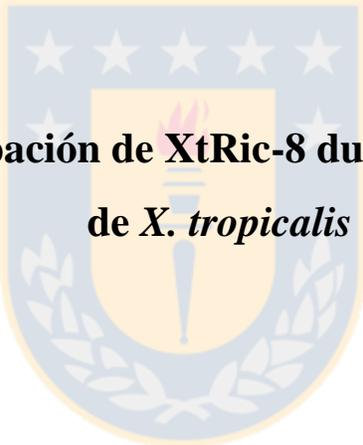




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Magister en Bioquímica y Bioinformática



**Estudio de la participación de XtRic-8 durante el desarrollo neural
de *X. tropicalis***

Gabriela Carolina Toro Tapia

CONCEPCIÓN-CHILE

2011

Profesor Guía: Marcela Torrejón Quezada
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Resumen:

Ric-8 es una proteína citoplasmática de 63kDa conservada en vertebrados e invertebrados, la cual posee actividad GEF. Se ha descrito inicialmente que la función de Ric-8 en el sistema nervioso estaría estrechamente asociada con la señalización de las proteínas G, durante la liberación de vesículas sinápticas en *C. elegans*. También se ha demostrado que participa durante la división celular asimétrica, tanto en *C. elegans* como neuroblastos de *Drosophila*, lo que permite la diferenciación celular durante la embriogénesis. Estudios realizados en ratón demuestran que Ric-8A se expresa de manera neuroespecífica a lo largo del desarrollo. Además, se ha descrito que ratones mutantes heterocigotos para Ric-8 presentan problemas de ansiedad, en la memoria espacial y problemas de aprendizaje, mientras que ratones knockout para Ric-8 no son viables. Por otro lado recientemente hemos descrito el patrón de expresión de Ric-8 durante el desarrollo de *Xenopus tropicalis* el que muestra una expresión a nivel neural y derivados de crestas neurales. Sin embargo, el mecanismo de cómo Ric-8 estaría participando durante la neurogénesis aún no ha sido dilucidado.

Con el fin de aportar a esta pregunta y debido a la importancia que puede tener Ric-8 en el desarrollo neural de vertebrados, se ha propuesto como hipótesis para esta tesis que: “Ric-8 participa en distintos contextos biológicos durante la embriogénesis, contribuyendo al correcto desarrollo neural en *Xenopus tropicalis*”. Para responder esta hipótesis se propone como objetivo general “Estudiar la participación de Ric-8 durante el desarrollo neural en *X. tropicalis*”.

Primero, se analizó el patrón espacio-temporal de expresión de XtRic-8 durante el desarrollo embrionario de *X. tropicalis*, a través de la técnica de hibridación *in situ*, resultados que validan los previamente obtenidos en nuestro laboratorio, demostrando que la expresión de XtRic-8 es neuroespecífica, al menos en estadios tempranos de organogénesis. Luego con el fin de comenzar a realizar estudios funcionales se generó un sistema de expresión inducible *in vivo*, a través de una técnica de transgénesis mediada por la meganucleasa I-Sce-I, donde se expresó al gen reportero GFP bajo la regulación del promotor inducible por calor (*pXthsp70*). Por otro lado, se generó un shRNA para silenciar XtRic-8, el cual se validó en un sistema celular en cultivo y también *in vivo* en el modelo *Xenopus tropicalis*. Luego se estudió el silenciamiento de XtRic-8, analizando el fenotipo obtenido a diferentes dosis de la construcción inducible y el efecto producido sobre marcadores neurales, tales como N-tubulina y Sox-2 a través de la técnica de hibridación *in-situ*. Fue posible observar que la pérdida de función de XtRic-8 produce un retardo en el desarrollo en comparación a los controles, generando un fenotipo celular de mayor tamaño. Así también se observó un desorden y/o pérdida del patrón de expresión de N-tubulina, y un aumento considerable del tamaño del lado microinyectado con el shRNA en relación a su lado control en neurulas de *X. tropicalis*. En estadios más tardíos, se observó una pérdida de movilidad y retardo en respuesta al tacto, siendo ésta mucho menor y más lenta que los controles. Estos resultados demuestran la participación de XtRic-8 durante el desarrollo neural y abren otras interrogantes del cómo está participando en este proceso.