



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

# **Visualización del crecimiento de los microtúbulos en células de la cresta neural de *Xenopus***

Tesis presentada a la Facultad de  
Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Para optar al título profesional de Bióloga  
ALEXIS DANIELLE SANHUEZA ALMENDRAS  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2023

Profesor Guía: Dra. Marcela Torrejón Quezada

Depto. de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

## HOJA DE FIRMAS

Profesor Tutor

---

Dra. Marcela Torrejón Quezada  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Universidad de Concepción

Comisión evaluadora

---

Dra. Marcell Gatica Miranda  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Universidad de Concepción

---

Dr. Patricio Castro Maldonado  
Departamento de Fisiología  
Universidad de Concepción

## AGRADECIMIENTOS

**“Celebra tus propias victorias,  
porque nadie más entiende realmente lo que te costó alcanzarlas”**

En primera instancia me gustaría agradecer a dos personas muy importantes durante mi formación académica, dos mujeres que fueron las encargadas de sembrar en mí el amor a la ciencia y en particular por biología a lo largo de mi enseñanza media. Gracias, profesora Yáskara Cisterna y profesora Patricia Robles por transmitir con pasión sus conocimientos y ser inspiración durante mi educación.

A continuación, le daré las gracias a la persona que más ha luchado conmigo en este camino, mi madre. Gracias por sostenerme en los momentos difíciles cuando ya no me sentía capaz de continuar, gracias por alegrarte más que cualquiera de mis logros y nunca dudar de mi potencial. Estoy aquí gracias a ti.

Gracias especiales a toda mi familia por acompañarme en este largo camino, por siempre tener una palabra de aliento frente a las dificultades y por el amor que me transmiten a pesar de la distancia.

No puedo dejar de darle las gracias a mi gran amiga Catalina, por recorrer este infinito camino hombro con hombro en las muy buenas y en las muy malas también. Sin ti no habría sido lo mismo. Aprovecho de agradecer también a Javiera e Yves amigos, colegas y unos científicos increíbles. También a mis amigos por su inmenso apoyo y fe.

Agradecimientos generales al Museo de Historia Natural de Concepción por recibirme con cariño y confianza durante mi práctica profesional. Me enseñaron un nuevo e increíble mundo oculto.

Gracias Laboratorio de Señalización y Desarrollo por la confianza, las risas, el conocimiento y la enorme dosis de inspiración que fueron cada uno de ustedes durante el desarrollo de mi seminario de título. Son seres humanos impresionantemente inteligentes y perseverantes, me recibieron como una más de la familia. Gracias Profesora Marcela por dejarme aportar con mi granito de arena al mundo científico, por confiar en mí y exigirme para ser mucho mejor. Les deseo el mejor de los éxitos.

A Lucas, por llegar en el mejor momento.

A Matías, por acompañarme en tiempos difíciles.

*A Nelson.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Migración Celular.....</b>	<b>9</b>
1.1. Tipos y mecánica de la migración celular.....	10
1.2. Elementos que participan en la migración celular.....	11
1.2.1. Citoesqueleto.....	11
1.2.1.1. Actina.....	12
1.2.1.2. Microtúbulos.....	13
1.2.1.2.1. Proteínas asociadas a microtúbulos.....	16
1.2.2. Adhesiones focales.....	18
1.2.3. Proteínas GTPasas de la familia Rho.....	20
<b>2. Proteínas G heterotriméricas durante la migración celular.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Cresta neural y la migración celular colectiva.....</b>	<b>24</b>
<b>4. Xenopus como modelo de estudio.....</b>	<b>25</b>
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>50</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estructura e inestabilidad dinámica de los microtúbulos.....	14
<b>Figura 2:</b> Morfología y elementos de una célula en migración.....	19
<b>Figura 3:</b> Modelo del proceso de activación de la proteína G Heterotrimérica.....	22
<b>Figura 4:</b> Mapa del plásmido pCS2+/EMTB-2xCherry (MAP7).....	36
<b>Figura 5:</b> Transformación del plásmido en bacterias DH5- $\alpha$ .....	37
<b>Figura 6:</b> Digestión analítica con <i>BamHI/EcoRI</i> para la confirmación del constructo PCS2+/EMTB-mCherry (MAP7) .....	39
<b>Figura 7:</b> Linealización del plásmido con <i>NotI</i> para la posterior construcción del mensajero.....	41
<b>Figura 8:</b> Transcripción <i>in vitro</i> del gen MAP7-Cherry.....	43
<b>Figura 9:</b> Timelapse del crecimiento de los microtúbulos en explantes en condición control.....	45
<b>Figura 10:</b> Timelapse de explantes en condición morfante.....	46
<b>Figura 11:</b> Análisis de la velocidad y longitud de crecimiento de los microtúbulos bajo condición normal y de silenciamiento con MO Gai-2.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Densitometría de gel de ADN de digestión analítica con BamHI y EcoRI.....	40
<b>Tabla 2:</b> Densitometría de gel de ADN con digestión de NotI.....	42
<b>Tabla 3:</b> Densitometría de ARNm.....	43

## RESUMEN

Uno de los principales procesos celulares durante la embriogénesis es la migración celular, la cual es altamente compleja y depende de la coordinación perfecta de distintas estructuras celulares para efectuarse. Esta requiere de la coordinación del citoesqueleto de actina y tubulina, para poder así lograr que la membrana plasmática se extienda y se logren generar estructuras de adhesión con el sustrato para migrar correctamente. Sabemos que el transcurso de estas acciones se lleva a cabo debido a diferentes señales ya sean moleculares o mecánicas. Es aquí donde entra en juego MAP7, proteína 7 asociada a los microtúbulos, que se ha descrito que está estrechamente vinculada a ellos participando en su dinámica, transporte de moléculas, en sus eventos de catástrofe y crecimiento. Se sabe también que MAP7 actúa como factor de reclutamiento y posterior activador de la motilidad de la MAP motora kinesina-1 (proteína encargada del transporte de cargas intracelulares en el microtúbulo). Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos observado que la subunidad Gai-2 de la proteína G heterotrimérica, al igual que MAP7, se encuentra interaccionando con tubulina y otros elementos de unión al extremo positivo de los microtúbulos. Bajo condiciones de silenciamiento de Gai-2 en células de la cresta neural de *Xenopus* hemos observado un fenotipo anormal del citoesqueleto de actina y tubulina, entre ellos observamos una disminución en la dinámica de los microtúbulos y adhesiones focales más estables y de gran tamaño. En esta investigación se utilizó como modelo a las células de la cresta neural craneal de *Xenopus*, en las cuales se estudió la velocidad de crecimiento de los microtúbulos durante el proceso migratorio en célula viva bajo condiciones normales y de silenciamiento de Gai-2. Con la ayuda de un constructo de ADN codificando a MAP7 asociado a la proteína fluorescente cherry se logró visualizar los microtúbulos en célula viva y con ellos analizar su dinámica en respuesta al silenciamiento de Gai-2.

Palabras clave: Citoesqueleto, MAP7, Cresta neural craneal, Proteína G heterotrimérica, Migración, Gai-2.

## ABSTRACT

One of the main cellular processes during embryogenesis is the cellular migration, which is highly complex and depends on the perfect coordination of different cellular structures in order to be performed. It requires the coordination of the actin and tubulin cytoskeleton, which allow the plasma membrane to extend and thus generate adhesion structures with the substrate to migrate correctly. We know that the course of these actions is performed due to different signals, either molecular or mechanical. At this point, MAP7, microtubule associated protein 7 comes into play, and it has been described to be closely linked to microtubules and to participate in their dynamics, molecule transport, catastrophe and growth events. It is also known that MAP7 acts as a recruitment factor and subsequent motility activator for the motor MAP kinesin-1 (protein in charge of intracellular cargo transport in the microtubule). On the other hand, in our laboratory we observed that the Gai-2 subunit from the heterotrimeric G protein, like MAP7, interacts with tubulin and other microtubule plus-end binding elements. Under Gai-2 silencing conditions in *Xenopus* neural crest cells we have observed a decrease in the microtubule dynamics and more stable and larger focal adhesions. In this research, we used *Xenopus* cranial neural crest cells as a model to study the growth velocity of microtubules during the migratory process in live cell under normal and Gai-2 silencing conditions. With the aid of a DNA construct encoding MAP7 associated with the fluorescent protein Cherry, we were able to visualize microtubules in live cell and analyze their dynamics in response to Gai-2 silencing.

Keywords: Cytoskeleton, MAP7, Cranial neural crest, Heterotrimeric G protein, Migration, Gai-2.



# INTRODUCCIÓN

## 1. MIGRACIÓN CELULAR

La migración celular es un proceso vital durante el transcurso de la formación y el crecimiento del organismo, así como en el organismo adulto (Huertas 2013). Un fracaso en la migración de las células o una migración hacia lugares incorrectos para el organismo puede dar como resultados la generación de anomalías en el desarrollo o incluso provocar la muerte de este (Horwitz & Webb 2003). Es durante la embriogénesis que las células comienzan a migrar hacia zonas específicas tanto para formar órganos y tejidos como para cumplir una función en particular (Garcin & Straube 2019). Es así como los primeros eventos de migración se observan durante la gastrulación, cuando son formadas las tres capas o láminas embrionarias las cuales posteriormente y, dependiendo de su diferenciación podrán seguir migrando hacia sitios diana donde van a formar tejidos que luego darán origen a determinados órganos (Huertas 2013). Es necesario mencionar que la migración celular no se limita solo a un organismo en desarrollo, sino que también se lleva a cabo en los individuos adultos, tanto en condiciones normales como patológicas.

En el individuo adulto la migración celular participa en diferentes procesos homeostáticos entre los que destaca la respuesta inmune y la regeneración de los distintos tejidos (van Helvert et al. 2018). Si bien esta investigación se desarrolla en base a la migración celular en vertebrados, la migración posee igual importancia en organismos invertebrados, plantas y organismos unicelulares como las bacterias (Hol et al. 2019; Horwitz & Webb 2003). Al mismo tiempo la migración celular está involucrada en procesos patológicos como enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades vasculares y la formación de tumores con posterior metástasis, que corresponde al proceso de propagación de un foco cancerígeno por medio de la migración de células a través de la sangre o del sistema linfático (Chang et al. 2013; Friedl et al. 2004; Horwitz & Webb 2003). Todos estos procesos mencionados anteriormente se relacionan en base a que la migración de una célula al igual que la migración de un individuo poseen una interacción y colaboración tanto con el ambiente como con sus pares. La colaboración o cooperación entre células se ve reconocida en el proceso de migración celular colectiva (Szabó & Mayor 2016).

## 1.1 TIPOS Y MECÁNICA DE LA MIGRACIÓN CELULAR

La migración celular es un proceso complejo el cual necesita múltiples vías de señalización además de importantes actores moleculares para llevarse a cabo (Toro-Tapia et al. 2017). Su comprensión representa un reto para científicos e intelectuales dado que conceptualmente una célula migratoria es vista como una entidad de extremos polarizados con movimientos que cambian de manera rápida en sus regiones anterior y posterior. Una migración eficaz requiere una coordinación entre los distintos componentes celulares que definen la polaridad de la célula (Horwitz & Webb 2003). Para esclarecer esta acción podemos mencionar que los diferentes tipos celulares pueden migrar de forma individual o colectiva al igual que, dependiendo de la organización del citoesqueleto esta puede ser ameboide o mesenquimal (Liu et al. 2015).

La migración de tipo ameboide se genera debido a una baja tracción hacia el sustrato, su forma es redondeada o en ocasiones irregular. Este tipo celular carece de adhesiones con la matriz extracelular (MEC), sin embargo, son proteínas de membrana las que van formando enlaces mecánicos entre la actina intracelular y su entorno de tal manera que las células van migrando gracias a expansiones y contracciones en su morfología (Friedl & Wolf 2009). Por el contrario, cuando existe mayor fuerza de adhesión y tracción hacia el sustrato las células migratorias adoptan una morfología mesenquimal de tipo alargada (también llamada fusiforme). La migración de tipo mesenquimal genera células capaces de originar adhesiones focales (AF) asociadas a extensiones de las células llamadas lamelipodios, responsables del movimiento celular (Panková et al. 2010). Al visualizar estos fenómenos en un entorno de tres dimensiones veremos que las células de tipo ameboide tienden a empujar, mientras que las células mesenquimales tiran del sustrato demostrando diferentes principios en la generación de fuerza para cada migración (van Helvert et al. 2018).

Al mismo tiempo puede ocurrir una migración colectiva de células (Friedl & Wolf 2010) la cual depende de una constante interacción con las células vecinas y los tejidos adyacentes (Szabó & Mayor 2018). Las células que migran colectivamente permanecen vinculadas a niveles funcionales y físicos a lo largo de todo el proceso migratorio con la finalidad de mantener íntegro al conjunto (Huertas 2013). Son los determinantes estructurales y moleculares en conjunto con el tipo de tejido próximo

quienes determinan si las células realizan migración individual o colectiva (Friedl 2004). Para efectos de este proyecto de investigación nos centraremos en la migración colectiva de células de la cresta neural craneal.

Una célula en migración requiere de la combinación de ciclos de extensión y contracción con ciclos de ensamble y desensamble de adhesión a la matriz extracelular (Ji et al. 2008) (Fig.2). Este tipo de migración se da cuando una célula percibe un estímulo migratorio, que puede ser tanto químico como mecánico, y extiende en dirección del movimiento lamelipodios para luego adherirse a la superficie de migración (Renkawitz et al. 2009). Finalmente, la célula se libera de su adhesión en su región posterior y gracias a la contracción del propio citoesqueleto logra su movimiento hacia el polo anterior (Trepap 2009).

Las células de la cresta neural, nuestro modelo de estudio corresponde a una población transitoria de células del embrión con gran capacidad migratoria y multipotencialidad que se constituyen en el borde de la placa neural, las cuales luego de sufrir una transición epitelio-mesenquimal (TEM) comienzan a migrar y posteriormente a diferenciarse para formar diferentes tipos de tejidos (Bronner & Simões-Costa 2016). Sus características migratorias hacen a la cresta neural un excelente modelo para entender los mecanismos moleculares que regulan el proceso de migración celular. Al respecto, el laboratorio donde se desarrolló este seminario de título se ha enfocado en los últimos años en estudiar la función de la señalización de la proteína G heterotrimérica durante la migración de este tipo celular. Este tema será desarrollado unos puntos más adelante.

## 1.2 ELEMENTOS QUE PARTICIPAN EN LA MIGRACIÓN CELULAR

### 1.2.1 CITOESQUELETO

Que la migración celular sea un proceso altamente dinámico es sin duda gracias a la función del citoesqueleto. La capacidad que poseen las células de organizar sus compartimentos, modificar su forma y de ejecutar movimientos coordinados es gracias a la presencia del citoesqueleto (Alberts et al. 1999).

Fue en los años setenta que se demostró la existencia de una red de proteínas de tipo fibrilar, que poseían la particularidad de anclarse a la membrana de las células y distribuirse desde el centro de estas hacia la periferia. Esta red de proteínas es el

citoesqueleto (Porter & Anderson 1982; Salceda & Albert 2016). El citoesqueleto se forma a partir de tres elementos proteicos: los filamentos intermedios, los microtúbulos y los filamentos de actina o microfilamentos (Alberts et al. 1999; Joo & Yamada 2016; Seetharaman & Etienne-Manneville 2020). Para efectos de esta investigación nos centraremos en actina y microtúbulos.

#### 1.2.1.1 ACTINA

La actina es una proteína globular, que se caracteriza por ser la más abundante en los organismos eucariontes y se precisa que se encuentra altamente conservada. Otro aspecto es que tiene un alto grado de antigüedad evolutivamente hablando (Pollard 2016). Esta estructura posee numerosas interacciones proteína-proteína aún más que cualquier otra proteína conocida, cualidad dada por su capacidad de transmutar entre un estado monomérico (actina G) y un estado filamentoso (polímeros lineales) denominados microfilamentos (actina F), en adición al control de la hidrólisis de nucleótidos, iones y las numerosas proteínas de unión a actina, lo que la convierte en el actor principal de funciones como: motilidad celular, mantenimiento de la estructura, polaridad celular y regulación de la transcripción (Dominguez & Holmes 2011). Su polimerización es necesaria para formar protrusiones y se encuentra constantemente regulada por proteínas que verifican la disponibilidad de actina globular y por aquellas que las despolimerizan (Huertas 2013).

Como se mencionó anteriormente, un resultado de la polarización celular son las formaciones de prolongaciones (lamelipodios y filopodios) de manera transitoria, siendo estas prolongaciones las responsables del movimiento celular. Una de las moléculas implicadas en dichas estructuras celulares es la actina formando estructuras como la actina cortical (Huertas 2013). Incluso la organización de los microtúbulos se ve influida por la presencia de la proteína actina y viceversa (Garcin & Straube 2019). Otra estructura importante y que se encuentra a lo largo de toda la célula son las fibras de estrés, compuestas cada una por entre 10 y 30 filamentos de actina y están asociadas a la miosina II, lo que le confiere capacidad contráctil. Las fibras de estrés ventrales se unen por ambos extremos a adhesiones focales, se disponen en dirección de la migración y son responsables de la retracción de la región posterior de la célula para permitir la motilidad (Pellegrin & Mellor 2007).

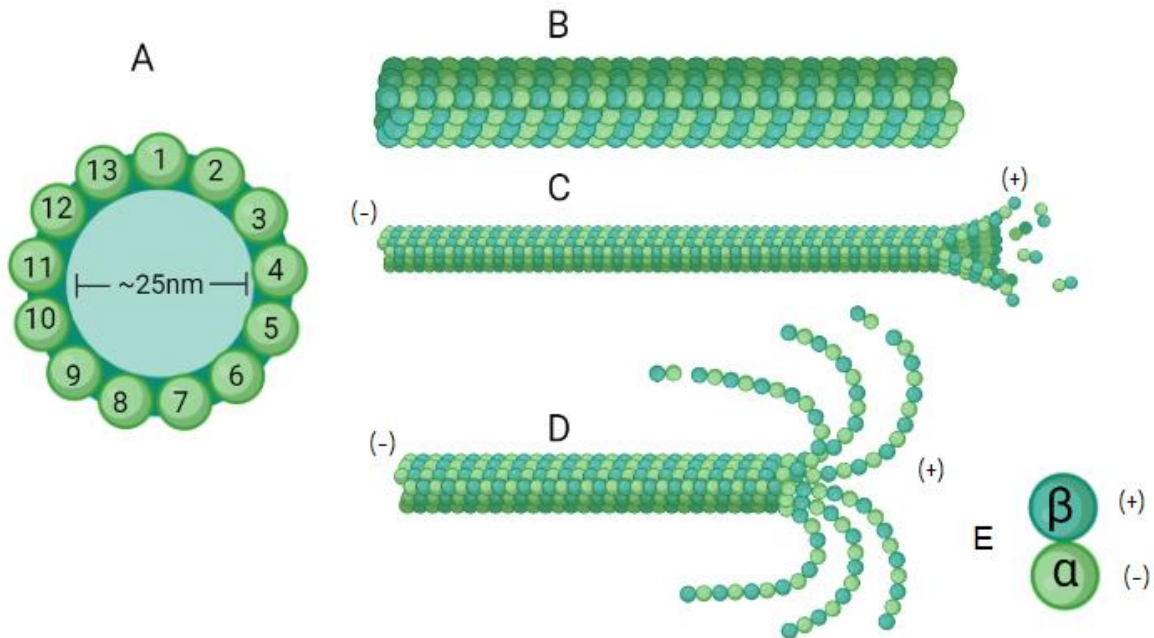
### 1.2.1.2 MICROTÚBULOS

Los microtúbulos son cilindros huecos conformados por filamentos creados por la unión de varios heterodímeros globulares de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, quienes le otorgan un diámetro y una rigidez mayor en comparación con los demás filamentos del citoesqueleto (Garcin & Straube 2019; Iwasa & Marshall 2020; Salceda & Albert 2016; Alberts et al. 1999). Estas características hacen de los microtúbulos un soporte estructural indispensable para la célula ya que les permite crear un esqueleto más recto y extenso promoviendo un mejor movimiento de moléculas a grandes distancias. Es por esto por lo que los microtúbulos son esenciales y además son el principal componente del citoesqueleto de la célula, gracias a que desarrollan un papel importante en procesos tales como división celular, diferenciación celular, morfología celular y transporte celular (Anitei & Hoflack 2011; Roychowdhury & Rasenick 2008). Estructuralmente los microtúbulos compuestos de alfa y beta tubulina se encuentran organizados en base a trece protofilamentos paralelos, cada uno de ellos es una cadena lineal creada de dímeros de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina alternados. En un microtúbulo todos los protofilamentos se encuentran orientados en la misma dirección, es decir, todos sus extremos (+) se encuentran en un mismo punto, y todos sus extremos (-) en otro de tal forma que dan origen a una estructura tubular hueca y polarizada (*Fig. 1*), dicha estructura le otorga al microtúbulo la capacidad de polimerizar y despolimerizar su esqueleto de tubulina, y es en esta particularidad que se basa la capacidad de los microtúbulos de regular los procesos mencionados previamente (Roychowdhury et al. 1999; Ávila 1990). Que exista una polarización de ensamblaje de los microtúbulos dentro de la célula es clave para lograr una morfología celular polarizada (Rodríguez et al. 2003). Un claro ejemplo se da en el caso de las neuronas, ya que la dinámica de crecimiento de los microtúbulos con polarización permite el alargamiento de la célula neuronal para dar forma a los axones y dendritas (Dent & Kalil 2001).

En las células gran parte del crecimiento de los microtúbulos se da en el extremo “plus” (+) del polímero, lugar en que queda ubicada la  $\beta$ -tubulina en los protofilamentos. Mientras que en el extremo “minus” (-) de los protofilamentos queda situada la  $\alpha$ -tubulina, en este sitio se identifican microtúbulos más estables e inmersos en el centrosoma (Morrison 2007) (*Fig.1*).

Los centrosomas son los centros organizadores más importantes de las células animal y constan de una matriz amorfa de proteínas donde están ubicados los anillos

de gamma ( $\gamma$ ) tubulina, quienes cumplen la función de nuclear el crecimiento de los microtúbulos y proteger el extremo menos de la despolimerización. Asimismo, existen en el centrosoma otras proteínas nucleadoras de microtúbulos colaborando entre sí (Alberts et al. 1999; Farache et al. 2018). Recordemos que los microtúbulos están en constante elongación y acortamiento, fenómeno que ha sido denominado inestabilidad dinámica (Contreras 2008; Morrison 2007).



**Figura 1:** Estructura e inestabilidad dinámica de los microtúbulos.

Los microtúbulos son cilindros constituidos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de tubulina. Estos presentan un diámetro de alrededor de 25 nm y poseen una rigidez mayor a los demás componentes del citoesqueleto. (A) Sección transversal de un microtúbulo con su anillo de 13 subunidades, cada una corresponde a un dímero de tubulina. (B) Esquema de un microtúbulo corto, formado por 13 protofilamentos. (C) Esquema de la polimerización de un microtúbulo, es decir, en crecimiento. (D) Esquema de la despolimerización de un microtúbulo. (E) Molécula de tubulina compuesta de  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina. Siendo  $\alpha$ -tubulina la parte con carga negativa en la molécula y  $\beta$ -tubulina cargada positivamente, otorgando polaridad al microtúbulo.

La inestabilidad dinámica es un medio que tienen los microtúbulos de lograr llegar a distintos puntos en el citoplasma celular pues les permite explorar, crecer y acortarse, para finalmente estabilizar los microtúbulos y de esta manera formar estructuras

concretas como el huso mitótico (Ohi & Zanic 2016). Es esta característica la que permite a los microtúbulos presentar diferentes comportamientos dependiendo del tipo celular y de las distintas fases del ciclo celular, por ejemplo, en células específicas estos son más estables y también pueden llegar a formar estructuras especializadas como cilios (ciliogenesis) y axones (He et al. 2015). Los microtúbulos incluso experimentan modificaciones post traduccionales que van a ejercer un papel importante tanto en la regulación de su dinámica como en las funciones a *posteriori* (Janke & Bulinski 2011). El cambio de crecimiento a acortamiento en los microtúbulos es llamado catástrofe, mientras que el cambio de despolimerización a polimerización se denomina crecimiento.

Se ha observado que la dinámica de los microtúbulos está continuamente siendo regulada, y son justamente las proteínas asociadas a microtúbulos o MAPs (por sus siglas en inglés) las encargadas de esta función. Debido a que los microtúbulos se encuentran constantemente al borde de su catástrofe es lo que los hace susceptibles a los cambios en el medio y a la unión de proteínas reguladoras, promoviendo diferentes cambios en su ensamblaje (Goodson & Jonasson 2018).

El término MAP (Microtubule Associated Protein) es aplicado a cualquier proteína que pueda demostrarse, con experimentos, que se une a los microtúbulos. Esta familia de proteínas desempeña funciones indispensables en la modulación de varios procesos celulares en que participan los microtúbulos, funciones tales como división y diferenciación celular, motilidad y morfogénesis de las células y ciliogenesis (Drewes et al. 1998; Ishikawa & Marshall 2011; Robertis 1996). A menudo las MAP pueden clasificarse según sus funciones como proteínas estabilizadoras, desestabilizadoras, proteínas de protección y ligadores (Goodson & Jonasson 2018). O dependiendo de la localización como citoplasmáticas (célula en interfase), mitóticas (fibras del huso), ciliares (en el eje de los cilios) y centriolares (cuerpos basales y centriolos) (Robertis 1996) e incluso según su localización en el microtúbulo (He et al. 2015).

El grupo de proteínas más destacadas de la familia MAP incluye a MAP1, MAP2, MAP4, tau y MAP7 (Tala et al. 2014). En cuanto a MAP4 esta se encuentra expresada en numerosos tipos celulares, en cambio MAP1, MAP2 y tau se reducen en gran medida a las células nerviosas y MAP7 se expresa predominantemente en las células epiteliales (Schoenfeld & Obar 1994). Para efectos de esta investigación nos centraremos en MAP7.

### 1.2.1.2.1 PROTEÍNAS ASOCIADAS A MICROTÚBULOS

La proteína 7 asociada a microtúbulos (también conocida como E-MAP-115 y ensconsin) MAP7 se encuentra expresada principalmente en líneas de células epiteliales, en componentes epiteliales de diferentes órganos (Fabre-Jonca et al. 1999) y en un nivel de expresión menor en células de tipo neuronal y muscular (Sood et al. 2004). Es identificada por primera vez en células HeLa con la utilización de anticuerpos monoclonales y policlonales purificados contra un fragmento de E-MAP-115 (115 kDa) previamente registrado llamando la atención de los autores en virtud de su capacidad de unión a los microtúbulos (Masson & Kreis 1993).

La estructura de MAP7 está constituida por tres dominios: un dominio amino (NH<sub>2</sub>-terminal) cargado positivamente en el que se encuentra el primer “coiled-coil” que se une a los microtúbulos (Masson & Kreis 1993; Tymanskyj et al. 2017), un dominio P en el medio lugar en que se reconocen varios sitios de fosforilación potenciales (Masson & Kreis 1995) y un dominio carboxilo que incluye un segundo “coiled-coil” (Metzger et al. 2012).

Se ha logrado identificar la participación de MAP7 en numerosos procesos celulares y en distintas especies. Por ejemplo, en roedores se demostró la importancia que tiene MAP7 en la maduración de las ramas neuronales, ya que esta logra estabilizar los microtúbulos en las uniones rama evitando su retracción de manera que crea un límite en los microtúbulos evitando así tanto la polimerización como la despolimerización (Tymanskyj & Ma 2019). Un estudio en piel humana y queratinocitos primarios realizado por Fabre-Jonca et al. 1999 revela el papel de MAP7 durante la formación de queratinocitos en diferenciación terminal, donde la expresión de MAP7 aumenta en células epiteliales polarizadas que fueron sometidas a una reorganización microtubular, en este caso los queratinocitos. En células HeLa se estableció la participación de la familia MAP7 en la regulación de la MAP motora kinesina-1 actuando como factor de reclutamiento en el microtúbulo y activando a la proteína (Hooikaas et al. 2019). Además, se ha demostrado que MAP7 tiene la capacidad de fosforilarse durante la mitosis y como consecuencia de esto se inactiva, y al inactivarse durante interfase se desencadena el proceso de catástrofe en los microtúbulos no centrosomales o microtúbulos largos (Mchedlishvili et al. 2018) con la finalidad de dar paso a la formación del huso mitótico. A pesar de que su inactivación es necesaria para iniciar la mitosis, es posible que las proteínas MAP7



realicen funciones durante la división celular, dado que en moscas MAP7 participa en la formación del huso mitótico (Gallaud et al. 2014). Asimismo, Kwon et al. 2016 revelan que la isoforma MAP7D3 participa en el reclutamiento de kinesina-13 en el huso.

Es preciso señalar que el segundo “coiled-coil” de MAP7 comprende en su estructura de un dominio carboxilo que interactúa con kinesina-1 (Metzger et al. 2012). Diferentes autores han evidenciado que la eliminación del dominio carboxilo de MAP7 afecta directamente a la correcta función de la polaridad celular basada en kinesina-1 (Sung et al. 2008), al transporte de orgánulos estudiado en neuronas de *Drosophila* (Barlan et al. 2013), a la disociación del huso mitótico (Gallaud et al. 2014) y a la correcta migración del núcleo celular (Metzger et al. 2012). Estas características le otorgan a MAP7 grandes expectativas en el pronóstico frente a ciertos tipos de enfermedades. En concreto se ha visto que una expresión elevada de MAP7 indica un pronóstico adverso en personas con un tipo de leucemia aguda atribuible a características genéticas distintivas de los pacientes con este cáncer (Fu et al. 2016). De manera similar ocurre en pacientes que padecen cáncer de colon en etapa II, unos niveles elevados de MAP7 señalan un pronóstico adverso en la evolución de la enfermedad y además estos resultados le otorgarían la facultad de biomarcador de la enfermedad a la proteína (Blum et al. 2008). Estos resultados se repiten tanto en estudios de cáncer de cuello uterino como en cáncer de pulmón, en los que MAP7 participa como un promotor de la proliferación de la enfermedad (Tang et al. 2020; Yan et al. 2013).

Se ha descrito que la sobreexpresión de MAP7 activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Dicho factor se encuentra involucrado en la respuesta celular frente a estímulos tales como: estrés, radiación ultravioleta, antígenos bacterianos o virales, entre otros. Además, una regulación defectuosa o inhibición de este factor juega un rol importante en enfermedades graves como el cáncer, asma, enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes, infecciones virales y un desarrollo inmune adecuado. Si NF- $\kappa$ B está bloqueado o inhibido va a evitar que las enfermedades proliferen, algo muy importante en tratamientos contra la migración de células tumorales durante la metástasis (Zhang et al. 2020; Lawrence 2009; DiDonato et al. 2012).

En Zhang et al. 2020 demostró que una sobreexpresión de MAP7 promueve la migración e invasión de células cancerígenas en un estudio de cáncer de cuello uterino. Junto con ello estudiaron el rol de MAP7 en cicatrización de tejido donde fue

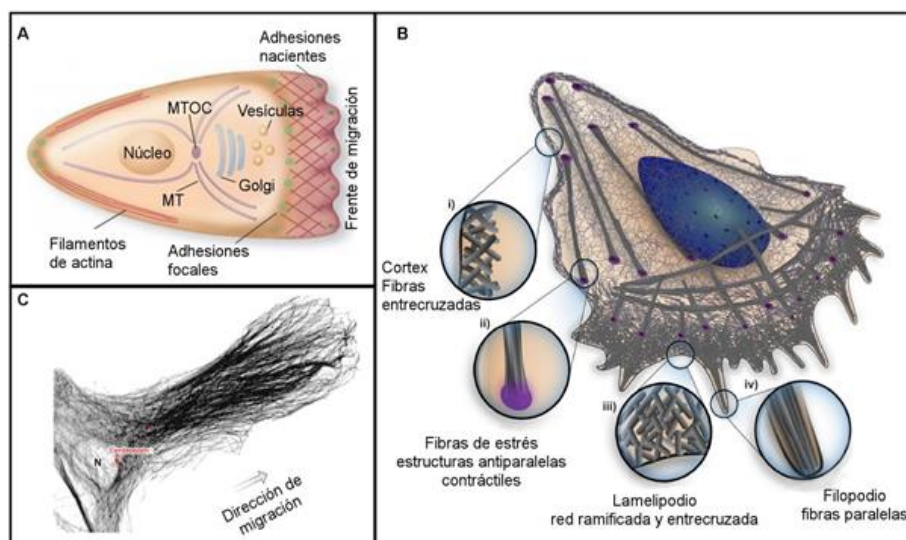
evidenciada que la sobreexpresión de MAP7 en las células aporta una mayor capacidad migratoria sanando a mayor velocidad el tejido dañado. Finalmente demostró que MAP7 promueve la transición epitelio mesenquimal de las células, proceso clave para la migración celular.

Los microtúbulos también tienen otro tipo de proteínas de unión en sus extremos, las que se han utilizado en numerosos estudios gracias a diferentes ventajas. En este grupo de proteínas encontramos a las EB (por sus siglas en inglés “end binding protein”). La familia de proteínas EB está compuesta por tres proteínas descritas EB1, EB2 y EB3 que se encuentran altamente conservadas y que están formadas de pequeños dímeros que poseen sitios de unión que reconocen los extremos de los microtúbulos en crecimiento (Slep et al. 2005). Además de unirse a los microtúbulos se ha demostrado que interactúan directamente con la mayoría de las proteínas de unión a extremo positivo y se han establecido como reguladoras de las vías de señalización de los microtúbulos (Lansbergen & Akhmanova 2006). La proteína EB3 se encuentra íntimamente relacionada con la regulación de la dinámica de los microtúbulos y de protegerlos frente a la despolimerización, contribuyendo a su estabilidad (Straube & Mercedes 2007), por este motivo es utilizada para observar y seguir el extremo “plus” de los microtúbulos en su etapa de crecimiento con la ayuda de marcadores fluorescentes (Roth et al. 2018).

### 1.2.2 ADHESIONES FOCALES

La formación de lamelipodios y filopodios por parte de la actina, una vez que estas estructuras se encuentran formadas requieren de un anclaje a la superficie para llevar a cabo su movimiento migratorio. Al hablar de superficie podemos referirnos tanto a la matriz extracelular como a una célula contigua (Huertas 2013). Las adhesiones focales son los puntos en que se anclan o adhieren los lamelipodios a la matriz extracelular. Son las integrinas los componentes esenciales de los complejos de adherencia focal, uniendo el citoesqueleto a la superficie extracelular permitiendo la propagación de las fuerzas de tracción (Beningo et al. 2001). Las integrinas son la principal familia de receptores promotores de la migración y, a pesar de que no poseen actividad catalítica, puede sufrir cambios conformacionales que permiten la comunicación tanto del interior de la célula hacia la matriz celular (inside-out) como

del exterior hacia el citosol (outside-in). Estas cascadas de señalización permiten regular la formación y fortalecimiento de las adhesiones focales, la organización y dinámica del citoesqueleto y la mantención de la polaridad durante la migración (Huttenlocher & Horwitz 2011; Ridley et al. 2003). Por otro lado, son los microtúbulos quienes se encargan de regular el recambio de los componentes que forman las adhesiones focales (Ezratty et al. 2005). Interesantemente, nuestro laboratorio ha reportado que las proteínas G heterotriméricas, G $\alpha$ 13 y G $\alpha$ i-2 estarían regulando la dinámica de las adhesiones focales (Toro-Tapia et al. 2018; Villaseca et al. manuscrito en preparación).



**Figura 2:** Morfología y elementos de una célula en migración.

- A) Polaridad celular en la migración. Durante la migración la célula presenta una polaridad anteroposterior caracterizada por la generación de protrusiones en dirección del movimiento, las que se estabilizan por la generación de adhesiones con la matriz extracelular. Además es característica la disposición espacial del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y el aparato de Golgi enfrentando al núcleo en dirección de la migración (modificado de Ridley et al. 2003). B) Citoesqueleto de actina en la migración. El citoesqueleto de actina presenta una estructuración diferencial durante la migración celular: I) Cortex celular, II) fibras de estrés, III) lamelipodio y IV) filopodios. Los puntos morados representan las adhesiones focales (modificado de Blanchoin et al. 2014). C) Organización de los microtúbulos en la migración. Los microtúbulos se organizan de forma paralela al frente de migración, lo que favorece el tráfico

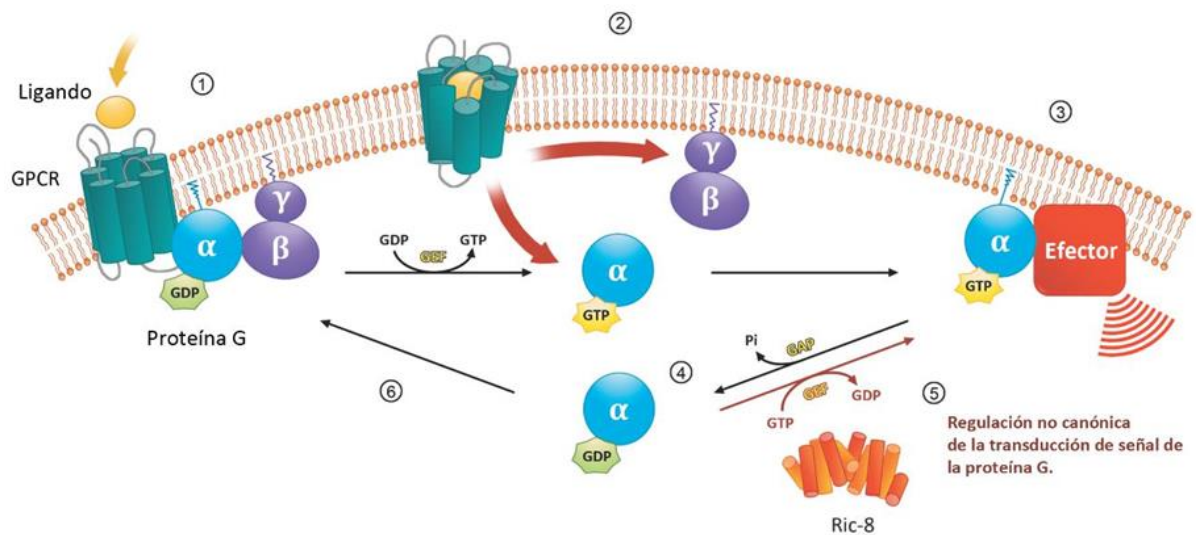
de componentes celulares hacia la protrusión (modificado de Etienne-Manneville 2013).

### 1.2.3 Proteínas GTPasas de la familia Rho

La señalización de las proteínas GTPasas pequeñas de la familia Rho involucra a aquellas proteínas que comparten las funciones de unión e hidrólisis de Guanosín trifosfato (GTP) (Bourne et al. 1991). Esta superfamilia que engloba a las proteínas GTPasas incluyendo a sus reguladores y efectores, son el elemento control esencial en las vías de transducción de señales implicadas en prácticamente todos los aspectos de la biología celular (Colicelli 2004). Procesos tales como la migración celular, diferenciación celular, proliferación, dinámica y transporte tanto de vesículas como de orgánulos, dinámica del núcleo y regulación del citoesqueleto, son algunos de los procesos en que participan las proteínas GTPasas pequeñas (Reiner & Lundquist 2018). La polarización de las células es clave durante la migración. Como se mencionó, las protrusiones se generan de la mano de una reorganización del citoesqueleto, se crean los lamelipodios para formar los filopodios (Jaffe & Hall 2005). Este proceso se lleva a cabo por medio de la familia Rho de las proteínas GTPasas. Ridley & Hall, 1992 describen un estudio realizado en un cultivo de células de mamíferos donde se llega a la conclusión de que RhoA en su estado activo impulsa la formación de adhesiones focales y fibras de estrés. En el mismo estudio señalan la importancia de Cdc42 y Rac1 (en sus estados activos) para la formación de filopodios y lamelipodios respectivamente. Cuando Rac1 está en su estado activo Rac1-GTP regula la polimerización de la actina promoviendo la formación de lamelipodios en el borde director. Por otro lado, Cdc42-GTP (su estado activo) está controlando la formación de filopodios en el borde director (Ridley et al. 1992). Estas proteínas a través de sus ciclos de activación y desactivación van controlando la polaridad de la célula por medio de cambios en la dinámica del citoesqueleto, por lo que son indispensables en la migración (Woldu et al. 2018).

## 2. PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS DURANTE LA MIGRACIÓN CELULAR

Las proteínas G heterotriméricas o proteínas de unión a GTP están constituidas por tres subunidades alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) que se anclan a la cara intracelular de la membrana plasmática, lugar donde logran interactuar ya sea con componentes río arriba (receptores) como río abajo (efectores) generando diversos sistemas de señalización (Fields & Casey 1997). Las subunidades  $\alpha\beta\gamma$  son consideradas interruptores biológicos debido a que varían entre sus estados activo (ON) e inactivo (OFF) (Weis & Kobilka 2018). En el estado inactivo prima en la membrana el complejo  $G\alpha$ -GDP/ $G\beta\gamma$ , y es cuando un ligando (o agonista) se une al receptor ubicado en la membrana que se produce la activación del heterotrímero promoviendo el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$ , y en consecuencia la disociación de estas unidades en las entidades  $G\alpha$ -GTP y el dímero  $G\beta\gamma$  (Hinrich et al. 2012; Gilman 1987; Offermanns 2003; Tesmer 2010). La reacción termina por la actividad GTPasa propia de la subunidad  $G\alpha$  que hidroliza el GTP a GDP y como consecuencia la reagrupación del complejo  $G\alpha$ -GDP/ $G\beta\gamma$ . Tanto el complejo activo  $G\alpha$ -GTP como el dímero  $G\beta\gamma$  son capaces de interactuar con la molécula efectora para generar segundos mensajeros (Fields & Casey 1997) (Fig 3). Las proteínas G heterotriméricas en su estado activo pueden regular de forma positiva o negativa a distintas proteínas efectoras tales como; canales iónicos, especialmente para potasio, calcio y sodio (García Sainz 2011) además de otros efectores intracelulares como adenil ciclasa, fosfolipasa C, fosfolipasa A2 y fosfodiesterasas (Wilkie et al. 1992) y finalmente incluso proteínas reguladoras de las proteínas GTPasas pequeñas (Cotton & Claing 2009).



**Figura 3:** Modelo del proceso de activación de la proteína G Heterotrimérica.

(1) El sistema inactivo se compone del heterotrímero, formado por  $G\alpha$ -GDP unida al dímero  $G\beta\gamma$ , y por un receptor de membrana acoplado a la proteína G (GPCR). Cuando el GPCR une su ligando, sufre un cambio conformacional en la región intracelular induciendo su actividad GEF sobre la subunidad  $G\alpha$ -GDP, activando el sistema con la disociación de  $G\alpha$ -GTP y el dímero  $G\beta\gamma$  (2).  $G\alpha$ -GTP puede activar sus efectores y amplificar la señal (3). Mediante la actividad GTPasa intrínseca que posee  $G\alpha$ , esta hidroliza el GTP, produciendo su disociación de sus efectores (4). Sobre  $G\alpha$ -GDP disociado actúa Ric-8, el cual vuelve a activar  $G\alpha$  con su actividad GEF para que continúe la activación de los efectores (5). Sin embargo, luego de que  $G\alpha$ -GDP se disocie del efector, este tiende a unirse nuevamente al dímero  $G\beta\gamma$  y formar el heterotrímero inactivo unido al GPCR (6). (Leal 2018 tesis de Magister).

Las subunidades de las proteínas G heterotriméricas acostumbran a acoplarse a los GPCRs (receptores acoplados a proteína G) y producto de esta acción transmiten las señales hacia el interior de la célula gracias a los segundos mensajeros (Barzi-Diéguez 2011). Sabemos que al momento en que la proteína G interactúa con su receptor esta se presenta en su estado inactivo (Oldham et al. 2008) y que la unión del ligando al GPCR genera un cambio conformacional en el receptor que induce la liberación del GDP unido a la subunidad  $G\alpha$  de la proteína G que se encontraba acoplada a su receptor, activándose y disociándose de  $G\beta\gamma$  (Barzi-Diéguez 2011). Estos receptores acoplados a proteínas G, son proteínas integrales de membrana que poseen una estructura particular la cual es otorgada

principalmente por la larga cadena de aminoácidos y que finalmente conforman las siete hélices  $\alpha$  transmembrana hidrofóbicas (García Sáinz 2011). Se desconoce el tamaño exacto de la superfamilia de GPCRs pero aproximadamente son 800 GPCRs codificados en el genoma humano (Weis & Kobilka 2018). Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) participan en gran parte de las respuestas de las células frente a estímulos externos tal como quimiocinas, hormonas, luz, temperatura y olores (Weis & Kobilka 2018), dichas respuestas llevan a cabo los procesos de migración y diferenciación celular, entre otros (Thompson et al. 2007). Por otro lado, existen también otras proteínas que controlan la activación y desactivación de las proteínas G heterotriméricas, de forma independiente de receptor, entre estas proteínas encontramos a Ric-8, proteína que al igual que el receptor actúa como un activador del intercambio del nucleótido de Guanina (GEF), uniéndose a la forma  $G\alpha$ -GDP induciendo el intercambio por GTP, y de esta forma manteniendo el estado activado de la proteína G (Hinrichs et al. 2012). Interesantemente, nuestro laboratorio ha descrito a Ric-8A regulando la migración celular a través del control de la señalización río abajo de las proteínas  $G\alpha$ , en células de la cresta neural en *Xenopus* (Fuentealba et al. 2013; Toro Tapia et al. 2017; Toro-Tapia et al. 2018; Leal et al. 2018; Villaseca et al. manuscrito en preparación; Romero G 2020, tesis de pregrado). Haciendo alusión a las proteínas de unión a GTP es importante indicar que se encuentran ordenadas en cuatro familias acordes al rol y estructura de la subunidad  $G\alpha$  en cada una, estas son: *Gai/o* (i representa inhibitoria), *Gaq/11*, *G $\alpha$ 12/13* y *Gas* (s representa estimulación) (Cotton & Claing 2009). La familia *Gas* incluye a *Gas* y *G $\alpha$ olf*. En la familia *Gaq* encontramos a *Gaq*, *G $\alpha$ 11*, *G $\alpha$ 14*, *G $\alpha$ 15* y *G $\alpha$ 16*. La familia *G $\alpha$ 12/13* tiene dos integrantes: *G $\alpha$ 12* y *G $\alpha$ 13*; en cuanto a la familia *Gai/o* consta de *Gai1*, *Gai-2*, *Gai-3*, *Gai-O-A*, *Gai-O-B*, *G $\alpha$ z*, transducina-bastones y transducina-conos (Cabrera-Vera et al. 2003). Roychowdhury & Rasenick 2008 en su revisión demuestran que las familias *Gai/o* y *Gas* desencadenan la actividad ATPasa de la proteína tubulina quien a su vez promueve el movimiento de los microtúbulos, además la familia *Gai/o* se ubica en la corteza de la célula y está encargada igualmente de la polaridad celular durante la división asimétrica (Colombo et al. 2003). Las proteínas G heterotriméricas parecieran establecer una relación entre neurotransmisores y la división celular, junto con diferenciación celular y la regulación de la organización de los

microtúbulos (Roychowdhury & Rasenick 2008). Particularmente la familia Gai/o cuenta con cuatro tipos de proteína Gai-1, Gai-2, Gai-3y Gai-o, pero es Gai-2 aquella que se ha sido asociada a la migración celular, durante el proceso de quimiotaxis de macrófagos y monocitos inducidos por procesos de inflamación (Wiege et al. 2012) y es de interés para nuestro estudio. Por otro lado, Zhong et al. 2012 en sus resultados demuestran que el bloqueo en la expresión de la proteína Gai-2 en células de cáncer pancreático inhibe la migración de estas, siendo inducidas por la hormona oxitocina. Interesantemente, Gai-2 ha sido descrita interaccionando con uno de los componentes motores de los microtúbulos, dineína junto con otras proteínas de polaridad celular controlando la división asimétrica (Kiyomitsu 2019). Otro punto importante de Gai-2, es que esta proteína está presente en nuestros modelos de estudio de migración colectiva: la cresta neural de *Xenopus* (Fuentealba et al. 2016). Además, en nuestro laboratorio se ha observado que esta proteína estaría regulando la migración y polaridad celular a través de la regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos (Villaseca et al. manuscrito en preparación).

### 3. CRESTA NEURAL Y LA MIGRACIÓN CELULAR COLECTIVA

La cresta neural (CN) es un modelo por excelencia para estudiar el proceso de migración colectiva de las células (Gilbert 2006). Fue descrita por primera vez en un embrión de pollo en el año 1868, y se le llamó “el cordón intermedio”, es desde ese entonces que la CN ha sido un sujeto de estudio por parte de biólogos evolutivos y del desarrollo (Huang & Saint-Jeannet 2004). La CN está ubicada entre la placa neural en desarrollo y el ectodermo epidérmico y es característica de organismos vertebrados (Gilbert 2006). Es durante el proceso de neurulación que se cierra la placa neural juntando sus pliegues en la línea media dorsal, tras este episodio las células de la CN comienzan la TEM comenzando así la delaminación desde el neuroepitelio y el posterior movimiento migratorio por las tres diferentes rutas que estas poseen (Thiery 2003). Estas rutas migratorias son: branquial, hioidea y mandibular (Gilbert 2006). La capacidad de separarse y migrar fuera de su lugar de origen es lo que hace única a la CN, y es por esto que se estudia en ella el proceso de migración celular tanto en situaciones normales como en patologías. Una de las características principales de estas células de la CN es su migración colectiva y



direccionada, regulada por mecanismos tales como la inhibición de la locomoción por contacto (CIL), la co-atracción (Co-A) y la quimiotaxis (Theveneau & Mayor 2012; Theveneau et al. 2010). Tras realizar una larga migración dorsoventral la CN comienza con la formación de múltiples tejidos y órganos (Alfandari et al. 2010). Debido a la naturaleza cohesiva de estas células es que se puede hacer experimentos de disección previos a la migración tanto para realizar injertos en nuevos embriones, como para someterlo a pruebas *in vitro* e *in vivo* bajo algún sustrato en particular (DeSimone et al. 2005). Al ocurrir el proceso de inducción de la CN se activan factores de transcripción específicos para CN tales como Slug, Snail, Twist y Sox8 (Alfandari et al. 2010). Durante la inducción neural las células cambian su tipo de adhesión a la glucoproteína transmembrana cadherina, quien pasa de E-cadherina a N-cadherina, proceso característico de la TEM (Nandadasa et al. 2009). Los mismos autores mencionan que esta molécula es expresada durante la migración de la CN en *Xenopus*. De esta manera la adhesión celular cambia y junto con ella la polaridad celular, proceso necesario para la óptima migración de la CN (Scarpa et al. 2015). Hay que destacar que las señales de Wnt-11 y Wnt-11R son críticas para el movimiento sincronizado y cohesivo de las células de la CN (Alfandari et al. 2010). Del mismo modo actúan junto a estas señales, la vía BMPs y las señales Notch, FGF y ácido retinoico (Steventon et al. 2005). En nuestro laboratorio, hemos descrito que la señalización de la proteína G heterotrimérica, específicamente Ric-8A y las subunidades G $\alpha$ , regulan la polaridad y migración de las células de la CN de *Xenopus*, a través del control de las proteínas Rac1 y RhoA y la formación de las adhesiones focales (Fuentelaba et al. 2013; Toro-Tapia et al. 2017; Toro-Tapia et al. 2018; Leal et al. 2018). Además, resultados no publicados de nuestro laboratorio también muestran que Ric-8A junto con G $\alpha$ q regulan los niveles de calcio intracelular durante la migración (Romero G 2020, tesis de pregrado). Finalmente, y concerniente a este proyecto es que también hemos descrito a Gai-2 controlando la migración de las CN a través del control del citoesqueleto de actina y microtúbulos y la dinámica de las adhesiones focales (Villaseca et al. manuscrito en preparación).

#### 4.XENOPUS COMO MODELO DE ESTUDIO

Hoy en día, gran parte del conocimiento que tenemos acerca de los mecanismos que participan durante el desarrollo embrionario de vertebrados, provienen de estudios

realizados en ranas del género *Xenopus* (Hirsh et al. 2002; Grainger 2012). Por mucho tiempo se han utilizado embriones de *Xenopus* y otras especies de anfibios para el estudio de movimientos morfogenéticos (Keller et al. 2003). Aun así, *Xenopus* posee ventaja frente a otros anfibios y a los demás vertebrados en cuanto a la experimentación. Ventajas debido a que genera una gran cantidad de huevos y por el hecho de que sus embriones sean de gran tamaño y resistencia (Harland & Grainger 2011). Embriones, provenientes tanto *X.tropicalis* como *X.laevis* se caracterizan por ser de fácil manipulación para realizar todo tipo de ensayos y diferentes tratamientos ya sea con proteínas, ARNm o químicos que interrumpen su desarrollo, y que van de la mano con técnicas de microscopía para su análisis, además de tener la gran ventaja de que todo el desarrollo del embrión es externo. Estas características determinan que *Xenopus* sea un modelo perfecto para estudiar también la migración de las células de la CN. Previamente en nuestro laboratorio, fue determinada la expresión de cuatro proteínas G $\alpha$  específicamente en *X. tropicalis*, donde se indica la presencia de las subunidades G $\alpha$  en etapas previas y durante la migración de la CN (Fuentealba et al. 2016).

#### Propuesta de investigación:

Con el fin de poder entender el mecanismo de como G $\alpha$ i-2 estaría regulando la dinámica de los microtúbulos durante la migración de las crestas neurales, es que en este seminario de título, nos propusimos estandarizar una técnica que nos permita visualizar en célula viva, el crecimiento de los microtúbulos a través de las ventajas del uso de la herramienta de proteínas de fusión, proteínas fluorescentes asociadas a otras proteínas, en este caso específicamente MAP7-cherry y EB3-GFP.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

De acuerdo con los antecedentes anteriormente expuestos, se propone como hipótesis que:

**“A través del análisis por microscopía en célula viva, utilizando proteínas fluorescentes de unión a microtúbulos, es posible medir el crecimiento de estos”.**

Para esto serán utilizados explantes de células de las CNC de *Xenopus*.

### OBJETIVO GENERAL

“Estudiar el crecimiento de los microtúbulos en célula viva a través del uso de marcadores fluorescentes de estos, en células de la CNC de *Xenopus*”.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar el plásmido que codifica el gen MAP7, pCS2+2xCherryMAP7.
2. Transcribir *in vitro* 2xCherryMAP7 para análisis de microscopía en célula viva.
3. Analizar en célula viva el crecimiento de los microtúbulos en condiciones normales y de pérdida de función de Gai-2, en células de la CNC de *Xenopus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

#### **Oligonucleótidos Morfolino contra XtGai2 (MOXtGai2):**

5'- CGA CAC AGC CCC AGA TAG TGC GT -3'

#### **Para la síntesis de ARNm:**

-pCS2+/EMTB 2X mCherry

-pCS2+/EB3GFP

#### **Enzimas:**

Enzimas de restricción: BamHI, EcoRI, NotI, Sp6 ARN polimerasa (Biolabs)

#### **Medio de crecimiento bacteriano:**

Luria Broth (LB): peptona, extracto de levadura y cloruro de sodio.

### MÉTODOS

Técnicas de biología molecular

Reconstitución del plásmido

El plásmido pCS2+/EMTB 2x Cherry (Fig. 4) contenido en papel filtro se introdujo en un tubo eppendorf de 1,5 mL, y se diluyó con 100 µL de agua libre de nucleasas. Con ayuda de una micropipeta se empleó la técnica de “up and down” para mezclar. Posteriormente el tubo se incubó 30 minutos sobre una termoplaca previamente calentada a 37°C. Al sacar el tubo de la placa este fue centrifugado durante 15 minutos a 10.000 rpm con una temperatura de 4°C. Se midió la concentración del ADN en un espectrofotómetro modelo GMBH de la marca Implen.

## Transformación en bacterias quimiocompetentes

Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de bacterias DH5 $\alpha$  quimiocompetentes las que fueron mezcladas con 2,5  $\mu\text{L}$  del plásmido e incubadas a 4°C por 30 minutos. Para realizar el shock térmico las bacterias se sometieron a 37° C por 2 minutos y luego se incubaron en hielo a 4°C por otros 5 minutos. Posteriormente se añadió 500  $\mu\text{L}$  de medio LB al tubo y se incubó a 42°C por 45 min en agitación. Tras finalizar la incubación se procedió a centrifugar a 5.000 rpm por 5 minutos proceso tras el cual se eliminó el sobrenadante del tubo y se resuspendió el pellet resultante, para luego agregar 40  $\mu\text{L}$  de la muestra en dos placas Petri agar/LB con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Ampicilina. Las bacterias se sembraron en las placas y fueron incubadas durante toda la noche a 37°C.

Al día siguiente con ayuda de una pinza se sacó un mondadientes y con él fue picada una colonia de bacterias (Fig. 5) que finalmente se añadió al tubo falcon con 3 mL de medio LB. Este tubo se incubó a 37°C durante 11 horas. Tras pasar las 11 horas se revisó bajo el mechero que existiera crecimiento bacteriano y luego el contenido del tubo fue a un matraz conteniendo 200 mL de medio LB. El matraz que finalmente contiene LB+Amp+bacterias con el plásmido fue dejado aproximadamente 12 horas incubando a 37°C bajo agitación.

## Preparación de ADN, por miniprep

Para esto se usó el kit Monarch® Plasmid Miniprep. Al término de las 12 horas de incubación, fueron sacados 3 mL del contenido del matraz para ser agregados cada 1 mL en tres tubos eppendorf diferentes los cuales fueron centrifugados a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalizando el centrifugado se resuspendió el pellet. Con 250  $\mu\text{L}$  de solución "cell resuspensión" se hizo "up and down" con la micropipeta para después tomar el contenido del tubo y adicionarlo en un segundo tubo para volver a resuspender y concentrar la muestra. Posteriormente tomamos el contenido del segundo tubo se incorporó al tercer tubo al cual además fueron adicionados 10  $\mu\text{L}$  de buffer de resuspensión la cual fue mezclada por inversión con el resto del contenido. En seguida se agregan 250  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis mezclados igualmente por inversión. Al cabo de 5 minutos fueron añadidos 350  $\mu\text{L}$  de neutralizador que de igual forma se mezcló por inversión para luego llevar el tubo a centrifugación por 10 minutos a

10.000 rpm a una temperatura de 4°C. Se conservó el eluido para adicionarlo en una columna de sílica con su tubo colector el que, posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Esta vez se eliminó el eluido del tubo colector y sólo se conservó la columna. A continuación, se realizaron lavados.

Los lavados se hicieron añadiendo a la columna Wash Solution. Para el primer lavado se añadieron 750 µL de Wash Solution a la columna sobre el tubo colector y posteriormente se llevó a centrifugación a 10.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, se volvió a eliminar el eluido. Se agregaron 250 µL más de Wash Solution para centrifugar una segunda vez a 10.000 rpm durante un tiempo de 2 minutos a temperatura ambiente.

Luego de los lavados se conserva la columna en un tubo eppendorf de 1,6 mL esteril y adicionamos 30 µL de agua libre de nucleasas. Se incubó 15 minutos el tubo a temperatura ambiente y se llevó a centrifugar por 2 minutos más a 10.000 rpm y a temperatura ambiente. El eluido de la centrifugación se conserva en un tubo eppendorf de 0,6 mL y a la columna nuevamente se le añadió 30 µL de agua libre de nucleasas para realizar una segunda centrifugación en las mismas condiciones anteriores. Este último eluido fue vertido también en el tubo de 0,6 mL reservado previamente, se midió concentración de ADN en el espectrofotómetro nuevamente y se conservó a -20°C.

#### Digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa

Para la digestión enzimática se utilizaron 2 tubos eppendorf, uno para utilizarlo de control y otro para realizar la digestión. En el tubo control fueron agregados 7 µL de agua libre de nucleasas junto con 2 µL de ADN (el que se encontraba a -20°C) y 1 µL de NEBuffer 3.1 10X. Al segundo tubo se adicionaron 2 µL del ADN junto con 0,5 µL de enzima BamHI y 0,5 µL de enzima EcoRI más 1 µL de NEBuffer 3.1 10X y 6 µL de agua libre de nucleasas. Cada tubo con 10 µL finales que son mezclados con “up and down” y luego fueron incubados a 37°C durante 2 horas. Durante el tiempo de centrifugado se preparó un gel analítico de agarosa para realizar la electroforesis. Para el gel se pesaron 0,25 g de agarosa a la cual se le añaden 25 mL de tampón TAE (solución amortiguadora de Tris base, Ácido acético y EDTA) 0.5X, esta mezcla se calentó en un microondas para disolver la agarosa. La mezcla se enfrió durante unos segundos bajo el agua y se agregó 2,5 µL de bromuro de etidio. Se preparó la

cámara de electroforesis y se procedió a verter la mezcla en el molde con la peineta donde se dejó hasta gelificar.

Finalizadas las 2 horas de incubación se añadieron a nuestro tubo 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga Green GoTaq 5X y se procedió a cargar en el gel. En el primer carril se cargaron 5  $\mu\text{L}$  del marcador de tamaño molecular 1Kb DNA Ladder en el segundo carril se cargó 5  $\mu\text{L}$  de ADN digerido y en el último carril se cargó el control sin digerir. El gel se dejó correr a 100V durante 45 minutos (Fig.6). Los análisis de densitometría de la electroforesis se realizaron con el programa Image J 1.49q (NIH, USA) y Excel.

### Linealización del ADN

Con el fin de sintetizar el ARN mensajero de nuestros constructos génicos se procedió a linealizar el plásmido como primer paso. Para ello al día siguiente nuevamente fue preparado un gel de agarosa para realizar la digestión con la enzima NotI. Para la linealización del plásmido se adicionaron en un tubo de 0,6 mL: 20  $\mu\text{L}$  del plásmido (95ng/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de NotI (10U), 69  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 10  $\mu\text{L}$  del buffer CutSmart NEB para obtener 100  $\mu\text{L}$  finales. El tubo fue incubado a 37°C en una termoplaca durante 3 horas. Luego de las tres horas se aumentó la temperatura a 65°C durante 20 minutos con la finalidad de inactivar a la enzima NotI. Luego se tomaron 2  $\mu\text{L}$  de plásmido sin digerir y se mezclaron en un nuevo tubo con 2  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 1  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 5X. En un segundo tubo se adiciona 1  $\mu\text{L}$  de la muestra digerida con 7  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 5X. En el primer carril se cargó el marcador de tamaño molecular 1Kb GeneRuler DNA Ladder, en el segundo carril la muestra sin digerir y en el tercero se cargaron 5  $\mu\text{L}$  de la muestra digerida. El gel se dejó correr a 100V por 40 minutos (Fig 7). Los análisis de densitometría de la electroforesis se realizaron con el programa Image J 1.49q (NIH, USA) y Excel.

### Purificación del ADN lineal

Se utilizó el Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit. Se realizó la purificación del ADN plasmidial para lo cual fueron adicionados 200  $\mu\text{L}$  de DNA CleanUp Binding Buffer a nuestra muestra de ADN y enseguida se ubicó una columna en su tubo colector para vaciar el material genético. Se llevó a centrifugación durante 1 minuto a 12.000 rpm y

al finalizar se descartó el eluido. A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de DNA Wash Buffer con posterior centrifugación a 12.000 rpm por 1 minuto y se eliminó el eluido, este paso fue realizado en dos ocasiones.

Para llevar a cabo la elución del ADN se cambió la columna a un nuevo tubo de 1,5 mL para luego agregar 15  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas a 50°C (previamente calentada en la termoplaca). El tubo fue centrifugado a 12.000 rpm durante 1 minuto. Finalizada la centrifugación se conservó el eluido y la columna fue cambiada a un nuevo tubo y fueron adicionados 10  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas a 50°C para llevar a una nueva centrifugación en las mismas condiciones. También fue conservado el sobrenadante. A continuación, se llevó a cabo la concentración del ADN de ambas eluciones, se juntaron ambas muestras y llevadas a un concentrador de vacío durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al terminar se conservó el ADN a -20°C por toda la noche.

#### Transcripción *in vitro*

Para la generación del ARN mensajero se utilizó el kit de transcripción *in vitro* mMMESSAGE mMACHINE SP6. Utilizando el máximo del ADN previamente linealizado se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de NTPs/Cap Buffer 2X, 2  $\mu\text{L}$  de SP6 Read Buffer 10X y 2  $\mu\text{L}$  de Sp6 enzima, generando 20  $\mu\text{L}$  totales. El tubo con los 20  $\mu\text{L}$  finales fue incubado en un termociclador a 37°C durante 2 horas. Al pasar las 2 horas se añadió 1  $\mu\text{L}$  de DNase turbo con el fin de eliminar el ADN y nuevamente se llevó al termociclador a 37°C esta vez por 15 minutos. Por último, añadimos 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas junto con 25  $\mu\text{L}$  de cloruro de litio y se dejó a -20°C durante la noche para precipitar el ARNm.

A la mañana siguiente se llevó la muestra a centrifugado por 15 minutos a 11.000 rpm y a 4°C. Al finalizar se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de etanol para realizar el lavado. Nuevamente se centrifugó a 11.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Luego de eliminar el sobrenadante se dejó evaporar el etanol por 5 minutos y se realizó resuspensión del pellet con 10  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.

Se preparó un gel de agarosa para ARNm (libre de RNAasas). En un tubo de 0,6 mL libre de RNAasas se agregaron: 1  $\mu\text{L}$  de ARNm, 4  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 2X. La muestra se denatura 65°C en el termociclador durante 5 minutos antes de cargar en el gel. En el primer carril del gel se cargó el marcador



de tamaño molecular 1Kb plus RiboRuler 4  $\mu$ L, en el segundo carril se cargaron 2  $\mu$ L del ARNm y en el tercer carril se cargaron los 8  $\mu$ L restantes. Se dejó el gel corriendo a 100V durante 45 minutos (Fig.8). Los análisis de densitometría de la electroforesis se realizaron con el programa Image J 1.49q (NIH, USA) y Excel.

## Manipulación de animales y técnicas embriológicas

### Obtención de embriones de *Xenopus tropicalis*

Todos los protocolos para la mantención, la manipulación y la eutanasia de los anfibios *Xenopus tropicalis* han sido aprobados por el comité de bioética de nuestra Facultad. Para el caso de la metodología de eutanasia de anfibios se basa en los métodos descritos en el trabajo de Close et al. 1996.

Los embriones de *Xenopus tropicalis* fueron obtenidos por medio de la técnica de fertilización *in vitro*. La ovulación de ranas hembra fue inducida mediante la inyección de hormona coriónica gonadotropina (hCG). La noche anterior a la obtención de embriones, se inyectaron tanto hembras como machos con 20 unidades de hCG. Al día siguiente, cuatro horas antes de la obtención de huevos, nuevamente tanto hembras como machos fueron inyectados con 200 unidades de hCG. Para la extracción de los testículos de los machos, éstos fueron anestesiados con benzocaína y sacrificados; para luego llevar a cabo la disección de los testículos por medio de una incisión en la pared abdominal. Los testículos fueron macerados en medio L15 (Leibovitz) suplementado con 10% de FBS. Posteriormente, los huevos fueron extraídos y fertilizados con gotas de macerado de testículos incubando por 20 min en 1/9x MR (Modified Ringer's solution; 0.1 M NaCl, 1.8 mM KCl, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.0 mM Hepes-NaOH pH 7.6). Una vez ocurrida la fertilización, los embriones fueron tratados con una solución de cisteína al 3% en 1/9x MR pH 7.9, para disolver la capa gelatinosa que los protege. Luego fueron lavados e incubados en 1/9x MR.

### Microinyección

Las microinyecciones se efectuaron utilizando un microinyector Narishige IM300, observando a través de un estereoscopio de luz visible. Utilizando capilares de borosilicato como agujas finas para la microinyección, se inyectaron 2 nL de cada

solución (ARNm o morfolino) en embriones posicionados sobre placas de microinyección con 1/9x MR y 2% Ficoll. Luego, el medio fue reemplazado por 1/20x MR con gentamicina a 100 g/mL hasta alcanzar los estadios requeridos.

Para el desarrollo de este seminario de título se utilizó ARNm de MAP7-cherry, el ARNm de EB3-GFP, H2B-mCherry (para teñir el núcleo en los morfantes) y el oligonucleótido de morfolino contra Gai-2 (MOGai-2) sintetizado por GeneTools® para realizar las microinyecciones.

Las cantidades microinyectadas para los controles fueron: 0,5 µL EB3-GFP, 0,25 µL MAP7 y 2,25 µL de agua libre de nucleasas. Para los morfantes se microinyectó: 1 µL MOGai-2, 0,5 µL EB3-GFP, 0,25 µL MAP7, 0,25 µL H2B-cherry, 1 µL de agua libre de nucleasas.

La microinyección de ARNm se realizó en un blastómero ventral y uno dorsal del embrión en estadio de ocho células de manera en que solo fueran afectadas las crestas neurales, además se microinyectó solo a un lado del embrión para mantener el otro lado como control. Este morfolino es capaz de hibridar con el ARN mensajero de Gai-2 impidiendo su traducción. La microinyección del morfolino en conjunto con los ARNm se realizó con el mismo procedimiento anterior, inyectando un blastómero ventral y uno dorsal de un solo lado del embrión para mantener el otro lado como control. Momentos previos a la microinyección, el morfolino fue incubado a 65°C por varias horas, luego fue centrifugado (centrífuga Force mini, Bioproducts) y cuantificado preparando las respectivas diluciones a inyectar. Este procedimiento fue necesario llevarlo a cabo debido a la baja solubilidad de estas moléculas y la facilidad con la que precipitan (Metodología descrita por Harland *Xenopus tropicalis* Site). Los embriones se traspasaron a placas de agarosa al 1% con el mismo medio y se mantuvieron a 26°C por alrededor de 2 horas, para transferirlos posteriormente a 1/20X MR con gentamicina.

### Explantos de Crestas Neurales Craneales

Para explantar las células de la cresta neural craneal (CNC), en primer lugar, fue necesario remover la membrana vitelínica de los embriones en estadio 17 en medio 1/9X MR con el uso de pinzas n° 5 ("Fine science tools" N° 11252-00) Para ello, los embriones fueron inmovilizados en una placa con plastilina y las células de CNC fueron cuidadosamente disectadas usando una "navaja" confeccionada con una ceja.

Cada explante fue colectado en una placa con medio DFA (53 mM NaCl, 5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4.5 mM Gluconato de potasio, 32 mM Gluconato de sodio, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, pH 8.3 (Ajustado con 1M de Bicina)) por un tiempo máximo de 30 minutos previo a ser pasados a un cubreobjeto de vidrio con fibronectina (50 µg/mL), en medio DFA. El tiempo de adhesión de los explantes al sustrato fue de aproximadamente 30 minutos. Ensayos de explantes sobre cubreobjetos de vidrio son usados para llevar a cabo análisis de inmunodetección y sobre placas de vidrio para estudios de “time-lapse”.

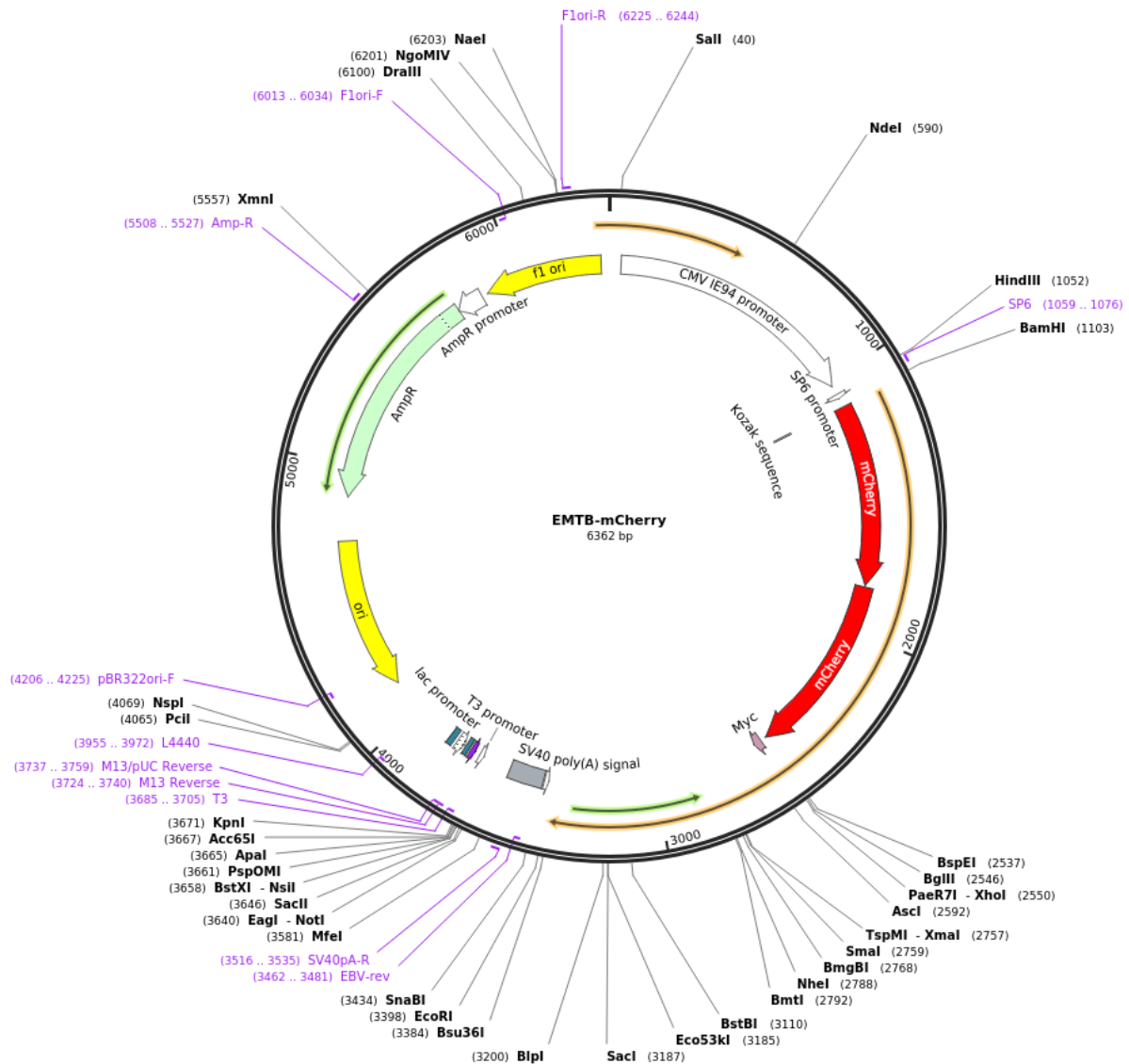
### Ensayos de “time-lapse”

Posterior a que los explantes se adhiriesen a la placa de vidrio con fibronectina se utilizó el microscopio para célula viva SP8 (Leica) del Centro de Microscopía Avanzada (CMA-Bio Bio) donde se obtuvieron imágenes de cada explante en lapsos de 2 segundos durante 5 minutos con el fin de visualizar los microtúbulos a través de la visualización a MAP7-cherry y EB3-GFP, y la velocidad de crecimiento de estos bajo condiciones normales y de pérdida de función de Gai-2 *in vivo* durante la migración en explantes de crestas neurales (Fig. 9 y 10).

Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa Image J 1.49q (NIH, USA), utilizando el plugin de pseudo-color. Los videos fueron analizados en Matlab utilizando el plus TipTracker.

## RESULTADOS

### 1. Preparar el plásmido que codifica el gen MAP7, pCS2+2xCherryMAP7



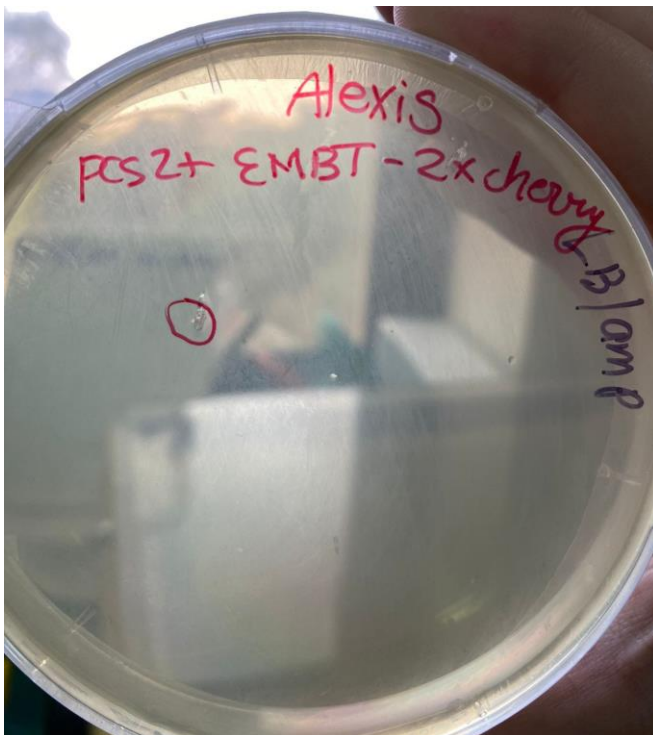
**Figura 4:** Mapa del plásmido pCS2+/EMTB-2xCherry, MAP7. Figura extraída de la página addgene (<https://www.addgene.org/26742/>)

Se comenzó con el papel filtro donde venía pCS2+/EMTB-2xCherry, el cual una vez resuspendido en agua libre de nucleasas se midió su concentración en el espectrofotómetro la que resultó ser de 32,5ng/μL, aunque se ha evidenciado que este siempre da aproximadamente el doble de la concentración real por lo que sería una concentración cercana a los 17ng/μL. Esta medición fue realizada porque ha

pasado que en ocasiones anteriores los proveedores de los plásmidos delimitan una zona donde estaría el plásmido en el papel filtro, y luego de llevar a cabo la transformación bacteriana no hay presencia ADN. Por lo tanto, esta concentración nos indicó que la zona donde se cortó el papel filtro completo era correcta.

Para lograr obtener grandes cantidades del gen de MAP7 utilizamos la técnica clásica de transformación bacteriana por medio de bacterias competentes DH5- $\alpha$ , correspondiente a una cepa de la bacteria *Escherichia coli* y posterior purificación de ADN por miniprep. La transformación bacteriana es a menudo utilizada en biotecnología para introducir ADN exógeno en las células bacterianas gracias a que ofrece diferentes ventajas tales como rápida producción, fácil manipulación, eficiencia y estabilidad genética (Reece et al. 2011).

En la Figura 5 podemos observar el resultado de la siembra de las bacterias, donde se pueden apreciar las colonias recombinantes tras un día de incubación. Se distinguen del agar por su tonalidad más blanquecina.



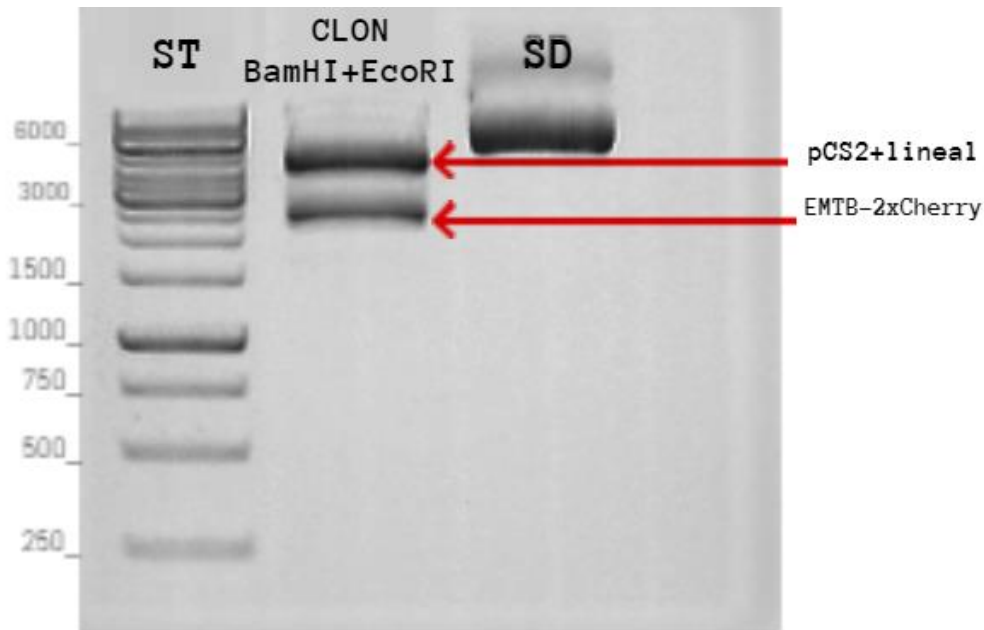
**Figura 5:** Transformación del plásmido en bacterias DH5- $\alpha$ . Imagen correspondiente a las colonias obtenidas luego de la transformación bacteriana. Se detalla en el círculo rojo una de las colonias utilizadas para la inoculación del plásmido.

Finalizado el proceso de transformación realizamos la purificación del ADN de 3 colonias y se procedió a medir la concentración del ADN para comprobar que las bacterias efectivamente habían incorporado el plásmido con el constructo de ADN plasmidial. Esta vez el espectrofotómetro nos entregó una concentración de 363ng/μL, la que generalmente se reduce a la mitad así que la concentración final sería de más o menos 182ng/μL. Por ende, podemos afirmar que las bacterias si incorporaron nuestro plásmido en la transformación.

Luego realizamos una digestión con enzimas de restricción del plásmido purificado y una electroforesis que nos permitió visualizar la presencia y tamaño correcto del inserto liberado del esqueleto del plásmido, además nos permitió observar si nuestro constructo génico contaba con la presencia de dos o tres marcadores fluorescentes mCherry, esta duda surgió por información contradictoria por parte del laboratorio al momento de enviar el plásmido.

Es relevante saber que en el plásmido se encuentran tres secuencias diferentes, el EMTB (que es en realidad el dominio de MAP7 que se une a los microtúbulos) tiene un tamaño de 816 pares de bases, el vector pCS2+ posee 4097 pares de bases en su secuencia, mientras que mCherry (la proteína fluorescente) tiene un tamaño de alrededor de 700 pares de bases.

Si el constructo génico tuviera incorporado 2-mCherry la digestión enzimática debería originar dos bandas: una banda con el vector pCS2+ a la altura de los 4097 pb y otra banda con el gen más la proteína fluorescente a la altura de los 2216 pb. Por el contrario, si nuestro gen incluyera 3-mCherry las bandas que se identificaran en la digestión serían de: 4097 pb y 2916 pb. Esta información se pudo corroborar a través de la página web del proveedor addgene.



**Figura 6:** Digestión analítica con *BamHI/EcoRI* para la confirmación del constructo PCS2+/EMTB-2xCherry (MAP7). Se analizó el ADN plasmidial de 1 colonia transformada con el constructo PCS2+/EMTB-Cherry con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* para identificar colonias positivas y observar el EMTB-2xCherry (St: DNA Ladder; SD: ADN plasmidial sin digerir). En el primer carril fueron cargados 5µL del marcador peso molecular 1kb, segundo carril 5µL de ADN con enzimas de restricción y en el cuarto carril 5µL de ADN sin digerir. El gel se dejó correr durante 45 minutos a 100V.

El patrón de digestión resultante para ambas colonias fue una banda por sobre los 4000 pb atribuible al vector pCS2+lineal y una banda inferior muy cercana a los 2000 pb perteneciente a nuestro gen MAP7 y a la presencia de 2-mCherry, por lo que nuestro plásmido si tendría el gen de interés. En cuanto a la muestra sin digerir esta se observa de alrededor de 6000pb.

Con respecto a las concentraciones obtenidas en los análisis de densitometría del gel fueron las siguientes:

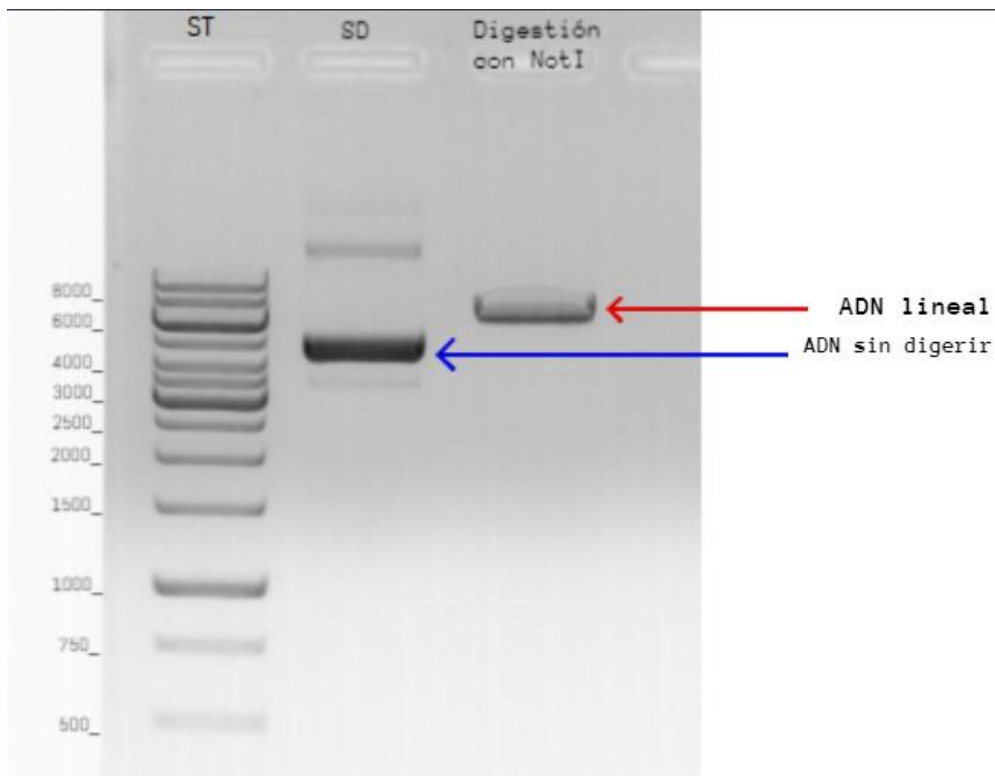
**Tabla 1:** Densitometría del gel de ADN de digestión analítica con *BamHI* y *EcoRI*.

Carril	Área bajo la curva	ng/5 $\mu$ L	ng/ $\mu$ L
St	2057.23	92.00	18.40
Clon+BamHI+EcoRI	3504.86	156.74	31.35
SD	10574.83	472.91	94.58

Tabla construida a partir de la electroforesis en la que se sometió a digestión enzimática del plásmido con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*. En la primera columna se ubican los carriles cargados en el gel, en la segunda el área bajo la curva resultante de las bandas analizadas y la tercera y cuarta columna corresponden a las concentraciones en 5 $\mu$ L (los cargados) y 1 $\mu$ L respectivamente.

A través del procesamiento digital en ImageJ sometimos a un análisis de densitometría las bandas de ADN obtenidas en el gel, en el que seleccionamos los carriles para posteriormente calcular el área bajo la curva de las gráficas obtenidas de dichos carriles. Cada curva presente en la gráfica corresponde a una de las bandas del gel, de modo que seleccionamos un área bajo la curva y la asociamos tanto a un número de pares de bases como a una concentración en ng/5 $\mu$ L en este caso correspondiente al estándar DNA Ladder (Thermo Scientific). La concentración inicial del plásmido dio como resultado alrededor de 32ng/ $\mu$ L.





**Figura 7:** Linealización del plásmido con *NotI* para la posterior construcción del mensajero. Fue linealizado el total del ADN plasmidial que contenía el constructo pCS2+EMTB-2xCherry. (St: GeneRuler DNA Ladder; SD: ADN plasmidial sin digerir). En el primer carril se cargó un marcador de peso molecular 1 Kb, en el segundo carril fueron cargados 5µL de ADN plasmidial sin digerir y en el tercer carril 5µL de la muestra digerida, es decir, ADN junto a la enzima de restricción *NotI* y buffer de carga. El gel se dejó correr durante 40 minutos a 100V.

El patrón de digestión fue el esperado, se observa una banda de alrededor 6000pb atribuible al ADN lineal pCS2+MAP7-2xCherry con una digestión completa. Por otro lado, en el ADN plasmidial sin digerir se pueden distinguir al menos cuatro bandas de diferentes tamaños. Esto es debido a la porosidad que tiene el gel de agarosa, en el que pueden difundir fragmentos de diferentes tamaños del plásmido producto de las conformaciones que pudo adquirir el plásmido sin linealizar durante la electroforesis.

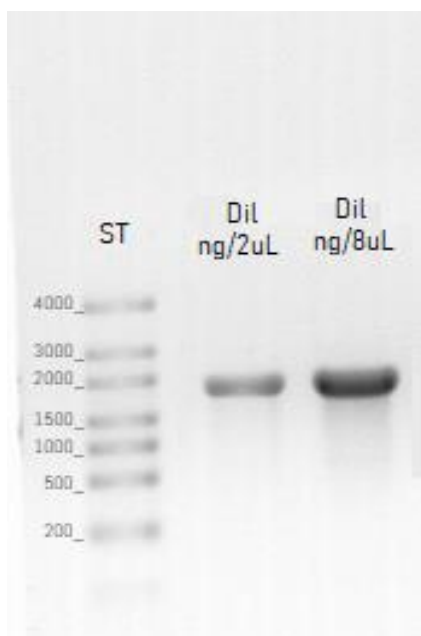
**Tabla 2:** Densitometría del gel de ADN con digestión de NotI.

<b>ADN+NotI</b>				
Carril	Área bajo la curva	ng/5 $\mu$ L	ng/ $\mu$ L	ng/ $\mu$ L restantes
St	1433.63	70.00	14.00	
Clon+NotI	2991.50	146.07	29.21	2862.91
SD	2770.80	135.29	27.06	2651.69

Tabla construida a partir de la electroforesis en la que se sometió a digestión enzimática del plásmido con la enzima de restricción NotI. En la primera columna se ubican los carriles cargados en el gel, en la segunda el área bajo la curva resultante de las bandas analizadas. Tercera y cuarta columna corresponden a las concentraciones en 5 $\mu$ L (los cargados) y 1 $\mu$ L respectivamente. La última columna equivale a la concentración total que restan en los 98 $\mu$ L de stock de ADN linealizado.

2. Transcribir in vitro 2xCherryMAP7 para análisis de microscopía en célula viva.

Tras purificar el ADN lineal codificando a MAP7-2xCherry se llevó a cabo el proceso de síntesis de ARNm como se describe en la sección de Materiales y métodos.



**Figura 8:** Transcripción *in vitro* del gen MAP7-2xCherry. Electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó un marcador de tamaño molecular 1Kb plus RibboRuler. En el primer carril fueron cargados 4 $\mu$ L del marcador, en el segundo carril 2 $\mu$ L de ARNm, en el tercer 8 $\mu$ L de ARNm. (Dil: Dilución).

**Tabla 3:** Densitometría del gel de ARNm.

<b>Transcripción <i>in vitro</i></b>			
Carril	Área bajo la curva	ng/4 $\mu$ L	ng/ $\mu$ L
St	605.46	120.00	
ARNm dilución ng/2 $\mu$ L	2812.43	557.42	139.35
ARNm dilución ng/8 $\mu$ L	9174.81	1818.43	454.61

Tabla construida a partir de la electroforesis en la que se sometió a transcripción *in vitro* el ADN lineal total. En la primera columna se describe lo que se cargó en cada carril del gel, en la segunda el área bajo la curva resultante de las bandas analizadas. Tercera y cuarta columna corresponden a las concentraciones en 4 $\mu$ L (los cargados) y 1 $\mu$ L respectivamente.

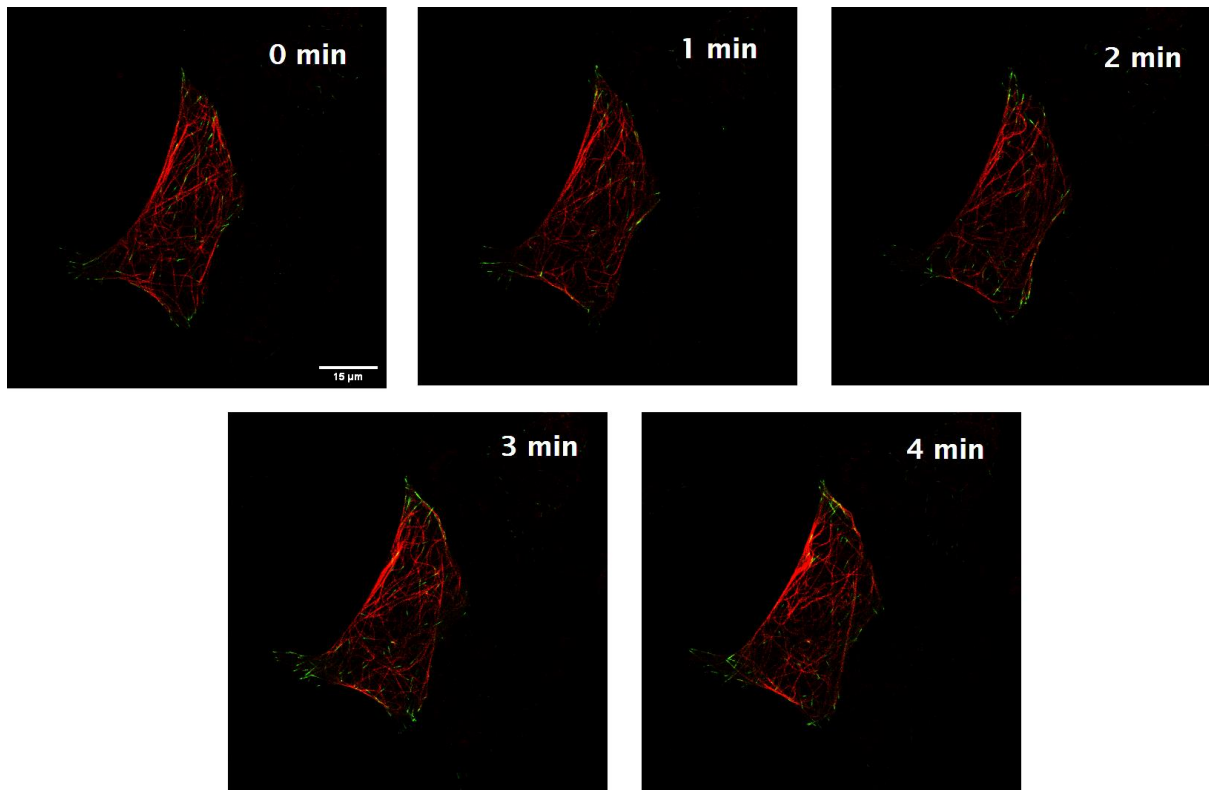
Con respecto a la transcripción *in vitro* esta nos generó de forma correcta el mensajero, ya que la electroforesis muestra una sola banda y del tamaño esperado. En la electroforesis podemos observar ambas diluciones con un número de bases

cercanas a las 2000 bases, recordemos que el gen MAP7 cuenta con 2200 pares de bases aproximadas. Además, podemos visualizar que el carril con mayor cantidad de  $\mu\text{L}$  cargados presenta una banda de mayor intensidad gracias al bromuro de etidio. Estos resultados concuerdan con los análisis de densitometría, ya que la concentración obtenida del carril donde cargamos  $8\mu\text{L}$  es más del doble que donde se cargaron solo  $2\mu\text{L}$ .

En esta parte podemos realizar una comparación con la digestión analítica (Tabla 1) ya que, luego de concentrar nuestro ADN tras su purificación este aumentó su concentración en cinco veces al generar el mensajero.

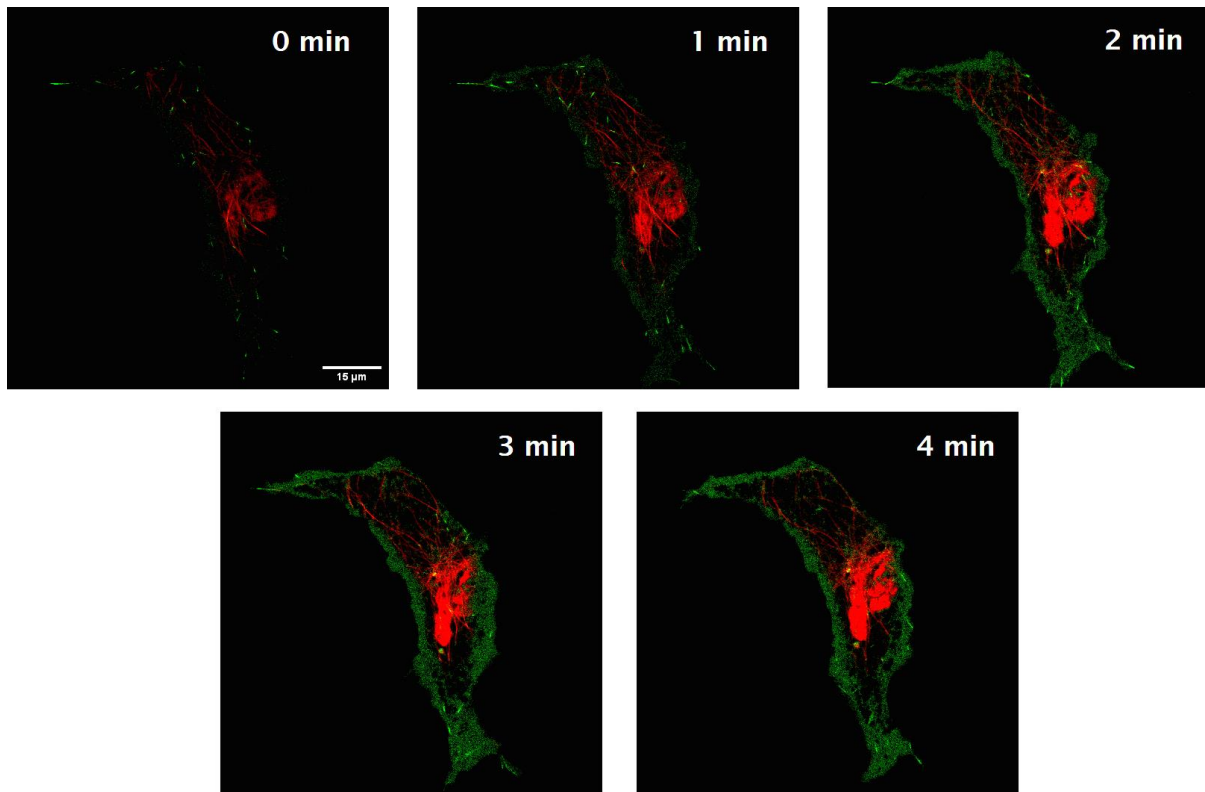
3. Analizar en célula viva el crecimiento de los microtúbulos en condiciones normales y de pérdida de función de Gai-2, en células de la cresta neural de *Xenopus*.

Para efectuar el análisis en célula viva, de la visualización de crecimiento de los microtúbulos se microinyectaron los ARNm de MAP7-2xCherry y EB3-GFP (con el que se contaba ya purificado en el laboratorio) en embriones de *Xenopus* en estadio de 8 células como se describe en la sección de Materiales y métodos; al mismo tiempo se microinyectó estos mensajeros en conjunto con el morfolino (MO) de Gai-2, con el fin de originar la condición de silenciamiento de Gai-2. El procedimiento de microinyección se describe en la sección de metodología (pág.33).



**Figura 9:** Timelapse del crecimiento de los microtúbulos en explantes en condición control. **Aumento: 63X.** Barra: 15µm. Imagen obtenida a partir de explantes de CNC de *Xenopus* y visualizada en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Universidad de Concepción mediante microscopía confocal (Leica SP8) y time-lapse. Las imágenes fueron capturadas cada 2 segundos por 5 minutos totales y los videos fueron procesados por medio de Matlab utilizando el software plus TipTracker. En rojo se distingue MAP7 gracias a la proteína fluorescente cherry, mientras que el color verde indica el extremo de los microtúbulos gracias a la proteína de unión a extremo positivo EB3-GFP.

Las células presentan un fenotipo mesenquimal normal para la migración, incluso se distinguen ligeras protrusiones en la periferia. Es posible observar a MAP7 participando de manera estable a lo largo de todas las imágenes; mientras que los cometas de los microtúbulos van apareciendo y desapareciendo debido a su inestabilidad dinámica. Al examinar más en detalle podemos identificar que cada microtúbulo marcado con MAP7 en la figura lleva en sus extremos la señal de EB3.



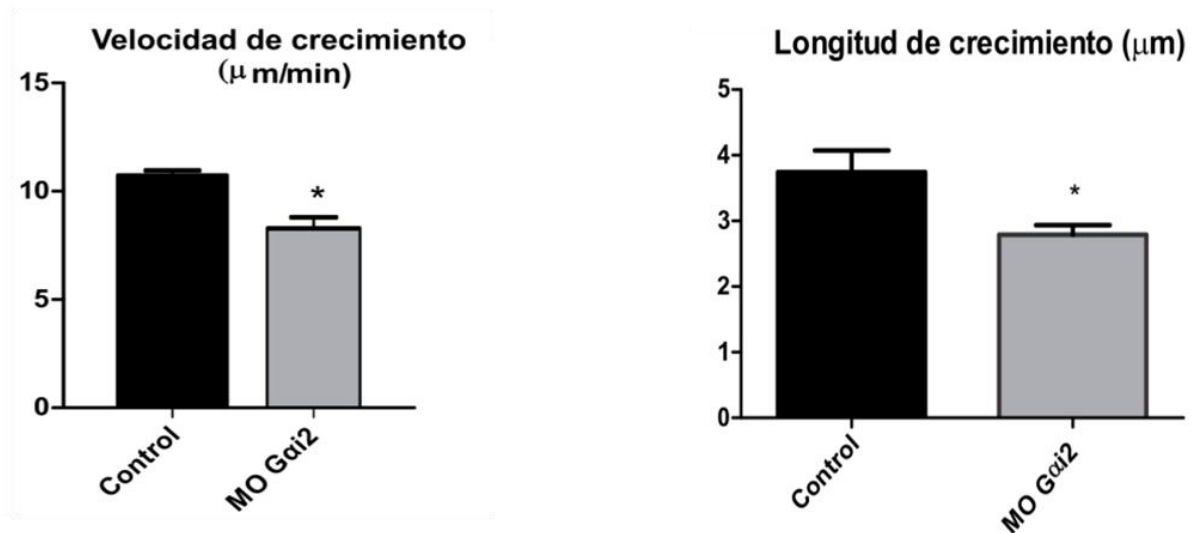
**Figura 10:** Timelapse de explantes en condición morfante. **Aumento: 63X.** Barra: 15µm. Imagen obtenida a partir de explantes de CNC de *Xenopus* y visualizada en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Universidad de Concepción mediante microscopía confocal (Leica SP8) y time-lapse.

Las imágenes fueron capturadas cada 2 segundos por 5 minutos totales y los videos fueron procesados por medio del Matlab utilizando el software plus TipTracker. En rojo se distingue MAP7 gracias a la proteína fluorescente cherry, mientras que el color verde indica la ubicación de los microtúbulos gracias a la proteína de unión a extremo positivo EB3-GFP.

Las células morfantes para Gai-2 (Fig.10) presentan un fenotipo anormal en comparación a las células controles (Fig.9), mucho más alargada presentando lamelipodios de mayor tamaño y alargados.

Las imágenes obtenidas luego fueron sometidas a análisis de crecimiento de los microtúbulos como se describe en la Fig.11. Nuestro análisis muestra que en el silenciamiento en la expresión de Gai-2 dio como resultado un aumento de la estabilidad de los microtúbulos probablemente reduciendo a gran escala su despolimerización, al inicio podemos observar pequeños cometas de microtúbulos en toda la extensión de la célula, los que con el paso del tiempo fueron permaneciendo

en el límite de la célula y que pudieron ser distinguidos gracias a EB3. También vemos a MAP7 que continúa estrechamente unida a los microtúbulos a lo largo de la secuencia. Además, se observa que la velocidad de crecimiento y longitud promedio de los microtúbulos disminuye bajo condiciones de silenciamiento de Gai-2 (Fig. 11)



**Figura 11:** Análisis de la velocidad y longitud promedio de crecimiento de los microtúbulos bajo condición normal y de silenciamiento con MO Gai-2. Los videos obtenidos fueron analizados en Matlab utilizando el software plusTipTracker, para detectar y analizar los extremos de crecimiento de microtúbulos +TIP (Applegate et al. 2011). Se utilizó un script que probó cientos de parámetros de detección de los cometas para seleccionar la configuración óptima para el análisis. Los parámetros de plusTipGetTracks determinados en este trabajo fueron: Search Radius Range (pixels) 5-12, Minimum Sub-Track Length (frames) 3; Max Gap Length (frames) 8; Max Shrinkage Factor 0.8; Max angle Forward 40; Max angle Backward 10; Fluctuation Radius 2,2. Luego de analizar cada región de interés en los videos de 5 minutos de duración, se realizó un análisis estadístico ANOVA para múltiples condiciones o Test T-Student (de dos colas) para comparar diferencias significativas en distintas condiciones.

Gracias a estos resultados podemos confirmar que Gai-2 cumple un rol crítico en modular la dinámica de los microtúbulos durante la migración celular, dado que en condiciones de disminución de la expresión de Gai-2 los microtúbulos se presentan de forma más estable en el tiempo y una velocidad más lenta de crecimiento.

## DISCUSIÓN

Diferentes procesos celulares basados en las funciones de los microtúbulos no dependen solo de ellos. Las MAPs acompañan a los microtúbulos en cada una de sus funciones, ya sea en transporte intracelular, manteniendo la polaridad celular, regulando a los motores celulares que se desplazan en ellos e incluso estabilizándolos o desestabilizándolos durante estas importantes tareas.

Se ha descrito a la familia MAP7 como proteínas fuertemente unidas a los microtúbulos y que se encuentran regulando a motores moleculares unidos a ellos (Hooikaas et al. 2019). En estudios realizados por Monroy et al. 2018 reveló que MAP7 permanece fuertemente unida a los microtúbulos, a pesar de ser sometida un a exceso de cien veces de la MAP tau, con la cual compite por el sitio de unión en los microtúbulos. En esta investigación pudo apreciarse la sólida unión existente entre MAP7 y los microtúbulos de forma constante, y a pesar de interrumpir el proceso migratorio con el silenciamiento de Gai-2. Sin embargo, al disminuir tanto la velocidad de crecimiento como la longitud de los microtúbulos en las células morfantes igual se percibe una menor intensidad de MAP7 en la célula.

Gai-2 ha sido arduamente relacionada al proceso de migración celular, destacando su participación en el establecimiento de la polaridad celular durante el proceso de división celular, la diferenciación celular y la regulación del citoesqueleto de microtúbulos (Roychowdhury & Rasenick 2008). Es más, estudios demuestran que una inhibición de la proteína Gai-2 tiene como consecuencia una inhibición en la migración de las células cancerosas (Wiege et al. 2012; Zhong et al. 2012). Se observó además que Gai-2 se encuentra específicamente regulando la migración y la polaridad por medio de la regulación tanto del citoesqueleto de actina como de microtúbulos (Villaseca et al. manuscrito en preparación).

Nuestros resultados son concordantes con esta información, ya que el silenciamiento de Gai-2 produjo cambios a nivel de la dinámica de los microtúbulos de las células, donde pudimos establecer que el crecimiento de los microtúbulos fue más lento y su longitud de crecimiento en el tiempo se redujo considerablemente. En cuanto a la regulación del citoesqueleto de actina, en ausencia de Gai-2, pudimos observar lamelipodios más alargados y estables.



En otros estudios se ha visto que las catástrofes microtubulares decrecen en las células con fenotipo morfante, lamentablemente no pudimos realizar el estudio en esta ocasión a causa de complicaciones en el análisis matemático puesto que el software a utilizar se encontraba obsoleto.

## CONCLUSIONES

- El constructo génico que codifica para la proteína MAP7 2x-cherry nos permitió llevar a cabo la visualización de los microtúbulos durante su crecimiento en células migratorias de la cresta neural craneal.
- En condiciones normales, es decir, sin suprimir la expresión de Gai-2 en las células de la cresta neural se mantiene el fenotipo migratorio típico de las células mesenquimales. En ellas se distinguen la dinámica de los microtúbulos y del citoesqueleto de actina, demostrado por el movimiento constante de los cometas y de las protrusiones.
- En condiciones de silenciamiento de Gai-2, el fenotipo de las células cambia radicalmente. Ya no presentan dinamismo en sus estructuras citoesqueléticas sino más bien se encuentran fuertemente estabilizadas.

## LITERATURA CITADA

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1999. Introducción a la biología celular.
- Alfandari, D., Cousin, H., & Marsden, M. 2010. Mechanism of *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Cell adhesion & migration*, 4(4) ,553–560.
- Anitei, M., & Hoflack, B. 2011. Bridging membrane and cytoskeleton dynamics in the secretory and endocytic pathways. *Nature Cell Biology*, 14, 11-19.
- Applegate, K. T., Besson, S., Matov, A., Bagonis, M. H., Jaqaman, K., & Danuser, G. 2011. plusTipTracker: Quantitative image analysis software for the measurement of microtubule dynamics. *Journal of structural biology*, 176(2), 168–184.
- Ávila, J. 1990. Microtubule dynamics. *Faseb J* 4:3284-90.
- Barlan, K., Lu, W., & Gelfand, V. I. 2013. The microtubule-binding protein ensconsin is an essential cofactor of kinesin-1. *Current biology: CB*, 23(4), 317–322.
- Barzi-Diéguéz, M. 2011. Implicación de las proteínas G y de la PKA en la regulación local de la vía de Sonic Hedgehog en el cilio primario. [Tesis de doctorado, Universitat de Barcelona].
- Beningo, K.A. et al. 2001. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J. Cell Biol.* 153, 881–888.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305), 117–127.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. 2014. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological reviews*, 94(1), 235–263.

- Blum, C., Graham, A., Yousefzadeh, M., Shroud, J., Benjamin, K., Krishna, M., ... & Mitas, M. 2008. The expression ratio of Map7/B2M is prognostic for survival in patients with stage II colon cancer. *International journal of oncology*, 33(3), 579-584.
- Bronner, M. E., & Simões-Costa, M. 2016. The Neural Crest Migrating into the Twenty-First Century. *Current topics in developmental biology*, 116, 115–134.
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., & Hamm, H. E. 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine reviews*, 24(6), 765–781.
- Garcin, C., & Straube, A. 2019. Microtubules in cell migration. *Essays in biochemistry*, 63(5), 509–520.
- Chang, W. K., Carmona-Fontaine, C., & Xavier, J. B. 2013. Tumour-stromal interactions generate emergent persistence in collective cancer cell migration. *Interface focus*, 3(4), 20130017.
- Colombo, K., Grill, S. W., Kimple, R. J., Willard, F. S., Siderovski, D. P., & Gönczy, P. 2003. Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science (New York, N. Y.)*, 300(5627), 1957–1961.
- Contreras Vallejos, E. 2008. Estudio de la Interacción entre la Proteína Asociada a Microtúbulos 1B y la Enzima Tirosina Tubulina Ligasa en Neuronas.
- Cotton, M., & Claing, A. 2009. G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cellular signalling*, 21(7), 1045–1053.
- Colicelli J. 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2004(250), RE13.

- Dent, E. W., & Kalil, K. 2001. Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(24), 9757–9769.
- DeSimone, D. W., Davidson, L., Marsden, M., & Alfandari, D. 2005. The *Xenopus* embryo as a model system for studies of cell migration. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 294, 235–245.
- DiDonato, J. A., Mercurio, F., & Karin, M. 2012. NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer. *Immunological reviews*, 246(1), 379–400.
- Dominguez, R., & Holmes, K. C. 2011. Actin structure and function. *Annual review of biophysics*, 40, 169–186.
- Drewes, G., Ebner, A., & Mandelkow, E. M. 1998. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends in biochemical sciences*, 23(8), 307-311.
- Etienne-Manneville S. 2013. Microtubules in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology*, 29, 471–499.
- Ezratty, E.J., Partridge, M.A. and Gunderson, G.G. 2005. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat. Cell Biol.* 7, 581–590.
- Fabre-Jonca, N., Viard, I., French, L. E., & Masson, D. 1999. Upregulation and redistribution of E-MAP-115 (epithelial microtubule-associated protein of 115 kDa) in terminally differentiating keratinocytes is coincident with the formation of intercellular contacts. *The Journal of investigative dermatology*, 112(2), 216–225.
- Farache, D., Emorine, L., Haren, L., & Merdes, A. 2018. Assembly and regulation of  $\gamma$ -tubulin complexes. *Open biology*, 8(3), 170266.

- Fields, T. A., & Casey, P. J. 1997. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *The Biochemical journal*, 321 ( Pt 3)(Pt 3), 561–571.
- Friedl, P. 2004. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(1), 14–23.
- Friedl, P., Hegerfeldt, Y., and Tusch, M. 2004. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *The International journal of developmental biology* 48, 441–449.
- Friedl, P, Wolf K. 2009. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Cell Biology Journal* 188 1: 11–19.
- Fu, L., Fu, H., Zhou, L., Xu, K., Pang, Y., Hu, K., ... & Shi, J. 2016. High expression of MAP7 predicts adverse prognosis in young patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, L., Beyer, A., Henriquez, J. P., ... & Torrejón, M. 2013. Ric-8A, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, is critical for cranial neural crest cell migration. *Developmental biology*, 378(2), 74-82.
- Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Rodriguez, M., Arriagada, C., Maureira, A., Beyer, A., Villaseca, S., Leal, J. I., Hinrichs, M. V., Olate, J., Caprile, T., & Torrejón, M. 2016. Expression profiles of the G $\alpha$  subunits during *Xenopus tropicalis* embryonic development. *Gene expression patterns : GEP*, 22(1), 15–25.
- Gallaud, E., Caous, R., Pascal, A., Bazile, F., Gagné, J. P., Huet, S., ... & Giet, R. 2014. Ensconsin/Map7 promotes microtubule growth and centrosome separation in *Drosophila* neural stem cells. *Journal of Cell Biology*, 204(7), 1111-1121.

- García Sáinz, J.A. 2011. Receptores acoplados a proteínas G y su desensibilización. *Revista odontológica mexicana*, 15(4), 210-213.
- Garcin, C., & Straube, A. 2019. Microtubules in cell migration. *Essays in biochemistry*, 63(5), 509–520.
- Gilbert S.F. 2006. *Developmental Biology*. 8th edition. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachusetts.
- Gilman A. G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual review of biochemistry*, 56, 615–649.
- Goodson, H. V., & Jonasson, E. M. 2018. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(6), a022608.
- Grainger RM. 2012. *Xenopus tropicalis as a Model Organism for Genetics and Genomics: Past, Present and Future*. *Methods Mol Biol* 917: 3–15.
- Harland, R. M., & Grainger, R. M. 2011. *Xenopus research: metamorphosed by genetics and genomics*. *Trends in genetics : TIG*, 27(12), 507–515.
- He, X., Liu, Z., He, Q., Qin, J., Liu, N., Zhang, L., Li, D., Zhou, J., Shui, W., & Liu, M. 2015. Identification of novel microtubule-binding proteins by taxol-mediated microtubule stabilization and mass spectrometry analysis. *Thoracic cancer*, 6(5), 649–654.
- Hinrichs, M. V., Torrejón, M., Montecino, M., & Olate, J. 2012. Ric-8: different cellular roles for a heterotrimeric G-protein GEF. *Journal of cellular biochemistry*, 113(9), 2797–2805.
- Hirsch, N., Zimmerman, L. B., Gray, J., Chae, J., Curran, K. L., Fisher, M., Ogino, H., & Grainger, R. M. 2002. *Xenopus tropicalis transgenic lines and their use in the study of embryonic induction*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 225(4), 522–535.

- Hol, F.J.H., Whitesides, G.M. and Dekker, C. 2019. Bacteria-in-paper, a versatile platform to study bacterial ecology. *Ecol Lett*, 22: 1316-1323.
- Hooikaas, P. J., Martin, M., Mühlethaler, T., Kuijntjes, G. J., Peeters, C. A. E., Katrukha, E. A., Ferrari, L., Stucchi, R., Verhagen, D. G. F., van Riel, W. E., Grigoriev, I., Altelaar, A. F. M., Hoogenraad, C. C., Rüdiger, S. G. D., Steinmetz, M. O., Kapitein, L. C., & Akhmanova, A. 2019. MAP7 family proteins regulate kinesin-1 recruitment and activation. *The Journal of cell biology*, 218(4), 1298–1318
- Horwitz, R., & Webb, D. 2003. Cell migration. *Current Biology*, 13(19), R756-R759.
- Huang, X., & Saint-Jeannet, J. P. 2004. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Developmental biology*, 275(1), 1–11.
- Huttenlocher, A., & Horwitz, A. R. 2011. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(9), a005074.
- Huertas, C. 2013. Mecanismos moleculares que regulan la migración colectiva [Tesis de doctorado, Universidad Pablo de Olavide].
- Ishikawa, H., & Marshall, W. F. 2011. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(4), 222-234.
- Iwasa J, & Marshall, W. 2020. El citoesqueleto y la movilidad celular. *Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos*, 8e. McGraw Hill.
- Jaffe, A. B., & Hall, A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, 247–269.
- Janke, C., & Bulinski, J. C. 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(12), 773–786.

- Ji, L., Lim, J., and Danuser, G. 2008. Fluctuations of intracellular forces during cell protrusion. *Nature cell biology* 10, 1393-1400.
- Joo, E. E., & Yamada, K. M. 2016. Post-polymerization crosstalk between the actin cytoskeleton and microtubule network. *Bioarchitecture*, 6(3), 53–59.
- Keller, R., Davidson, L. A., & Shook, D. R. 2003. How we are shaped: the biomechanics of gastrulation. *Differentiation; research in biological diversity*, 71(3), 171–205.
- Kiyomitsu, T. 2019. The cortical force-generating machinery: how cortical spindle-pulling forces are generated. *Curr. Opin. Cell Biol.* 60, 1-8.
- Kwon, H.J., J.E. Park, H. Song, and C.Y. Jang. 2016. DDA3 and Mdp3 modulate Kif2a recruitment onto the mitotic spindle to control minus-end spindle dynamics. *J. Cell Sci.* 129:2719–2725.
- Lansbergen, G., & Akhmanova, A. 2006. Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7(5), 499–507. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00400.x>
- Lawrence T. 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a001651.
- Leal, J.I. 2018. Análisis funcional de Ric-8A en la polaridad celular durante la migración de la cresta neural en *Xenopus tropicalis*. Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática.
- Liu, Y. J., Le Berre, M., Lautenschlaeger, F., Maiuri, P., Callan-Jones, A., Heuzé, M., Takaki, T., Voituriez, R., & Piel, M. 2015. Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell*, 160(4), 659–672.
- Masson, D., & Kreis, T. E. 1993. Identification and molecular characterization of E-MAP-115, a novel microtubule-associated protein predominantly expressed in epithelial cells. *The Journal of cell biology*, 123(2), 357–371.



- Masson, D., & Kreis, T.E. 1995. Binding of E-MAP-115 to microtubules is regulated by cell cycle-dependent phosphorylation *The Journal of Cell Biology* 131:1015–1024.
- Mchedlishvili, N., Matthews, H. K., Corrigan, A., & Baum, B. 2018. Two-step interphase microtubule disassembly aids spindle morphogenesis. *BMC biology*, 16(1), 14.
- Metzger, T., Gache, V., Xu, M., Cadot, B., Folker, E. S., Richardson, B. E., ... & Baylies, M. K. 2012. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature*, 484(7392), 120-124.
- Morrison E. E. 2007. Action and interactions at microtubule ends. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 64(3), 307–317.
- Nandadasa, S., Tao, Q., Menon, N. R., Heasman, J., & Wylie, C. 2009. N- and E-cadherins in *Xenopus* are specifically required in the neural and non-Neural ectoderm, respectively, for F-actin assembly and morphogenetic movements. *Development (Cambridge, England)*, 136(8), 1327–1338.
- Offermanns S. 2003. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in biophysics and molecular biology*, 83(2), 101–130.
- Ohi, R., & Zanic, M. 2016. Ahead of the Curve: New Insights into Microtubule Dynamics. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev-314.
- Oldham, W. M., & Hamm, H. E. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(1), 60–71.
- Panková, K., Rösel, D., Novotný, M., & Brábek, J. 2010. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(1), 63–71.

- Pellegrin, S., & Mellor, H. 2007. Actin stress fibres. *Journal of cell science*, 120(Pt 20), 3491–3499.
- Poma P. 2020. NF- $\kappa$ B and Disease. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9181.
- Pollard T. D. 2016. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(8), a018226.
- Porter, K.R, Anderson, K.L. 1982. The structure of the cytoplasmic matrix preserved by freeze-drying and freeze-substitution. *Eur J Cell Biol* 29:83-96.
- Reece, J.B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. y Jackson, R. B. 2011. DNA tools and biotechnology. *Campbell biology* (10<sup>o</sup> ed., págs. 408-435). San Francisco, CA: Pearson.
- Reiner, D. J., & Lundquist, E. A. 2018. Small GTPases. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 2018, 1–65.
- Renkawitz, J., Schumann, K., Weber, M., Lammermann, T., Pflücke, H., Piel M., Polleux, J., Spatz, J.P., and Sixt, M. 2009. Adaptive force transmission in amoeboid cell migration. *Nature cell biology* 11, 1438-1443.
- Ridley, A. J., & Hall, A. 1992. Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 57, pp. 661-671). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.

- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., & Horwitz, A. R. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5651), 1704–1709.
- Robertis, D. 1996. *Biología celular y molecular*. Ediciones El Ateneo, Buenos Aires.
- Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., Forscher, P., Bement, W. M., & Waterman-Storer, C. M. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature cell biology*, 5(7), 599–609.
- Romero, G. 2020. Estudio de la función de Ric-8A/Gαq durante la migración de las crestas neurales craneales de *Xenopus tropicalis* [Tesis de pregrado, Universidad de Concepción].
- Roth, D., Fitton, B. P., Chmel, N. P., Wasiluk, N., & Straube, A. 2018. Spatial positioning of EB family proteins at microtubule tips involves distinct nucleotide-dependent binding properties. *Journal of cell science*, 132(4), jcs219550.
- Roychowdhury, S., Panda, D., Wilson, L., & Rasenick, M. M. 1999. G protein alpha subunits activate tubulin GTPase and modulate microtubule polymerization dynamics. *The Journal of biological chemistry*, 274(19), 13485–13490.
- Roychowdhury, S., & Rasenick, M. M. 2008. Submembraneous microtubule cytoskeleton: regulation of microtubule assembly by heterotrimeric G proteins. *The FEBS journal*, 275(19), 4654–4663.
- Salceda, S.R, Albert, G.J.S. 2016. El citoesqueleto: un componente fundamental en la arquitectura y en la fisiología celular. *Rev Educ Bioquímica*, 35(4):102-114.
- Scarpa, E., Szabó, A., Bibonne, A., Theveneau, E., Parsons, M., & Mayor, R. 2015. Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Forces. *Developmental Cell*, 34(4), 421–434.

- Schoenfeld, T.A., & Obar, R.A. 1994 .Diverse Distribution and Function of Fibrous Microtubule-Associated Proteins in the Nervous System. *International Review of Cytology*, 151 , 67-137.
- Seetharaman, S., & Etienne-Manneville, S. 2020. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends in cell biology*, 30(9), 720–735.
- Slep, K. C., Rogers, S. L., Elliott, S. L., Ohkura, H., Kolodziej, P. A., & Vale, R. D. 2005. Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. *The Journal of cell biology*, 168(4), 587–598.
- Sood, R., Bader, P. I., Speer, M. C., Edwards, Y. H., Eddings, E. M., Blair, R. T., ... & Trent, J. M. 2004. Cloning and characterization of an inversion breakpoint at 6q23. 3 suggests a role for Map7 in sacral dysgenesis. *Cytogenetic and Genome Research*, 106(1), 61-67.
- Steventon, B., Carmona-Fontaine, C., & Mayor, R. 2005. Genetic network during neural crest induction: from cell specification to cell survival. *Seminars in cell & developmental biology*, 16(6), 647–654.
- Straube, A., & Merdes, A. 2007. EB3 regulates microtubule dynamics at the cell cortex and is required for myoblast elongation and fusion. *Current biology : CB*, 17(15), 1318–1325. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.058>
- Sung, H.H., Telley, I.A., Papadaki, P., Ephrussi, A., Surrey, T., Rørth, P. 2008. *Drosophila* ensconsin promotes productive recruitment of Kinesin-1 to microtubules. *Dev. Cell* 15(6): 866--876.
- Szabó, A., & Mayor, R. 2016. Modelling collective cell migration of neural crest. *Current Opinion in Cell Biology*, 42, 22–28.
- Szabó, A., & Mayor, R. 2018. Mechanisms of Neural Crest Migration. *Annual review of genetics*, 52, 43–63.

- Tala, Sun, X., Chen, J., Zhang, L., Liu, N., Zhou, J., Li, D., & Liu, M. 2014. Microtubule stabilization by Mdp3 is partially attributed to its modulation of HDAC6 in addition to its association with tubulin and microtubules. *PloS one*, 9(3), e90932.
- Tang, N., Lyu, D., Chang, J. F., Liu, Z. T., Zhang, Y., & Liu, H. P. 2020. Enhanced expression of microtubule-associated protein 7 functioned as a contributor to cervical cancer cell migration and is predictive of adverse prognosis. *Cancer cell international*, 20, 354.
- Tesmer, J. J. 2010. The quest to understand heterotrimeric G protein signaling. *Nature structural & molecular biology*, 17(6), 650–652.
- Thiery, J.P. 2003. Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 15, Issue 6. Pages 740-746.
- Theveneau, E., & Mayor, R. 2012. Neural crest migration: interplay between chemorepellents, chemoattractants, contact inhibition, epithelial-mesenchymal transition, and collective cell migration. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 1(3), 435–445.
- Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., & Mayor, R. 2010. Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Developmental cell*, 19(1), 39–53.
- Thompson, B., Jin, Y., Wu, K.H., Colvin, R., Luster, A., Birnbaumer, L., & Wu, M. 2007. Inhibition of Gai2 Activation by Gai3 in CXCR3-mediated Signaling\*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 9547 - 9555.
- Toro-Tapia, G., Villaseca, S., Leal, J. I., Beyer, A., Fuentealba, J., & Torrejón, M. 2017. *Xenopus* as a model organism to study heterotrimeric G-protein pathway during

collective cell migration of neural crest. *Genesis* (New York, N.Y.: 2000), 55(1-2), 10.1002/dvg.23008.

Toro-Tapia, G., Villaseca, S., Beyer, A., Roycroft, A., Marcellini, S., Mayor, R., & Torrejón, M. 2018. The Ric-8A/Gα13/FAK signalling cascade controls focal adhesion formation during neural crest cell migration in *Xenopus*. *Development* (Cambridge, England), 145(22), dev164269.

Trepat, X. 2009. Mecánica de la migración celular ¿Qué fuerzas gobiernan el movimiento celular durante la morfogénesis, la metástasis y la regeneración de tejidos? *Prensa Científica. Investigación y ciencia*, España, pp. 16-17.

Tymanskyj, S. R., Yang, B., Falnikar, A., Lepore, A. C., & Ma, L. 2017. MAP7 regulates axon collateral branch development in dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience*, 37(6), 1648-1661.

Tymanskyj, S. R., & Ma, L. 2019. MAP7 Prevents Axonal Branch Retraction by Creating a Stable Microtubule Boundary to Rescue Polymerization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(36), 7118–7131.

van Helvert, S., Storm, C., & Friedl, P. 2018. Mechanoreciprocity in cell migration. *Nature cell biology*, 20(1), 8–20.

Villaseca, S. 2017. Estudio de la función de las proteínas Gai-2 y Ric-8A en la morfología y polarización celular durante la migración de células de la Cresta Neural Craneal en *Xenopus* [Tesis de magíster, Universidad de Concepción].

Wiege, K., Le, D. D., Syed, S. N., Ali, S. R., Novakovic, A., Beer-Hammer, S., Piekorz, R. P., Schmidt, R. E., Nürnberg, B., & Gessner, J. E. 2012. Defective macrophage migration in Gai2- but not Gai3-deficient mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 189(2), 980–987.

- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. 2018. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annual review of biochemistry*, 87, 897–919.
- Wilkie, T. M., Gilbert, D. J., Olsen, A. S., Chen, X. N., Amatruda, T. T., Korenberg, J. R., Trask, B. J., de Jong, P., Reed, R. R., & Simon, M. I. 1992. Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Nature genetics*, 1(2), 85–91.
- Woldu, S. L., Hutchinson, R. C., Krabbe, L. M., Sanli, O., & Margulis, V. 2018. The Rho GTPase signalling pathway in urothelial carcinoma. *Nature reviews. Urology*, 15(2), 83–91.
- Yan, X., Liang, H., Deng, T., Zhu, K., Zhang, S., Wang, N., ... & Chen, X. 2013. The identification of novel targets of miR-16 and characterization of their biological functions in cancer cells. *Molecular cancer*, 12(1), 1-11.
- Zhang, R., Li, L., Chen, L., Suo, Y., Fan, J., Zhang, S., Wang, Y., Gao, S., & Wang, Y. 2020. MAP7 interacts with RC3H1 and cooperatively regulate cell-cycle progression of cervical cancer cells via activating the NF- $\kappa$ B signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, 527(1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.008>
- Zhong, M., Clarke, S., Vo, B. T., & Khan, S. A. 2012. The essential role of G $\alpha$ 2 in prostate cancer cell migration. *Molecular cancer research : MCR*, 10(10), 1380–1388.