La letalidad embrionaria y los defectos en la morfología se prevenían en los embriones que fueron tratados con VAS2870 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mendieta-Serrano et al., 2019).

En este proyecto lo que observamos fue que el tratamiento simultáneo con el inhibidor de las Nox y con el inhibidor de la dinamina 2 por 24 h a partir de la etapa de esfera prevenía la letalidad embrionaria causada por el VAS2870 (Fig. 12). A la vez, no se observaron a simple vista defectos evidentes en el desarrollo de algún órgano o tejido en las larvas. Cuando a las larvas se les permitió continuar su desarrollo en ausencia de los fármacos hasta las 48 h, la supervivencia se mantuvo

y nuevamente no se lograron observar defectos morfológicos evidentes (Fig. 13). Nosotros hipotetizamos que posiblemente la falta de las EOR producidas por las Nox aumenta la endocitosis de manera significativa durante la epibolia y este fenómeno es el causante directo o indirecto de la letalidad embrionaria. Cuando se hace el tratamiento simultáneo con VAS2870 y Dynasore, la endocitosis disminuye y regresa a sus niveles basales, revirtiendo la letalidad y rescatando el desarrollo.

Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a que existe una ventana de tiempo antes de que el embrión alcance el 90 % de epibolia donde el  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  producidos por las Nox son esenciales para la regulación de la endocitosis, la cual a su vez participa en la progresión de la epibolia, la gastrulación y la supervivencia del embrión.

La idea de que la regulación de la endocitosis durante el desarrollo temprano es esencial para la supervivencia se refuerza por otros fenotipos donde la endocitosis se inhibe de forma significativa y se producen también defectos en el desarrollo y muerte. Cuando los embriones son decorionados y tratados con Dynasore se observa un retraso significativo en la progresión de la epibolia. Asimismo, cuando los embriones expresan a la dominante negativa de la dinamina 2 (DN-Dnm2), y por ende tienen un impedimento en el flujo endocítico, estos también presentan retrasos en el desarrollo y letalidad embrionaria (Lepage et al., 2014).

Esta forma DN-Dnm2 se utilizó en el laboratorio para corroborar con una herramienta genética la existencia de la relación entre las EOR producidas por las Nox y la endocitosis y descartar que los resultados obtenidos fueran artefactos generados por la interacción entre el Dynasore y el VAS2870. Cuando los embriones que expresan a la DN-Dnm2 fueron tratados desde la etapa de 1000 células con el inhibidor de las Nox, el retraso en la epibolia se revierte y se recupera la supervivencia embrionaria (datos no publicados de Javier Méndez Cruz). Es necesario realizar estudios de resonancia magnética nuclear para determinar con certeza si la interacción de los dos fármacos no está interfiriendo con sus estructuras y los efectos que tienen sobre los embriones (Mendieta-Serrano et al., 2019), pero

ya que contamos con dos experimentos con metodologías distintas que producen los mismos resultados podemos decir con bases que existe una relación entre EOR producidas por las Nox y la endocitosis durante el desarrollo temprano del pez cebra.

#### *8.5. La inhibición catalítica de las Nox tiene efectos diferentes en las distintas capas celulares embrionarias durante la epibolia*

En los resultados obtenidos en este proyecto se observó que tratamientos con los distintos fármacos tuvieron un efecto diferente en las dos capas celulares que conforman al blastodermo. La disminución de la señal de E-cad, tanto en las vesículas citoplasmáticas como en las membranas celulares, se observó en las células de la EVL, mientras que el retraso en la progresión de la epibolia reportado en trabajos previos del laboratorio se observó preferencialmente en las células de la DCL (Mendieta-Serrano et al., 2019). Estas diferencias pueden deberse a que la EVL funciona como un andamio para la DCL y se encuentra involucrada en la intercalación y migración de las células de esta capa durante la epibolia, fenómeno que se observa en otros modelos como el pez killi (Reig et al., 2017).

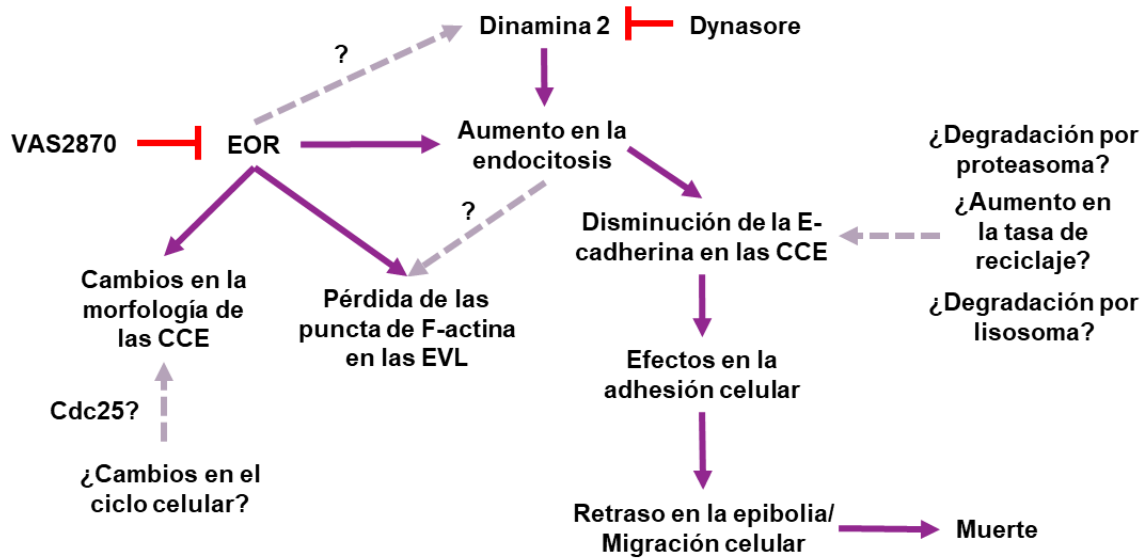
Se ha reportado además que la disminución en la E-cad en la EVL afecta la interacción de esta capa con las células de la DCL, así como la capacidad de intercalación de blastómeros ubicados en posiciones más profundas en relación con la interfase entre la DCL y la EVL (Sempou et al., 2016). Por eso pensamos que la diferencia en la localización de E-cad entre la EVL y la DCL es una de las razones por la que los embriones tratados con VAS2070 presentan un retraso en la epibolia, que además es diferente entre las dos capas, siendo las células de la DCL las que se retrasan más (Kane et al., 2005; Mendieta-Serrano et al., 2019).

En el presente proyecto encontramos evidencia que apunta a que cuando se rescatan los efectos que la inhibición de las Nox tiene sobre las células de la EVL al regular a la endocitosis, los diferentes comportamientos en la migración celular de ambas capas se normalizan y la epibolia se lleva a cabo de forma normal.



## 9. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este proyecto y la relación biológica entre los distintos fenómenos observados se resumen en la siguiente figura (Fig. 14).



**Figura 14. Resumen gráfico de los resultados obtenidos en esta tesis.** Líneas solidas denotan las relaciones entre los resultados obtenidos en este proyecto. Líneas punteadas sugieren relación entre los procesos biológicos propuestos y los resultados obtenidos en este proyecto. Flecha con remate plano denota la inhibición entre el VAS2870 y las Nox, así como del Dynasore y la actividad de GTPasa de la dinamina 2.

En este proyecto presentamos evidencia de la relación que existe entre las EOR producidas por las Nox y la regulación de la endocitosis dependiente de dinamina 2 durante el proceso de epibolia en el desarrollo temprano del pez cebra.

El rescate que se encontró al tratar a los embriones que presentan la inhibición farmacológica de la actividad de las Nox con Dynasore durante la etapa de esfera sugiere que al haber una disminución en la producción de  $H_2O_2$  se está aumentando la tasa de endocitosis en las células de la EVL, proceso que observamos al utilizar a la E-cad como un reportero indirecto. Esta desregulación se recupera al inhibir a la dinamina 2 y, por ende, a la endocitosis dependiente de esta GTPasa. Nuestros resultados indican que la regulación que el  $H_2O_2$  modifica la tasa endocítica vía la dinamina 2, ya sea de forma directa o por algún elemento río arriba.

Encontramos además que el efecto de la inhibición de las Nox sobre la morfología de las células del embrión es diferente, ya que observamos que las células de la EVL son las que presentan cambios en la localización de la E-cad y en su morfología, con probables problemas para realizar la citocinesis como lo indican una mayor área celular y la presencia de múltiples núcleos. Estos efectos en la morfología de las células, el área y el número de núcleos por célula, se rescatan al hacer tratamientos simultáneos con el inhibidor de la dinamina 2. Es probable que las diferencias en la morfología sean una consecuencia secundaria de los cambios en la endocitosis de algún morfógeno o efector de distintas vías de señalización. Para obtener más información sobre este fenómeno observado sería necesario realizar experimentos dirigidos a observar el ciclo celular de forma específica.

Con respecto al alcance que los efectos de los inhibidores tienen más allá del desarrollo temprano se encontró que la inhibición farmacológica simultánea de las Nox y de la dinamina 2 rescata la supervivencia de los embriones que presentan la inhibición de las Nox a las 24 y 48 h del tratamiento con los inhibidores. El rescate del fenotipo parece ser total, ya que no se observaron defectos o retrasos en el desarrollo de ningún tejido embrionario tanto a las 24 h como a las 48 h. Esto nos indica que la regulación de la endocitosis dentro de las primeras 24 h es necesaria y suficiente para el correcto desarrollo embrionario y que el devolver su dinámica a valores normales al inhibir a la dinamina 2 rescata la supervivencia prácticamente en su totalidad a las 48 h.

## 10. Perspectivas

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren una relación entre la endocitosis, la adhesión celular, el citoesqueleto, la epibolia y las EOR. No obstante, se requiere más información para descubrir cual es el mecanismo que conecta a todos estos procesos celulares durante el desarrollo temprano. A continuación, se sugieren algunas preguntas que serían importantes responder y posibles metodologías para poder abordarlas.

En esta tesis y en trabajos previos en el laboratorio reportamos una disminución en la señal de la E-cad en las células de la EVL cuando se provoca una disminución en la formación de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  (Mendieta-Serrano et al., 2019). Una pregunta que queda por responder es qué le pasa a la E-cad que se retira de la membrana plasmática. Se hicieron avances importantes en este proyecto para conseguir ver la banda de 120 kDa de E-cad con el método de Western blot, la cual corresponde a la forma madura que se integra en la membrana y participa en la adhesión celular (Anexo 3).

Conseguir una separación nítida entre la banda de 140 kDa y la de 120 kDa nos permitiría cuantificar la proteína total de cada peso y determinar si la pérdida de la E-cad de las membranas y del citoplasma se debe a que hay una degradación seguida de la endocitosis o si la deslocalización se debe solamente a que hay un aumento en la endocitosis. Este fenómeno se podría evaluar haciendo tratamientos simultáneos con el VAS2070 y distintos inhibidores para el proteasoma y el lisosoma como el MG132 y la cloroquina respectivamente (Sempou et al., 2016). Con ensayos de Western blot de estos tratamientos se determinaría cuál de los tratamientos con los demás inhibidores realizados simultáneamente junto con el VAS2870 rescatan a la E-cad, lo que revelaría un eje de regulación entre la endocitosis de la E-cad, su degradación y las EOR producidas por las Nox.

También se puede evaluar si existen más integrantes en la dinámica de localización y transporte de la E-cadherina que se encuentren regulados por la acción del  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  y participen en la generación de los fenotipos de retraso en la epibolia observados en este trabajo. Existe evidencia de que las Rabs presentan una regulación redox (Ferro et al., 2012). Determinar la dinámica de reciclaje de la E-cad *in vivo* utilizando una E-cad fusionada con GFP (Kardash et al., 2010), así como su asociación con distintas Rabs fluorescentes (Song et al., 2013) nos darían la oportunidad de monitorear este fenómeno en distintas condiciones redox.

Otra pregunta que queda por responder es qué le pasa a la tasa de endocitosis de los embriones tratados con los inhibidores VAS2870 y Dynasore, ya que los fenotipos ocasionados por el inhibidor de las Nox se rescatan por un

inhibidor de la dinamina. Para ver la endocitosis de elementos del medio hacia el interior de las células *in vivo* se pueden utilizar moléculas fluorescentes como Lucifer yellow (Lepage et al., 2014). El Lucifer yellow es una sal de litio de carbohidrazida soluble en agua con picos de excitación y emisión de 428 y 536 nm respectivamente la cual se puede utilizar para medir la endocitosis al ingresar a las células por medio de vesículas endocíticas (Page et al., 1994). Los resultados observados en este proyecto sugieren que existe una desregulación que incrementa la endocitosis en los embriones debido a inhibición farmacológica de las Nox. La cuantificación del material fluorescente endocitado nos daría información sobre esta hipótesis.

Finalmente, consideramos importante evaluar cómo la ausencia de la E-cad en las células de la EVL afecta la dinámica de intercalación de las células de la capa profunda y su interacción con las células de la capa envolvente (Lepage & Bruce, 2010). La deslocalización de la E-cad ocasiona defectos en la capacidad de las células de la DCL de intercalarse en la región más superficial y asociarse con las células de la EVL (Sempou et al., 2016). Se puede emplear microscopía con iluminación de Nomarski para observar a las dos distintas capas del blastodermo y seguir con un video en tiempo real la dinámica de intercalación y asociación de las células. Una segunda opción es emplear moléculas fluorescentes para marcar de forma diferente los núcleos y membranas de las células (M. S. Cooper & D'Amico, 1996) y poder seguir así sus dinámicas *in vivo* utilizando la microscopía confocal de disco giratorio. Hemos recibido algunos plásmidos del grupo de la Dra. Ashley Bruce que codifican para las proteínas que marcan la membrana y el núcleo (Lepage et al., 2014) que podemos inyectar en embriones de 1 célula para su transcripción, lo cual permitirá realizar un análisis de este tipo en el futuro.

## 11. Referencias

- Aamar, E., & Dawid, I. B. (2008). Protocadherin-18a has a role in cell adhesion, behavior and migration in zebrafish development. *Developmental Biology*, 318(2), 335–346. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.03.040>
- Aguirre, J., & Lambeth, J. D. (2010). Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 49, Issue 9, pp. 1342–1353). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.027>
- Al-Mehdi, A. B., Pastukh, V. M., Swiger, B. M., Reed, D. J., Patel, M. R., Bardwell, G. C., Pastukh, V. V., Alexeyev, M. F., & Gillespie, M. N. (2012). Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription. *Science Signaling*, 5(231). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002712>
- Ameziane-El-Hassani, R., Morand, S., Boucher, J. L., Frapart, Y. M., Apostolou, D., Agnandji, D., Gnidehou, S., Ohayon, R., Noël-Hudson, M. S., Francon, J., Lalaoui, K., Virion, A., & Dupuy, C. (2005). Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30046–30054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500516200>
- Angst, B. D., Marcozzi, C., & Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily: Diversity in form and function. *Journal of Cell Science*, 114(4), 629–641. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.4.629>
- Aoki, S. (2017). *BIORENDER*. Biorender.
- Arribat, Y., Grepper, D., Lagarrigue, S., Richard, J., Gachet, M., Gut, P., & Amati, F. (2019). Mitochondria in Embryogenesis: An Organellogenesis Perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00282>
- Babb, S. G., Barnett, J., Doedens, A. L., Cobb, N., Liu, Q., Sorkin, B. C., Yelick, P. C., Raymond, P. A., & Marrs, J. A. (2001). Zebrafish E-cadherin: Expression during early embryogenesis and regulation during brain development. *Developmental Dynamics*, 221(2), 231–237. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1132>
- Babb, S. G., & Marrs, J. A. (2004). E-cadherin regulates cell movements and tissue formation in early zebrafish embryos. *Developmental Dynamics*, 230(2), 263–277. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20057>
- Bardaweel, S. K., Gul, M., Alzweiri, M., Ishaqat, A., Alsalamat, H. A., & Bashatwah, R. M. (2018). Reactive oxygen species: The dual role in physiological and pathological conditions of the human body. In *Eurasian Journal of Medicine* (Vol. 50, Issue 3, pp. 193–201). Ataturk University School of Medicine. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.17397>
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. In *Physiological Reviews* (Vol. 87, Issue 1, pp. 245–313). <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Behring, J. B., van der Post, S., Mooradian, A. D., Egan, M. J., Zimmerman, M. I.,

- Clements, J. L., Bowman, G. R., & Held, J. M. (2020). Spatial and temporal alterations in protein structure by EGF regulate cryptic cysteine oxidation. *Science Signaling*, 13(615). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aay7315>
- Behrndt, M., Salbreux, G., Campinho, P., Hauschild, R., Oswald, F., Roensch, J., Grill, S. W., & Heisenberg, C. P. (2012). Forces driving epithelial spreading in zebrafish gastrulation. *Science*, 338(6104), 257–260. <https://doi.org/10.1126/science.1224143>
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1758, Issue 8, pp. 994–1003). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Bitsikas, V., Corrêa, I. R., & Nichols, B. J. (2014). Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *ELife*, 2014(3), 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.03970>
- Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 76, pp. 208–226). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046>
- Bruce, A. E. E., Howley, C., Fox, M. D., & Ho, R. K. (2005). T-box gene eomesodermin and the homeobox-containing mix/bix gene mtx2 regulate epiboly movements in the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 233(1), 105–114. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20305>
- Carreira-Barbosa, F., Kajita, M., Morel, V., Wada, H., Okamoto, H., Arias, A. M., Fujita, Y., Wilson, S. W., & Tada, M. (2009). Erratum: Flamingo regulates epiboly and convergence/extension movements through cell cohesive and signalling functions during zebrafish gastrulation (Development vol. 136 (383-392)). *Development*, 136(5), 877. <https://doi.org/10.1242/dev.034751>
- Chalut, K. J., & Paluch, E. K. (2016). The Actin Cortex: A Bridge between Cell Shape and Function. In *Developmental Cell* (Vol. 38, Issue 6, pp. 571–573). Dev Cell. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.011>
- Chandra, S., Romero, M. J., Shatanawi, A., Alkilany, A. M., Caldwell, R. B., & Caldwell, R. W. (2012). Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *British Journal of Pharmacology*, 165(2), 506–519. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01584.x>
- Commoner, B., Townsend, J., & Pake, G. E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature*, 174(4432), 689–691. <https://doi.org/10.1038/174689a0>
- Cooper, J. A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. In *The Journal of cell biology* (Vol. 105, Issue 4, pp. 1473–1478). The Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.4.1473>
- Cooper, M. S., & D'Amico, L. A. (1996). A cluster of noninvoluting endocytic cells at the margin of the zebrafish blastoderm marks the site of embryonic shield formation. *Developmental Biology*, 180(1), 184–198. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0294>
- Corallino, S., Malabarba, M. G., Zobel, M., Di Fiore, P. P., & Scita, G. (2015). Epithelial-to-

- mesenchymal plasticity harnesses endocytic circuitries. *Frontiers in Oncology*, 5(FEB). <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00045>
- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., & Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? In *Developmental Biology* (Vol. 320, Issue 1, pp. 1–11). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.041>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Gagliano, N., Di Simplicio, P., Colombo, R., & Milzani, A. (2002). Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 927–937. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00799-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00799-2)
- Dalle Nogare, D. E., Arguello, A., Sazer, S., & Lane, M. E. (2007). Zebrafish cdc25a is expressed during early development and limiting for post-blastoderm cell cycle progression. *Developmental Dynamics*, 236(12), 3427–3435. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21363>
- Davis, M. A., Ireton, R. C., & Reynolds, A. B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *Journal of Cell Biology*, 163(3), 525–534. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307111>
- De Wit, R., Capello, A., Boonstra, J., Verkleij, A. J., & Post, J. A. (2000). Hydrogen peroxide inhibits epidermal growth factor receptor internalization in human fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(1), 28–38. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00199-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00199-9)
- Depasquale, J. A. (2018). Actin Microridges. In *Anatomical Record* (Vol. 301, Issue 12, pp. 2037–2050). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/ar.23965>
- Disanza, A., Frittoli, E., Palamidessi, A., & Scita, G. (2009). Endocytosis and spatial restriction of cell signaling. In *Molecular Oncology* (Vol. 3, Issue 4, pp. 280–296). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.05.008>
- Eaton, R. C., & Farley, R. D. (1974). Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory. *Copeia*, 1974(1), 195. <https://doi.org/10.2307/1443023>
- Feng, B., Schwarz, H., & Jesuthasan, S. (2002). Furrow-specific endocytosis during cytokinesis of zebrafish blastomeres. *Experimental Cell Research*, 279(1), 14–20. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5579>
- Ferg, M., Sanges, R., Gehrig, J., Kiss, J., Bauer, M., Lovas, A., Szabo, M., Yang, L., Straehle, U., Pankratz, M. J., Olsz, F., Stupka, E., & Müller, F. (2007). The TATA-binding protein regulates maternal mRNA degradation and differential zygotic transcription in zebrafish. *EMBO Journal*, 26(17), 3945–3956. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601821>
- Ferro, E., Goitre, L., Retta, S. F., & Trabalzini, L. (2012). The Interplay between ROS and Ras GTPases: Physiological and Pathological Implications. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/365769>

- Feuer, G., & Molnar, F. (1948). Studies on the composition and polymerization of actin. *Hungarica Acta Physiologica*, 1(4–5), 150–163.
- Fogarty, C. E., Diwanji, N., Lindblad, J. L., Tare, M., Amcheslavsky, A., Makhijani, K., Brückner, K., Fan, Y., & Bergmann, A. (2016). Extracellular Reactive Oxygen Species Drive Apoptosis-Induced Proliferation via *Drosophila* Macrophages. *Current Biology*, 26(5), 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.064>
- Frémont, S., Hammich, H., Bai, J., Wioland, H., Klinkert, K., Rocancourt, M., Kikuti, C., Stroebel, D., Romet-Lemonne, G., Pylypenko, O., Houdusse, A., & Echard, A. (2017). Oxidation of F-actin controls the terminal steps of cytokinesis. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14528>
- Fuentes, R., & Fernández, J. (2010). Ooplasmic segregation in the zebrafish zygote and early embryo: Pattern of ooplasmic movements and transport pathways. *Developmental Dynamics*, 239(8), 2172–2189. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22349>
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E. M., Behrens, J., Sommer, T., & Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature Cell Biology*, 4(3), 222–231. <https://doi.org/10.1038/ncb758>
- Galkina, S. I., Fedorova, N. V., Serebryakova, M. V., Arifulin, E. A., Stadnichuk, V. I., Gaponova, T. V., Baratova, L. A., & Sud'ina, G. F. (2015). Inhibition of the GTPase dynamin or actin depolymerisation initiates outward plasma membrane tubulation/vesiculation (cytoneme formation) in neutrophils. *Biology of the Cell*, 107(5), 144–158. <https://doi.org/10.1111/boc.201400063>
- Geng, F., Zhu, W., Anderson, R. A., Leber, B., & Andrews, D. W. (2012). Multiple post-translational modifications regulate E-cadherin transport during apoptosis. *Journal of Cell Science*, 125(11), 2615–2625. <https://doi.org/10.1242/jcs.096735>
- Gibbs, E. M., Davidson, A. E., Trickey-Glassman, A., Backus, C., Hong, Y., Sakowski, S. A., Dowling, J. J., & Feldman, E. L. (2013). Two Dynamin-2 Genes Are Required for Normal Zebrafish Development. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055888>
- Gilbert, S. F. (2013). *Developmental Biology*. 10th Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. In *10th Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates*.
- Go, Y. M., Chandler, J. D., & Jones, D. P. (2015). The cysteine proteome. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 84, pp. 227–245). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.022>
- Green, R. A., Paluch, E., & Oegema, K. (2012). Cytokinesis in animal cells. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 28, pp. 29–58). Annu Rev Cell Dev Biol. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155718>
- Grintsevich, E. E., Yesilyurt, H. G., Rich, S. K., Hung, R. J., Terman, J. R., & Reisler, E. (2016). F-actin dismantling through a redox-driven synergy between Mical and cofilin. *Nature Cell Biology*, 18(8), 876–885. <https://doi.org/10.1038/ncb3390>



- Halbleib, J. M., & Nelson, W. J. (2006). Cadherins in development: Cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. In *Genes and Development*.  
<https://doi.org/10.1101/gad.1486806>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1985). Free radicals in biology and medicine. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1(4), 331–332. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90140-0](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90140-0)
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 142, Issue 2, pp. 231–255). Wiley-Blackwell.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Han, Y., Ishibashi, S., Iglesias-Gonzalez, J., Chen, Y., Love, N. R., & Amaya, E. (2018). Ca<sup>2+</sup>-Induced Mitochondrial ROS Regulate the Early Embryonic Cell Cycle. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.042>
- Hernández-García, D., Wood, C. D., Castro-Obregón, S., & Covarrubias, L. (2010). Reactive oxygen species: A radical role in development? In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 49, Issue 2, pp. 130–143). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.020>
- Hoschuetzky, H., Aberle, H., & Kemler, R. (1994).  $\beta$ -Catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *Journal of Cell Biology*, 127(5), 1375–1380. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.5.1375>
- Huber, A. H., & Weis, W. I. (2001). The Structure of the  $\beta$ -Catenin/E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by  $\beta$ -Catenin. *Cell*, 105(3), 391–402. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00330-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00330-0)
- Hung, R. J., Pak, C. W., & Terman, J. R. (2011). Direct redox regulation of F-actin assembly and disassembly by Mical. *Science*, 334(6063), 1710–1713.  
<https://doi.org/10.1126/science.1211956>
- Hurd, T. R., DeGennaro, M., & Lehmann, R. (2012). Redox regulation of cell migration and adhesion. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 107–115). Trends Cell Biol.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.11.002>
- Ishiyama, N., Lee, S. H., Liu, S., Li, G. Y., Smith, M. J., Reichardt, L. F., & Ikura, M. (2010). Dynamic and Static Interactions between p120 Catenin and E-Cadherin Regulate the Stability of Cell-Cell Adhesion. *Cell*, 141(1), 117–128.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.017>
- Kane, D. A., McFarland, K. N., & Warga, R. M. (2005). Mutations in half baked/E-cadherin block cell behaviors that are necessary for teleost epiboly. *Development*, 132(5), 1105–1116. <https://doi.org/10.1242/dev.01668>
- Kardash, E., Reichman-Fried, M., Matre, J. L., Boldajipour, B., Papusheva, E., Messerschmidt, E. M., Heisenberg, C. P., & Raz, E. (2010). A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility in vivo. *Nature Cell Biology*, 12(1), 47–53.  
<https://doi.org/10.1038/ncb2003>

- Kawahara, B. T., Quinn, M. T., & Lambeth, J. D. (2007). Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evolutionary Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-109>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kimmel, C. B., Warga, R. M., & Schilling, T. F. (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development*, 108(4), 581–594. <https://doi.org/10.1242/dev.108.4.581>
- Labernadie, A., Kato, T., Brugués, A., Serra-Picamal, X., Derzsi, S., Arwert, E., Weston, A., González-Tarragó, V., Elosegui-Artola, A., Albertazzi, L., Alcaraz, J., Roca-Cusachs, P., Sahai, E., & Trepac, X. (2017). A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nature Cell Biology*, 19(3), 224–237. <https://doi.org/10.1038/ncb3478>
- Lachnit, M., Kur, E., & Driever, W. (2008). Alterations of the cytoskeleton in all three embryonic lineages contribute to the epiboly defect of Pou5f1/Oct4 deficient MZspg zebrafish embryos. *Developmental Biology*, 315(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.008>
- Lepage, S. E., & Bruce, A. E. E. (2010). Zebrafish epiboly: Mechanics and mechanisms. *International Journal of Developmental Biology*, 54(8–9), 1213–1228. <https://doi.org/10.1387/ijdb.093028sl>
- Lepage, S. E., Tada, M., & Bruce, A. E. E. (2014). Zebrafish Dynamin is required for maintenance of enveloping layer integrity and the progression of epiboly. *Developmental Biology*, 385(1), 52–66. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.015>
- Link, V., Shevchenko, A., & Heisenberg, C. P. (2006). Proteomics of early zebrafish embryos. *BMC Developmental Biology*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-1>
- López Lomas, A. A. (2019). *Análisis del patrón de expresión de las subunidades de complejos nox durante el desarrollo temprano de Danio rerio*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 224, pp. 164–175). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., & Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin. *Developmental Cell*, 10(6), 839–850. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.002>
- MacKay, C. E., Shaifita, Y., Snetkov, V. V., Francois, A. A., Ward, J. P. T., & Knock, G. A. (2017). ROS-dependent activation of RhoA/Rho-kinase in pulmonary artery: Role of Src-family kinases and ARHGEF1. *Free Radical Biology and Medicine*, 110, 316–331. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.022>
- Málaga-Trillo, E., Solis, G. P., Schrock, Y., Geiss, C., Luncz, L., Thomanetz, V., &

- Stuermer, C. A. O. (2009). Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS Biology*, 7(3), 0576–0590. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000055>
- Matsushita, K., Morrell, C. N., Cambien, B., Yang, S. X., Yamakuchi, M., Bao, C., Hara, M. R., Quick, R. A., Cao, W., O'Rourke, B., Lowenstein, J. M., Pevsner, J., Wagner, D. D., & Lowenstein, C. J. (2003). Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell*, 115(2), 139–150. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00803-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00803-1)
- McNiven, M. A., Kim, L., Krueger, E. W., Orth, J. D., Cao, H., & Wong, T. W. (2000). Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *Journal of Cell Biology*, 151(1), 187–198. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.1.187>
- Mendieta-Serrano, M. A., Mendez-Cruz, F. J., Antúnez-Mojica, M., Schnabel, D., Alvarez, L., Cárdenas, L., Lomelí, H., Ruiz-Santisteban, J. A., & Salas-Vidal, E. (2019). NADPH-Oxidase-derived reactive oxygen species are required for cytoskeletal organization, proper localization of E-cadherin and cell motility during zebrafish epiboly. *Free Radical Biology and Medicine*, 130, 82–98. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.416>
- Mendieta-Serrano, M. A., Schnabel, D., Lomelí, H., & Salas-Vidal, E. (2013). Cell Proliferation Patterns in Early Zebrafish Development. *Anatomical Record*, 296(5), 759–773. <https://doi.org/10.1002/ar.22692>
- Miaczynska, M., Pelkmans, L., & Zerial, M. (2004). Not just a sink: Endosomes in control of signal transduction. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 16, Issue 4, pp. 400–406). Curr Opin Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.005>
- Milzani, A., Rossi, R., Simplicio, P. Di, Giustarini, D., Colombo, R., & Dalledonne, I. (2000). The oxidation produced by hydrogen peroxide on Ca-ATP-G-actin. *Protein Science*, 9(9), 1774–1782. <https://doi.org/10.1110/ps.9.9.1774>
- Miranda-Rodríguez, J. R., Salas-Vidal, E., Lomelí, H., Zurita, M., & Schnabel, D. (2017). RhoA/ROCK pathway activity is essential for the correct localization of the germ plasm mRNAs in zebrafish embryos. *Developmental Biology*, 421(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.11.002>
- Miyashita, Y., & Ozawa, M. (2007). A dileucine motif in its cytoplasmic domain directs  $\beta$ -catenin-uncoupled E-cadherin to the lysosome. *Journal of Cell Science*, 120(24), 4395–4406. <https://doi.org/10.1242/jcs.03489>
- Naqvi, S. N., Feng, Q., Boulton, V. J., Zahn, R., & Munn, A. L. (2001). Vrp1p functions in both actomyosin ring-dependent and Hof1p-dependent pathways of cytokinesis. *Traffic*, 2(3), 189–201. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.020305.x>
- Nasiadka, A., & Clark, M. D. (2012). Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR Journal*, 53(2), 161–168. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.161>
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A. T., & Mitchison, T. J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*,

459(7249), 996–999. <https://doi.org/10.1038/nature08119>

- Ochoa, G. C., Slepnev, V. I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R., & De Camilli, P. (2000). A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *Journal of Cell Biology*, *150*(2), 377–389. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.377>
- Orth, J. D., Krueger, E. W., Cao, H., & McNiven, M. A. (2002). The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(1), 167–172. <https://doi.org/10.1073/pnas.012607899>
- Owusu-Ansah, E., & Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, *461*(7263), 537–541. <https://doi.org/10.1038/nature08313>
- Ozawa, M., & Kemler, R. (1990). Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *Journal of Cell Biology*, *111*(4), 1645–1650. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.4.1645>
- Ozawa, Masayuki, Hoschützky, H., Herrenknecht, K., & Kemler, R. (1990). A possible new adhesive site in the cell-adhesion molecule uvomorulin. *Mechanisms of Development*, *33*(1), 49–56. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(90\)90134-8](https://doi.org/10.1016/0925-4773(90)90134-8)
- Page, E., Goings, G. E., Upshaw-Earley, J., & Hanck, D. A. (1994). Endocytosis and uptake of Lucifer yellow by cultured atrial myocytes and isolated intact atria from adult rats: Regulation and subcellular localization. *Circulation Research*, *75*(2), 335–346. <https://doi.org/10.1161/01.RES.75.2.335>
- Perdiguero, E., & Nebreda, A. R. (2004). Regulation of Cdc25C activity during the meiotic G2/M transition. In *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.3.6.906>
- Perez-Moreno, M., Fontenete, S., & Peña-Jimenez, D. (2017). Heterocellular cadherin connections: Coordinating adhesive cues in homeostasis and cancer. In *F1000Research* (Vol. 6). Faculty of 1000 Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11357.1>
- Petridou, N. I., Grigolon, S., Salbreux, G., Hannezo, E., & Heisenberg, C. P. (2019). Fluidization-mediated tissue spreading by mitotic cell rounding and non-canonical Wnt signalling. *Nature Cell Biology*, *21*(2), 169–178. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0247-4>
- Piedra, José, Martínez, D., Castaño, J., Miravet, S., Duñach, M., & García De Herreros, A. (2001). Regulation of  $\beta$ -Catenin Structure and Activity by Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(23), 20436–20443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100194200>
- Piedra, Jose, Miravet, S., Castaño, J., Pálmer, H. G., Heisterkamp, N., García de Herreros, A., & Duñach, M. (2003). p120 Catenin-Associated Fer and Fyn Tyrosine Kinases Regulate  $\beta$ -Catenin Tyr-142 Phosphorylation and  $\beta$ -Catenin- $\alpha$ -Catenin Interaction. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(7), 2287–2297.

<https://doi.org/10.1128/mcb.23.7.2287-2297.2003>

- Pinto, C. S., Khandekar, A., Bhavna, R., Kiesel, P., Pigino, G., & Sonawane, M. (2019). Microridges are apical epithelial projections formed of F-actin networks that organize the glycan layer. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48400-0>
- Platta, H. W., & Stenmark, H. (2011). Endocytosis and signaling. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 23, Issue 4, pp. 393–403). Curr Opin Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.03.008>
- Pollard, T. D., & Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. In *Science* (Vol. 326, Issue 5957, pp. 1208–1212). Science. <https://doi.org/10.1126/science.1175862>
- Ramachandran, R., & Schmid, S. L. (2018). The dynamin superfamily. In *Current Biology* (Vol. 28, Issue 8, pp. R411–R416). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.013>
- Randriamboavonjy, V., Schrader, J., Busse, R., & Fleming, I. (2004). Insulin Induces the Release of Vasodilator Compounds from Platelets by a Nitric Oxide-G Kinase-VAMP-3-dependent Pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 199(3), 347–356. <https://doi.org/10.1084/jem.20030694>
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. In *Cellular Signalling*. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Reig, G., Cerda, M., Sepúlveda, N., Flores, D., Castañeda, V., Tada, M., Härtel, S., & Concha, M. L. (2017). Extra-embryonic tissue spreading directs early embryo morphogenesis in killifish. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15431>
- Reth, M. (2002). Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. In *Nature Immunology* (Vol. 3, Issue 12, pp. 1129–1134). <https://doi.org/10.1038/ni1202-1129>
- Salas-Vidal, E., Lomelí, H., Castro-Obregón, S., Cuervo, R., Escalante-Alcalde, D., & Covarrubias, L. (1998). Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Experimental Cell Research*, 238(1), 136–147. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3828>
- Salas-Vidal, E., Mendez-Cruz, F. J., Ramírez-Corona, A., & Reza-Medina, B. (2021). Oxygen, reactive oxygen species and developmental redox networks: Evo-devo evil-devils? *International Journal of Developmental Biology*, 65(5–6), 345–356. <https://doi.org/10.1387/ijdb.200170es>
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S. M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P., & Loirand, G. (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA- induced ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21722–21729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000753200>
- Savitsky, P. A., & Finkel, T. (2002). Redox regulation of Cdc25C. *Journal of Biological*

*Chemistry*, 277(23), 20535–20540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201589200>

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schnabel, D., Ramírez, L., Gertsenstein, M., Nagy, A., & Lomelí, H. (2005). Ectopic expression of KitD814Y in spermatids of transgenic mice, interferes with sperm morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 233(1), 29–40. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20292>
- Schnell, U., Cirulli, V., & Giepmans, B. N. G. (2013). EpCAM: Structure and function in health and disease. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.018>
- Schötz, E. M., Burdine, R. D., Jülicher, F., Steinberg, M. S., Heisenberg, C. P., & Foty, R. A. (2008). Quantitative differences in tissue surface tension influence zebrafish germ layer positioning. *HFSP Journal*, 2(1), 42–56. <https://doi.org/10.2976/1.2834817>
- Sempou, E. (2013). *Molecular roles of the Prion Protein in zebrafish embryos and cultured cells*. Universität Konstanz.
- Sempou, E., Biasini, E., Pinzón-Olejua, A., Harris, D. A., & Málaga-Trillo, E. (2016). Activation of zebrafish Src family kinases by the prion protein is an amyloid- $\beta$ -sensitive signal that prevents the endocytosis and degradation of E-cadherin/ $\beta$ -catenin complexes in vivo. *Molecular Neurodegeneration*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0076-5>
- Shimizu, T., Yabe, T., Muraoka, O., Yonemura, S., Aramaki, S., Hatta, K., Bae, Y. K., Nojima, H., & Hibi, M. (2005). E-cadherin is required for gastrulation cell movements in zebrafish. *Mechanisms of Development*, 122(6), 747–763. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.03.008>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. In *Redox Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Solnica-Krezel, L., & Driever, W. (1994). Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: Organization and function during epiboly. *Development*, 120(9), 2443–2455. <https://doi.org/10.1242/dev.120.9.2443>
- Song, S., Eckerle, S., Onichtchouk, D., Marrs, J. A., Nitschke, R., & Driever, W. (2013). Pou5f1-Dependent EGF Expression Controls E-Cadherin Endocytosis, Cell Adhesion, and Zebrafish Epiboly Movements. *Developmental Cell*, 24(5), 486–501. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.016>
- Swanson, M. M. M., & Poodry, C. A. (1981). The shibirets mutant of *Drosophila*: A probe for the study of embryonic development. *Developmental Biology*, 84(2), 465–470. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90416-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90416-4)

- ten Freyhaus, H., Huntgeburth, M., Wingler, K., Schnitker, J., Bäumer, A. T., Vantler, M., Bekhite, M. M., Wartenberg, M., Sauer, H., & Rosenkranz, S. (2006). Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation. *Cardiovascular Research*, *71*(2), 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.01.022>
- Terman, J. R., & Kashina, A. (2013). Post-translational modification and regulation of actin. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 25, Issue 1, pp. 30–38). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.10.009>
- Trubiroha, A., Gillotay, P., Giusti, N., Gacquer, D., Libert, F., Lefort, A., Haerlingen, B., De Deken, X., Opitz, R., & Costagliola, S. (2018). A Rapid CRISPR/Cas-based Mutagenesis Assay in Zebrafish for Identification of Genes Involved in Thyroid Morphogenesis and Function. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24036-4>
- Van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. In *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>
- Wang, G., Moniri, N. H., Ozawa, K., Stamler, J. S., & Daaka, Y. (2006). Nitric oxide regulates endocytosis by S-nitrosylation of dynamin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508354103>
- Warga, R. M., & Kimmel, C. B. (1990). Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development*, *108*(4), 569–580. <https://doi.org/10.1242/dev.108.4.569>
- Weaver, C. J., Leung, Y. F., & Suter, D. M. (2016). Expression dynamics of NADPH oxidases during early zebrafish development. *Journal of Comparative Neurology*, *524*(10), 2130–2141. <https://doi.org/10.1002/cne.23938>
- Westerfield, M. (2007). The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 5th Edition. *University of Oregon Press, Eugene (Book)*.
- Wienke, D. C., Knetsch, M. L. W., Neuhaus, E. M., Reedy, M. C., & Manstein, D. J. (1999). Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. *Molecular Biology of the Cell*, *10*(1), 225–243. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.1.225>
- Wilkins, S. J., Yoong, S., Verkade, H., Mizoguchi, T., Plowman, S. J., Hancock, J. F., Kikuchi, Y., Heath, J. K., & Perkins, A. C. (2008). Mtx2 directs zebrafish morphogenetic movements during epiboly by regulating microfilament formation. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.050>
- Wilson, C., Terman, J. R., González-Billault, C., & Ahmed, G. (2016). Actin filaments—A target for redox regulation. In *Cytoskeleton* (Vol. 73, Issue 10, pp. 577–595). Cytoskeleton (Hoboken). <https://doi.org/10.1002/cm.21315>
- Wit, R., Makkinje, M., Boonstra, J., Verkleij, A. J., & Post, J. A. (2001). Hydrogen peroxide reversibly inhibits epidermal growth factor (EGF) receptor internalization and coincident ubiquitination of the EGF receptor and Eps15. *The FASEB Journal*, *15*(2),

306–308. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0454fje>

Wong, S. W., Sun, S., Cho, M., Lee, K. K. H., & Mak, A. F. T. (2015). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposure Affects Myotube Stiffness and Actin Filament Polymerization. *Annals of Biomedical Engineering*, 43(5), 1178–1188. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1178-2>

Xiao, K., Oas, R. G., Chiasson, C. M., & Kowalczyk, A. P. (2007). Role of p120-catenin in cadherin trafficking. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1773, Issue 1, pp. 8–16). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.005>

Yang, R. M., Tao, J., Zhan, M., Yuan, H., Wang, H. H., Chen, S. J., Chen, Z., de Thé, H., Zhou, J., Guo, Y., & Zhu, J. (2019). TMM41 is required for heart valve differentiation via regulation of PINK-PARK2 dependent mitophagy. *Cell Death and Differentiation*, 26(11), 2430–2446. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0311-z>

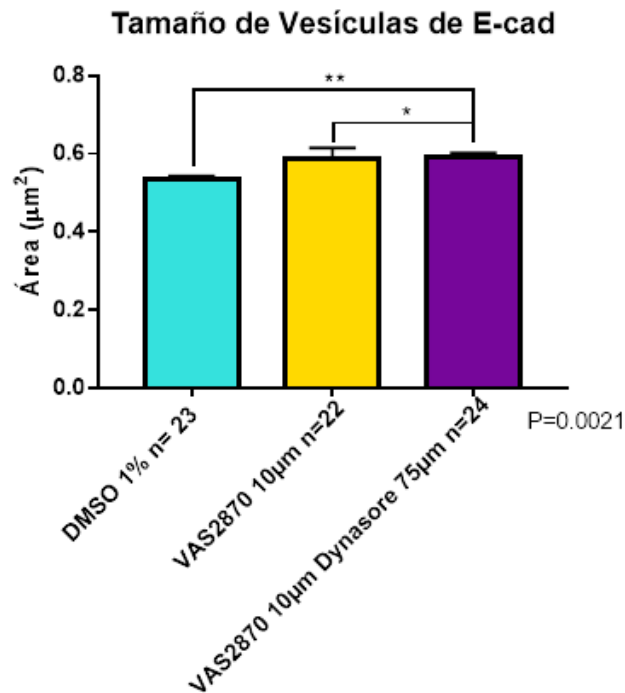


## 12. Anexos

En esta sección se incluyen los experimentos control de tratamientos realizados con Dynasore y todos los métodos, experimentos y datos obtenidos que se realizaron durante la duración de la maestría, pero no se incluyeron en el cuerpo principal de la tesis. También se incluye un análisis bioinformático de las secuencias de E-cad y Cdc25 en distintos organismos y de la conservación de distintas cisteínas entre los distintos homólogos.

### *Anexo 1. Cuantificación del tamaño de las vesículas de E-cad en las células de la EVL*

En el trabajo de Mendieta-Serrano et al. del 2019 se encontró que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rescata la presencia de vesículas positivas a E-cad en el citoplasma de las células de la EVL en embriones tratados con VAS2870. Por otra parte, se observó también que las vesículas observadas en el tratamiento de rescate eran más grandes que aquellas presentes en los embriones control (Fig. 5).



**Figura suplementaria 1. La inhibición de la endocitosis resulta en vesículas positivas a E-cad más grandes que las obtenidas al inhibir la actividad de las Nox.** Tamaño de las vesículas positivas a E-cad en las células de la EVL cuantificado en función a su área. \*\* p value =0.0051, \* p value =0.0108. Barras de error muestran el error estándar de la media.

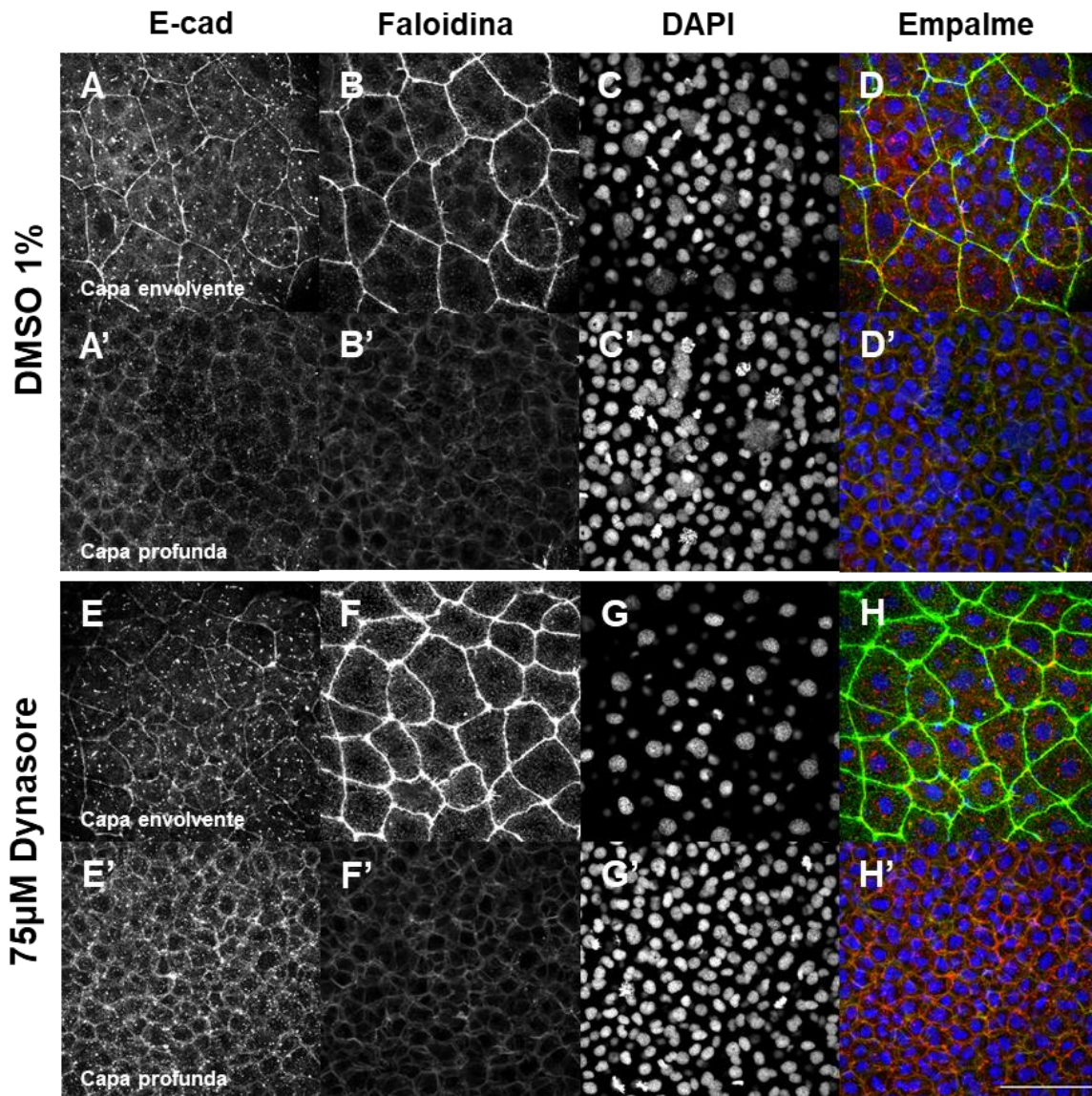
Cuando se analizó en este trabajo de tesis el tamaño de las vesículas positivas a E-cad en embriones tratados con VAS2870 no se encontraron diferencias entre las medias de este grupo y el control ( $0.53 \pm 0.59 \mu\text{m}^2$  vs  $0.59 \pm 0.90 \mu\text{m}^2$ ). Por otro lado, se encontró que las vesículas de los embriones tratados con Dynasore eran significativamente más grandes ( $0.59 \pm 0.62 \mu\text{m}^2$ ) que las observadas en el grupo control y en los tratados únicamente con VAS2870 (Fig. sup.1). Estos datos parecen indicar que, como en el caso del tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en embriones con una disminución en la actividad catalítica de las Nox hay un aumento en el tamaño vesicular cuando se inhibe la dinamina 2.

A lo largo del flujo de exocitosis y endocitosis se pueden encontrar distintas vesículas con distintas características y tamaños dependiendo del cargo que están transportando o procesando y de los complejos proteicos asociados. Los endosomas y su cargo provenientes de la membrana convergen y se fusionan con endosomas tempranos, también pueden dirigirse hacia compartimentos de reciclaje y a endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares (Disanza et al., 2009). Conociendo las características particulares de las vesículas observadas en el citoplasma, como por ejemplo el tipo de Rabs, se podría conocer el tipo de vesícula o complejo endosomal que se está acumulando o perdiendo en los distintos tratamientos. Por la información que obtuvimos en este proyecto no podemos saber qué tipo de vesícula es la que estamos observando.

#### *Anexo 2. Inmunofluorescencia para evaluar a la E-cadherina y al citoesqueleto de actina en embriones tratados con 75 $\mu\text{M}$ de Dynasore*

En este proyecto se observó un rescate dramático de los efectos causados por la inhibición de las Nox al tratar simultáneamente con Dynasore, inhibidor farmacológico de la dinamina 2 (Fig. 6). Es por este rescate tan sorprendente que observamos que fue importante evaluar si el Dynasore estaba teniendo por su cuenta algún efecto sobre alguno de los procesos celulares estudiados en este proyecto. Esta evaluación se realizó mediante ensayos de inmunotinción en embriones tratados en etapa de esfera con el vehículo como control, DMSO al 1 % en medio ERM, o con Dynasore 75  $\mu\text{M}$ . Los embriones se fijaron en la etapa de 60

% de epibolia y la inmunotinción y visualización se realizaron utilizando el mismo protocolo empleado con los demás tratamientos.



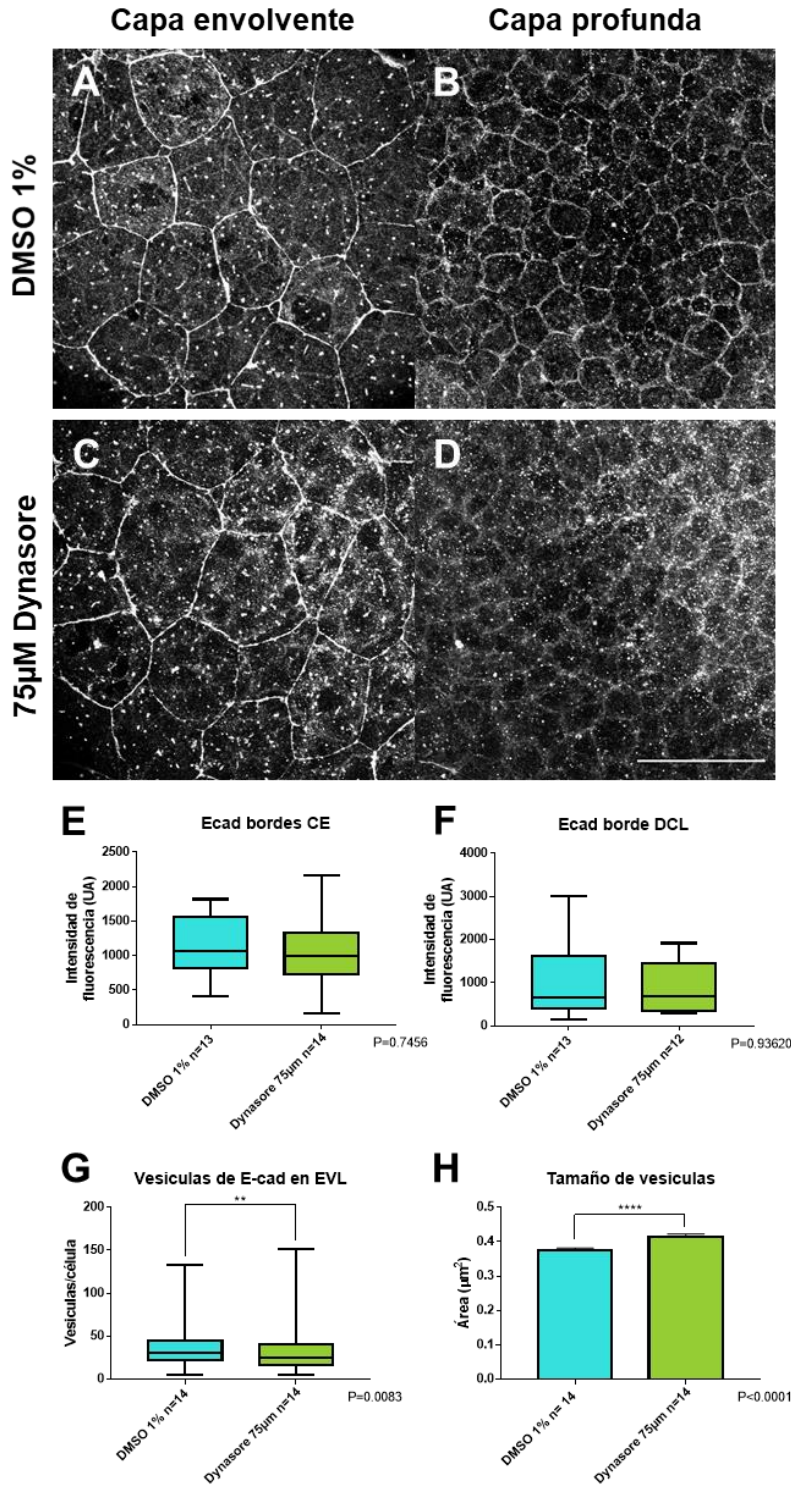
**Figura suplementaria 2. La concentración de Dynasore utilizada en este proyecto no es suficiente para afectar por su cuenta a la localización de la E-cad y al citoesqueleto de actina.** Inmunofluorescencia para E-cad y el citoesqueleto de actina en embriones control y tratados con 75 μM de Dynasore en la etapa de esfera y fijados en 60% de epibolia. **A-H'**: Señal de E-cad en las células de la capa envolvente (**A, E**) y en las células de la capa profunda (**A', E'**), señal de actina en las células de la capa envolvente (**B, F**) y en las células de la capa profunda (**B', F'**) y señal de DAPI en las células de la capa envolvente (**C, G**) y en las células de la capa profunda (**C', G'**). Ambos niveles del blastodermo se adquirieron de un mismo embrión por cada tratamiento. Los núcleos se tiñeron empleando DAPI. Empalme muestra los tres canales juntos en colores falsos. E-cadherina, rojo. F-actina, verde. DNA, azul. Barra de escala de 50 μm.

Una vez adquiridas las series de imágenes de las inmunofluorescencias se observó en los controles una distribución de E-cad membranar y citoplasmática (Fig. sup. 2A, A') con un patrón similar al que ya se había descrito en otros trabajos pasados (Mendieta-Serrano et al., 2019; Sempou et al., 2016; Song et al., 2013). En el caso de los embriones tratados con 75  $\mu$ M de Dynasore se observó la misma señal positiva a E-cad en la membrana y en vesículas citoplasmáticas tanto de las células de la EVL y de la DCL (Fig. sup. 2E, E').

Otro elemento analizado en las inmunofluorescencias fue el citoesqueleto de actina. En los embriones control tratados con DMSO nuevamente se observó una distribución uniforme de puncta de actina sobre la superficie de las células de la EVL, así como en los bordes celulares en la EVL y también de la DCL (Fig. sup. 2B, B'). Cuando los embriones se trataron con 75  $\mu$ M de Dynasore la distribución de puncta en las células de la EVL y en los bordes celulares presentó el mismo patrón que las células de los embriones control (Fig. sup. 2F, F').

A pesar de que no se observaron diferencias a simple vista en los elementos analizados en este proyecto, se realizaron las mismas cuantificaciones utilizando el programa Fiji de Image J y el programa de Prisma para los análisis estadísticos. Se cuantificó la intensidad de la señal en los bordes celulares del blastodermo, tanto en las células de la EVL como las de la DCL y observamos que la inhibición de la dinamina 2 no tuvo ningún efecto en su intensidad ni en su distribución a comparación del control (Fig. sup. 3E, F).

También se cuantificó en las células del EVL el número y el tamaño de las vesículas de E-cad (Fig. sup. 3G, H). Las células en embriones con tratamientos control y con Dynasore nuevamente presentan numerosas vesículas distribuidas en todo el citoplasma (Fig. sup. 3A, C). Por otro lado, la cuantificación del número de las vesículas positivas a E-cad en embriones tratados únicamente con 75  $\mu$ M de Dynasore reveló que la diferencia de  $30 \pm 20$  a  $35 \pm 22$  vesículas en comparación con el control es significativa (Fig. sup 3).



**Figura suplementaria 3. La concentración de Dynasore utilizada en este proyecto no afecta a la E-cad membranal, pero si tiene un efecto en su distribución citoplasmática.** Cuantificación de la señal de E-cadherina en las membranas celulares y en vesículas citoplasmáticas. **A-D:** Señal de E-cad en las células de la capa envolvente (**A, C**) y en las células de la capa profunda (**B, D**). Ambos niveles se adquirieron en un mismo embrión por cada tratamiento. Barra de escala de 50 µm.

**E:** Intensidad de fluorescencia en los bordes de las células del EVL. p value= 0.7456. **F:** Intensidad de fluorescencia en los bordes de las células de la DCL. p value= 0.9362. **G:** cuantificación de vesículas positivas a E-cad en las células de la EVL. \*\* p value= 0.0083. **E, F, G:** los bigotes muestran el rango de los datos. **H:** tamaño de las vesículas positivas a E-cad, en las células de la EVL cuantificado en función a su área. \*\*\*\* p value <0.0001. Barras de error en **H** muestran el error estándar de la media.

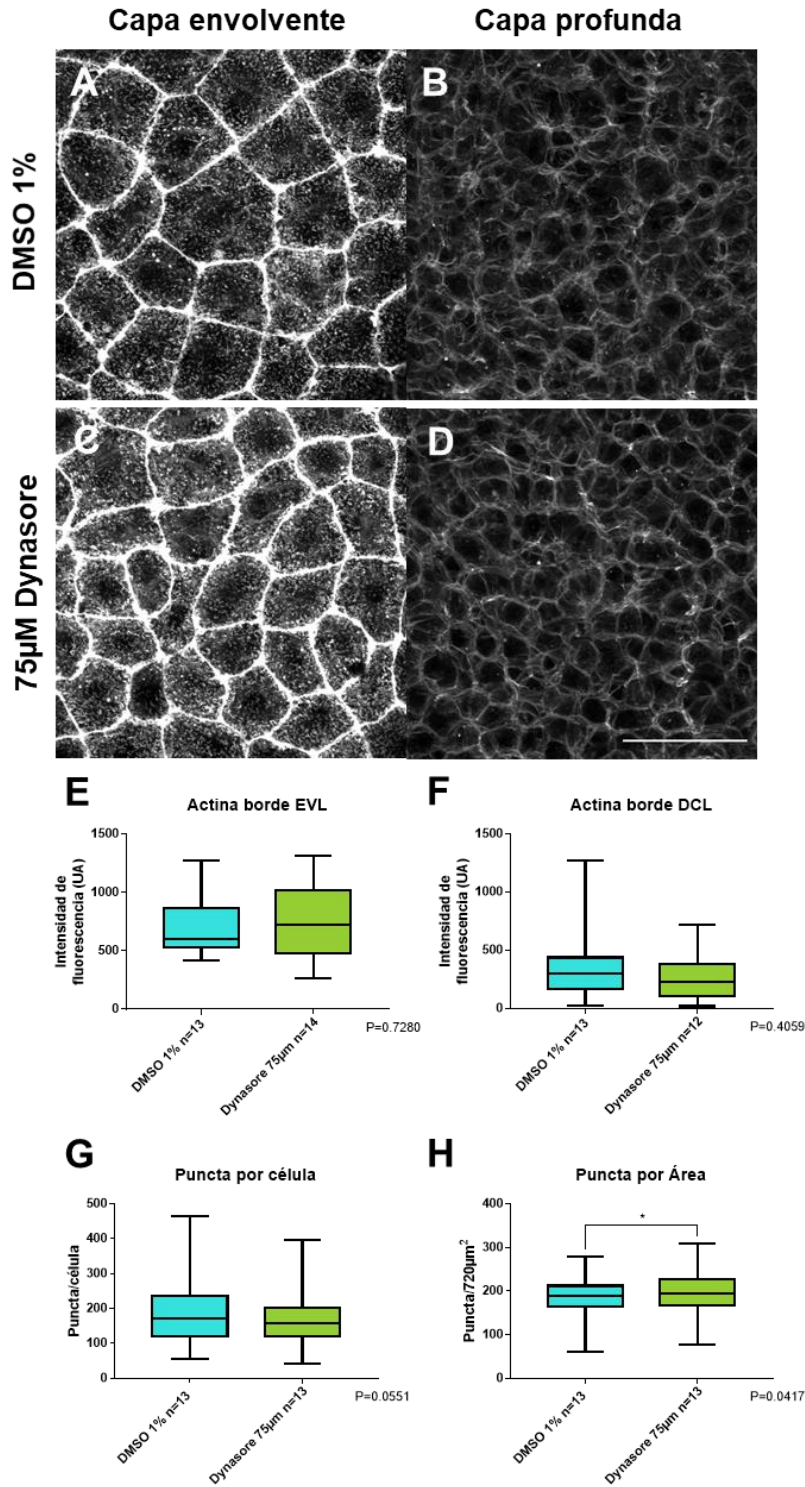
No obstante, las diferencias observadas de  $25 \pm 12$  a la  $10 \pm 6$  vesículas por célula entre los tratamientos con DMSO y VAS2870 son también significativas y aún más marcadas. Esta disminución entre los embriones tratados con el inhibidor de la dinamina 2 con respecto al control de DMSO puede deberse a la inhibición parcial de las células a formar vesículas por acción del fármaco, por lo que este resultado no nos resulta inesperado ya que corrobora la función del Dynasore.

Con respecto al tamaño de las vesículas positivas a E-cad, la diferencia entre las medias de los datos nuevamente fue significativa al comparar a control con el tratamiento, tendiendo a ser más grandes en los tratados con Dynasore (Fig. sup. 3H). Este fenómeno podría nuevamente deberse a la inhibición parcial de la célula para formar vesículas endocíticas y la acumulación de otras en el citoplasma de mayor tamaño, como cuerpos multivesiculares o exosomas.

De la misma manera en la que se analizó la E-cad, se cuantificó la intensidad de la señal fluorescente de faloidina en los bordes tanto de las células de la EVL (Fig. sup. 4A, C, E) como de las células de la DCL (Fig. sup. 4B, D, F). En el caso de las células de la EVL, no hay diferencias significativas en la intensidad de la señal de actina en los bordes celulares (Fig. sup. 4E). Por otro lado, aun cuando parece haber una ligera disminución en la señal de actina en las células de la DCL en embriones tratados con Dynasore, esta disminución no es estadísticamente significativa (Fig. sup. 4F).

Las punta teñidas con F-actina también se cuantificaron en las células de la EVL, en relación con punta por célula y punta por área. Se encontró que el número de punta por célula en embriones control fue de 184.6 y los tratados únicamente con Dynasore 75  $\mu$ M tuvieron un número de 165.4 punta (Fig. sup. 4G). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por otro lado, cuando la

cuantificación se hizo con puncta por el área promedio de las células, que en este grupo de tratamientos fue de  $720 \mu\text{m}^2$ , esta diferencia sí fue significativa al haber 188.2 puncta en el control y 197.6 en los tratamientos (Fig. sup. 4H).



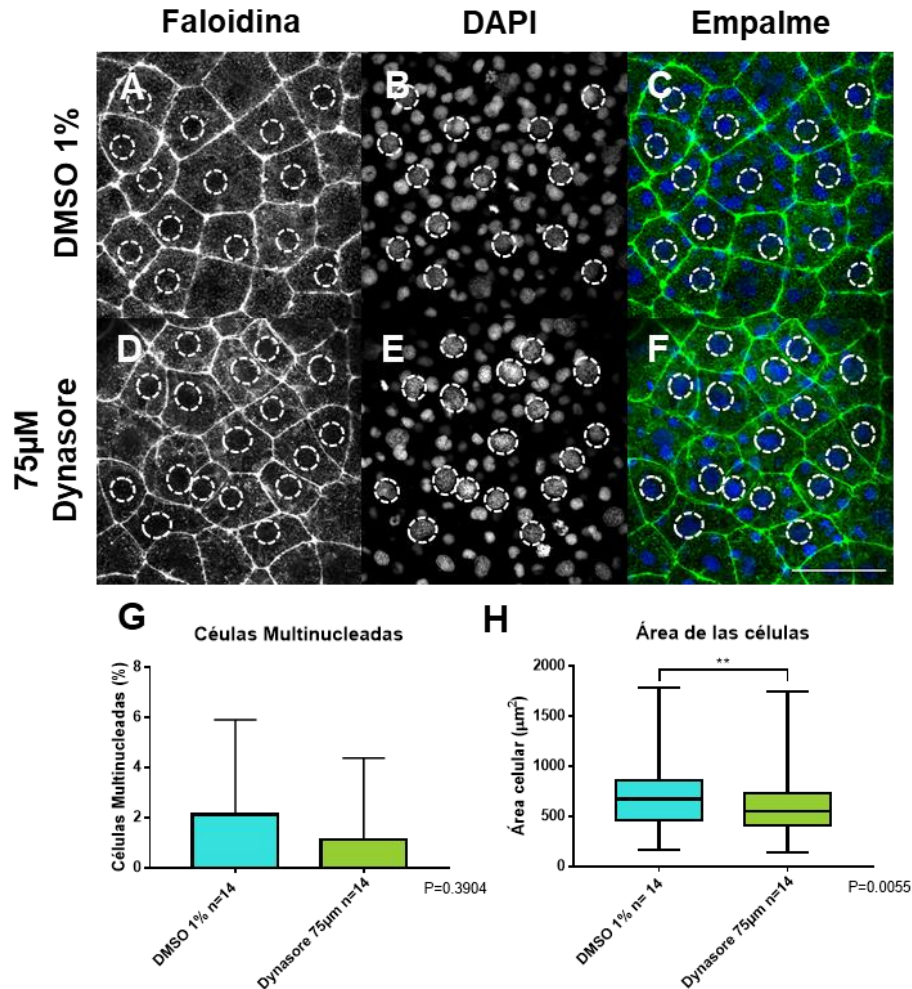
**Figura suplementaria 4. La concentración de Dynasore utilizada en este proyecto no afecta la maya cortical de actina, pero si aumenta las puncta de F-actina en las células del EVL.** Cuantificación de puncta en la superficie de las células de la EVL y de la señal de actina en los bordes celulares. **A-D:** localización de F-actina en células de la EVL visualizadas mediante la unión de faloidina acoplada a Alexa 488. Barra de escala de 50µm. **E:** Cuantificación de la intensidad de señal fluorescente en los bordes de la EVL. p value= 0.7280. **F:** Cuantificación de la intensidad de señal en los bordes de la DCL. p value= 0.4059. **G:** Cuantificación de puncta por célula completa. p value= 0.0551. **H:** Cuantificación de puncta por cada 720 µm<sup>2</sup> de superficie celular. p value= 0.0417: Los bigotes muestran el rango de los datos.

Este aumento en relación con el área podría deberse a que la disminución en la endocitosis estabiliza a las puncta las cuales pudiera estar teniendo una presencia más dinámica en la membrana de células control. También la diferencia podría deberse a que hay reportes donde existe una interacción entre el Dynasore y el citoesqueleto de actina (Galkina et al., 2015; McNiven et al., 2000).

Ya que en este proyecto se observaron diferencias morfológicas en las células de la EVL en embriones tratados con VAS2870, también se evaluaron los mismos parámetros en los embriones tratados con el inhibidor de la dinamina 2 (Fig. sup. 5). En los tratamientos donde se utilizó al Dynasore de manera individual se observó un 2.1 % de células de la EVL multinucleadas en el tratamiento control y un 1.1 % en el grupo tratado con Dynasore (Fig. sup. 5E, G), pero la diferencia no es significativa cuando se utiliza al Dynasore de manera aislada sobre el número de núcleos en las células. En ninguno de los grupos de tratamientos se observaron células multinucleadas en la DCL de los embriones evaluados.

Otra diferencia que se observó en la morfología de las células tratadas con los inhibidores además del número de núcleos fue el tamaño de las EVL. Las células control tienen un área promedio de 697.6 µm<sup>2</sup> mientras que el grupo tratado con Dynasore presentaron un área de 608.3 µm<sup>2</sup> (Fig. sup. 5H). Aun cuando esta diferencia de aproximadamente 90 micras resultó ser significativa, no es tan dramática como el aumento de casi 200 micras observado entre el tratamiento con VAS2870 y las células control (Fig. 11K). Es por esto por lo que concluimos que el rescate del área observado al tratar simultáneamente a las células con VAS2870 y Dynasore no se debe a algún artefacto ocasionado por este último fármaco.





**Figura suplementaria 5. La concentración de Dynasore utilizada en este proyecto disminuye el área de las células de la EVL.** Evaluación de células multinucleadas en la EVL en embriones tratados con 75 μM de Dynasore en la etapa de esfera. **A-F:** inmunotinción con faloidina acoplada a Alexa 488 para delimitar bordes celulares y DAPI para marcar núcleos en embriones control (**A-C**) y con Dynasore (**D-F**). Los núcleos de células completas se encuentran bordeados por líneas punteadas. Barra de escala de 50 μm. **G:** Porcentaje de células completas multinucleadas por tratamiento. p value= 0.3904. Barras de error muestran la desviación estándar. **H:** Área de células de la EVL en embriones tratados con DMSO 1 % y 75 μM de Dynasore. p value= 0.0055. Los bigotes muestran el rango de los datos.

### Anexo 3. Western blot para evaluar a la E-cadherina y a la β-catenina

En este proyecto se empleó la técnica de Western blot para evaluar si los tratamientos con los distintos inhibidores tenían un efecto ya sea sobre la cantidad de E-cad madura o inmadura en vista que se observa una deslocalización de esta proteína en las células de la capa envolvente al tratar con VAS2870 y esta deslocalización se rescata con el tratamiento con Dynasore.

### *Protocolo de Western blot y resultados*

El procedimiento se basa en protocolos previamente descritos, con algunas modificaciones (Link et al., 2006; Miranda-Rodríguez et al., 2017; Schnabel et al., 2005). El procedimiento se describe brevemente a continuación. Embriones en etapa de esfera se separaron en grupos de 120 individuos por tratamiento en placas de cultivo celular de 35 mm con medio ERM (Westerfield, 2007). Se les retiró el medio y se les agregó 3 ml de ERM con DMSO al 1 % como control, 10  $\mu$ M de VAS2870 en DMSO al 1 % o 10  $\mu$ M de VAS2870 junto con 75 mM de Dynasore en DMSO al 1 %. Los embriones se incubaron posteriormente a 29°C hasta que alcanzaron la etapa de 50 a 60 % epibolia.

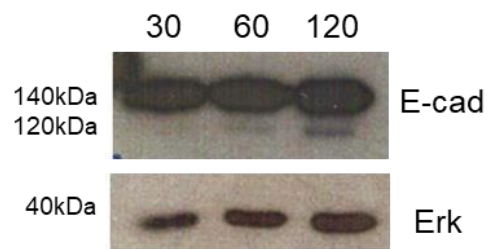
En esta etapa los embriones se decorionaron a mano utilizando pinzas de relojero bajo un estereoscopio y se separaron en grupos de 120 embriones por tubo en tubos ependorff de 1.5 ml. Se les retiró el medio y se colocaron en hielo. Todos los lavados se realizaron en hielo. Se les agregó 1 ml de buffer desvitelinizante frío y los tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min a 4°C. Se retiró el buffer desvitelinizante con cuidado de no remover el pellet de células y se lavó con 1ml de buffer de lavado frío. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 3000 rpm por 1 min a 4°C. Se removió el buffer de lavado y se resuspendió el pellet de células en buffer de lisis en una proporción de 1  $\mu$ l de buffer por embrión. Los embriones se lisaron por 1 h a 4°C con agitación suave. Tras la lisis se centrifugó a 13000 rpm por 3 min a 4°C. Se tomó 1  $\mu$ l de lisado para cuantificar y se agregó buffer de carga en una proporción de 1:4 al lisado restante. Las muestras se hirvieron por 5 min y posteriormente se colocaron en hielo. La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro (Ependorff BioPhotometer) y con el ensayo de Bradford. Se utilizó BSA para hacer la curva de concentración.

Se prepararon geles de acrilamida al 7 % y las muestras se corrieron a 50 mA en amperaje constante hasta que la banda de 37 kDa salió de la parte inferior del vidrio. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia húmeda Bio-Rad. La transferencia se realizó en frío a 400 mV en amperaje constante por 1 h. Se tiñeron las membranas con solución de

Ponceau para corroborar la presencia de proteína tras la transferencia y se lavaron las membranas con TBST al 0.5 %. Las membranas se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente en leche al 5 % en TBST. Los anticuerpos primarios se diluyeron en solución de bloqueo y se incubaron con las membranas toda la noche a 4°C.

Al siguiente día las membranas se lavaron 3 veces por 10 min con TBST y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo. Posteriormente se lavaron 3 veces por 10 min con TBST y se revelaron con el kit LumiGLO 20x en TBS 1X. Para observar a la banda de 120 kDa las membranas se expusieron 30 min y para observar Erk se expusieron por 3 min.

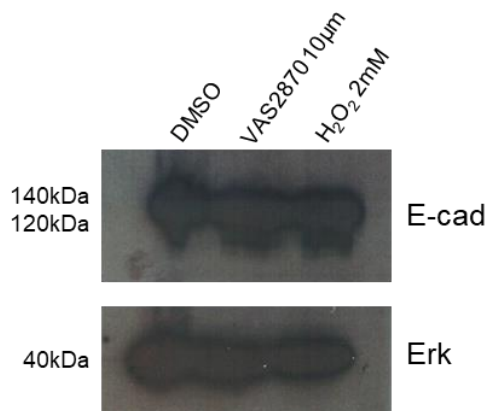
Se realizaron varios ensayos de Western blot con metodologías y buffers de lisis distintos y se encontró que, con el protocolo descrito en los métodos donde se procesan las muestras en hielo y con medios fríos, se logró identificar a la banda previamente reportada que representa a la E-cad procesada de 120 kDa (Sempou, 2013; Sempou et al., 2016). Se determinó también que partiendo de lisados de 120 embriones por grupo se puede observar claramente a la banda de 120 kDa de la E-cad, cargando alrededor de 30 a 50 µg de proteína por pozo (Fig. sup. 6).



**Figura suplementaria 6.** Western blot para la visualización de la forma madura de 120 kDa e inmadura de 140 kDa de la E-cad en grupos de 30, 60 y 120 embriones. Banda de E-cad fue expuesta por 30 min y la de Erk por 5 min.

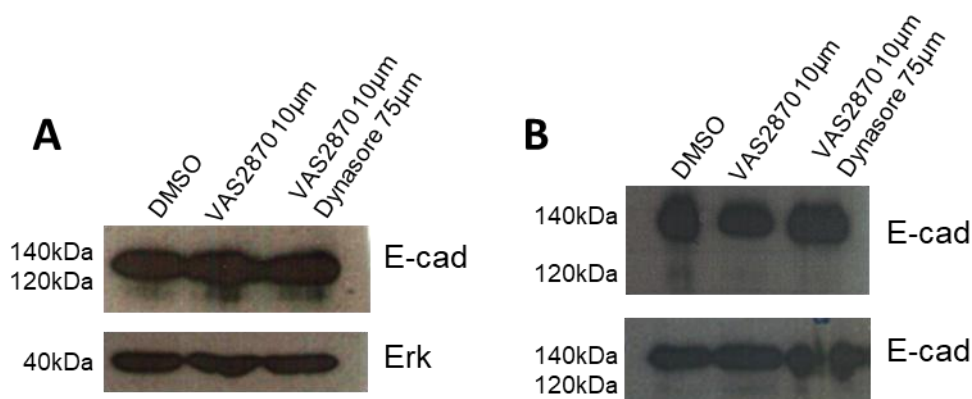
Una vez observada la banda deseada de 120 kDa se prosiguió a hacer un primer tratamiento con 10 µM de VAS2870 y 2mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para evaluar si la ausencia o exceso de este oxidante tenía un efecto en la cantidad de E-cad madura o inmadura (Fig. sup. 7). Este primer ensayo no fue muy exitoso ya que no se

podieron separar ambas bandas de forma nítida y la información obtenida no fue concluyente.



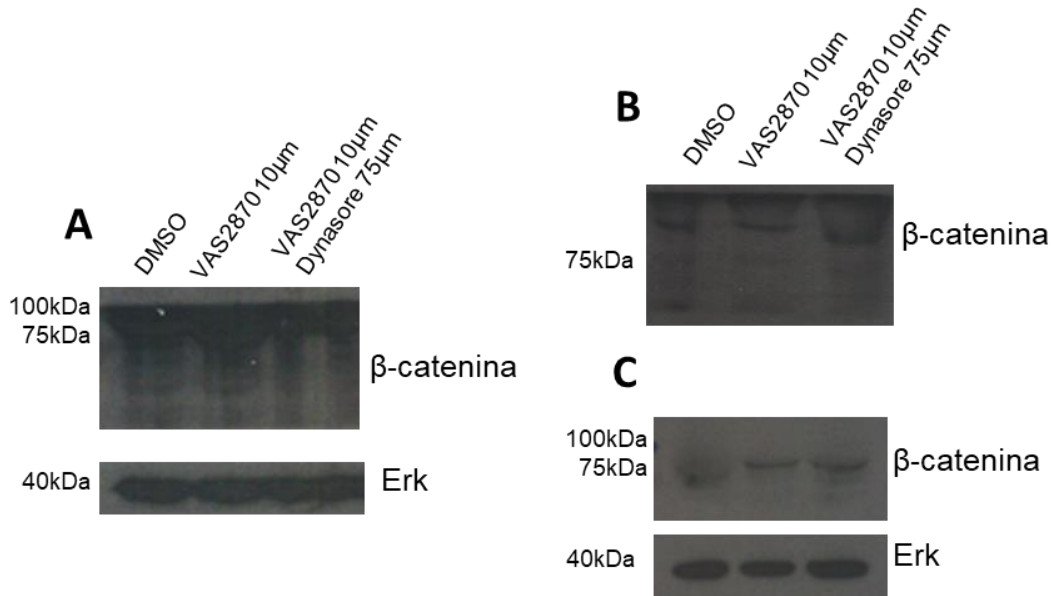
**Figura suplementaria 7.** Western blot para la visualización de la forma madura e inmadura de la E-cad en grupos de 120 embriones tratados con 10 µM de VAS2870 y 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Grupo control tratado con 1 % de DMSO. Banda de E-cad y Erk se expusieron por 30 min. Erk fue empleado como control de carga.

Posteriormente se realizaron tratamientos con 10 µM de VAS2870 y 75 µM de Dynasore para evaluar si la ausencia o exceso de este oxidante tenía un efecto en la cantidad de E-cad madura o inmadura (Fig. sup. 8). Nuevamente estos primeros ensayos no fueron concluyentes ya que en ninguna de las repeticiones de los tratamientos con inhibidor se pudo observar una banda de 120 kDa lo suficientemente nítida para realizar densitometrías y determinar si existen cambios en su concentración entre los distintos grupos de tratamiento.



**Figura suplementaria 8.** Western blot para la visualización de la forma madura e inmadura de la E-cad en embriones tratados con VAS2870 y con el inhibidor de la endocitosis Dynasore. A: Primer ensayo. Banda de E-cad expuesta por 30 min, banda de Erk expuesta por 5 min. Erk es empleado como control de carga. B: Repeticiones del mismo ensayo de tratamiento. Sólo se muestran bandas de E-cad de cada ensayo.

Por último se realizaron pruebas para el anticuerpo de  $\beta$ -catenina (Sigma-Aldrich C2206) para posteriormente evaluar si los tratamientos con los inhibidores también tienen un efecto sobre otras proteínas asociadas al complejo de uniones adherentes (Van Roy & Berx, 2008; Xiao et al., 2007). El patrón de bandeado obtenido en los distintos ensayos parecía ser inespecífico ya que correspondía a las bandas observadas al teñir a la membrana con Ponceau (Fig. sup. 9).



**Figura suplementaria 9.** Western blot para la visualización de la  $\beta$ -catenina en embriones tratados con VAS2870 y con el inhibidor de la endocitosis Dynasore. A: Primer ensayo. Bandas expuestas por 30 min. B: Repeticiones del mismo ensayo de tratamiento. Bandas expuestas por 5 min. No se muestra banda de Erk para este ensayo. C: prueba de anticuerpo en embriones WT sin tratar. Erk es utilizado como control de carga.

Es necesario evaluar si los anticuerpos utilizados en este ensayo de Western blot funcionan de manera correcta, así como si se tiene que cambiar las condiciones de bloqueo de membrana para este anticuerpo primario en particular.

#### *Anexo 4. Inmunofluorescencia para evaluar el patrón de localización de la E-cadherina en la etapa de 500 a 1000 células*

En este proyecto de maestría se realizaron tratamientos en embriones en etapa de 500 a 1000 células y en etapa de esfera con 10  $\mu$ M de VAS2870, tratamientos simultáneos de 10  $\mu$ M de VAS2870 y 75  $\mu$ M de Dynasore y tratamientos solamente con 75  $\mu$ M de Dynasore y se analizó la distribución e

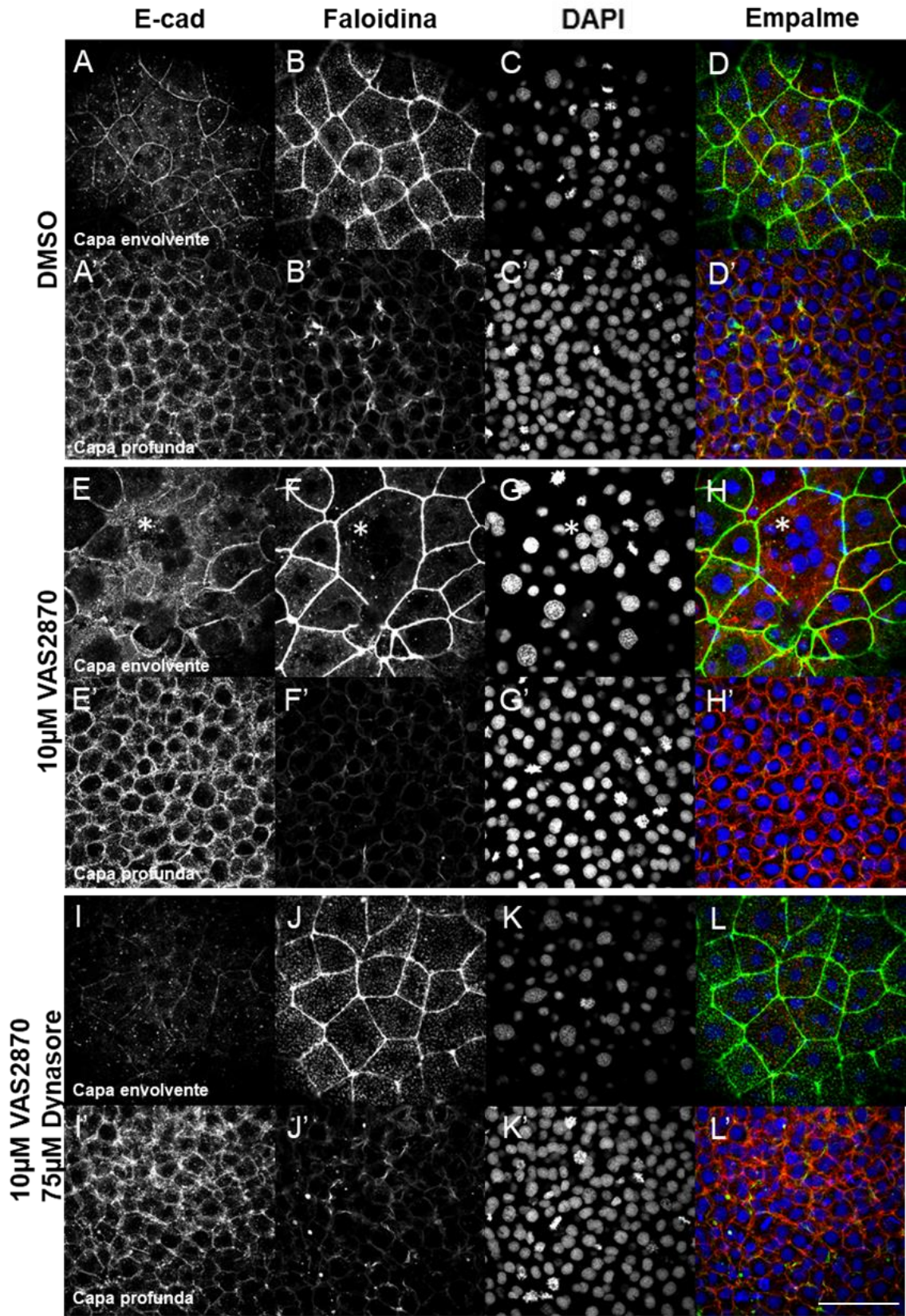
intensidad del citoesqueleto de actina y de la E-cad. A continuación, se muestran las series obtenidas al tratar a los embriones en la etapa de 500-1000 células. El protocolo de inmunotinción se describió en los materiales y métodos de la tesis.

En este proyecto de maestría se realizaron tratamientos en embriones en etapa de 500 a 1000 células y en etapa de esfera con DMSO 1 %, 10  $\mu$ M de VAS2870 y tratamientos simultáneos de 10  $\mu$ M de VAS2870 y 75  $\mu$ M de Dynasore. Posteriormente se fijaron los embriones en la etapa de 50 a 60 % de epibolia y se analizó la distribución e intensidad de la E-cad y del citoesqueleto de actina. A continuación, se muestran las series obtenidas al tratar a los embriones en la etapa de 500-1000 células. El protocolo de inmunotinción se describió en los materiales y métodos de la tesis.

En los embriones tratados en etapa de 500 a 1000 células se observó en los controles una distribución de E-cad membranal y citoplasmática (Fig. sup. 10A, A') como ya se había descrito en trabajos pasados (Mendieta-Serrano et al., 2019; Sempou et al., 2016; Song et al., 2013). Por otra parte, en algunos embriones tratados con 10  $\mu$ M de VAS2870 se presenta una aparente deslocalización de la E-cad de la membrana de las EVL (Fig. sup. 10E), así como una disminución en el número de vesículas citoplasmáticas positivas para la proteína.

La distribución de actina en la EVL también se ve afectada ya que se pierden las puncta ubicadas en la cara externa de estas células (Fig. sup. 10F). Asimismo, la morfología general de las células de embriones tratados con VAS2870 también se modificó ya que las EVL en algunos casos son más grandes, o se observan redondeadas y aparentemente disociadas de las demás células (Fig. sup. 10E-G).

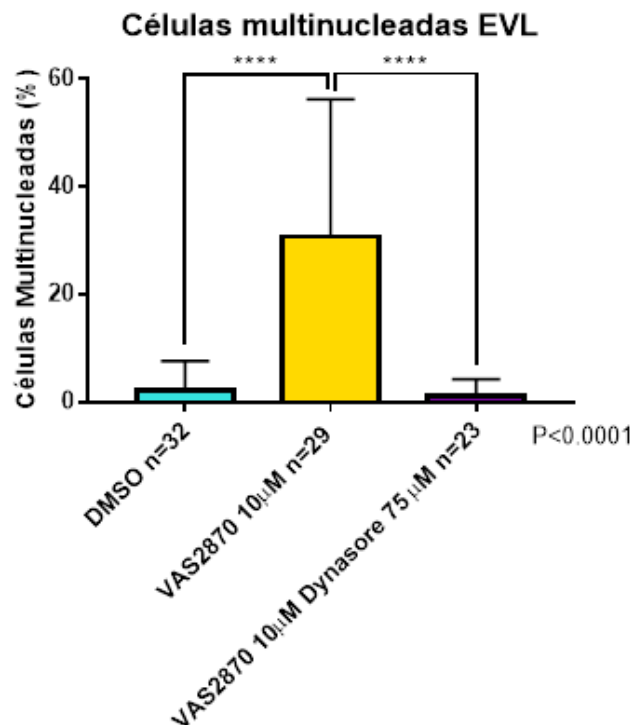
En el caso de las DCL, las células de embriones tratados con VAS2870 parecen ser un poco más grandes que las células de los embriones control (Fig. sup. 10E'), no obstante, se necesitan hacer los análisis necesarios para determinar si las diferencias son significativas.



**Figura suplementaria 10. Los cambios en la localización de la E-cad y en el citoesqueleto de actina ocasionados por la inhibición de las Nox se revierten por la inhibición de la endocitosis.** Inmunofluorescencia para E-cad y el citoesqueleto de actina en embriones tratados con 10  $\mu$ M de VAS2870 y 10  $\mu$ M de VAS2870 con 75  $\mu$ M de Dynasore en la etapa de 500-1000 células. **A-L'**: Señal de E-cad en las células de la capa envolvente (**A, E, I**) y en las células de la capa profunda (**A', E', I'**). Señal de actina en las células de la capa envolvente (**B, F, J**) y en las células de la capa profunda (**B', F', J'**). Señal de DAPI en las células de la capa envolvente (**C, G, K**) y en las células de la capa profunda (**C', G', K'**). Ambos niveles del blastodermo se adquirieron de un mismo embrión por cada tratamiento. **E-H**: Asterisco denota célula del EVL multinucleada y más grande que las demás. Los núcleos se tiñeron empleando DAPI. Empalme muestra los tres canales juntos en pseudocolores. E-cadherina, rojo. F-actina, verde. DNA, azul. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

Los efectos ocasionados por el tratamiento con el VAS2870 sobre la E-cad, el citoesqueleto de actina y la morfología general parecen ser rescatados tratando simultáneamente a los embriones con Dynasore. La E-cad se vuelve a observar en la membrana y vesículas citoplasmáticas en las EVL (Fig. sup. 10I). Se recuperan las punta de las EVL y estas dejan de observarse tan redondeadas (Fig. sup. 10J). Es necesario hacer los análisis correspondientes para verificar si las diferencias observadas en tamaño e intensidad de fluorescencia son estadísticamente significativas entre tratamientos.

Otro resultado observado en los embriones tratados con VAS2870 fue un aumento en el número de núcleos en las células de la EVL.





**Figura suplementaria 11. La inhibición de la endocitosis revierte el aumento de células multinucleadas en la EVL ocasionadas por la inhibición de las Nox.** Porcentaje de células de la EVL multinucleadas en embriones tratados con 10  $\mu$ M de VAS2870 y 10  $\mu$ M de VAS2870 con 75  $\mu$ M de Dynasore en la etapa de 500-1000 células. p value <0.0001.

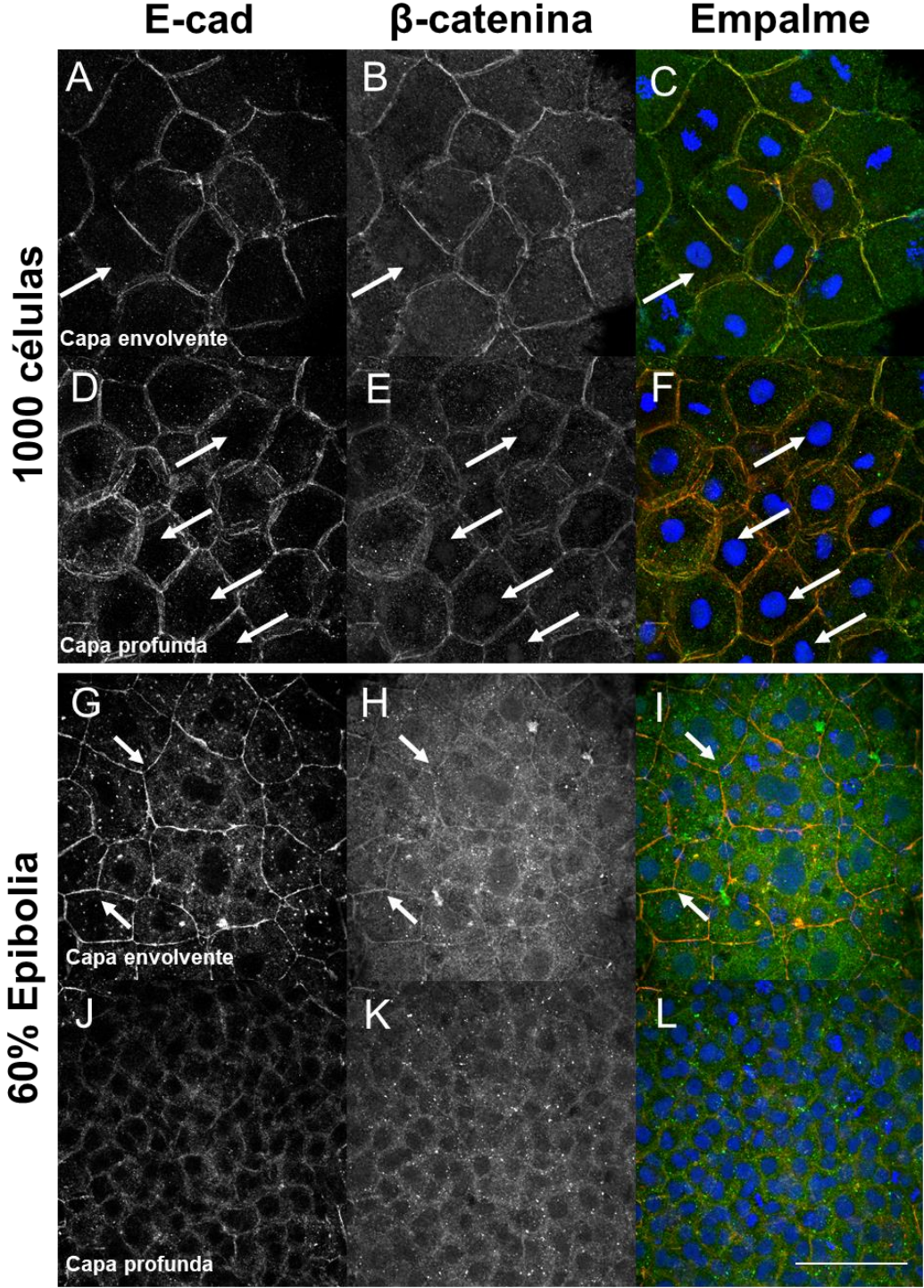
Encontramos que el VAS2870 causó un aumento en el porcentaje de células multinucleadas, 30.8 % en promedio. Esta diferencia fue estadísticamente significativa al compararlas con los embriones control (2.19 %). Por otro lado, el tratamiento simultáneo con VAS2870 y Dynasore rescata el fenotipo silvestre en las EVL y el porcentaje de células multinucleadas se asemeja más al del control (1.08 %). El rescate también fue estadísticamente significativo al compararse con los embriones con la inhibición de la actividad de las Nox (Fig. sup. 11). En las series de fotografías que se adquirieron para estos tratamientos no se observaron células multinucleadas en las DCL (n=29).

Se realizaron 3 ensayos de tratamientos en etapas anteriores a las 1000 células, y tanto entre los ensayos como entre los embriones de un mismo grupo de tratamiento se observó variabilidad en los resultados obtenidos sobre la cuantificación de los distintos elementos evaluados en este proyecto. La variabilidad en los resultados puede deberse a la diferencia temporal entre grupos en la que se comenzó el tratamiento con los inhibidores. Después de estos ensayos logramos estandarizar un método de selección de los embriones para asegurarnos que son tratados en la etapa de 1000 células, que es cuando son liberados los núcleos de algunas células del blastodermo al vitelo (Kimmel et al., 1995).

*Anexo 5. Inmunofluorescencia para evaluar a la localización subcelular de la  $\beta$ -catenina en embriones de 500 a 1000 células y en la etapa de 50-60 % epibolia*

En este proyecto se quería también analizar proteínas accesorias a las uniones adherentes para ver de forma indirecta la localización del complejo de E-cad. Para este propósito se realizaron pruebas de inmunofluorescencia para detectar a la  $\beta$ -catenina, la cual participa en unir a la E-cad en las uniones adherentes con el citoesqueleto de actina (Kane et al., 2005; Van Roy & Berx, 2008). La  $\beta$ -catenina tiene típicamente una distribución membranal asociada a E-cad, también se puede observar en el citoplasma y en el núcleo. Para evaluar su localización con respecto

al complejo de uniones adherentes, se hizo una doble inmunolocalización para la E-cad y la  $\beta$ -catenina en embriones de 500 a 1000 células y en la etapa de 50-60 % epibolia.

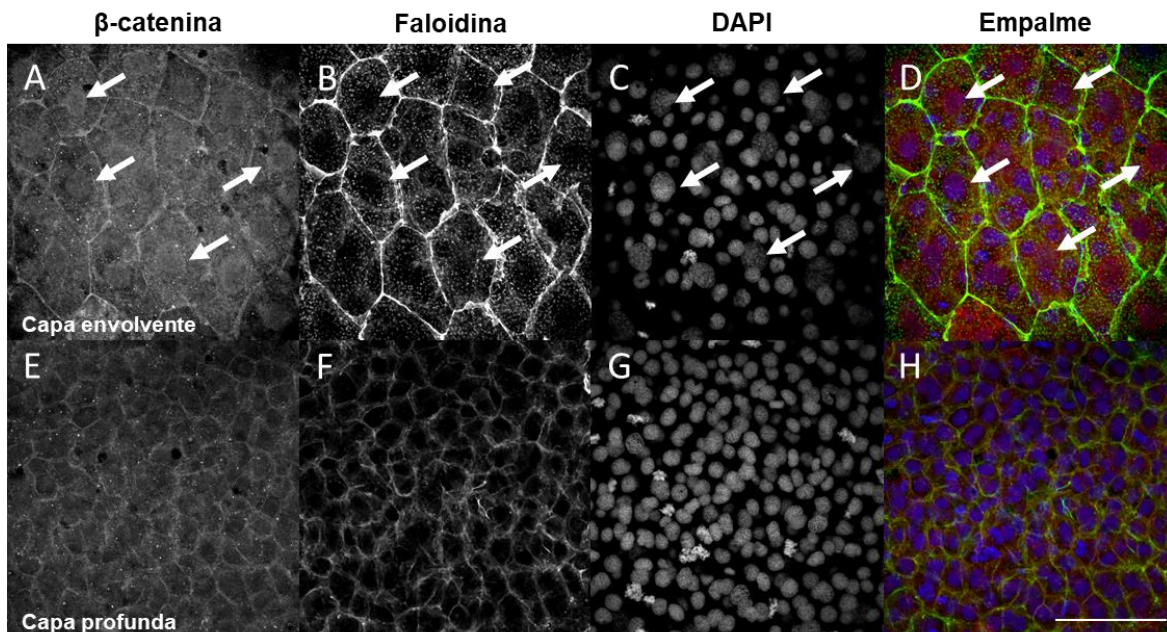


**Figura suplementaria 12.** Inmunofluorescencia para E-cad y  $\beta$ -catenina en etapa de 1000 células (A-F) y en 50-60 % epibolia (G-L). La señal en la membrana de los blastómeros en ambas etapas fue muy tenue y difusa. A-F: En la etapa de 500-1000 células los blastómeros de la EVL y de la DCL se observan grandes y redondeados. Flechas muestran núcleos positivos a  $\beta$ -catenina. G-L: Flechas muestran bordes celulares que presentan señal tanto de  $\beta$ -catenina como de E-cad. Los núcleos se tiñeron empleando DAPI. Empalme muestra los tres canales juntos en pseudocolor. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

En la etapa de 500-1000 células los blastómeros de la EVL y de la DCL se observan grandes y redondeados (Fig. sup. 12A-D'). Se observó un poco de señal en la membrana de los blastómeros en ambas etapas, así como un poco de señal en algunos núcleos, pero la señal fue muy tenue y difusa (Fig. sup. 12).

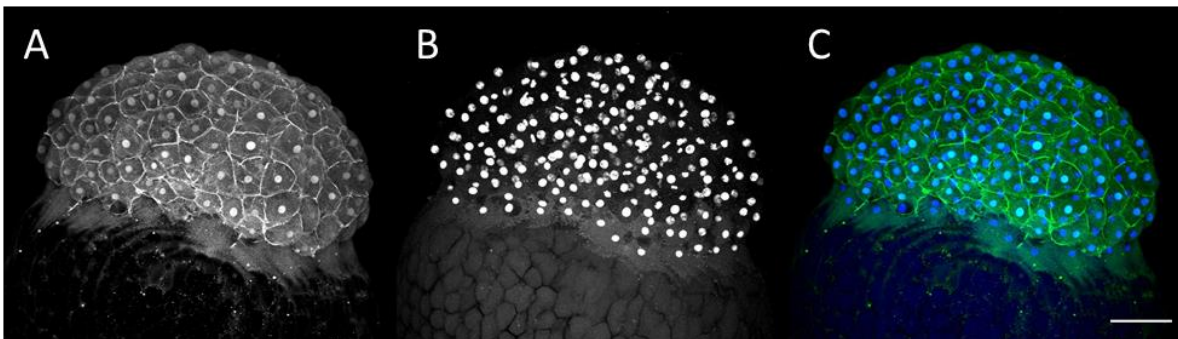
En esta primera prueba de inmunofluorescencia se logró observar señal muy tenue en las membranas de las EVL y de las DCL en las dos distintas etapas del desarrollo evaluadas. No se logró observar núcleos claramente positivos a  $\beta$ -catenina en este primer ensayo.

En una segunda prueba se utilizó únicamente el anticuerpo contra la  $\beta$ -catenina y la faloidina fluorescente para poder observar los bordes de las células. Con esta inmunolocalización se logró observar señal muy tenue en las membranas de las EVL y de las DCL, pero nuevamente no se logró observar núcleos positivos a  $\beta$ -catenina como en el primer ensayo (Fig. sup. 13).



**Figura suplementaria 13.** Inmunofluorescencia para  $\beta$ -catenina y el citoesqueleto de actina en embriones en la etapa de 50-60 % epibolia. **A-D:** señal en las células de la capa envolvente. **E-H:** señal en las células de la capa profunda. Puntas de flecha denotan núcleos de las células de la EVL que parecen tener señal de  $\beta$ -cat. Los núcleos se tiñeron empleando DAPI. Empalme muestra los tres canales juntos en pseudocolor. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

Tras estos dos primeros ensayos, al igual que con el resultado del Western blot, determinamos que la señal de  $\beta$ -catenina producida con el anticuerpo primario con el que contamos en este momento en el laboratorio no fue lo suficientemente nítida para hacer un análisis correcto de localización e interacción con la E-cad. Es por esto y por la señal que el anticuerpo produce al elaborar Western blots que se compró un nuevo anticuerpo primario y posteriormente se volvió a hacer una tercera inmunofluorescencias para analizar la localización de la  $\beta$ -catenina en embriones en etapa de 250 células.



**Figura suplementaria 14.** Inmunofluorescencia para  $\beta$ -catenina en la etapa de 250 células. **A:** Se observa señal  $\beta$ -catenina en las membranas de los blastómeros y en los núcleos. **B:** Los núcleos se tiñeron empleando DAPI. **C:** Empalme muestra los tres canales juntos en pseudocolor. Embriones mostrados en vista lateral utilizando un aumento de 20X. Barra de escala de 100  $\mu$ m.

En esta ocasión si logramos observar la señal deseada de  $\beta$ -catenina en las membranas y núcleos de las células por lo que este anticuerpo será utilizado en futuros experimentos.

#### *Anexo 6. Ensayo de gota colgante para evaluar la cohesividad de las células del blastodermo*

En el artículo de Mendieta-Serrano y colaboradores (2019) se utilizó al ensayo de gota colgante como una aproximación para evaluar la capacidad de agregación de las células tratadas con VAS2870 y el rescate utilizando  $H_2O_2$ . En este proyecto se

quiso retomar este protocolo para evaluar la interacción entre las células tanto de la capa envolvente como de la capa profunda obtenidas de embriones disgregados en la etapa de esfera y tener evidencia de los efectos sobre la adhesión celular al tratar a las células con distintos inhibidores y antioxidantes.

#### *Protocolo para ensayo de gota colgante y resultados*

El procedimiento se basa en el descrito Schötz y Carreira-Barbosa con algunas modificaciones (Carreira-Barbosa et al., 2009; Schötz et al., 2008). El procedimiento se describe brevemente a continuación. Embriones en etapa de esfera (4 hpf aprox.) se decorionaron a mano utilizando pinzas de relojero bajo un microscopio estereoscópico y se separaron en grupos de 50 embriones por tubo en tubos ependorff de 1.5 ml. Se les retiró el medio y se les agregó 1 ml de buffer desvitelinizante (Link et al., 2006).

Posteriormente se disgregaron los embriones mecánicamente utilizando una pipeta Gilson p200 con una punta amarilla hasta obtener una suspensión sin cúmulos grandes de células visibles. Los tubos se centrifugaron 1 min a 500 rfm y se retiró el buffer con cuidado de no absorber el pellet de células. El pellet se resuspendió en 1 ml de medio L15 suplementado con 15 % de SFB y antibióticos y se volvió a centrifugar 1 min a 500 rcf (fuerza centrífuga relativa) para retirar el medio. El pellet se resuspendió en 1 ml de medio suplementado con DMSO 1 %, VAS2870 o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la cara interna de la tapa de cajas Petri se sembraron gotas de 15 µl de la suspensión de células, se invirtió la tapa para que las células precipitaran a la base de la gota y dentro de la caja se sirvió H<sub>2</sub>O estéril para hacer una cámara húmeda y evitar que las gotas perdieran volumen por evaporación. Las gotas se incubaron a 29 °C y se tomaron fotos de las gotas en un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ800) en aumento 6.3x a las 0, 2, 4 y 6 h del tratamiento.

En los blastómeros control tratados con 1 % de DMSO en L15 suplementado con 15 % SFB se observó que a las 2 h de haber sembrado a las células éstas comenzaron a formar agregados (Fig. sup. 13E), los cuales se compactaron a las 4 h de cultivo (Fig. sup. 13I) y se mantuvieron hasta las 6 h de cultivo (Fig. sup. 13M).

Cuando las células se trataron con 5  $\mu\text{M}$  de VAS2870 también se observó agregación a las 2 h (Fig. sup. 13F) y compactación a las 4 y 6 h Fig. sup. 13J, N). Por otra parte, cuando se trataron con 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870 la agregación celular se inhibió desde las 2 h de cultivo (Fig. sup. 13G) y la inhibición se sostuvo hasta las 6 h de cultivo (Fig. sup. 13O). Estos resultados reproducen los resultados obtenidos previamente en el laboratorio (Mendieta-Serrano et al., 2019).

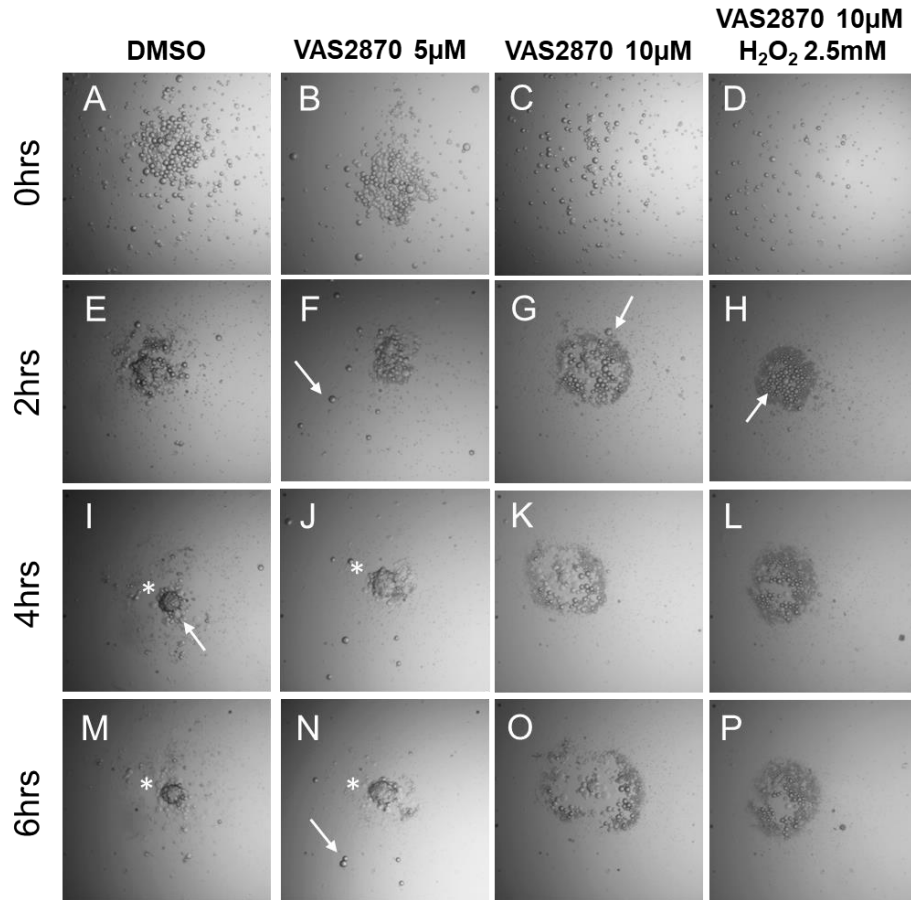
Se quiso evaluar si la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  rescataba la adhesión de las células disgregadas tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870 en los cultivos in vitro, como rescató el retraso de las células de DCL y la localización de la E-cadherina en la epibolia en embriones completos (Mendieta-Serrano et al., 2019).

El número de repeticiones de ensayos por cada condición que se realizaron en este proyecto de maestría se muestra en la siguiente la tabla:

Tabla 3: Número de repeticiones del ensayo de gota colgante y las condiciones evaluadas			
DMSO	VAS2870 5 $\mu\text{M}$	VAS2870 10 $\mu\text{M}$	VAS2870 10 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ 2.5 mM
4	1	4	1

A las 2 h de cultivo se observó lo que parecían ser células en la parte cóncava de la gota las cuales no mostraban agregación y como en el caso del cultivo únicamente con 10  $\mu\text{M}$  de VAS2870 (Fig. sup. 15H), la inhibición de la agregación se sostuvo hasta las 6 h de cultivo (Fig. sup. 15P).

Durante los ensayos de gota colgante al observar a las células con más detenimiento se observaron estructuras muy grandes y redondas que no se agregaban después de 6 h en cultivo y presentaban un tamaño mayor al de las células (Fig. sup. 15F-H). Se quiso evaluar si estas estructuras eran vesículas vitelo que permanecía en liposomas tras la disgregación de los embriones.

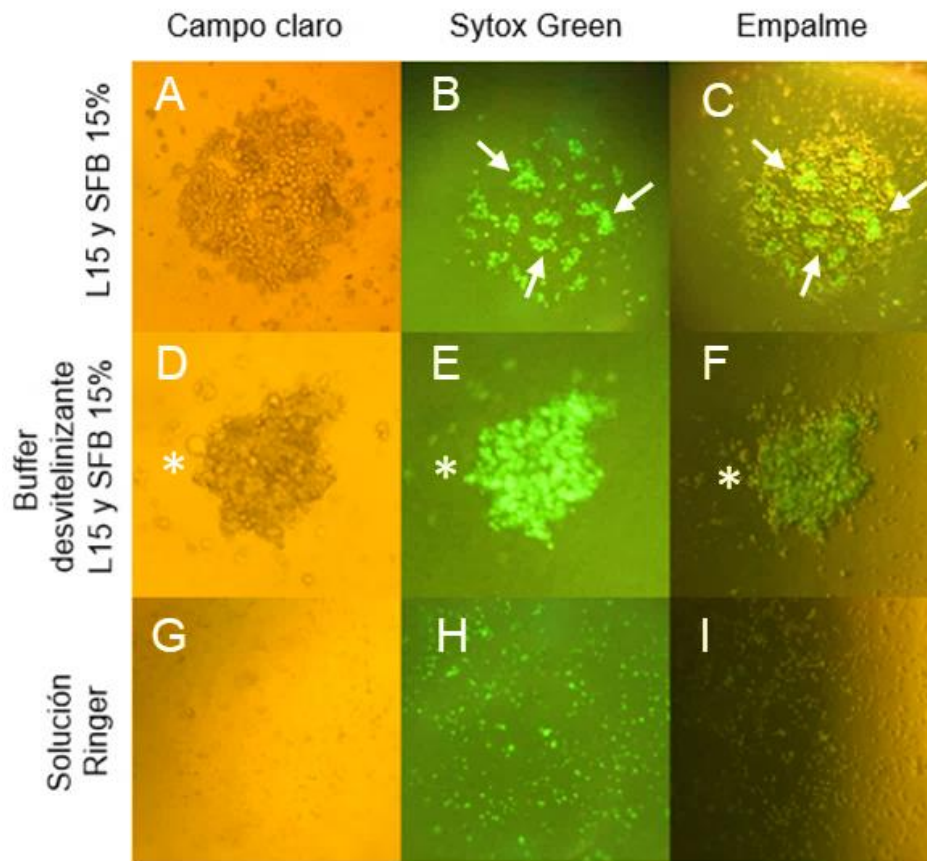


**Figura suplementaria 15. La inhibición de la agregación causada por la inhibición de las Nox no pudo ser rescatada por la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Ensayo de gota colgante. Células de embriones disgregados en etapa de esfera se incubaron en presencia de 5 μM VAS2870, 10 μM VAS2870 y 10 μM VAS2870 con 2mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para evaluar su capacidad de agregación. Asterisco denotan agregados celulares, flechas apuntan a vesículas redondeadas más grandes que los blastómeros en solución.

Para probar esta hipótesis se realizaron inyecciones de Sytox Green (1:30 en medio ERM) en embriones en etapa de 1 célula para marcar a los núcleos fluorescentemente y se disgregaron para llevar a cabo un ensayo de gota colgante. Se realizó la disgregación con 3 medios distintos. Se hizo un grupo de 10 embriones disgregados en medio L15 con SFB al 15 % (Fig. sup. 16A-C), otro grupo disgregado con buffer desvitelinizante (Link et al., 2006) y sembrado en medio L15 con SFB al 15 % (Fig. sup. 16D-F) y un último grupo que fue disgregado y sembrado utilizando una solución ringer (Fig. sup. 16G-I) (Málaga-Trillo *et al.*, 2009). Se tomaron

fotografías en un microscopio de epifluorescencia con un aumento 10x después de 2 h de agregación (Fig. sup. 16).

En las gotas donde los embriones se disgregaron con medio L15 se observaron muchas vesículas y materia que no se agregó después de 2 h en cultivo y que rodeaba a los agregados celulares que eran positivos para Sytox Green (Fig. sup. 16B, C). Concluimos que con el protocolo utilizado anteriormente se estaba obteniendo mucho material del vitelo que podría estar afectando al ensayo de agregación. Con el protocolo de disgregación con buffer desvitelinizante se observó un enriquecimiento significativo de células en las gotas y disminuyó considerablemente el vitelo (Fig. sup. 16E, F). Por último, con el protocolo de disgregación y cultivo en ringer se recuperaron células positivas a Sytox green, pero éstas no llegan a precipitar en la base de la gota, las células se mantienen en suspensión (Fig. sup. 16G-I).





**Figura suplementaria 16. La disgregación de las células utilizando buffer desvitelinizante remueve eficientemente los restos de vitelo del medio.** Variaciones en el protocolo de disgregación e incubación en el ensayo de gota colgante para eliminar los remanentes de vitelo en el medio. **A-C:** células disgregadas e incubadas con L15 y SFB al 15 %. **D-F:** células disgregadas en buffer desvitelinizante e incubadas con L15 y SFB al 15 %. **G-I:** células disgregadas e incubadas con solución ringer. Flechas blancas denotan agregados celulares positivos a Sytox Green. Asterisco denota vesícula del vitelo negativa para Sytox Green.

Al final de estos primeros ensayos se decidió modificar el protocolo de disgregación de embriones para el protocolo de gota colgante, ahora utilizando el buffer desvitelinizante para disgregarlos y después se sembrarán en medio L15. En un futuro será necesario hacer ensayos para evaluar si es posible disminuir la cantidad de SFB que se le suministre al medio para reducir efectos que este suplemento pueda estar teniendo en el sistema experimental.

#### *Anexo 7. Secuencias de E-cadherina*

Como ya se mencionó previamente en este trabajo, las EOR son moléculas que se producen tanto en condiciones de estrés oxidativo como en condiciones fisiológicas y en estas últimas condiciones la señalización redox mediada por las EOR pueden participar en regular distintas respuestas celulares esenciales durante el desarrollo de metazoarios (Covarrubias et al., 2008). Esta regulación se lleva a cabo mediante la interacción y oxidación de biomoléculas por parte de las EOR, lo cual puede afectar tanto su estructura como también su función (Bedard & Krause, 2007). Los componentes de esta red de biomoléculas sujetas a regulación redox incluyen proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos.

En el caso de las proteínas, se han descrito a receptores, tirosina cinasas y fosfatasas, así miembros de la familia de las Ras GTPasas, componentes del citoesqueleto, o bien factores de transcripción que son sujetos a regulación redox. Estas proteínas presentan aminoácidos que son sensibles a cambios redox, como las cisteínas y metioninas (Salas-Vidal et al., 2021).

Las cisteínas pueden ser blanco directo del  $H_2O_2$  o modificadas por acción de peroxiredoxinas y tioredoxinas. Además, las cisteínas son aminoácidos que se encuentran subrepresentados en las secuencias de proteínas en distintos

organismos, pero al mismo tiempo las proteínas poseen cuando mínimo una cisteína en su secuencia (Go et al., 2015).

Muchas de estas cisteínas se encuentran comúnmente conservadas en las secuencias de las proteínas entre diferentes organismos, lo que sugiere que poseen una relevancia biológica y que probablemente las proteínas homólogas sean parte de una red de regulación redox.

Para comenzar a analizar esta hipótesis, en el laboratorio realizamos análisis de las secuencias de varias proteínas clave en distintas redes de señalización por medio del alineamiento de las secuencias de diferentes especies de organismos representativos para compararlas. Las secuencias de las proteínas seleccionadas fueron aquellas las que existe evidencia experimental reportada en la literatura de poseer cisteínas que sufrieran cambios redox de importancia biológica para su función. Posteriormente se buscaron proteínas homólogas en distintos animales modelo de distintas clases y finalmente se analizó que tan conservada se encontraban las cisteínas.

A continuación, se enlistan los organismos utilizados para el análisis de las secuencias de E-cadherina, así como los nombres de las proteínas homólogas encontradas y su código de NCBI.

<b>Especie</b>	<b>Nombre</b>	<b>ID</b>
<i>Homo sapiens</i>	CADH1_HUMAN	P12830.3
<i>Mus musculus</i>	cadherin 1 preproprotein	NP_033994.1
<i>Gallus gallus</i>	cadherin 1 precursor	NP_001034347.2
<i>Anolis carolinensis</i>	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: cadherin 1	XP_008121673.2
<i>Xenopus tropicalis</i>	cadherin 1	XP_002936043.5
<i>Danio rerio</i>	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) precursor	NP_571895.1
<i>Branchiostoma floridae</i>	uncharacterized protein LOC118422413	XP_035685847.1
<i>Amphimedon queenslandica</i>	PREDICTED: protocadherin Fat 4-like	XP_019850869.1
<i>Nematostella vectensis</i>	cadherin 1	QDE55751.1
<i>Trichoplax adhaerens</i>	hypothetical protein TRIADDRAFT_58116	XP_002114375.1
<i>Capsaspora owczarzaki</i>	hypothetical protein CAOG_06334	XP_004345083.1

Se analizó la conservación de las cisteínas en donde existe evidencia experimental que sufren cambios redox y están sujetas a regulación por las EOR

(Behring et al., 2020). Las secuencias subrayadas con gris claro muestran la conservación de la secuencia citada en el artículo de Behring y en gris oscuro están subrayadas las cisteínas que sufren cambios redox.

Cisteína	Secuencia	
<b>C60 HUMANO</b>	<b>VNFEDTGR</b>	
	H. sapiens	AESYTFVPRRHLE-----RGRVLGRVN---FEDCTGRQRTAYFSL-----D 72
	M. musculus	SEVYTFVPVPERHLE-----RGHVLGRVVR---FEGCTGRPRTAFFSE-----D 74
	G. gallus	AETFSFSPVQDSVA-----AGRELGRVS---FAACSGRPWAVYVPT-----D 79
	A. carolinensis	SENYVFHVPRADLE-----RNRVLGRVT---FTDCTDRTOVPFLSD-----D 78
	X. tropicalis	KERYSFSPVK-NLE-----TDKALGRVI---FNSCEGPPVRIQFASK-----D 73
	D. rerio	LEEFVFKVHRNHLH-----SGKRLGKVT---FNNCDGRTRTLFQSI-----D 73
	B. floridae	KWN---LGSNVLV-----GAETRLFT---FRYNNKGVLIYQQOGEGRNFALGVND 87
	A. queenslandica	ASIYENQPNGTLLARVMASDGDGSGTDGRIT---YSIVSVSPSV-----GMNRFITIGSDN 1942
	N. vectensis	VVIDSFSAKDTQLVQARALDADSGSLGEVT---YGDGGKSTS-----NLPFNINVKT 1169
	T. adhaerens	VNVTEQLPANTPMIRI-----EALSDDKIT---YAIASGNKHS-----SFAIGQNN 258
	C. owczarzaki	-----VPLGNLYL-----QQNTNLGPLSGGAFRGLGSTLVELFTSI----- 270
	<b>C603 HUMANO</b>	<b>TIFFCER</b>
H. sapiens		RTIFFCERNPKP-----QVINIIDA----- 617
M. musculus		RNMQFCQRNPQP-----HITILDP----- 619
G. gallus		RSFEICSRQPEK-----QILSIVDK----- 623
A. carolinensis		RAFDICSRSPPEP-----QVLGIVDK----- 628
X. tropicalis		QQNSFCQKDPGF-----RVFNIIDK----- 611
D. rerio		RTIKLQNRRESAP-----VLLSITDK----- 603
B. floridae		---NCSAPGY-----KGVD----- 524
A. queenslandica		RSYSRE---IPESTPVGTQILQVMATDADFIDQGN-LRYQIL-NFVPLFNISRTGATY 2579
N. vectensis		IVDQIDRKAIGTCSPTDIAEGEVITRLGAFDRDGEITFIVPDDVKDLFKIDSRGVVTA 1693
C. owczarzaki	SSDTIASASAS---VA-SAASAASASSAFDASVA-----SAATASSASVASA 924	
<b>C686, C688 y C695 HUMANO</b>	<b>DQVTTLEVSVDCDEGAAGVCR</b>	
	H. sapiens	-QESIILKPKMALEV-----GDYKINLKLMDNQNKD-----QVTT 680
	M. musculus	-QESLILQPRKDLLEI-----GEYKIHLKLDNQNKD-----QVTT 682
	G. gallus	-QDELAMGLKKELEP-----GEYNI FVKLTDSQGKA-----QVTQ 684
	A. carolinensis	--DRLTLQLTKVLDP-----GDYNVAVKLTGQGLS-----HLTM 688
	X. tropicalis	-QSLLELRPKKELDI-----GRYEVLSLRDNQGLT-----DVTK 672
	D. rerio	-GHFLNIKPOSQLEQ-----GEYKVVLRVADREGES-----QENI 665
	B. floridae	--GMCVNSISSENSI-----GDFVCECKEG-YEGKD-CSSIEDWCKDNPCGTGICNNF 587
	A. queenslandica	IEGSIISLGFPPDMNITDPDVLQNLYSANVTLATS-----TN 2672
	N. vectensis	VHYR-----PDQKHV-----RVNVRE----- 1744
	C. owczarzaki	VASIVSASAASVAVAASALSQLSAAVAASASAASASASVASAASASASSASVA- 1017
	H. sapiens	LEVSVDCDEGAA-----GVCRAQPV-EAGLQIPAILG-----ILGGILALL- 721
	M. musculus	LDVHVDCDEGTV-----NNCMKAGIV-AAGLQVPAILG-----ILGGILALL- 723
	G. gallus	VKAQVCECEGTA-----KNCERRSYI-VGGLGVPAILG-----ILGGILALL- 725
	A. carolinensis	VKARVDCDEGAA-----QNCERRGAIGSAGMGVPAILG-----ILGAILGFL- 730
	X. tropicalis	LQITICCCNGDQ-----MOCCKEAAQ-AGGLGISAIVG-----ILGGILALL- 713
	D. rerio	IQASVDCCKGEEA-----FOCTDKQV---AGIPLFGVLG-----VLGGIALLL- 704
	B. floridae	LTGYNCTCPDDPSGAVP-----NRQSCPLRVVNPQISPAALVA-----ILVCLVILL- 636
	A. queenslandica	NTATNCLCTNIS-----VSDSCTL-GCVEFLQLDPEKFPGTITQSSDGHSLLLT- 2720
	N. vectensis	DTPTGSVIA--T-----VRRYFPN-GIVSLLLPEKANFS---VRANGDVILLTP 1787
	C. owczarzaki	SAAASASSTSIAGATPNLVNPNVSNATS-----SSMPIIVG-----VILGMLALL- 1064

### Anexo 8. Secuencias de Cdc25

A continuación, se enlistan los organismos utilizados para el análisis de las secuencias de Cdc25, así como los nombres de las proteínas homólogas encontradas y su código de NCBI.

Especie	Nombre	ID
<i>Homo sapiens</i>	M-phase inducer phosphatase 3 isoform a	NP_001274511.1
<i>Mus musculus</i>	M-phase inducer phosphatase 3	NP_033990.2
<i>Gallus gallus</i>	M-phase inducer phosphatase 1	NP_001186501.1

