



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas área
Biología Celular y Molecular

“Estudio de la función de Ric-8A y G α 13 durante la migración de las células de la cresta neural craneal en *Xenopus*”

GABRIELA CAROLINA TORO TAPIA
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

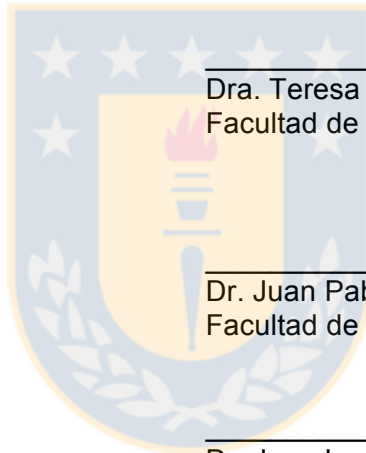
Profesores Guías: Dra. Marcela Eliana Torrejón Quezada
Dr. Sylvain Guy Andre Marcellini Liotaud
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. Marcela Torrejón Quezada
Profesor Guía
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Sylvain Marcellini Liotaud
Profesor Co-Guía
Facultad de Ciencias Biológicas



Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Juan Pablo Henríquez H.
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Juan Larraín Correa
Profesor Evaluador Externo
Universidad de Católica

Dr. Juan Pablo Henríquez H.
Director
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

RESUMEN:

RIC-8 es una proteína accesoria de la señalización de la proteína G heterotrimérica la cual tiene actividad GEF y de chaperona sobre distintas subunidades $G\alpha$. Ric-8A posee un patrón de expresión neuroespecífico durante la embriogénesis de ratón y es requerido para el desarrollo temprano de este organismo, ya que embriones “knock-out” para Ric-8A mueren en estadios de gástrula. Este fenotipo letal limita seriamente la comprensión de la función de Ric-8A durante la embriogénesis y sugiere que los modelos no-mamíferos vertebrados pueden abordar de mejor manera este problema. Por otro lado, la proteína G heterotrimérica ha sido descrita participando en la migración celular en distintos tipos celulares, incluyendo a los movimientos ocurridos durante la gastrulación en el desarrollo embrionario de diferentes modelos, donde recientemente se ha vinculado a Ric-8A en estos eventos. En nuestro laboratorio hemos descrito una nueva función para Ric-8A durante la migración celular en *Xenopus*, donde experimentos de pérdida de función resultan en defectos en la correcta formación de los cartílagos faciales. En esta tesis, hemos realizado ensayos de epistasis demostrando que Ric-8A actúa arriba de la señalización de $G\alpha13$, y controlan la migración de la células de la cresta neural craneal. Explantes de cresta neural fueron analizados *in vivo* a través de “time-lapse” y de inmunocitoquímicas para evaluar la dispersión, la estabilidad de las protrusiones y la localización subcelular de diversas proteínas. El silenciamiento de $G\alpha13$ produce el mismo fenotipo que las células morfantes para Ric-8A: Las células presentan una alteración en el citoesqueleto de actina, muestran protrusiones inestables en el tiempo y una fuerte reducción en el número y la dinámica de las adhesiones focales. Además, la sobreexpresión de la subunidad $G\alpha13$, es suficiente para rescatar todos los fenotipos morfantes observados para Ric-8A. También demostramos que, Ric-8A y $G\alpha13$ interaccionan y colocalizan principalmente en las protrusiones del frente de migración y en menor proporción en el área citoplasmática. Por otro lado, la quinasa de adhesiones focales (FAK) colocaliza parcialmente con $G\alpha13$ endógena y ambas proteínas a través de ensayos de inmunoprecipitación determinamos que forman parte del mismo complejo proteico. Además Src constitutivamente activa, proteína que cumple una función importante en la formación de las adhesiones focales, es capaz de rescatar el fenotipo morfante de $G\alpha13$ en las crestas neurales. Finalmente, el silenciamiento de Ric-8A y $G\alpha13$ induce una alteración en la localización del marcador de polaridad aPKC y provoca defectos en la respuesta quimiotáctica hacia Sdf-1. Por lo tanto, con este trabajo de tesis comenzamos a revelar parte de los mecanismos moleculares esenciales para la migración colectiva, evento importante durante la embriogénesis, y que en este caso involucran la regulación de la vía de proteínas G heterotriméricas y a su GEF Ric-8A. Proponemos que, Ric-8A regula la señalización de $G\alpha13$, y en conjunto, controlan la polaridad celular y la morfología celular, regulando las propiedades de las adhesiones focales y la formación de protrusiones, requeridas para una apropiada migración celular.

SUMMARY:

Ric-8 is an accessory protein involved in different heterotrimeric G protein pathways, and exerts a GEF and chaperone activity over different $G\alpha$ subunits. In mouse, Ric-8A exhibits a neuro-specific expression pattern during embryogenesis, and is required for early development as knock-out embryos die during gastrulation stages. This lethal phenotype severely limits our understanding of Ric-8A function during embryogenesis and suggests that non-mammalian vertebrate model organisms might be best-suited to tackle this issue. On the other hand, heterotrimeric G proteins control the migration of several cellular types, including gastrulation movements, which have recently been shown to also rely on Ric-8A function. Our laboratory has recently reported a novel function for Ric-8A during cranial neural crest cell migration in *Xenopus*, showing that loss of function experiment result in facial cartilage defects. In this thesis, we have performed epistatic experiments to demonstrate that Ric-8A acts upstream of $G\alpha13$ to control cranial neural crest cells migration. Neural crest explants were analyzed *in vivo* by time-lapse microscopy and by immunostaining to evaluate dispersion, protrusion stability and protein localization. The $G\alpha13$ knock-down mimics the Ric-8A morphant condition, as cells show an alteration of their actin cytoskeleton, and display protrusion instability and a strong reduction in the number and dynamics of focal adhesions. In addition, the overexpression of the $G\alpha13$ subunit is sufficient to rescue all the Ric-8A morphant phenotypes. Furthermore, Ric-8A and $G\alpha13$ interact and colocalize mainly in protrusion at the leading edge and in minor proportion at the cytoplasmic zone. On the other hand, Focal Adhesion Kinase (FAK) colocalizes partially with endogenous $G\alpha13$ and we showed by immunoprecipitation that both proteins belong to the same complex. Constitutively active Src, which plays a role during focal adhesion formation, is able to rescue the $G\alpha13$ morphant phenotype in neural crest. Finally, Ric-8A and $G\alpha13$ down-regulation induce an alteration in the localization of the polarity marker aPKC and elicit defects in chemotactic response to Sdf-1. Therefore, this thesis starts unraveling the molecular mechanisms that are essential for collective cell migration during embryogenesis, a crucial process involving the heterotrimeric G protein signaling and its GEF Ric-8A. We propose that Ric-8A regulates $G\alpha13$ signaling pathway and together control cell polarity and cell morphology by regulating focal adhesion properties and protrusion formation, required for proper cell migration.

ÍNDICE GENERAL:

I. INTRODUCCIÓN (1)

- 1) DESARROLLO EMBRIONARIO Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN (1)
- 2) CRESTAS NEURALES (CNs) (1)
 - 2.1) FORMACIÓN Y ESPECIFICACIÓN DE LA CRESTA NEURAL CRANEAL (2)
 - 2.2) TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL (EMT) Y MIGRACIÓN (2)
 - 2.3) MIGRACIÓN: DIRECCIONALIDAD Y POLARIDAD CELULAR (4)
 - 2.4) POLARIDAD CELULAR Y ADHESIONES A LA MATRIZ EXTRACELULAR MEDIADAS POR INTEGRINA DURANTE LA MIGRACIÓN CELULAR (9)
- 3) PROTEÍNA G HETEROTRIMÉRICA (11)
 - 3.1) PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA G HETEROTRIMÉRICA DURANTE LA MIGRACIÓN CELULAR (11)
 - 3.2) REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA G HETEROTRIMÉRICA (15)
- 4) RIC-8 (15)
 - 4.1) RIC-8 Y POLARIDAD CELULAR (16)
 - 4.2) RIC-8A DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS (17)
 - 4.3) RIC-8A EN LA MIGRACIÓN CELULAR (19)
- 5) CONTEXTO TRABAJO DE TESIS (20)

II) HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS (22)

III) MATERIALES Y MÉTODOS (23)

MATERIALES (23)

Plásmidos

Morfolinos

Anticuerpos y fluoróforos

Cantidades de morfolino y mRNA inyectadas

MÉTODOS (26)

Fertilización *in vitro* (26)

Microinyección (26)

Fijación de embriones en MEMFA (27)

Síntesis de sonda y mRNA *in vitro* (27)

Hibridación *in situ* (27)

Explantos de Crestas Neurales Craneales (28)

Trasplantes de Crestas Neurales Craneales (29)
Ensayos de dispersión celular (29)
Ensayo de motilidad celular en células individuales (30)
Análisis de protrusiones por “time-lapse” (30)
Ensayos de adhesión celular (30)
Inmunocitoquímica (31)
Análisis de adhesiones focales por microscopia TIRF (31)
Ensayos de quimiotaxia (31)
Lisis de embriones (32)
Detección de proteínas (32)
Co-inmunoprecipitación (33)
Transfección para expresión transiente en células HEK293T (33)
Construcciones DNA y digestión preparativa (34)
Transformación en bacterias competentes por calcio (34)
Preparación de DNA a pequeña escala (34)
Purificación del DNA plasmidial a gran escala por el método del polietilenglicol (35)

IV) RESULTADOS (37)

OBJETIVO 1 (37)

OBJETIVO 2 (50)

OBJETIVO 3 (66)

V) DISCUSIÓN (70)

- i) Ric-8 actúa corriente arriba de $G\alpha 13$ y ambas son necesarias para una correcta migración (70)
- ii) Ric-8A y $G\alpha 13$ se localizan en la corteza celular en el frente de migración (73)
- iii) Ric-8A y $G\alpha 13$ regulan la morfología celular durante la migración (74)
- iv) Ric-8A y $G\alpha 13$ regulan la adhesión a la matriz (75)
- v) Ric-8A y $G\alpha 13$ controlan la polaridad celular y migración quimiotáctica (79)
- vi) De la biología del desarrollo al cáncer (81)
- vii) Modelo final: Ric-8A y $G\alpha 13$ regulan la formación de las adhesiones focales durante la migración de las células de la cresta neural craneal (81)

VI) CONCLUSIONES (84)

VII) AGRADECIMIENTOS (85)

VIII) BIBLIOGRAFÍA (86)

IX) ANEXOS (97)

i) PUBLICACIONES

ii) PRESENTACIONES A CONGRESOS DURANTE LA PERMANENCIA EN EL PROGRAMA DE DOCTORADO

A) Congresos internacionales

B) Congresos Nacionales

iii) VERSIÓN DIGITAL: VIDEOS “TIME-LAPSE”



ÍNDICE DE FIGURAS:

FIGURAS INTRODUCCIÓN

Figura I

La inducción de la cresta neural se lleva a cabo por gradientes de señalización que contribuyen también a la especificación del eje del embrión de *Xenopus*. (7)

Figura II

La migración de las células de la Cresta Neural Craneal ocurre de forma colectiva y direccionada debido a interacciones establecidas entre las células y señales externas. (8)

Figura III

Maduración de las adhesiones focales y activación de las proteínas Rho GTPasas. (14)

Figura IV

Patrón de expresión de Ric-8A durante el desarrollo embrionario de *Xenopus tropicalis*. (21)

FIGURAS RESULTADOS

Figura 1

Estudio del efecto de la sobreexpresión de Ric-8A en la migración de las CNC *in vivo*. (40)

Figura 2

Estudio del efecto del silenciamiento de Ric-8A y $G\alpha 13$ en la migración de las CNC *in vivo* y ensayos de epistasis empleando la subunidad $G\alpha 13$ en embriones morfantes para Ric-8A. (41)

Figura 3

Análisis de la sobreexpresión y el silenciamiento de $G\alpha 13$ en extractos de proteínas totales de embriones de *Xenopus*. (42)

Figura 4

Análisis del comportamiento de células morfantes para $G\alpha 13$ en un contexto normal. (43)

Figura 5

Estudio del silenciamiento de Ric-8A y $G\alpha 13$ sobre la migración de las CNC *in vitro* y ensayos de epistasis empleando la subunidad $G\alpha 13$ en embriones morfantes para Ric-8A. (46)

Figura 6

Análisis de motilidad en células individuales de CNC. (49)

Figura 7

Localización sub-celular de $G\alpha 13$ y Ric-8A en células de la CNC y evaluación de la interacción de ambas proteínas. (52)

Figura 8

Localización sub-celular de $G\alpha 13$ en células morfantes para Ric-8A. (53)

Figura 9

Evaluación de cambios en la estructura del citoesqueleto de actina en células morfantes para $G\alpha 13$ y morfantes para Ric-8A. (56)

Figura 10

Evaluación del fenotipo del citoesqueleto de actina en las protrusiones de células morfantes para $G\alpha 13$ y morfantes para Ric-8A por medio de “time-lapse”. (57)

Figura 11

Ensayo de adhesión a la matriz extracelular de explantes morfantes para $G\alpha 13$. (58)

Figura 12

Efecto del silenciamiento de $G\alpha 13$ y Ric-8A sobre las adhesiones focales en células de la CNC. (61)

Figura 13

Análisis de la dinámica de las adhesiones focales en células morfantes para $G\alpha 13$ y estudio de la localización sub-celular e interacción de $G\alpha 13$ con FAK. (62)

Figura 14

Ensayo de epistasis co-inyectando a Src constitutivamente activa en embriones donde ha sido silenciado $G\alpha 13$ para analizar la migración *in vivo* de CNC. (64)

Figura 15

Ensayo de epistasis co-inyectando a Src constitutivamente activa en células donde ha sido silenciado $G\alpha 13$ para analizar adhesiones focales en células de CNC. (65)

Figura 16

Análisis funcional de Ric-8A y $G\alpha 13$ en la polaridad celular a través de la detección de aPKC en células morfantes. (68)

Figura 17

Ensayo de quimiotaxia en explantes morfantes para G α 13. **(69)**

Figura 18

Modelo final de la función de Ric-8A y G α 13 en la migración de las CNC. **(83)**

Figura anexo I:

Metodología para microinyección y disección de CNC desde embriones de *Xenopus*. **(100)**



ABREVIATURAS:

BMP, “Bone Morphogenetic Proteins”

BSA, “Bovine serum albumin”

CIL, “Contact inhibition of locomotion”

CN, Crestas neurales

CNC, Crestas Neurales Craneales

CoA, “Coattraction”

DFA, “Danilchik's for Amy”

DNA, “Deoxyribonucleic Acid”

FAK, “Focal Adhesion Kinase”

FGF, “Fibroblast Growth Factor”

Fog, “Folded gastrulation”

GAP, “GTPase Activating Protein”

GDI, “Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors”

GEF, “Guanine Nucleotide Exchanging Factor”

GPCR, “G protein-coupled receptors”

GPR1/GPR2, “G-protein regulator”

HCG, “Human Chorionic Gonadotropin”

Hif-1, “Hypoxia-Inducible transcription Factor 1”

LB, Luria-Bertani

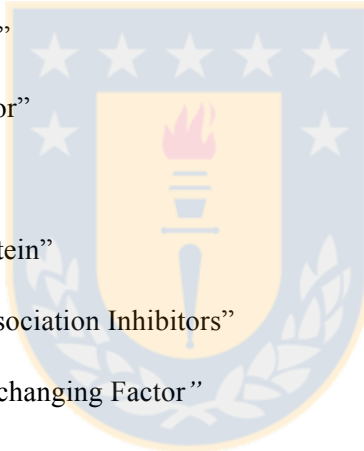
LiCl, “Lithium chloride”

LPA, “Lysophosphatidic acid”

MAB, “Maleic Acid Buffer”

MEF, “Mouse Embryonic Fibroblast”

MR, “Modified Ringer’s solution”



mRNA, “Messenger Ribonucleic acid”

NAM “Normal Amphibian Medium”

Par, “Partition defective”

PBS, “Phosphate-Buffered Saline

PCP, “Planar Cell Polarity”

PI3K, “Phosphoinositide 3-kinase”

PLC, “Phospholipase C”

RLC, “Regulatory Light Chain”

RNA, “Ribonucleic acid”

ROCK, “Rho-associated kinase”

Sdf1, “Stromal cell-derived factor 1”

SDS, “Sodium Dodecyl Sulfate”

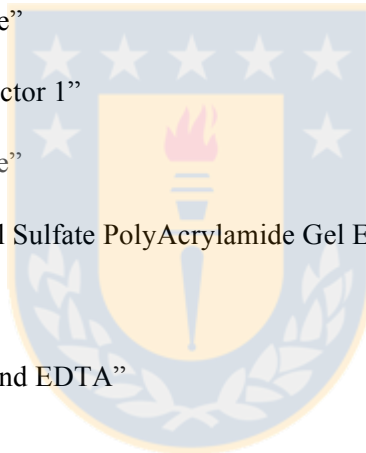
SDS-PAGE, “Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis”

SSC, “Saline Sodium Citrate”

TAE, “Tris base, Acetic acid and EDTA”

TBS, “Tris-buffered saline”

TIRF, “Total Internal Reflection Fluorescence”



I. INTRODUCCIÓN:

1) DESARROLLO EMBRIONARIO Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN

El desarrollo embrionario temprano, es similar en casi todos los grupos vertebrados, compartiendo muchos de los procesos y expresión génica que se requieren desde la formación de los ejes hasta el establecimiento de los diversos órganos. Dentro de los vertebrados, los anfibios han sido ampliamente estudiados, debido a varias características que los hacen un excelente modelo de estudio tales como: los cientos de huevos que son fertilizados externamente, un rápido desarrollo embrionario, la fácil manipulación de los embriones, y el gran tamaño celular que permite realizar experimentos de trasplantes y explantes, los cuales se complementan con las múltiples técnicas de biología molecular desarrolladas hasta el momento, como hibridaciones *in situ*, la microinyección de oligonucleótidos antisentido y proteínas dominantes negativas (o modificadas en general), entre otras (Gilbert, S. F. 2013). Considerando esta ventaja experimental, el entendimiento de cómo el sistema nervioso es formado, mantenido y reparado ha sido ampliamente descrito en *Xenopus*. Numerosos trabajos han contribuido en la identificación de diversas señales, vías de señalización y tejidos necesarios para la inducción, especificación y diferenciación del sistema nervioso. Dentro de estas rutas de señalización, se han descrito por ejemplo, a las proteínas BMP (“Bone Morphogenetic Proteins”), Wnt, FGF (“Fibroblast Growth Factor”) y ácido retinoico, las cuales se encuentran activadas y/o reprimidas en forma de gradiente para formar el patrón dorso-ventral y antero-posterior de embrión, los cuales definen la formación de la placa neural, y que son esenciales para la formación e inducción de muchos tejidos y estructuras, como lo son las crestas neurales (CN) (Kloc, M., y Kubiak, J. Z., 2014). Sin embargo, debido a la complejidad del proceso, continúan muchas interrogantes con respecto a la formación y desarrollo de muchos tejidos, así como también de múltiples vías de señalización que aún no se han descrito completamente durante la embriogénesis (Kloc, M., y Kubiak, J. Z., 2014), y en lo cual este trabajo de tesis quiere aportar.

2) CRESTAS NEURALES (CNs):

Las CNs son un tejido transitorio el cual posteriormente deriva en la formación de diversos tipos celulares tales como neuronas y células gliales del sistema nervioso periférico, del sistema nervioso simpático y para-simpático; células de la glándula adrenal; células pigmentadas de la epidermis; tejido esquelético y conectivo craneo-facial; entre otras estructuras (Mayor, R., y Theveneau, E., 2013). Debido a la amplia migración de este tipo celular a lo largo de todo el cuerpo del embrión, las células de la CN pueden ser divididas en 4 tipos principales (que se traslapan) según sus regiones anatómicas, cada una de ellas con características funcionales diferentes: las CNs craneales

(CNC), las CNs cardiacas, las CNs troncales, y las CNs sacral-vagales (Gilbert, S. F. 2013, Theveneau, E., y Mayor, R, 2012). Dentro de este trabajo de tesis sólo se estudiarán las CNC, las cuales migran para producir la mesénquima cráneo-facial, la cual se diferencia a cartílago, hueso, neuronas craneales, glía, células pigmentadas y tejido conectivo de la cara (Hall, B. K., 2008). Estas células progenitoras además pueden entrar en los arcos faríngeos para formar las células del timo, odontoblastos de los primordios dentales y huesos del oído medio y de la mandíbula (Crane, J. F., y Trainor, P. A., 2006).

2.1) FORMACIÓN Y ESPECIFICACIÓN DE LA CRESTA NEURAL CREANEAL

La inducción de las células de la CN ocurre durante la gastrulación temprana, en el borde entre la placa neural prospectiva (ectodermo neural) y la epidermis prospectiva (ectodermo no-neural) (Hall, B. K., 2008). La formación y especificación de las células de la CN proviene de la unión de múltiples pasos. En anfibios, por ejemplo, ocurre por la interacción de múltiples señales inductivas durante la gastrulación (especificación de la CN) y la neurulación (mantención de la CN) del embrión, incluyendo señalizaciones de la vía BMP, Wnts y FGF, siendo importantes tanto el tiempo como el gradiente producido por ellas para llevar a cabo la correcta formación de las CN (LaBonne, C., y Bronner-Fraser, M., 1998; Milet, C., y Monsoro-Burq, A. H., 2012; Steventon, B. y col., 2009; Steventon, B., y Mayor, R., 2012). Niveles intermedios de BMP y crecientes de Wnt son requeridos en los bordes de la placa neural para la formación de las CN (Figura I), los que activan y regulan la expresión de un grupo de factores de transcripción llamados “especificadores del borde de la placa neural” (Basch, M. L. y col., 2004). Dentro de estos se encuentran: *AP2*, *Pax3*, *Pax7*, *Dlx*, *Msx1*, *Zic* y *Gbx2*; regulando la formación de las células de la CN, así como también algunas células dorsales del tubo neural (Milet, C., y Monsoro-Burq, A. H., 2012; Rogers, C. D., y col., 2012). Luego las células expresan un segundo grupo de factores de transcripción llamados “Factores de transcripción especificadores de crestas neurales”, dentro de los cuales encontramos a *FoxD3*, *Sox9*, *Sox10*, *Id*, *Twist* y *Snail*, que permiten a las células adquirir características de CN, diferenciándose completamente de la placa neural, pasando a la etapa de transición epitelio-mesenquimal (EMT) y delaminando desde el neuroepitelio, manteniendo de esta forma la identidad del tejido y ayudando en la fase final de diferenciación del progenitor (Milet, C., y Monsoro-Burq, A. H., 2012; Rogers, C. D., y col., 2012).

2.2) TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL (EMT) Y MIGRACIÓN.

Las células de la CN se separan del neuroepitelio desde la región dorsal del tubo neural para posteriormente migrar extensivamente hacia diferentes partes del embrión, proceso llamado delaminación, que para el caso de las células de CNC de *Xenopus* ocurre de una sola vez como un tejido cohesivo (Alfandari, D., y col., 2010). Para que esto ocurra, una serie de eventos moleculares se

deben orquestar para que la célula epitelial adquiera nuevas características que le permitan la migración: proceso llamado transición epitelio-mesenquimal o EMT (Theveneau, E., y Mayor, R., 2012). Tradicionalmente, la EMT consiste en la ruptura de los componentes de adhesión epitelial, la pérdida de la polaridad apico-basal, seguido por la ruptura de la membrana basal, la cual permite después la movilidad mesenquimal (Kerosuo, L., y Bronner-Fraser, M., 2012). Dentro de los cambios que la célula realiza, se ha descrito en *Xenopus* que las moléculas de adhesión celular juegan un rol fundamental durante la EMT en las CNC y también durante la migración celular. En un principio durante la inducción neural, las células pasan por un cambio global de cadherinas: de E-cadherinas a N-cadherinas (ambas cadherinas de tipo I) (Nandadasa, S., y col. 2009; Takeichi, M., 1988). Es por este motivo que tanto las células de la placa neural como las CN pre-migratorias expresan altos niveles de N-cadherinas con algunos niveles residuales de E-cadherinas, principalmente en las regiones craneales de *Xenopus* (Mayor, R., y Theveneau, E., 2013). La N-cadherina se expresa durante la migración colectiva temprana de las CNC en *Xenopus*, y se ha descrito que tanto la sobreexpresión como el silenciamiento de esta proteína bloquea la emigración de las CNC (Theveneau, E., y col. 2010). Incluso, recientemente se ha descrito que el cambio de cadherinas (de E por N) es fundamental para la migración de las CNC, debido a que este recambio es necesario para establecer la polaridad requerida por las células para realizar correctamente este proceso (Scarpa, E., y col., 2015), mecanismo que se explicará más adelante. Luego, las células continúan cambiando la expresión de cadherinas, disminuyendo la expresión de N-cadherinas y reemplazándolas por cadherinas de tipo II (6/7/11), las cuales son más débiles que las tipo I (McKeown, S. J., y col., 2013). Dentro de este grupo, la cadherina-11 se encuentra expresada en la CNC de *Xenopus*, la que participa directamente en la migración induciendo la formación de filopodias y lamelipodias en las células, siendo crítico en este proceso el dominio citoplasmático de la proteína, la cual posee un sitio de unión para el GEF (“Guanine Nucleotide Exchanging Factor”) de las proteína G pequeñas, Trio (Kashef, J., y col., 2009). Contribuyendo a la EMT, las CNs expresan proteasas que inducen la escisión de las cadherinas, tales como ADAM10 y ADAM13, las que modulan la propiedades de adhesión célula a célula, provocando de este modo la emigración. Por ejemplo, se ha estudiado ampliamente ADAM13 en *Xenopus*, y se ha demostrado que esta metaloproteinasas es esencial para el clivaje de cadherina-11, y que este clivaje es necesario para la migración de las CNC mediando la adhesión célula-célula (McCusker, C., y col., 2009). Además, se comprobó que el dominio extracelular producto del clivaje de cadherina-11 estimula la migración *in vivo* de las CNC (Abbruzzese, G., 2015). También, modulando el proceso de la EMT, se encuentra el factor de transcripción *Hif-1* (“Hypoxia-Inducible transcription Factor 1”) el cual controla la expresión de *Twist*, repimiendo la expresión de E-cadherina y permitiendo iniciar la migración de las CNC (Barriga, E. H., y col., 2013).

Por otro lado, la remodelación del citoesqueleto es uno de los pasos fundamentales para llevar a cabo la EMT y una migración efectiva, proceso que es regulado por integrinas y proteínas G pequeñas, entre otros (Kerosuo, L., y Bronner-Fraser, M., 2012). Las proteínas G pequeñas, se han descrito participando activamente en la EMT de las CN en otros modelos biológicos (Kerosuo, L., y Bronner-Fraser, M., 2012). Estudios realizados en pez cebra demuestran a través de ensayos de microscopia de “time-lapse”, una alta actividad protrusiva a través de la activación de miosina II y ROCK (“Rho-associated kinase”), provocando que la células de la CN abandonen el neuroepitelio una vez que las adhesiones célula a célula se han perdido (Berndt, J. D., 2008). Así también, la señalización de la proteína G pequeña Rho (RhoA y RhoB) ha sido descrita participando en el proceso de delaminación en las CN aviares, la cual a través de ROCK modula tanto las fibras de estrés como las adhesiones focales (Groisman, M., y col., 2008; Liu, J. P., y Jessell, T. M. 1998). Sin embargo, a pesar de la importancia que aparentemente tienen las proteínas G pequeñas durante el proceso de delaminación en las CN, pocos hallazgos se han realizado en este ámbito, contrario a los avances que se han realizado en el estudio de estas proteínas en la polaridad celular adquirida durante la migración celular.

2.3) MIGRACIÓN: DIRECCIONALIDAD Y POLARIDAD CELULAR.

Las CNC migran en base a los contactos celulares, en forma colectiva, lo cual es necesario para la migración direccionada. Una vez delaminadas, las CNC de *Xenopus* comienzan la migración celular separándose en pequeños grupos, a través de las corrientes migratorias llamadas: mandibular, hioide y branquial, separadas cada una de ellas por regiones libres de crestas neurales (Figura IIa) (Theveneau, E., y Mayor, R. 2012). Para que las CNC puedan migrar eficientemente a través de las tres corrientes migratorias, las células necesitan de señales intracelulares y extracelulares (Gilbert, S. F., 2013).

Dentro de las señales intracelulares, las CNC expresan proteínas que le permiten interactuar con moléculas presentes en el medio extracelular o con otras células de la CNC, para migrar eficientemente y en forma colectiva. Se han descrito al menos dos mecanismos por los cuales las células de la cresta neural pueden migrar grupalmente: La inhibición de la locomoción por contacto (CIL) y la co-atracción (CoA) (Figura IIb). La CIL consiste en que una vez que dos células se han encontrado, ellas detienen su migración en esa dirección debido a una señal inhibitoria (el contacto célula-célula) para luego extender protrusiones hacia el lado opuesto de la interacción, causado por un reordenamiento de la proteínas de la señalización de la vía Wnt no canónica/PCP (Polaridad Celular Planar) en el sitio del contacto, activando a la proteína G pequeña RhoA y re-polarizando a la célula (Carmona-Fontaine, C., y col. 2008). También se ha demostrado que N-cadherina es esencial para CIL, ya que activa a Rho en el contacto célula-célula, vinculando a esta proteína con la vía PCP

(Theveneau, E., y col. 2010). Cuando numerosas células migratorias se encuentran en contacto con otras, las células que se encuentran en el borde, exhiben movimientos migratorios hacia fuera del grupo, formando protrusiones hacia los extremos libres debido a la polaridad generada por este mecanismo, promoviendo la migración de todo el grupo en forma radial o dispersión, si no existen señales extracelulares, o en forma direccionada si estas señales existen (Carmona-Fontaine, C., y col. 2008; Mayor, R., y Theveneau, E., 2013). Recientemente se ha descrito que la EMT es un paso clave para la CIL, donde el cambio de cadherinas (de E a N) ayuda a la re-polarización de la célula y al desensamblaje de los complejos de adhesión, provocado principalmente por las fuerza de tracción polarizadas que se generan y que permiten el quiebre de las uniones adherentes, dilucidando que E-cadherina actuaría como un supresor de CIL (Scarpa, E., y col, 2015). Además, se ha demostrado que cadherina-11 es necesaria para llevar a cabo la CIL (Becker, S. F. S, y col, 2013) y que el aumento de la actividad de ADAM13 o de la expresión del fragmentos extracelulares de cadherina-11, aumenta la invasividad y bloquea la respuesta CIL que ocurre luego de la colisión de dos células, demostrando influencia sobre la polaridad celular en las CNC (Abbruzzese, G., y col., 2015).

Por otro lado, la co-atracción (CoA), es un mecanismo por el cual las células se mantienen en grupos cohesivos y permiten contrabalancear la tendencia natural de dispersión de las células provocado por CIL (Carmona-Fontaine, C., y col., 2011). Las CNC son co-atraídas debido a que las mismas células secretan el fragmento del complemento C3a y a la vez expresan al receptor C3aR, los cuales activan a Rac-1, contrario al efecto de CIL, el que permite la re-polarización de las células que se alejan del grupo principal. Cuando este mecanismo es bloqueado, interrumpe los movimientos coordinados y colectivos de estas células, perdiendo la capacidad de responder eficientemente a las señales extracelulares (Figura IIb) (Carmona-Fontaine, C., y col., 2011).

Modelos computacionales demuestran que en conjunto los mecanismos opuestos de CIL y CoA son suficientes y necesarios *in silico* para generar la migración direccional efectiva por las corrientes migratorias, las cuales además pueden interactuar con tejidos específicos y señales permisivas que contribuyen a una migración de largo alcance (Woods, M. L., y col., 2014).

Dentro de las señales extracelulares que las CNC reciben para lograr una adecuada migración se encuentra el factor Sdf1 (“Stromal cell-derived factor 1”), el cual estaría encargado de atraer a las células en forma colectiva y direccional en respuesta al gradiente, debido a que las CNC expresan a su receptor CXCR4, aumentando de esta forma el número y también la estabilidad de las protrusiones en el borde director o frente de migración (“leading edge”), mecanismo que es dependiente de N-cadherina/CIL (Theveneau, E., y col, 2010). En este caso, Rac1 permanecería inactivo en el contacto célula a célula, y activo en el borde libre de células (Theveneau, E., y col. 2010). Las células de la placoda, un tejido epitelial que contribuye a la formación de diferentes órganos sensoriales, son la fuente de Sdf1 *in vivo* y se ha descrito que estas células en conjunto con las CNC, presentan un

mecanismo llamado “Chase and Run”, donde las CNC son atraídas por las placodas vía quimiotaxis, y a su vez las células de las placodas las repelen moviéndose en dirección opuesta del contacto que establece con las células de la CNC (Szabó, A., y Mayor, R., 2015; Theveneau, E., y col., 2013). Los mecanismos responsables de este último comportamiento, son derivados de la activación de la vía PCP y de N-cadherina, las cuales inhiben las adhesiones focales en el contacto célula a célula, generando fuerzas asimétricas que permiten el movimiento del grupo completo de las placodas en dirección contraria de la unión (Theveneau, E., y col., 2013).

Dentro de las señales extracelulares que también se han descrito en *Xenopus*, se encuentran las efrinas (Figura I Ib), de las que existe evidencia que se expresan en la zona libre de crestas neurales permitiendo que las corrientes migratorias no se junten durante la migración, debido a que las células de la CNC expresan los receptores EphA4 y EphB1 que reconocen a estas moléculas (Helbling, P. M., y col., 1998; Smith, A., y col., 1997). Otra de las señales restrictivas que se han estudiado en la migración de las CN son las semaforinas (Figura I Ib), las cuales no se han descrito en CNC en *Xenopus*. Sin embargo, en otras especies como ratón y pollo su expresión se encuentra presente complementariamente con su ligando neuropilina-2, y ambos son importantes para la correcta migración de las CNC (Gammill, L. S., y col. 2008).

Aunque se encuentran descritos receptores de proteína G heterotrimérica (GPCR) participando activamente en la migración de las CNC, tales como CXCR4 y C3aR, se desconoce completamente la casacada de señalización, y por ende la familia de la proteína(s) G heterotrimérica(s) asociada(s) a este proceso. Es por esto, que este trabajo de tesis se enfocó en una de las posibles vías de señalización asociadas a la proteína G heterotrimerica.

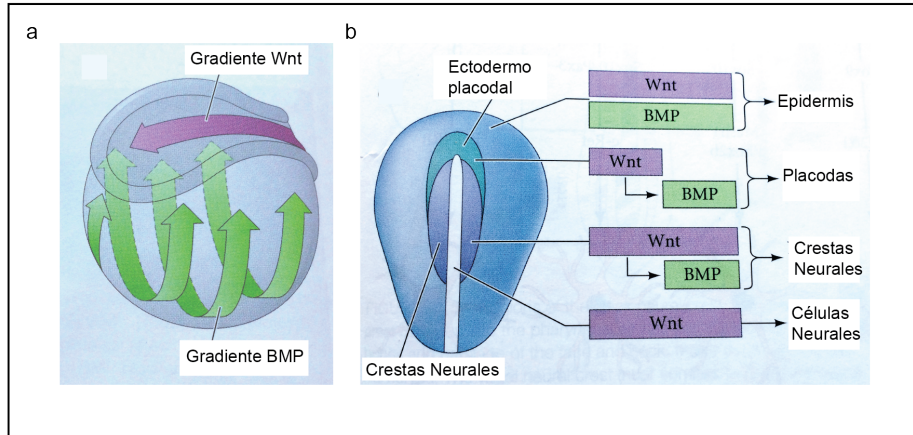


Figura I: La inducción de la crestas neural se lleva a cabo por gradientes de señalización que contribuyen también a la especificación del eje del embrión de *Xenopus*.

Se puede observar el gradiente producido por BMP y Wnt que especifica a la polaridad dorsal-ventral y posterior-anterior del embrión respectivamente (a). La cresta neural (morado) se induce en el borde de la placa neural (blanco), entre el ectodermo neural y el ectodermo no neural (azul), debido a un gradiente medio lateral de BMP y antero-posteriores de Wnt, FGF y RA (b). En la parte anterior del embrión además se induce un tejido llamado ectodermo placodal (calipso). Si las células del ectodermo reciben señales de BMP y Wnt por un periodo de tiempo extendido, las células se transforman en epidermis. En cambio, si Wnt induce la señalización de BMP y luego la primera señal es silenciada, las células se transforman en placodas. Por el contrario si Wnt induce BMP permaneciendo ambas activas, las células se transforman en CN. Si las células reciben sólo señal de Wnt se convierten en células neurales (Figura proveniente y adaptada desde Gilbert, S. F., 2013).

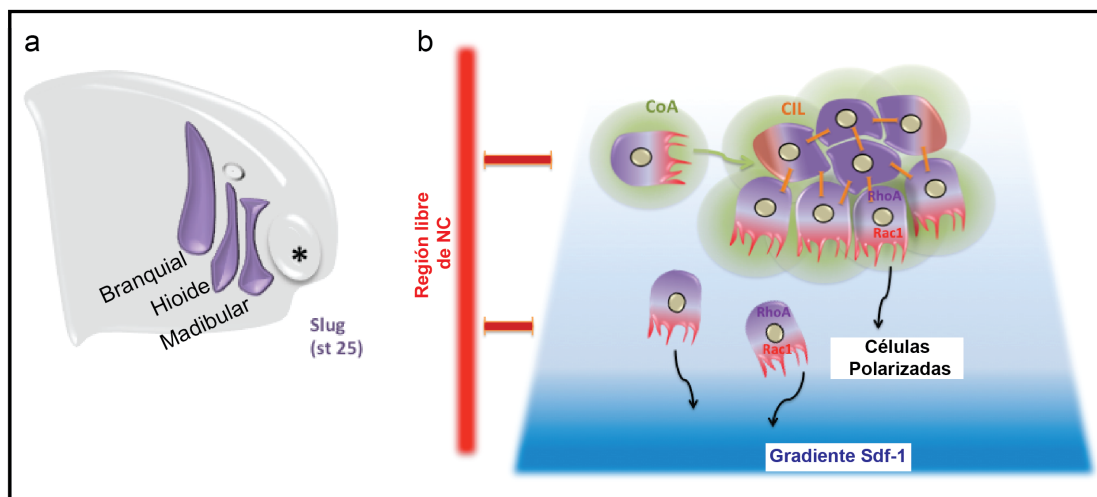


Figura II: La migración de las células de la cresta neural craneal ocurre de forma colectiva y direccionada debido a interacciones establecidas entre las células y señales externas.

Rutas de migración de las células de la CNC de *Xenopus*. Las células comienzan a migrar durante el estadio 19 al estadio 25. Se observan tres rutas migratorias llamadas corriente mandibular, hioide, y branquial separadas cada una de ellas por áreas libre de células de la cresta neural. Estas corrientes son claramente distinguibles empleando marcadores tales como *Snail2* (*Slug*) y *Twist* (a). Las células migran grupalmente y de forma direccionada (b). La población celular que se encuentra a los bordes del grupo celular muestran una clara polaridad con protrusiones orientadas hacia fuera del grupo, en sentido contrario a las células que se encuentran dentro del grupo celular. Los contactos celulares dentro del grupo presentan inhibición de la locomoción por contacto (CIL, flechas inhibitorias naranjas), lo que produce un colapso de las protrusiones vía RhoA (morado en la célula). Las células que se alejan del grupo celular son atraídas nuevamente debido a la co-atracción (CoA, flecha y círculos verdes). Existen señales inhibitorias en los tejidos adyacentes los que inducen el colapso de las protrusiones celulares (en rojo a la izquierda), mientras que el factor quimiotáctico Sdf1 (gradiente en azul) mantiene las protrusiones hacia la dirección de la señal mediante la activación de la proteína Rac-1 (rojo en la célula). Las moléculas atractantes estabilizan las protrusiones que se encuentran bien orientadas incrementando la actividad de Rac1, generando la direccionalidad del movimiento.

2.4) POLARIDAD CELULAR Y ADHESIONES A LA MATRIZ EXTRACELULAR MEDIADAS POR INTEGRINA DURANTE LA MIGRACIÓN CELULAR.

Una célula en migración, independiente del tipo celular que sea, requiere del establecimiento de una polaridad celular, de la formación de protrusiones en el borde director, del establecimiento de interacciones adhesivas con el sustrato y de la coordinada remodelación del citoesqueleto, procesos que se pueden ejecutar debido a la acción de algunos moduladores claves pertenecientes a la familia de las proteínas G pequeñas de la familia Rho (Ridley, A. J., y col, 2003). Dentro de esta familia, se ha descrito a Cdc42, el cual es un regulador maestro de la polaridad que recluta al complejo Par6/Par3/aPKC, encargado del establecimiento del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y del aparato de Golgi, frente al núcleo en dirección hacia al punto de migración (Etienne-Manneville, S., y Hall, A., 2003; Ridley, A. J., y col, 2003). De esta forma, Cdc42 promueve el crecimiento de los microtúbulos hacia la lamela, facilitando además la liberación de vesículas provenientes del Golgi hasta el borde director, trasladando proteínas requeridas en ese lugar para realizar una correcta migración celular (Etienne-Manneville, S., y Hall, A., 2003; Ridley, A. J., y col, 2003). Por otro lado, la activación de Rac, otra proteína G pequeña clave para la migración, está relacionada con la formación y la mantención de lamelipodias y “ruffles” de membrana, y activa diversas cascadas moleculares río abajo, estimulando a proteínas tales como WAVE y Arp2/3 entre otras, las que permiten y ayudan a la polimerización de actina en el borde director (Parri, M., y Chiarugi, P., 2010). Por otra parte, Rho activa principalmente a la proteína quinasa ROCK (“Rho-associated serine/threonine kinase”) la cual actúa sobre la fosforilación de la cadena liviana regulatoria de la miosina o RLC (“Regulatory Light Chain”), que controla de forma directa a las fibras de estrés dependientes de actomiosina, modulando la contracción celular y las adhesiones focales (Parri, M., y Chiarugi, P., 2010; Spiering, D., y Hodgson, L., 2011). Es importante destacar, que la señalización de las tres proteínas G pequeñas descritas se encuentran enlazadas y reguladas entre ellas. Es así como Cdc42 activa a Rac-1, y la activación de Rac suprime la actividad de Rho y viceversa (Spiering, D., y Hodgson, L., 2011). Clásicamente, se ha observado que Rac-1 se encuentra activada en el borde director y Rho-A en la parte posterior de la célula, pero recientemente otros estudios parecen indicar que no sólo están reguladas espacialmente, sino que también temporalmente en las regiones donde se lleva a cabo el reordenamiento del citoesqueleto, describiéndose, por ejemplo, la participación de RhoA en las protrusiones previo a la activación de Rac-1 (Machacek, M., y col., 2009).

Al igual que otros modelos celulares, las CNC están altamente polarizadas en dirección a la migración. La vía Wnt no canónica de la PCP ha sido descrita como modulador clave en la polaridad de las CNC, y es una de las rutas clásicas que establecen la orientación celular, modulando el citoesqueleto y la morfología para una correcta migración celular (Vladar, E. K., y col., 2009). Wnt11, ha sido descrito como un ligando relevante para esta ruta de señalización; es expresado en células

adyacentes a las CNC, y la deslocalización de esta señal inhibe la migración de las CN, demostrándose que la vía Wnt no canónica afecta directamente la formación de lamelipodias y filopodias necesarias para una correcta migración (De Calisto, J., y col., 2005). Dentro del mismo contexto, otra proteína involucrada en polaridad, como Par3, ha sido estudiada en *Xenopus*, la cual a diferencia de lo que ocurre en otros modelos celulares, regula negativamente a Rac-1 en el contacto célula a célula, inhibiendo al GEF Trio y promoviendo el colapso de los microtúbulos, contribuyendo de esta forma al mecanismo de CIL en las CNC (Moore, R., y col. 2013).

Una vez que las células se encuentran polarizadas durante la migración, comienzan a producir protrusiones, las cuales son dependientes de estructuras formadas en las lamelipodias y filopodias llamadas adhesiones focales. Cuando las protrusiones se extienden, los receptores de adhesión, tales como las integrinas o sindecanos, entran en contacto con ligandos presentes en la matriz extracelular, promoviendo la activación de una cascada intracelular que permite el reclutamiento de proteínas adaptadoras que se unen con elementos del citoesqueleto de actina (Parri, M., y Chiarugi, P., 2010). En los estadios tempranos de adhesión se han caracterizado pequeñas adhesiones nacientes que se forman detrás del borde director de las células en migración, las que pueden madurar para convertirse en complejos focales, las cuales son mucho más grandes y estables que las estructuras previas. Los complejos focales son prominentes en células que presentan una alta actividad de Rac1 y una baja actividad de RhoA (Lawson, C. D., y Burridge, K., y col., 2014). Posteriormente, en estadios tardíos de adhesión, estas estructuras vuelven a evolucionar a adhesiones focales maduras, las que presentan un mayor tamaño y son más estables que las anteriores, anclándose a fibras de estrés, proceso que es inducido por la activación de RhoA (Figura III) (Lawson, C. D., y Burridge, K., y col., 2014). La activación de las Rho GTPasas en el mecanismo de adhesión involucra una serie de interacciones moleculares con las integrinas y con la familia de las quinasas Src, entre otras proteínas. La activación espacio temporal de diferentes proteínas con actividad GAP (“GTPase Activating Protein”) y GEF (“Guanine Nucleotide Exchanging Factor”) para las GTPasas pequeñas permiten el ensamblaje y desensamblaje de estas estructuras, regulación que hasta el momento no se encuentra completamente dilucidada (Parsons, J. T., y col., 2010). Diversas proteínas adaptadoras se fosforilan permitiendo la unión entre la matriz extracelular e integrinas con el citoesqueleto de actina (Parsons, J. T., y col., 2010). Las integrinas no poseen dominio catalítico, pero pueden reclutar y activar río abajo de su señalización a proteínas no-receptoras con actividad tirosina-quinasa, las que fosforilan a proteínas adaptadoras. Las proteínas FAK (“Focal Adhesion Kinase”) y Src son activadas posterior al reclutamiento de integrinas en las nuevas adhesiones focales, donde un cambio conformacional permite la auto-fosforilación de FAK, reclutando a Src, la cual media una nueva fosforilación de FAK, y además de paxilina, así como también de otras proteínas moduladoras de la adhesión (Parsons, J. T., y col., 2010).

En las CNC de *Xenopus*, poco se ha estudiado sobre las adhesiones focales durante la migración celular. Se conoce que las CNC durante la migración expresan a las subunidades de integrina $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV y $\beta 1$ (McKeown, S. J., y col., 2013), pero no existen estudios referentes a su señalización. Sin embargo, otra familia de receptores de la matriz extracelular, como es Sindecano-4, ha sido descrita participando en la migración de las CNC. Sindecano-4 controla la migración direccionada, regulando la orientación de las protrusiones y la polarización de la célula, similar a lo observado por la vía Wnt no canónica descrita anteriormente, pero esta vez inhibiendo la función de la proteína G pequeña Rac-1 (Matthews, H. K., y col, 2008).

Por otro lado, estudios recientes sugieren que N-cadherina interfiere con la maduración de las adhesiones focales, la cual inhibe localmente la adhesión a la matriz extracelular y la maduración de las adhesiones focales, debido a que estas se reducen en tamaño pero aparentemente no reducen su cantidad. Este fenómeno se puede observar tanto en la unión entre células de la placoda, entre células de la CNC, y entre células de las CNC-placodas (Theveneau, E., y col, 2013).

Considerando que la formación y regulación de las adhesiones focales es fundamental para los procesos migratorios de diferentes tipos celulares, es importante entender y conocer en mayor medida el mecanismo de regulación de estas para la estabilización de las protrusiones y otras funciones en la cual estas estructuras se encuentran involucradas. Aunque se encuentran descritos múltiples mecanismos por el cual las CNC migran durante el desarrollo embrionario, las rutas de señalización que regulan la formación y/o estabilización de las adhesiones focales no se encuentra completamente dilucidadas, por lo cual resulta interesante indagar al respecto y se planteó como uno de los objetivos de este trabajo de tesis.

3) PROTEÍNA G HETEROTRIMÉRICA

3.1) PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA G HETEROTRIMÉRICA DURANTE LA MIGRACIÓN CELULAR

Diferentes modelos celulares, distintos a las CNC, se han utilizado para estudiar los diversos mecanismos y rutas de transducción de señales que permiten llevar a cabo una correcta migración celular, dentro de las cuales se ha descrito la participación de miembros de la familia de la proteína G heterotrimérica y sus múltiples proteínas accesorias dependientes de esta señalización.

Se han descrito varios ejemplos donde los GPCRs (“G protein-coupled receptors”) actúan como quimiorreceptores en una amplia variedad celular, promoviendo la reorganización del citoesqueleto de actina y modulando la movilidad celular (Cotton, M., y Claing, A., 2009; Xu X. y Jin T., 2012; Yan, J., y Jin, T. 2012). Por ejemplo, como se mencionó anteriormente tanto C3aR (Receptor de C3a) como CXCR4 (receptor de Sdf1) son miembros de los GPCRs, que han sido

descritos participando en la migración de las CNC. Sin embargo, la(s) proteína(s) G asociada(s) a estos receptores no ha(n) sido descrita(s) (Carmona-Fontaine, C., y col., 2008; Carmona-Fontaine, C., y col., 2011). En otros tipos celulares, la desregulación de estos receptores se ha asociado con varias patologías incluyendo la inflamación crónica, la progresión metastásica y la angiogénesis aberrante durante la progresión tumorigénica (Cotton, M., y Claing, A., 2009). Por ejemplo, CXCR4, cumple un rol importante durante el desarrollo, así como también en la hematopoyesis y en la organización del sistema inmune, observándose además el importante papel que juega en diferentes tipos de cáncer (Cotton, M., y Claing, A., 2009; Kamps, A. R., y Coffman, C. R., 2005; Xu, C., y col., 2015), no obstante, en varios de estos ejemplos se desconoce la proteína G heterotrimérica involucrada.

Como se mencionó, múltiples estudios han relacionado a los miembros de las 4 familias de las proteínas G heterotriméricas (Gs, Gi/o, Gq/11 y G12/13) con la migración celular, donde los efectores de las diferentes cascadas de señalización activan a diversos miembros de las proteínas G pequeñas de la familia Rho, incidiendo directamente en el citoesqueleto (Cotton, M., y Claing, A., 2009). Una de las familias ampliamente estudiadas durante la migración es la G α 12/13 y fue una de las primeras descubiertas participando en movimientos celulares durante el desarrollo embrionario (Kelly, P., y col., 2007). Estudios en *Drosophila*, indican que la señalización del homólogo G α 12/13, concertina, regula los cambios morfológicos de las células que sufren internalización durante la gastrulación (Parks, S., y Wieschaus, E., 1991). Así también, G α 12/13 ha sido estudiada durante la gastrulación de *Danio rerio*, observándose su participación en los movimientos de conversión-extensión y en epibolia, donde en este último proceso se ha encontrado regulando al citoesqueleto de actina a través de la vía de RhoGEF/Rho y además asociándose en parte con el dominio citoplasmático de E-cadherina, inhibiendo su actividad y la adhesión celular (Lin, F., y col., 2005; Lin, F., y col., 2009). Otros estudios han revelado la participación de la familia G α 12/13 en la migración de linfocitos (Gräler, M. H., y col., 2003), neutrófilos (Xu, J., y col., 2003), y cultivos fibroblásticos embrionarios (Offermanns, S., y col., 1997), en ensayos de quimiotaxis realizados en respuestas a diversos ligando. Además se ha involucrado a la señalización de G α 12/13 promoviendo la invasión en cáncer de próstata (Kelly, P. Y col., 2006), mama (Kelly, P. Y col., 2006b) y ovario (Bian, D., y col., 2006) entre otros, todos ellos involucrando la activación de Rho.

Durante los últimos 30 años, también se ha estudiado a la familia G α i/G α o durante la migración usando la toxina pertussis (Ptx), la cual ADP-ribosila a estas proteínas, desacoplándolas de sus receptores. Se ha observado su participación en el movimiento quimiotáctico requerido por diversas células del sistema inmune (Boullaran, C., y Kehrl, J. H., 2014; Chaffin, K. E., y Perlmutter, R. M., 1991; Gräler, M. H., y col., 2003; Han, S.-B., y col., 2005; Spangrude, G. J., y col., 1985). Por otro lado, se ha asociado a G α i2 con la polarización normal en respuesta a quimioattractantes, paso necesario para la reorganización del citoesqueleto durante la migración de los macrófagos (Wiege,

K., 2012). Además, durante la embriogénesis se ha demostrado que la toxina Ptx afecta los movimientos de gastrulación en *Xenopus*, (Winklbauer, y col., 2001). Al igual que para la familia de $G\alpha_{12/13}$, Gai ha sido caracterizada en procesos cancerosos, donde se ha visto asociada al complejo CXCR4/Sdf1 induciendo la migración celular direccional y provocando metástasis espontáneas vía mTORC1 (Dillenburg-Pilla, P., y col. 2015). Una novedosa técnica de estudio fue desarrollada recientemente, donde se corroboró a través de optogenética (inhibiendo de forma localizada la función de Gai) que la influencia de $G\alpha_i/G\beta\gamma$ y su gradiente intracelular es suficiente para generar migración celular direccionada (O'Neill, P. R., y Gautam, N., 2014). La mayoría de las señalizaciones descritas para Gai durante la migración celular están mediadas principalmente por la subunidad $G\beta\gamma$ activando a sus efectores, tales como la vía PLC (fosfolipasa C), PI3K (fosfoinositol 3 quinasa) y Rac-GEFs (Wettschureck, N., y Offermanns, S., 2005). Durante la gastrulación en *Xenopus*, adicionalmente a lo descrito anteriormente, se ha demostrado que $G\beta\gamma$ se encuentra río abajo de Wnt/Xfz7, regulando la actividad de Cdc42 (Penzo-Mendèz, A., y col., 2003), sugiriendo nuevamente la participación de la proteína G durante este proceso.

A su vez, tanto la familia de $G\alpha_s$ como $G\alpha_q$ han sido estudiadas durante la migración celular principalmente en células del sistema inmune, señalización que es dependiente de cAMP y de PLC respectivamente (Boullaran, C., y Kehrl, J. H., 2014; Cotton, M., y Claing, A., 2009). Es así como por ejemplo, en células endoteliales provenientes de vena del cordón umbilical (HUVECs), al ser estimuladas por oxitocina, aumentan su migración e invasión involucrando la activación de la vía $G\alpha_q/PLC$ (Cattaneo, M. G., y col. 2008).

La mayoría de los estudios de la señalización vía proteína G heterotrimérica, se han centrado durante la migración en los eventos de gastrulación (Malbon, C. C., 2005). Sin embargo, considerando que el desarrollo embrionario es un proceso altamente dinámico, y que por ende los movimientos celulares son claves para llevar a cabo los diferentes procesos requeridos para la formación completa de un organismo adulto, no se ha indagado lo suficiente para entender la función de las proteínas G heterotriméricas en estos procesos. Además, se conoce a varios receptores de la familia de los GPCR asociados a múltiples eventos durante el desarrollo embrionario, por lo cual se hace evidente reconsiderar el estudio de las proteínas G heterotriméricas durante la embriogénesis, y establecer los mecanismos moleculares que estas proteínas emplean durante el proceso de migración celular. Por este motivo, este trabajo de tesis se centra en indagar acerca del rol que la proteína G heterotrimérica ejerce sobre la migración de las células de la CNC en conjunto a Ric-8A.

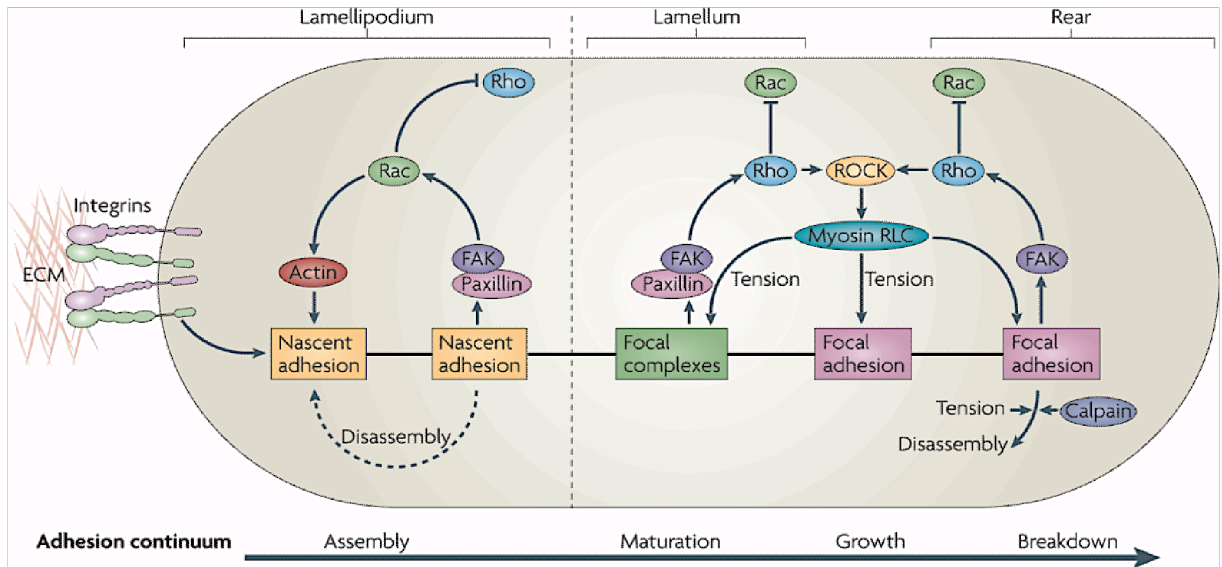


Figura III: Maduración de las adhesiones focales y activación de las proteínas Rho GTPasas.

La formación y el desensamblaje de las adhesiones nacientes están acopladas y relacionadas con el movimiento dirigido hacia delante por la lamelipodia. La maduración de las adhesiones focales es dependiente de la actomiosina en la lamela, donde las adhesiones crecen y son más grandes en comparación a las primeras estructuras. La nueva adhesión formada involucra la señalización y fosforilación de proteínas de andamiaje como paxilina y FAK, señal que desencadena finalmente la activación de Rac. En la lamela, la maduración de la adhesión es acompañada por la activación localizada de Rho, probablemente por el reclutamiento inducido por FAK de proteínas GEF y GAP para proteínas G pequeñas. La activación de Rho sostiene el compromiso de miosina II a través de la acción de ROCK, la cual controla las quinasas y fosfatasas que regulan a la fosforilación de la cadena RLC de la miosina. La miosina II genera la tensión sostenida por la maduración de la adhesión focal debido al entrecruzamiento producido por varias proteínas adaptadoras. Finalmente, el desensamblaje de las adhesiones focales en el lado posterior de la células es dependiente de Rho-GTPasas y miosina II, y también involucra a proteasas como calpaina (Parsons, J. T., y col., 2010).

3.2) REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA G HETEROTRIMÉRICA

Se han descrito diversos componentes que participan en la activación de las proteínas G heterotriméricas involucrados tanto en migración como en otros procesos celulares. La vía clásica de señalización propone que las proteínas G heterotriméricas se encuentran acopladas a receptores de membrana (GPCRs) los cuales son activados por ligandos específicos. Una vez que se activa el receptor, provoca un cambio conformacional sobre la proteína G, induciendo el intercambio de GDP por GTP de la subunidad $G\alpha$, disociándola del heterodímero $\beta\gamma$. Debido a la propiedad antes mencionada, el receptor actuaría como un GEF para la proteína G, activando al “switch” biológico desde un estado inactivo a otro activo (Oldham, W. M., y Hamm, H. E., 2008; Tesmer J., 2010). Las subunidades $G\alpha$ y $\beta\gamma$ disociadas activan a diversos efectores, como adenilciclasas, quinasas, fosfolipasa C, canales iónicos, entre otros, generando segundos mensajeros capaces de amplificar las señales producidas. Luego, debido a la actividad GTPásica intrínseca de la subunidad $G\alpha$, se produce la hidrólisis de GTP a GDP, lo que conduce a la inactivación de la subunidad $G\alpha$, por un cambio conformacional que provoca la re-asociación con el heterodímero $\beta\gamma$, dejando a la proteína G en su estado inactivo (Oldham W. M., 2006; Tesmer J., 2010).

Existen otras proteínas anexas regulando el estado “ON/OFF” de la subunidad $G\alpha$. Dentro de estas proteínas, existen proteínas con actividad GAP, que aceleran la hidrólisis del GTP en la subunidad $G\alpha$, y proteínas con actividad GDI (“Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors”) que inhiben la disociación de GDP desde la subunidad $G\alpha$ (Hinrichs, M. V., y col., 2012; Wilkie, T. M., y Kinch, L., 2005). Por otro lado, durante estos últimos años se han descrito a otros activadores de la proteína G heterotrimérica independientes a los GPCRs, activando a la señalización de forma no canónica, dentro de los cuales se encuentra Ric-8.

4) RIC-8

En mamíferos, existen dos parálogos homólogos al gen de Ric-8 descrito inicialmente en *C. elegans*, llamados Ric-8A y Ric-8B, diferenciándose entre ellos según la subunidad $G\alpha$ a la que regulan, cuando esta se encuentra disociada de la subunidad $\beta\gamma$ (Tall, G. G., y col., 2003). Ric-8A tiene especificidad y actúa como GEF sobre Gai , Gaq , Gao , $G\alpha13$ pero no Gas (Tall, G. G., y col., 2003). Por otro lado, Ric-8B interacciona y tiene actividad GEF para Gaq , Gas , $G\alpha13$, pero no para Gai/Gao (Chan, P., y col., 2011). Ambas Ric-8 participan en la amplificación de la señal de las diversas subunidades $G\alpha$ y se unen preferentemente a la $G\alpha$ que se encuentra en su estado unido a GDP promoviendo su disociación para dejarlo en un complejo de transición libre de nucleótidos (Tall, G. G., y col., 2003). Además, recientemente se ha descrito que Ric-8 también actuaría como chaperona sobre las subunidades $G\alpha$ nacientes, regulando su abundancia y función, participando directamente en el plegamiento de las proteínas post-traduccionalmente (Chan, P., y col., 2013;

Gabay, M., y col., 2011). En relación a esta función, se ha descrito que los niveles de Gai2 y Gaq son regulados a través de sistema de degradación ubiquitina-proteosoma, degradación que se ve disminuida cuando las subunidades $G\alpha$ se encuentran interaccionando con Ric-8A (Chishiki, K., y col., 2013). Además de su función molecular como chaperona, se han descrito funciones anexas para Ric-8, relacionadas con la polaridad celular y siendo descrita como una proteína clave durante la embriogénesis en diversos organismos.

4.1) RIC-8 Y POLARIDAD CELULAR

Ric-8 es una proteína citoplasmática de 63kDa, altamente conservada entre vertebrados e invertebrados, y como se mencionó anteriormente, participa activando a la subunidad $G\alpha$ de las proteínas G heterotriméricas. Esta proteína fue descubierta en estudios realizados en *C. elegans*, donde mutantes para Ric-8 sobrevivieron a los efectos neurotóxicos del inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (Aldicarb), debido a que estos presentaban defectos en la formación de vesículas sinápticas (Miller, K. G., y col., 1996; Miller, K. G., y col., 2000a).

Se ha descrito a Ric-8 involucrada en la división celular asimétrica del cigoto de *C. elegans* y de los neuroblastos y células precursoras de órganos sensoriales de *Drosophila* (Miller, K. G., y Rand, J. B. 2000; Wang, H., y col., 2005; Wilkie, T. M., y Kinch, L., 2005). Diversos estudios han demostrado que el posicionamiento del huso mitótico durante la división asimétrica es regulado de forma no canónica por la proteína G. Esta vía de señalización es independiente de receptores GPCR y es activada por dos tipos de proteínas de unión, una con función GDI, otorgada por motivos Goloco presentes en la proteína (GPR1/2 en *C. elegans* y Pins en *Drosophila*), y Ric-8 que actúa como GEF sobre la subunidad Gai/o (Hinrichs, M. V., y col., 2012; Miller, K. G., y Rand, J. B. 2000; Wang, H., y col., 2005).

La división celular asimétrica es un proceso crucial durante el desarrollo, debido a que permite generar la diversidad de células necesarias para poder formar un organismo. Durante la división celular asimétrica de una célula progenitora, es necesario que la célula se encuentre polarizada permitiendo que los determinantes celulares queden bien distribuidos en cada célula hija. Las proteínas Par (“Partition defective”), que fueron mencionadas en la sección anterior, son necesarias para la división celular asimétrica, regulando el posicionamiento de diversas proteínas que permiten la correcta orientación del huso mitótico durante la división celular. Las proteínas Par son las responsables de la polarización del cigoto de *C. elegans*, se encuentran acopladas a proteínas que regulan el posicionamiento de los centrosomas y rotan al huso mitótico, donde también encontramos otras proteínas como Ric-8. Además, las proteínas Par especifican la polaridad apicobasal de las células epiteliales, orientan la migración celular, participan en la polaridad celular planar y en la especificación neural (Macara, I. G., 2004). Para el caso de la migración celular se ha evidenciado la

participación de las proteínas Par en diferentes sistemas celulares, demostrando la importancia de la polaridad durante el movimiento celular (Dow L., Humbert P., 2007). En *C. elegans*, durante la división celular asimétrica Par3, Par6 y aPKC se localizan en la zona anterior del cigoto, donde la célula hija generada conserva la identidad de la célula madre, mientras Par1 y Par2 están en la parte posterior, junto al complejo de proteínas compuestos por Ric-8, la subunidad $G\alpha$ -GDP, GPR1/GPR2 (G-protein regulator-1) y Lin-5. Esta última corresponde a la proteína efectora de este proceso que regula el posicionamiento del centrosoma a través de los microtúbulos (Wilkie y Kinch, 2005). Por otro lado, en la división celular asimétrica de *Drosophila*, Ric-8 interacciona con el complejo de proteínas $G\alpha$ i-GDP-Pins-Mud, el que es reclutado hacia la zona apical por Par-3/6-aPKC, a través de una proteína adaptadora llamada Insc (Inscuteable) reteniendo la identidad del neuroblasto, y de forma similar a *C. elegans* a través de su efector Mud (Bellaiche, Y., y Gotta, M., 2005; Betschinger, J., y Knoblich, J. A. 2004; Siller, K. H., y Doe, C. Q. 2009). Así mismo, se ha observado en mamífero que Ric-8A en conjunto con $G\alpha$ i reclutan a LGN (la cual posee dominios GoLoco), a Numa (proteína efectora) y a Dineína hacia la corteza celular, ayudando a la orientación del huso mitótico durante la división celular (Woodard, G. E., y col., 2010).

Recientemente se ha descrito que Ric-8A se expresa en el oocito de ratón (Saare, M., y col., 2015), lo cual concuerda con estudios previos donde se ha involucrado a Ric-8 en el arresto miótico del oocito de *X. laevis* (Romo, X., y col., 2008). Durante la maduración del oocito, la localización de Ric-8A es dependiente de la fase del ciclo celular en la cual se encuentra, y se asocia a la cromatina y al huso mitótico en estadios más avanzados de oogenesis (Saare, M., y col., 2015). Por otro lado, después de la fertilización, la localización de Ric-8A converge con los pronúcleos, para luego localizarse en el huso mitótico y en la corteza celular durante la primera división, colocalizando con $G\alpha$ i1-GDP/ $G\alpha$ i2-GDP, y LGN (Saare, M., y col., 2015).

Complementando lo antes descrito, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el silenciamiento de Ric-8A afecta la polaridad celular en estadio de blástula durante el desarrollo embrionario de *Xenopus tropicalis* (Arriagada C., 2012).

Debido a que los complejos proteicos que se requieren en el establecimiento de la polaridad en una célula durante la división asimétrica son prácticamente idénticos que los requeridos en la células durante la migración para establecer el patrón antero-posterior, resulta fundamental estudiar a Ric-8A, proteína que es necesaria para la asimetría celular, en la migración celular.

4.2) RIC-8A DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS

Además de lo descrito durante la división celular asimétrica, los primeros estudios abordados en *C. elegans* mostraron la expresión de Ric-8 en el sistema nervioso, incluyendo la cadena nerviosa ventral y ganglios cerebrales de anélidos juveniles y adultos (Miller, K. G., y col., 2000a).

Recientemente, estudios realizados en *Drosophila* demostraron que la organización de la actina cortical, esencial para la constricción requerida durante la gastrulación, requiere de la participación de Ric-8, además de las proteínas G heterotriméricas, donde la mutación de cualquiera de estas proteínas produce protrusiones esféricas de la membrana plasmática o “blebs” (Kanesaki, T., y col., 2013). Incluso, análisis realizados en el mismo modelo, demuestran que Ric-8 en conjunto a $G\alpha_{12/13}$ actúan en la misma vía de señalización de Fog (“Folded gastrulation”), señal que es requerida para la constricción apical de las células durante la gastrulación para la formación del surco ventral (Peters, K. A., y Rogers, S. L., 2013).

Estudios realizados en ratón demostraron que Ric-8A posee una expresión neural en estadios de organogénesis, expresándose en el ganglio craneal, en el tubo neural, ganglio de la raíz dorsal y cerebro en desarrollo, entre otras estructuras del sistema nervioso. Además la expresión de Ric-8A también está presente en varias regiones cerebrales de individuos adultos (Tönissoo, T., y col., 2003). Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que la presencia del transcrito de Ric-8A es dinámica a lo largo del desarrollo de *Xenopus*, y similar a lo observado en ratón, su expresión está restringida a tejidos neurales, tales como el cerebro en desarrollo, tubo neural, vesícula ótica, tejido ocular y tejidos derivados de cresta neural, como el tejido craneofacial (Maldonado-Agurto, R., y col., 2011) (Figura IV). Por otro lado, ratones homocigotos (-/-) para el gen *ric-8A* no son viables, alcanzando sólo al estadio de gástrula, muriendo en estadios cercanos a E6.5-E8.5 (Tönissoo, T., y col., 2010). Resultados similares obtuvo el grupo de Gabay M. el año 2011, donde corroboran que tanto ratones homocigotos (-/-) para *ric-8A* como para *ric-8B* no son viables, los cuales mueren durante la embriogénesis temprana antes del estadio E8.5 (Gabay, M., y col., 2011). Estudios del fenotipo obtenido para *ric-8A* (-/-) demuestran un retraso en el crecimiento del embrión y una desorganización del epiblasto y del mesodermo, demostrando que Ric-8A es una proteína fundamental para la correcta gastrulación del embrión de ratón (Tönissoo, T., y col., 2010). Para evitar la letalidad asociada a Ric-8A y la posibilidad de estudiar la función del gen en estadios más tardíos del desarrollo, se empleó a ratones “knock-out” transgénicos Cre/loxP, utilizando al promotor de sinapsina I sobre la regulación de Cre, para indagar sobre la función de Ric-8A en el sistema nervioso. Ratones *SynCre^{+/+}Ric8lac^{Z/F}* mueren a los estadios posnatales P4-P6, los cuales presentan defectos en el desarrollo neuromuscular, retraso en el crecimiento, debilidad muscular, problemas de coordinación y equilibrio, espasmos musculares y latidos anormales del corazón, defectos asociados con una atrofia del músculo esquelético e hipoplasia del músculo cardíaco (Ruisu, K., y col., 2013).

Por otro lado, resultados no publicados de nuestro laboratorio estudiando la pérdida de función de Ric-8A en estadios tempranos de desarrollo de *Xenopus tropicalis*, también muestran que el embrión sufre un retardo en el desarrollo con problemas a nivel de la gástrula, produciéndose una

exogastrulación, atribuible a un defecto en la migración de las células durante esta etapa (Maldonado-Agurto, 2010 tesis magister).

Con estos antecedentes se puede establecer la importancia que tiene Ric-8 durante la embriogénesis, por lo que resulta necesario el estudio más acabado e indagar sobre las distintas funciones y los mecanismos por el cual participa en diversos eventos durante el desarrollo embrionario.

4.3) RIC-8A EN LA MIGRACIÓN CELULAR

Pocos estudios han relacionado a Ric-8 con la migración celular, considerando los múltiples trabajos que se han realizado estudiando a la proteína G heterotrimérica en este proceso. Se ha vinculado a Ric-8A con la vía de señalización no-canónica de $G\alpha_{13}$, participando en la migración de células MEF (“mouse embryonic fibroblast”) dependiente de receptores para factores de crecimiento tirosina quinasa, conectando ambas vías de señalización. En este estudio se observó que al silenciar a Ric-8A, $G\alpha_{13}$ no transloca a la membrana en células previamente inducidas con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y que además estas afectan el citoesqueleto de actina, causando defectos en la migración celular (Wang, L., y col., 2011). El mismo grupo de investigación recientemente describió que PDGF puede inducir la fosforilación de Ric-8A, la cual es dependiente de $pPKC\lambda$, proteína que además es requerida para la correcta migración celular (Xing, B., y col., 2013).

Recientemente, se ha descrito que Ric-8A es fundamental para mantener los niveles normales de diferentes subtipos de $G\alpha$ en linfocitos B, donde además se describió que Ric-8A es necesario para la diferenciación, el tráfico, y respuesta humoral de este tipo celular. En este estudio células $ric8^{fl/fl} mb1-cre$ B (transgénico que sólo silencia a Ric-8A en las células B de la médula ósea) exhiben una deficiente respuesta de quimiotaxia, además de una pérdida de componentes polares durante la diferenciación de este tipo celular (Boullaran, C., y col., 2015).

En nuestro laboratorio, además de la descripción del patrón de expresión y los ensayos de pérdida de función de Ric-8A durante la embriogénesis de *Xenopus*, se ha estudiado la participación de Ric-8A en la migración de las células de la CNC. Ensayos realizados *in vivo* e *in vitro*, demostraron que el silenciamiento de Ric-8A, mediante el uso de un morfolino específico, afecta la migración de las células de la cresta neural craneal (Fuentealba, J. y col., 2013). Además, las células morfantes para Ric-8A no responden a la quimiotaxia dependiente de Sdf1 (vía CXCR4), las que pueden recuperar su capacidad migratoria en ensayos de rescate. También en nuestro estudio se comprobó que las células morfantes para Ric-8A tienen problemas de adhesión a la matriz extracelular presentando menos adhesiones focales que las células control, sugiriendo la posible participación de Ric-8A en la remodelación del citoesqueleto de actina vinculada con la formación de adhesiones focales (Fuentealba, J. y col., 2013). Apoyando nuestros resultados, estudios realizados sobre células del

cerebelo en ratón, demuestran que la ausencia de Ric-8A compromete la correcta migración de las células granulosas presentes en la glía de Bergmann, conduciendo a una disminución en su afinidad con la membrana basal. Además, ensayos *in vivo* demuestran que las malformaciones generadas sobre el cerebelo en desarrollo de ratones deficientes en Ric-8A son similares a ratones mutantes para integrina $\beta 1$, proteína que como ya describimos cumple un papel importante en la adhesión de las células a la matriz extracelular (Ma, S., y col., 2012).

5) CONTEXTO TRABAJO DE TESIS

La migración celular cumple un rol fundamental durante la embriogénesis. El comportamiento que involucra la dinámica y la morfología celular durante la migración requiere de una fina regulación de un conjunto de moléculas involucradas en este proceso. Las células de la CN de *Xenopus*, son un excelente ejemplo de este tipo de migración ya que son una población de células que migran en forma direccionada y coordinada *in vivo*. Algunas de las proteínas involucradas en este comportamiento han sido discutidas en esta sección, entre ellas Ric-8A y GPCRs, las cuales son expresadas en estas células y cumplen una rol fundamental durante la migración, tanto en las CNC, como en otros tipos celulares. Sin embargo, poco se sabe del mecanismo a través del cual Ric-8A y la proteína G participan en este proceso. Por lo tanto, en este trabajo de tesis, se propuso como objetivo indagar sobre la función y el mecanismo a través del cual Ric-8A actúa durante la migración de las CNC, proponiendo como principal candidato en la señalización a $G\alpha 13$, debido a que es una proteína que ha sido descrita en múltiples eventos migratorios. A través de ensayos *in vivo* e *in vitro* se investigó como Ric-8-A y $G\alpha 13$ regulan la direccionalidad, formación de protrusiones e interacción de la célula a la matriz extracelular, y en consecuencia, como ambas proteínas regulan la dinámica y la morfología de las células de la CNC durante la migración.

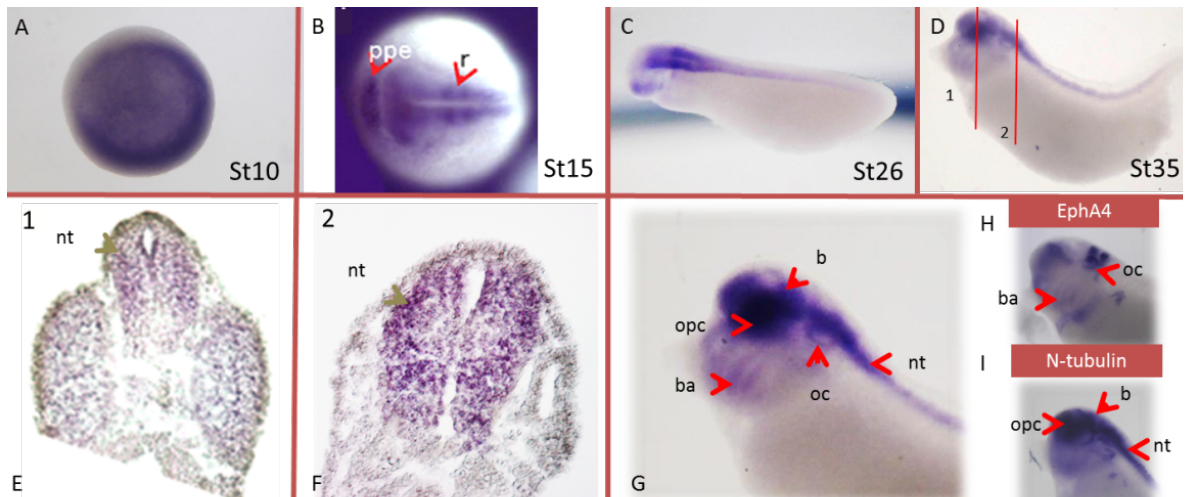


Figura IV: Patrón de expresión de Ric-8A durante el desarrollo embrionario de *Xenopus tropicalis*.

Hibridación *in situ* utilizando una sonda contra Ric-8A en diferentes estadios de desarrollo para evaluar la presencia del transcrito. Estadio 10 (A), estadio 15 (B), estadio 26(C) y estadio 35 (D). E y F corresponden a secciones transversales de D, las líneas rojas muestran la posición de cada sección. G corresponde a una magnificación de D de la zona rostral del embrión en estadio 35. Comparación de la expresión con EphA4 (H) y N-tubulina (I). Ppe (ectodermo preplacodal), r (rombomeros), nt (tubo neural), opc (tejido óptico), b (cerebro), oc (vesícula ótica), ba (arcos branquiales) (modificado de Maldonado-Agurto R., y col., 2011).

II) HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

“Ric-8A, a través de la subunidad $G\alpha 13$, regula la polaridad y las propiedades de adhesión a la matriz extracelular durante la migración de las células de la cresta neural craneal de *Xenopus*”

Para responder a esta hipótesis se propone como objetivo general:

“Estudiar cómo Ric-8A y la subunidad $G\alpha 13$ de la proteína G heterotrimérica afectan la morfología celular y modulan la polaridad durante el proceso de migración de las células de la cresta neural craneal de *Xenopus*”

Con el fin de poder responder al objetivo general hemos establecido tres objetivos específicos:

- 1. Estudiar la función de Ric-8A durante la migración de la cresta neural craneal en *Xenopus* y analizar si esta función está mediada por la subunidad de la proteína G heterotrimérica $G\alpha 13$.**
- 2. Estudiar la función de Ric-8A y la subunidad $G\alpha 13$ sobre la morfología celular y en el establecimiento de las adhesiones focales durante la migración de las células de la cresta neural craneal de *Xenopus*.**
- 3. Analizar la función de Ric-8A y $G\alpha 13$ sobre la polaridad celular durante la migración de las células de la cresta neural craneal de *Xenopus*.**

III) MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES:

Plásmidos:

- pcs2+6myc-XtRic-8A
- pcs2+6myc-XtGα13
- pSP72-slug
- pBSK-twist
- pcs2+H2B-cherry
- pcs2+H2B-GFP
- pcs2+lifeActRFP
- pcDNA/His-XtGα13
- ha-hGα13
- ha-hGα13QL
- pcs2+FAK-GFP
- pcs2+SrcY527F (Constitutivamente activa)



Morfolinos:

Ric-8AMO: 5'-GAGGGTACCCGGATCCATGGCTGGC-3'

Gα13MO: 5'-GCAGGAAGTCCGCCATCTTACACAC-3'

ControlMO: 5' CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'

Anticuerpos y fluoróforos:

(I: Inmunofluorescencia; WB: “Western Blot”; IS: Hibridación *in situ*)

Fluoresceína, Life Technologies

Rodamina dextran, Life Technologies

Anti-Digoxigenina AP Fab fragments, Roche (IS:1:3000)

Anti-cMyc (9E10)sc-40, Santa Cruz. (I:1:200; WB: 1:5000)
Anti- G α 13 (A-20) sc-410, Santa Cruz.(I:1/20; WB:1:500)
Anti-PKC ξ (c-20) sc-216, Santa Cruz. (I:1:5)
Anti-6His Monoclonal #631212, Clontech. (WB: 1:500)
Anti-GAPDH (1D4), Novus Biologicals. (WB: 1:1000)
Anti-GFP (B-2) sc-9996, Santa cruz. (WB: 1:1000)
Anti- α tubulina T9026, Sigma-Aldrich. (WB: 1:5000)
Anti-paxilina (pY118), Invitrogen. (I:1:20)
Anti mouse Alexa fluor 488, Life Technologies.(I: 1:200)
Anti mouse Alexa fluor 546, Life Technologies. (I: 1:200)
Anti rabbit Alexa fluor 488, Life Technologies. (I: 1:200)
Anti rabbit Alexa fluor 546, Life Technologies. (I: 1:200)
Anti rabbit Alexa fluor 647, Jackson Immunoresearch. (I: 1:200)
Anticuerpo normal mouse IgG sc-2025, Santa Cruz.
Anticuerpo normal rabbit IgG sc-2027, Santa Cruz.
Faloidina 546 y 633, Life Technologies (1:500-1:1000)
Hoechst, Thermo Fisher Scientific. (1:500-1:1000)

Cantidades de morfolino y mRNA inyectadas por blastómero en cada especie:

X. tropicalis:

- 10ng morfolino contra Ric-8A;
- 15ng morfolino contra G α 13;
- 15ng morfolino control;
- 150pg mRNA para G α 13;
- 150pg mRNA para mycRic-8A;
- 200pg mRNA para FAK-GFP
- 50pg mRNA para Src constitutivamente activa;
- 40pg mRNA H2B GFP;
- 50pg mRNA GFP de membrana.

-*X. laevis*:

- 15ng morfolino contra Ric-8A;
- 25ng morfolino contra Gα13;
- 25ng morfolino control;
- 50pg mRNA para Gα13;
- 150pg lifeActRFP.
- 200-300pg mRNA FAK-GFP;
- 100pg mRNA para Src constitutivamente activa;
- 50pg mRNA H2B RFP.



MÉTODOS:

Fertilización *in vitro*:

Todos los métodos utilizados para la mantención y utilización del modelo *Xenopus* siguen los parámetros de las tres 3R (Reemplazar, Refinar y Reducir) y han sido evaluados por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

La obtención de embriones de *Xenopus tropicalis* se realizó a través de fertilización *in vitro*. Se prepararon ranas el día previo a la fertilización para su ovulación con una dosis de 20 unidades de HCG (gonadotrofina coriónica humana). El día de la fertilización se inyectaron las ranas (macho y hembra) con 200 unidades de HCG y se esperó hasta que comenzara la desovación. El macho se sacrificó para disecar sus testículos, los cuales fueron macerados en L15 (“Leibovitz Medium”) suplementado con 10% FBS (Suero Fetal de Bovino) para la obtención de espermios. Se colectaron los huevos y se fertilizaron con la solución de espermios por 3 minutos y luego por 20 minutos en 1/9XMR (“Modified Ringer’s solution”; 0.1M NaCl, 1.8mM KCl, 2.0mM CaCl₂, 1.0mM MgCl₂, 5.0mM Hepes-NaOH, pH 7.6). Posteriormente los huevos fueron desgelatinizados (eliminación de la capa de gelatina que rodea a los huevos) con una solución de cisteína al 3% en 1/9 MR (pH 7.9) por 10 minutos. Finalmente, los huevos fueron lavados cuatro veces con 1/9X MR y se incubaron hasta los estadios de desarrollo requeridos siguiendo tabla de Nieuwkoop P. and Faber J. (1994). Los embriones en el estadio adecuado se traspasaron a 1/9XMR con 3% de Ficoll para su microinyección y luego se cambiaron a medio 1/20X MR con gentamicina para su mantención.

Para el caso de *Xenopus laevis* se utilizaron 500 unidades de HCG para inducir la desovación, y el protocolo de obtención de embriones se realizó de forma similar, sólo cambiando los lavados y mantención de los embriones por medio 3/4 y 3/8 de NAM (“Normal Amphibian Medium”; 110mM NaCl, 2mM KCl, 1mM Ca(NO₃)₂, 1mM MgSO₄, 0,1mM EDTA, 1mMNaHCO₃, 2 mM de fosfato de sodio pH 7.4).

Microinyección:

Los embriones se prepararon para la microinyección ya sea con RNA mensajeros (mRNA) y/o morfolidos en medio con Ficoll. En la mayoría de los casos se coinyectó además con fluoresceína o rodamina dextrano como trazador de linaje. Se cargaron 2-3μL de la solución con la muestra a analizar en una aguja previamente calibrada para un volumen de 2nL para *X. tropicalis* o 5nL para *X. laevis* en el sistema de microinyección “Narishige” (IM300, Narishige Co., Japan). Se inyectó un blastómero dorsal y uno ventral de un lado del embrión en estadio de 8 células para dirigir el efecto hacia la población celular que más contribuye a la generación de la CN sin afectar en gran medida al mesodermo. Los embriones inyectados se traspasaron a placas de agarosa al 1% con el mismo medio y

se mantuvieron a 24°C para *X. tropicalis* y 14.5°C-16°C para *X. laevis* por alrededor de 2 a 3 horas, para transferirlos posteriormente a medio con gentamicina.

Fijación de embriones en MEMFA:

Se fijaron los embriones de *Xenopus* a diferentes estadios de desarrollo según Nieuwkoop P. and Faber J. (1994). Se seleccionaron los embriones inyectados y se incubaron en formaldehído al 3,7% /MEM 1X (100mM MOPS pH 7.4, 2mM EGTA, 1mM MgSO₄) a 4°C toda la noche en agitación. Se realizaron tres lavados con etanol 100% por 10 minutos para luego almacenarlos a -20°C.

Síntesis de sonda y mRNA *in vitro*:

Tanto las sondas como los mensajeros de RNA se sintetizaron en el laboratorio, los cuales fueron empleados en ensayos de hibridación *in situ* y sobreexpresión de genes específicos en embriones, respectivamente.

Para la síntesis de ambos, sondas y mensajeros, primero se linealizó el DNA plasmidial que contiene el gen de interés con una enzima de restricción que se encuentre cerca del extremo 5' en el caso de la sonda y 3' en el caso del mRNA, los cuales generarán un RNA antisentido y sentido, respectivamente. Luego se purificó por gel de agarosa el fragmento linealizado empleando el kit de extracción NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHERY-NAGEL). Se cuantificó por gel, analizando la banda generada a través de densitometría empleando Image J 1.49q (NIH, USA) y luego se utilizó 1.5µg de DNA purificado como templado para comenzar la transcripción *in vitro*. La transcripción de la sonda se llevo a cabo en presencia de dig-UTP (nucleótidos de uridina marcado con digoxigenina) junto al resto de la mezcla de nucleótidos y la RNA polimerasa correspondiente, según las especificaciones de la enzima en cuestión (Sp6, T7 o T3, Promega). Para la generación de mRNA se empleó el kit de transcripción *in vitro* mMESSAGING mMACHINE SP6, según recomendaciones de la empresa (Life Technologies). Ambas reacciones se realizaron en agua libre de nucleasas. Con el uso de DNAasas, se removió el DNA templado y posteriormente se purificaron los mensajeros a través de precipitación con LiCl, agregando 30 µl a la reacción final, para luego centrifugarlo por 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C, o alternativamente purificándolos mediante kit de extracción de RNA (Nucleospin RNAII, MACHERY-NAGEL).

Hibridación *in situ*:

El protocolo es una modificación del descrito en el sitio web Harland Lab *Xenopus tropicalis* y probado previamente en el laboratorio. Este consiste en una etapa de hidratación de los embriones previamente fijados a concentraciones crecientes de PTw (1X PBS + 0.1% Tween-20) para tratarlos después con 5mg/ml de proteinasa K por 3 minutos. Se realizaron dos lavados con 100mM de

trietanolamina pH 7-8 por 5 minutos, dos lavados con trietanolamina/anhidrido acético por 5 minutos, seguido de cinco lavados con PTw por 5 minutos, todos ellos a temperatura ambiente y en agitación. Se volvió a fijar los embriones en 3,7% formaldehído/ PTw por 20 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se realizaron reiterados lavados con PTw. Se realizó una pre-hibridación con “buffer” de hibridación (50% formamida, 5X SSC, 1mg/ml tórula de RNA, 100µg/ml heparina, 1X Denhart’s solution, 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS, 10mM EDTA) por al menos 30 minutos a 65°C, para posteriormente remplazar la solución por una mezcla del “buffer” de hibridación con la sonda a una concentración final de 1µg/ml, incubándola toda la noche a 65°C. Al día siguiente, se realizaron lavados a 65°C con formamida al 50%, 25% y 12,5% en 2X SSCTw (“Saline Sodium Citrate”, 1X SSC; 150mM NaCl, 17mM Citrato de sodio, pH 7.0) por 10 minutos cada uno, terminando los lavados con 2X y 0,2X de SSCTw por 10 y 30 minutos, respectivamente. Se realizaron dos lavados con PTw y MAB (“Maleic Acid Buffer”; 100mM ácido maleico, 150mM NaCl, pH 7.5) previos al bloqueo con “Blocking Reagent” (Roche) al 2% en MAB por al menos 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina 1:3000 toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron múltiples lavados con MAB, luego se incubaron los embriones con "buffer" AP (“Alkaline Phosphatase buffer”, 100mM Tris-HCl 9.5pH, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween 20) dos veces por 5 minutos y se reveló con NBT/BCIP (“Nitro-Blue Tetrazolium Chloride /5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt”). Se detuvo la reacción cromogénica con MAB y luego se fijaron los embriones nuevamente con la solución de Bouin (70% ácido pícrico saturado, 5% ácido acético glacial, 25% formaldehído) toda la noche. Se lavaron los embriones con una solución de etanol al 70% en PTw hasta acabar con la tinción amarilla, para seguidamente realizar lavados hidratantes a concentraciones decrecientes de etanol en 1X SCC. Después se blanquearon los embriones con solución blanqueadora (0.5X SSC, 5% formamida, 1% peróxido, y agua destilada) incubando bajo luz blanca a temperatura ambiente, eliminando los pigmentos naturales de los embriones. Se mantuvieron los embriones en PBS para realizar la fotodocumentación, y se almacenaron en etanol 100%. La fotodocumentación se realizó en un estereoscopio Olympus SZ61 utilizando una cámara Leica DFC450.

Explantos de Crestas Neurales Craneales

Se extrajeron las crestas neurales craneales (CNC) desde embriones inyectados previamente con las moléculas de interés en estadio cercanos a st17. Para realizar la disección, primero se extrajo la membrana vitelina en medio 1/9X MR (3/4 NAM para *X. laevis*) para luego proceder a realizar una incisión en la zona más ventral y una incisión en la zona más dorsal de las CNC, ayudado de un pelo de ceja que se utiliza a modo de navaja. Esta disección se realizó en una placa que en su fondo posee plasticina, que permite dar contraste a las CNC y también ayuda a la manipulación del embrión durante

la disección. Posteriormente se retiró la epidermis del embrión para luego cortar y sacar las CNC desde el embrión. Seguido a eso, se limpiaron las CNC separándolas de contaminación proveniente del mesodermo, se traspasaron a medio DFA (53mM NaCl, 10mM Na₂CO₃, 4,5mM Gluconato de Potasio, 1mM MgSO₄, 1mM CaCl₂, 0,1% BSA, 17,5mM Bicina) y se cortaron a los tamaños indicados para realizar cada ensayo. Una vez cortadas las CNC, se cultivaron y se esperó su migración sobre una matriz de fibronectina (10μg/ml en plástico y 50μg/ml en vidrio) (Sigma-Aldrich) por 4-5 horas en el caso de *X. tropicalis* a 26°C y alrededor de 10 horas en el caso de *X. laevis* a 16°C. Previamente, se incubó las placa a utilizar por alrededor de 1 hora a 37°C con fibronectina a la concentración necesaria, para luego bloquearlas con PBS/BSA por media hora a la misma temperatura. Ambas incubaciones van seguidas por tres lavados con PBS 1X (“Phosphate-Buffered Saline”, 1.9mM NaH₂PO₄, 8.7mM NaHPO₄, 175mM NaCl). De cada embrión se extrajo entre uno y dos explantes, dependiendo del tamaño del explante requerido en cada ensayo.

Trasplantes de Crestas Neurales Craneales

Se empleó un embrión donante y un embrión receptor (“wild-type”) para realizar cada ensayo. El embrión donante fue inyectado con las moléculas de interés, ya sea sólo fluoresceína o fluoresceína en conjunto al morfolino. Se extrajeron las CNC del embrión donante, y luego las CNC del embrión receptor en medio DFA, cuidadosamente en este último caso para no dañar la epidermis del embrión. Posteriormente se introdujeron las CNC del embrión donante dentro del embrión receptor, justo en el espacio dejado por las CNC anteriormente extraídas, tapándolas luego con el tejido epidermal. Para facilitar este trabajo, se amoldó la plasticina de la placa de disección con la forma del embrión (orificio), rodeado por dos montículos, para luego poner un cubreobjeto previamente cortado a las dimensiones adecuadas sobre esta estructura, aplastando al embrión suavemente y permitiendo que la cicatrización se desarrolle de mejor manera. Después de unos 15 minutos, se sacaron los embriones trasplantados y se traspasaron a medio 1/20X MR, hasta estadio st28 para observar la migración de las CNC.

Ensayos de dispersión celular

Para llevar a cabo los ensayos de dispersión celular, se sembraron los explantes a los tamaños adecuados en placas plásticas, para capturar alrededor de 10-15 explantes por condición, con 30 explantes totales por ensayo. Se realizaron videos “time-lapse” cada 5 minutos aproximadamente en un microscopio de epifluorescencia con platina móvil (Nikon modelo Eclipse 80i). Luego se cuantificaron las áreas entre células a través de una triangulación de Delaunay, demarcando las células de forma manual (plugin de ImageJ 1.49q, NIH, USA) al tiempo 0, 5 y 10 horas. Se graficaron la relación de las áreas de triángulo promedio correspondientes entre el tiempo 5 y 0 horas, y entre el tiempo 10 y 0

horas. Se evaluó la significancia con el test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples empleando el test Dunn y los gráficos fueron procesados en Prism 6.

Ensayo de motilidad celular en células individuales.

Se diseccionaron las CNC desde embriones previamente inyectados y luego se traspasaron a un medio DFA libre del ion calcio y magnesio. Para separar las células, los explantes se disgregaron a través de pipeteo (“up and down”), teniendo cuidado de no dejarlas por más de 5 minutos en el medio, debido a la toxicidad que gatilla este medio sobre las células. Luego, la células disgregadas se cultivaron en medio DFA normal sobre fibronectina como se describió anteriormente. Se realizó microscopia de epifluorescencia (Nikon modelo Eclipse 80i) haciendo capturas cada 3 minutos, para luego seguir cada célula de forma manual a través del “plugin” “cell tracking” (ImageJ 1.49q, NIH, USA). Después se empleó el “plugin” “Chemotaxis Tool” para realizar la cuantificaciones de velocidad, distancia y direccionalidad de cada ensayo. Se evaluó la significancia con el test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples empleando el test Dunn y los gráficos fueron procesados en Prism 6.

Análisis de protrusiones por “time-lapse”:

Los embriones fueron inyectados con los respectivos morfolidos en adición a lifeActRFP, para luego diseccionar las CNC y ponerlas sobre fibronectina como se describió anteriormente en la sección de Explantes de CNC. Luego se realizó microscopia de “time-lapse” cada 15 segundos por media hora, enfocando un rango de 5 planos diferentes con un incremento de 0,5 μ m empleando el objetivo 40X de un microscopio de epifluorescencia Nikon modelo Eclipse 80i con platina móvil. Luego se editaron las películas empleando el software SimplePCI v 6.6.0.0, seleccionando el mejor foco, aumentando el contraste en ImageJ (NIH, USA), y empleando el filtro “sharpen tool” de Photoshop CC. Se cuantificaron las protrusiones de forma manual y se evaluó la significancia con el test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples empleando el test Dunn. Los gráficos fueron procesados en Prism 6.

Ensayos de adhesión celular:

Se diseccionaron y sembraron explantes de CNC como se explicó anteriormente, y se esperó durante media hora para observar su adhesión. Para realizar el test, se invirtieron las placas previamente selladas y se contaron los explantes remanentes en la placa para sacar la proporción de explantes que permanecen adheridos a la matriz de fibronectina. Para los experimentos con MnCl₂, se suplementó el medio DFA con las concentraciones indicadas en cada ensayo. Se evaluó la significancia con el test ANOVA con comparaciones múltiples empleando el test Dunnett y los

gráficos fueron procesados en Prism 6.

Inmunocitoquímica

Se fijaron los explantes en 3,7% formaldehído/PBS por 30 minutos a temperatura ambiente (18°C). Después se realizaron tres lavados con PBS por 5 minutos, para luego permeabilizar las células con dos lavados de 0,2% TRITON100/PBS por 5 minutos cada uno a 4°C. Se realizaron tres lavados con PBS por 5 minutos para posteriormente bloquear con 2% suero/PBS por al menos 30 minutos. Se incubó con el anticuerpo primario y secundario toda la noche a 4°C (o 2 horas a temperatura ambiente), efectuando múltiples lavados con PBS luego de cada incubación de anticuerpos. En caso de requerir faloidina y/o Hoechst en el experimento, se incubó en conjunto al anticuerpo secundario. Finalmente, se montaron los explantes en “Fluorescence Mounting Medium” (Dako) o “Mowiol” para su posterior análisis bajo microscopía confocal. Los microscopios confocales empleados en esta tesis fueron: Microscopio espectral confocal LSM780 NLO Zeiss (objetivo 60X) y microscopio confocal Leica TCS SPE (objetivo 60X). Las adhesiones focales fueron cuantificadas con la herramienta “Threshold” y luego con análisis de partículas de ImageJ (NIH, USA), graficando posteriormente la relación entre las condiciones de experimentación y los controles, considerando las estructuras mayores a 1µm. Se evaluó la significancia con el test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples empleando el test Dunn y los gráficos fueron procesados en Prism 6.

Análisis de adhesiones focales por microscopía TIRF (“Total Internal Reflection Fluorescence”):

Se inyectaron embriones con mRNA para FAK-GFP y mRNA para lifeACT y se prepararon los explantes tal como se describe anteriormente, para luego realizar “time-lapse” bajo microscopía TIRF (Olympus TIRF System, NA value 1.45) en un aumento de 60X. Las imágenes fueron captadas cada 30 segundos por 10 minutos y se tomaron 3 planos cercanos a las adhesiones focales, para intentar alcanzar la totalidad de la estructura. Las imágenes fueron procesadas en ImageJ (NIH, USA). Los datos fueron procesados y comparados empleando la prueba T de Student no pareada.

Ensayos de quimiotaxia:

Como factor quimiotáctico se utilizó a Sdf-1 (“Stromal cell-derived factor 1”). Primero se diluyó el stock de Sdf-1 (10µg/ml) (Sigma-Aldrich) 10 veces en PBS y se incubó en conjunto a las “beads” heparina (Sigma H5236) por 4 horas a temperatura ambiente en agitación protegido de la luz. Las “beads” deben ser lavadas antes de la incubación con Sdf-1 al menos 3 veces en PBS. Luego se secó una placa plástica cubierta con fibronectina preparada previamente (como se describió en explantes de CNC), y se dibujó una línea delgada y plana con grasa (Dow corning high-vacuum silicone grease, Sigma-Aldrich) usando una jeringa, con el fin de sostener adecuadamente las “beads”

dentro de ella. Luego se agregó a la placa medio DFA y se sacaron algunas “beads” con micropipeta (punta cortada) y se vaciaron en una zona libre de fibronectina. Se seleccionaron “beads” de tamaño similar y se posicionaron en la grasa con ayuda de un pelo de ceja, separados de al menos 5 “beads” de distancia. Posteriormente con ayuda de una pinza, se empujaron dentro de la grasa y a continuación se situaron los explantes de CNC frente a las “beads”, aproximadamente a dos “beads” de distancia, y se esperó media hora hasta su adhesión sobre la fibronectina. Finalmente, se llenó la placa con medio DFA y se selló para realizar el “time-lapse” bajo microscopio.

Lisis de embriones

Se colectaron los embriones y se agregó 20µl de “buffer” de lisis por embrión (0.5% Igepal CA030, 10mM Hepes pH7.9, 1mM DTT, 100mM NaCl, 0.5mM PMSF) adicionando inhibidores de proteinasas (cOmplete Mini EDTA free, Roche). Se re-suspendieron los embriones por pipeteo “up and down” hasta obtener una solución gris homogénea. Luego se centrifugó la solución a 400g por 10 minutos a 4°C. Se extrajo la fase intermedia, y se volvió a centrifugar repetitivamente hasta no observar pellet. Se cuantificaron las proteínas a través del método de Bradford.

Detección de proteínas

Se separaron las proteínas a través de electroforesis en gel denaturante al 10% de acrilamida (SDS-PAGE) para luego realizar la inmunodetección a través de la técnica de “western blot”. Se emplearon geles de 0.75mm para la detección de proteínas sobre-expresadas y 1.5mm para las inmunoprecipitaciones.

Las muestras se incubaron por 5 minutos a 95°C con “buffer” de carga (62.5mM TrisHCl pH6.8, 2%SDS, 10% glicerol, 0.01% azul de bromofenol) en presencia de 0.1M de DTT. Luego las muestras se sembraron junto al estándar pre-teñido (Fermentas) en el gel, para posteriormente correrlas a 100V constantes en solución de corrida (25mM Tris, 250mM glicina, 0.1% SDS). Se cargaron 15µg de proteínas totales para la detección de proteínas sobre-expresadas en HEK293T y entre 50-100µg para embriones de *Xenopus*. Posteriormente las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa en solución de transferencia (25mM Tris, 192mM glicina, 20% metanol) durante 1 hora (para geles delgados) y 2 horas (para geles gruesos) a 4°C a 250mA constantes. Para verificar la correcta transferencia, se tiñó la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau. Luego se realizaron múltiples lavados con agua destilada, para luego bloquearla con leche descremada al 5% en TBS-Tween (150mM NaCl, 10mM Tris, 0.05%Tween20) durante 1 hora. Después se incubó con el anticuerpo primario y el secundario por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C cada uno, realizando tres lavados con TBS-Tween por 10 minutos después de cada incubación de anticuerpo. Finalmente, la membrana se reveló con líquidos quimioluminocentes (“Western Lightning Plus-ECL”,

Perkin Elmer) y se expuso a un film autoradiográfico (Ultracruz Autoradiography Film Blue, Santa Cruz Biotechnology). Luego, con el fin de detectar otra proteína en el mismo gel, se realizó “stripping” sobre la membrana con solución de bajo pH (“Low pH Stripping Solution”, 25mM Glicina-HCl, 1% p/v SDS) por 45 minutos, para luego realizar dos lavados con PBS y dos lavados con TBS-Tween por 5 minutos cada uno, y así continuar con un nuevo “western blot”. Se realizaron análisis densitométricos de los films revelados utilizando el programa ImageJ 1.49q (NIH, USA).

Co-inmunoprecipitación

Para cada inmunoprecipitación se empleó 1.5mg (2.5mg para el experimento con FAK) de proteína total por ensayo donde se consideran como muestras: la inmunoprecipitación de la proteína en cuestión, el control con anticuerpo no relacionado, y el control con proteína A/G (Thermo Scientific) agarosa sola. Primero se equilibraron los tubos con 25µl proteína A/G agarosa realizando tres lavados con 500µL de “buffer” de lisis (0.5% Igepal CA030, 10mM Hepes pH 7.9, 1mM DTT, 100mM NaCl) en agitación, seguidos de centrifugaciones a 2000g por 2 minutos a 4°C. Luego se incubó la proteína A/G agarosa con los anticuerpos respectivos por 2 horas a 4°C en agitación. En paralelo se realizó el “pre-clearing” del lisado, utilizando proteína A/G agarosa previamente equilibrada, incubando el lisado de proteínas por 2 horas en agitación a 4°C. Después se realizaron centrifugaciones por 2 minutos a 2000g a 4°C. Se descartó el sobrenadante de todos los tubos, menos del “pre-cleared, para luego distribuir el sobrenadante de este último entre todos los tubos restantes. Se realizó la inmunoprecipitación incubando por 4 horas o toda la noche en presencia de inhibidores de proteasas. Luego se centrifugó nuevamente a 2000g y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron cinco lavados con “buffer” de lisis seguido de una centrifugación, tal como se describió anteriormente. Finalmente se agregó 10µL de “buffer” de carga 5X para posteriormente detectar las proteínas en gel de poliacrilamida e inmunodetectarlo con la técnica de “western blot”.

Transfección para expresión transiente en células HEK293T

Se emplearon células HEK293T cultivadas a un 50% de confluencia en placas de 10cm en medio HyClone DMEM (GE Lifesciences) 10% FBS, suplementado con 4mM glutamina, 50µg/ml penicilina y 50µg/ml estreptomicina. Posteriormente el medio de cultivo fue reemplazado por medio DMEM sin suero conteniendo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 3µg de los plásmidos que contienen los genes a expresar. Las células fueron incubadas por 5-6 horas a 37°C, para luego reemplazarlo al medio por DMEM con suero. Se realizó la lisis celular a las 18 horas post-transfección en 500µL de “buffer” de lisis (0.5% Igepal CA030, 10mM Hepes pH7.9, 1mM DTT, 100mM NaCl, 0.5mM PMSF) en presencia de inhibidores de proteasas.

Construcciones DNA y digestión preparativa:

Se realizó una construcción de traspaso, para cambiar los 6 epítopes myc por uno his de XtGα13 y así emplearlo en los ensayos de co-inmunoprecipitación con Ric-8A (la cual posee 6 epítopes myc). Para ello, se emplearon las enzimas de restricción XhoI y XbaI, traspasando el gen de XtGα13 (inserto) desde pcs2+6myc-XtGα13 al vector pcDNA3.1/HisC, y así generar a pcDNA3.1/His-XtGα13. Se realizaron digestiones preparativas para purificar al vector y al inserto por separado, empleando 10µg de DNA y 20 unidades de cada enzima de restricción, utilizando al “buffer” de compatibilidad según las especificaciones de la empresa (New England Biolabs) en 100µL totales de reacción. La incubación de la reacción se llevó a cabo a 37°C por 4 horas, y luego se desforforiló al vector con fosfatasa alcalina “Antarctic Phosphatase” (New England Biolabs), incubándola por 1 hora a 37°C, previa desactivación de las enzimas de restricción. Luego, se purificaron los fragmentos desde gel de agarosa al 1% en 0.5X TAE (40mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1.14mL/L ácido acético glacial, pH 7.8) en presencia de bromuro de etidio con el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL). Se cuantificó por gel, analizando la banda generada a través de densitometría empleando a ImageJ 1.49q (NIH, USA) para luego realizar la ligación. Para la ligación, se utilizó una relación molar 3:1 (inserto:vector) y al vector sólo como control, empleando la enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) según las recomendaciones de la empresa, incubando a 16°C toda la noche. Posteriormente cada mezcla de ligación se transformó en bacterias competentes por calcio.

Transformación en bacterias competentes por calcio:

Para la transformación, se incubó la reacción de ligación con las bacterias competentes por 30 minutos en hielo, para luego inducir el shock térmico a 42°C por 2 minutos, finalizando con una incubación de la mezcla por 5 minutos en hielo. A continuación, las células se recuperaron por una hora a 37°C en medio LB (Medio Luria-Bertani, MO BIO Laboratories, Inc.) sin antibiótico, para posteriormente sembrar las bacterias en placas agar LB/Ampicilina 100µg/ml, las cuales se incubaron toda la noche a 37°C.

Preparación de DNA a pequeña escala:

Se analizaron 10 colonias aisladas por separado para verificar la presencia del gen en la nueva construcción. Se crecieron las colonias en 3ml de medio LB con ampicilina por toda la noche a 37°C. Posteriormente, 1.5 ml de bacterias fueron centrifugadas por 10 minutos a 14.000rpm. Luego se descartó el sobrenadante, para resuspender el pellet con 300µL de “buffer” TENS (10mM Tris-HCL pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, 0.1N NaOH, 0.5% SDS) por vórtex. Se incubó en hielo por 10 minutos, y se le agregó 15µL de Acetato de sodio 3M pH 5.2 agitando nuevamente en vórtex. A continuación, se

realizó una centrifugación por 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo donde se le agregó 900µL de etanol al 100% frío para la precipitación del DNA. Se realizó una centrifugación por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 1000µL de etanol al 70% y se realizó otra centrifugación por 10 minutos. Después se resuspendió el pellet en agua des-ionizada conteniendo RNasa a 20µg/ml. Finalmente, para verificar si los clones elegidos corresponden a la construcción esperada, se realizó una digestión analítica (1 unidad de enzima en 20µl finales) empleando enzimas de restricción (New England Biolabs) según descripción de la empresa. Se verificó la liberación de fragmentos mediante un gel de agarosa al 1% en 0.5X de tampón TAE.

Purificación del DNA plasmidial a gran escala por el método del polietilenglicol:

Para generar DNA plasmidial a gran escala se creció, en primera instancia, el clon seleccionado en 250ml de LB /ampicilina toda la noche a 37°C. Luego, se centrifugó por 15 minutos a 5000rpm y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 5ml de solución I (50mM glucosa, 25mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0), y a continuación se agregó 10ml de solución II (0.2N NaOH, 1%SDS) mezclando suavemente por inversión e incubando posteriormente por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se agregó 5ml de solución III (60ml de acetato de potasio 5M, 11.5ml ácido acético glacial, 28.5ml agua desionizada), mezclando con suavidad, para incubar en hielo por 10 minutos. Se centrifugó el lisado a 10.000rpm por 15min a 4°C y luego se filtró el sobrenadante mediante gasa. Se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol al filtrado, mezclando e incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el pellet centrifugando a 10.000rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante, para lavar el pellet con etanol al 70%. Se disolvió el pellet en 3ml de “buffer” TE (100mM Tris Cl pH 8.0, 1mM EDTA) y se agregó 3 ml de LiCl 5M, para después centrifugar a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó 6ml de isopropanol mezclando vigorosamente, para luego incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10.000rpm por 10 minutos y se desechó el sobrenadante, para lavar posteriormente el pellet con etanol al 70%. A continuación, se disolvió el pellet en 500µL de TE pH 8 conteniendo 20µg/ml de RNasaA y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, se agregó 500µL de 1.6M NaCl 13% polietilenglicol, mezclando bien e incubando la solución en hielo por 10 minutos. Se recuperó el DNA plasmidial por centrifugación a 14.000rpm, removiendo en seguida el sobrenadante y se disolvió el pellet en 400µL de TE. Luego, se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo centrifugando a 10.000rpm por 5 minutos, y a continuación se le agregó a la fase acuosa 2 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 de acetato de sodio 3M. Se incubó al menos 2 horas a -20°C para precipitar el DNA, se recuperó el DNA mediante centrifugación y se lavó el pellet de DNA con etanol al 70% centrifugando por 5 minutos a 14.000rpm. Se dejó secar a temperatura ambiente y se agregó agua desionizada para resuspender el DNA. Finalmente, se

determinó la concentración de DNA a través de la absorbancia obtenida a través de espectofotometría (espectrofotómetro IMPLEN, NanoPhotometer UV/Vis spectrophotometer).



IV) RESULTADOS:

OBJETIVO 1: Estudiar la función de Ric-8A durante la migración de la cresta neural craneal en *Xenopus* y analizar si esta función está mediada por la subunidad de la proteína G heterotrimérica $G\alpha_{13}$

Con el fin de estudiar la función de Ric-8 durante la migración de las CNC de *Xenopus in vivo*, se realizaron ensayos de sobreexpresión y de silenciamiento, empleando mRNA codificando a 6Myc-Ric-8A y un morfolino específico contra Ric-8A, respectivamente. Para evaluar la migración de las CNC en embriones completos, se realizaron hibridaciones *in situ* empleando sondas contra el mRNA de *snail2* o *twist*, como marcadores específico de CNC.

Para los ensayos de sobreexpresión de Ric-8A, se microinyectó mRNA codificando a Ric-8A asociado al epítipo Myc (6Myc-Ric-8A), tal como se describió en la sección de metodología. Se inyectó un blastómero dorsal y uno ventral (ambos del polo animal) en embriones en estadio de 8 células, en un lado del embrión (anexo 1), de tal manera de dejar el lado no inyectado como control. En los ensayos de sobreexpresión, no se observó diferencia en las corrientes migratorias de las CNC a las diferentes concentraciones de mRNA utilizadas, al compararlas con su respectivo lado control (figura 1a), con los embriones inyectados con un mRNA control (que expresa para la proteína “cherry” asociada a la membrana celular), y con los embriones no tratados (figura 1c). Para comprobar la correcta sobreexpresión del gen, se realizó un “western blot”, donde se demuestra la expresión de la proteína en los lisados de los embriones previamente inyectados con el mRNA para 6Myc-Ric-8A, a las diferentes concentraciones utilizadas (figura 1b). Con estos resultados se descartan efectos sobre la migración de las CNC al sobreexpresar Ric-8A. Por otro lado, como se describió en Fuentealba J. y col. (2013), en los ensayos de pérdida de función, al inyectar el morfolino contra Ric-8A se observa una severa inhibición de la migración de las CNC, valor que alcanza un 70% en *X. tropicalis* y un 50% en *X. laevis* del total de embriones inyectados para cada ensayo (figura 2a,b,e). Por lo tanto, estos resultados muestran que los niveles de Ric-8A son importantes durante la migración de este tipo celular.

Como ya se describió en la sección de introducción, Ric-8A corresponde a un GEF para proteínas G heterotriméricas (Tall, G. G., y col., 2003), y hemos corroborado su participación en la migración celular de las CNC, sin embargo no se ha estudiado en detalle el mecanismo a través del cual regula este proceso. Por lo tanto, el siguiente paso fue analizar qué proteína G heterotrimérica podría estar involucrada mediando la función de Ric-8A sobre la migración. Dentro de las 4 subfamilias de las $G\alpha$ existentes y presentes en el modelo *Xenopus tropicalis* (data no publicada), tal como se describió en la introducción, $G\alpha_{12/13}$ es una de las familias más estudiadas durante la migración en el desarrollo (Kelly, P., y col., 2007). Adicionalmente, esta proteína ha sido descrita en

eventos de migración en varios tipos celulares, incluyendo a líneas tumorales (Bian, D., y col., 2006; Kelly, P. Y col., 2006; Kelly, P. Y col., 2006b; Lin, F., y col., 2005; Lin, F., y col., 2009; Offermanns, S., y col., 1997; Parks, S., & Wieschaus, E., 1991; Xu, J., y col., 2003).

Por esta razón, es que en esta tesis decidimos comenzar a estudiar la posible función e interacción que podría tener la subunidad $G\alpha 13$ con Ric-8A en la migración celular de las CNC. Para esto, al igual que para Ric-8A, se realizaron ensayos de pérdida y ganancia de función para $G\alpha 13$. En los ensayos de pérdida de función, inyectando un morfolino específico contra la subunidad $G\alpha 13$ de la proteína G heterotrimérica, se obtuvo el mismo fenotipo que los embriones morfantes para Ric-8A, donde alrededor de un 40% para *X. tropicalis* y un 60% para *X. laevis* del total de embriones inyectados, se observa un efecto severo de inhibición de la migración de las CNC (figura 2a,b,e). Para descartar efectos sobre la inducción de las CNC por causa del silenciamiento de $G\alpha 13$, se evaluó mediante hibridación *in situ*, la expresión de *snail2* en las CNC en estadios cercanos a st17-18 (figura 2c), donde no se observó alteración del marcador. Por otro lado, para verificar el correcto funcionamiento del morfolino diseñado contra $G\alpha 13$, se determinó mediante “western blot” el silenciamiento de la proteína endógena (figura 3b). Es así que, con estos experimentos, se demuestra que el silenciamiento de $G\alpha 13$ altera la correcta migración de las CNC, y que su fenotipo es similar al que se obtiene al silenciar Ric-8A.

Cabe destacar, que el efecto de ambos morfolinos (Ric-8AMO y $G\alpha 13$ MO) se rescata empleando el RNA mensajero correspondiente a cada gen en ambas especies (figura 2a,b) (Ric-8AMO: 100% migración normal, n total=20; $G\alpha 13$ MO: 70% migración normal, n total=43), demostrando la especificidad del efecto observado. Adicionalmente, como se describió en Maldonado-Agurto R. y col., (2011) y por resultados obtenidos en nuestro laboratorio que no se encuentran publicados, ambos genes se expresan en zonas correspondientes a las corrientes migratorias de las CNC (figura 2d), acorde con su efecto sobre ellas.

Por otro lado, al inyectar el RNA mensajero de $G\alpha 13$ en embriones morfantes para Ric-8A, se observa el rescate del fenotipo, donde las CNC recuperan su migración (figura 2a 2b), y por ende reducen el efecto severo de inhibición de la migración de un 70% a un 30% en *X. tropicalis*, y de un 50% a un 20% en *X. laevis*, al comparar con el fenotipo morfante para Ric-8A (figura 2e). Por el contrario, al realizar el experimento inverso, es decir inyectando al RNA mensajero de Ric-8A en embriones morfantes para $G\alpha 13$, no se observa la recuperación de la migración, manteniendo valores similares a los observados para los fenotipos morfantes de $G\alpha 13$ (figura 2c). Estos resultados concuerda con el hecho que Ric-8A se encontraría río arriba de $G\alpha 13$ y sugieren que $G\alpha 13$ estaría mediando la función de Ric-8A sobre la migración de las CNC.

Por medio de ensayos de ganancia de función, se analizó el efecto de la sobreexpresión de $G\alpha 13$, ensayos donde no se observó diferencia en la migración de las CNC entre el lado inyectado y el lado control (figura 2), y se corroboró mediante “western blot” la correcta expresión de la proteína $G\alpha 13$ sobreexpresada en los embriones analizados (figura 3b).

Como se describió en la introducción las células de la CNC presentan una migración colectiva, la cual se encuentra influenciada por señales provenientes de las mismas células de la CNC, como por señales provenientes de células que rodean a este tejido. De aquí la pregunta de anlaizar si las células morfantes para $G\alpha 13$ son capaces de responder a su ambiente, es decir si presentan autonomía celular. Para ello se realizaron experimentos de trasplantes (figura anexo I). Como se observa en la figura 4, las CNC morfantes para $G\alpha 13$ no migran en el embrión huésped, en comparación a las CNC controles, donde se pueden observar claramente las corrientes migratorias. Esto nos indica que, el efecto que tiene sobre la migración el silenciamiento de $G\alpha 13$ en las CNC depende de la función que $G\alpha 13$ ejerce en este tejido y no del tejido circundante.



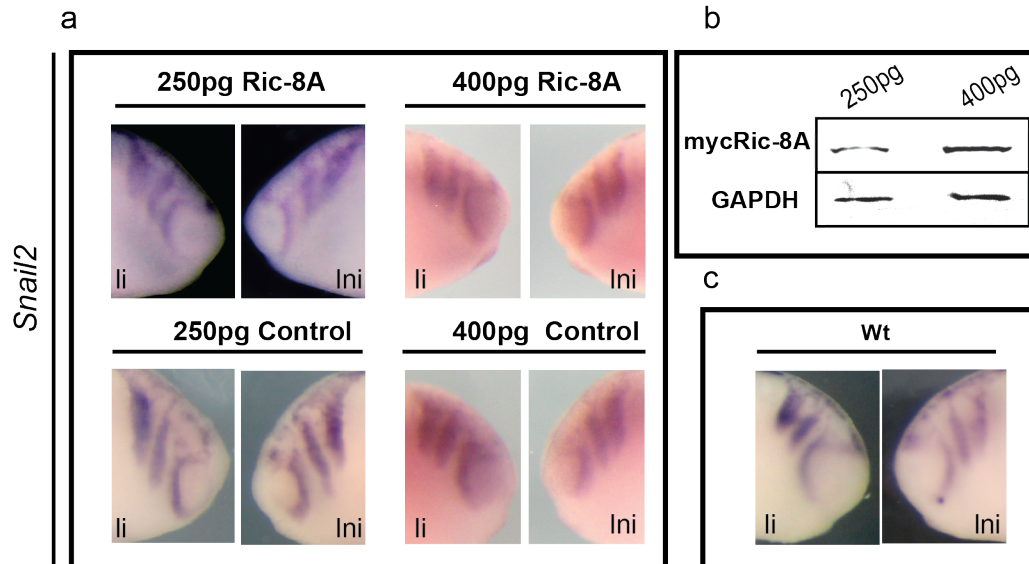


Figura 1: Estudio de la sobreexpresión de Ric-8A en la migración de las CNC *in vivo*.

Hibridaciones *in situ* contra *snail2* se realizaron en embriones previamente inyectados con 250pg y 400pg de RNA mensajero para 6Myc-Ric-8A y de RNA mensajero control (a). Se evaluó a través de “western blot” la sobre-expresión de Ric-8A mediante el reconocimiento del epítipo 6myc, empleando GAPDH como control de carga (b). Un valor menor al 5% del total de embriones inyectados se observó con una alteración en la migración de las CNC para la condición de 250pg de Ric-8A (control no fue alterado). Por otro lado, menos de un 10% del total de embriones inyectados, se observó con una alteración en la migración de las CNC tanto para los 400pg del mRNA para 6Myc-Ric-8A como del mRNA control. *N total por condición:* 250pg Ric-8A: n=30; 400pg Ric-8A: n=18; 250pg control: n=22; 400pg control: n=17. “Wild-type” (c) li: Lado inyectado; lni: Lado no inyectado.

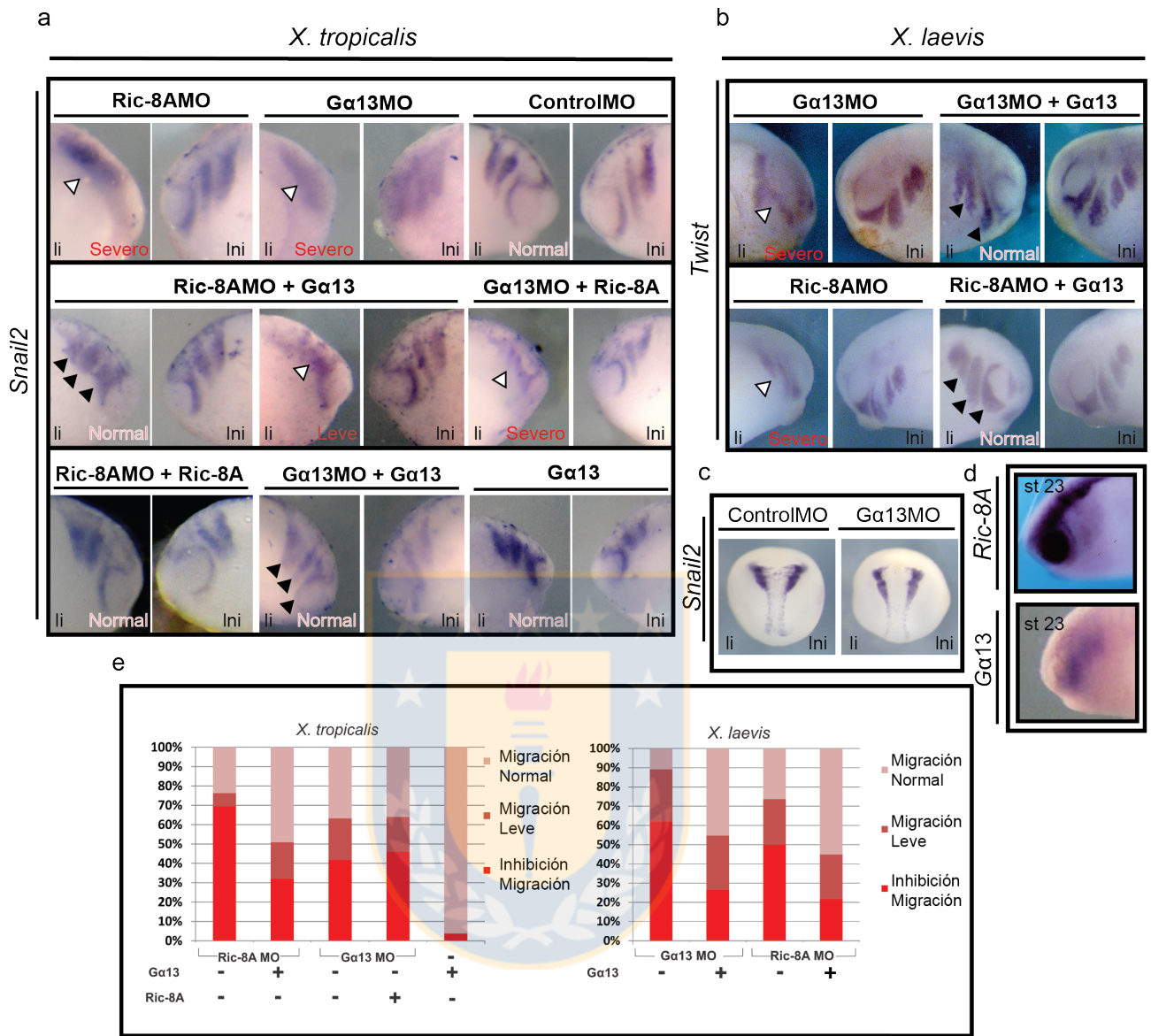


Figura 2: Estudio del efecto del silenciamiento de Ric-8A y Gα13 en la migración de las CNC *in vivo* y ensayos de epistasis empleando la subunidad Gα13 en embriones morfantes para Ric-8A.

Hibridaciones *in situ* fueron realizadas en estadio 23-24 para *X. tropicalis* (a) y estadio 26 en *X. laevis* (b) usando *snail2* y *twist* como marcadores de CNC, respectivamente. Los embriones fueron inyectados con morfolino contra Ric-8A (Ric-8AMO), morfolino contra Gα13 (Gα13MO), morfolino control (ControlMO), morfolino contra Ric-8A más mRNA para Gα13 (Ric-8AMO + Gα13), morfolino contra Gα13 más mRNA para Ric-8A (Gα13MO + Ric-8A), rescate del silenciamiento de Ric-8A (Ric-8AMO + Ric-8A) y rescate del silenciamiento de Gα13 (Gα13MO + Gα13). La inducción de las CNC en los Gα13MO se evaluó empleando *snail2* en embriones en estadio 17-18 (c). La expresión de Ric-8A y Gα13 fue evaluado a través de hibridación *in situ* con sus respectivas sondas (d). Se realizó una cuantificación del fenotipo observado con respecto al total de embriones inyectados por condición (e). *N total por condición para X. tropicalis*: Ric-8AMO n= 59; Ric-8AMO + Gα13 n= 53; Gα13MO n= 98; Gα13MO + Ric-8A n= 50; Gα13 n=53; Gα13MO + Gα13 n= 43. *N total por condición para X. laevis*: Gα13MO n=37; Gα13MO + Gα13 n=53; Ric-8AMO n=38; Ric-8AMO + Gα13 n=69. Cabezas de flechas negras: Migración normal de las CNC. Cabeza de flecha blancas: Migración alterada de las CNC. li: Lado inyectado; lni: Lado no inyectado.

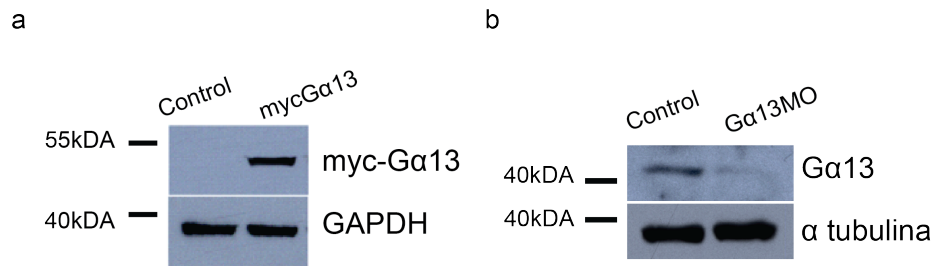
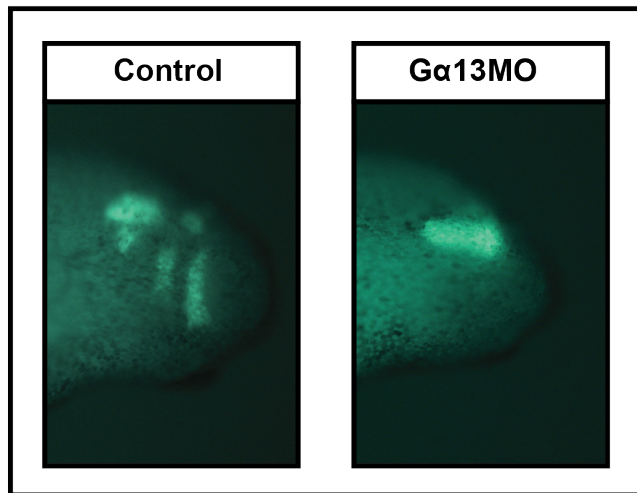


Figura 3: Análisis de la sobreexpresión y el silenciamiento de Gα13 en extractos de proteínas totales de embriones de *Xenopus*.

“Western blot” realizado a lisados totales de embriones previamente inyectados con mRNA para 6myc-Gα13 **(a)** y morfolino contra Gα13 **(b)**. Se empleó un anticuerpo anti myc en **(a)** para la detección de los niveles de Gα13 sobreexpresada y un anticuerpo anti-Gα13 para reconocer los niveles de la Gα13 endógena en **(b)**.





X. tropicalis

Figura 4: Análisis del comportamiento de células morfantes para $G\alpha 13$ en un contexto normal.

Se realizaron trasplantes en embriones “wild-type”, donde se utilizaron CNC de un embrión inyectado sólo con fluoresceína (control) o con morfolino contra $G\alpha 13$ co-inyectado con fluoresceína ($G\alpha 13MO$). 16 de los 19 embriones trasplantados controles migraron normalmente, mientras que sólo 3 de los 17 migraron normalmente para la condición morfante para $G\alpha 13$, indicando un comportamiento de autonomía celular de las células morfantes para $G\alpha 13$.

Otra forma de evaluar la migración celular, además de los ensayos *in vivo* mostrados anteriormente, es a través de ensayos *in vitro* en explantes de CNC sembrados sobre fibronectina, como se describió en Alfandari D., y col., 2003. Para ello, se midió la dispersión celular empleando la triangulación de Delaunay a las 5 y 10 horas desde los ensayos de microscopia de “time-lapse” realizados sobre explantes provenientes de *X. laevis*. La triangulación de Delaunay empleada para cuantificar, consiste en la medida de las áreas generadas entre 3 núcleos cercanos de todas las células presentes en el explante, la cual es proporcional a la migración celular radial a las diferentes condiciones y tiempos analizados.

Similar a lo obtenido *in vivo*, las células morfantes, tanto para Ric-8A como para $G\alpha 13$, disminuyen significativamente la dispersión celular al compararlo con los controles, tanto a las 5 como a las 10 horas (figura 5a). Al cuantificar esta dispersión a través de la triangulación de Delaunay, se pudo comprobar que existe una clara disminución de la dispersión en las células morfantes al compararla con las controles, donde las áreas son menores a los 200 píxeles² (indicados por el color negro) en las células morfantes y mayores a 400 píxeles² en las células controles, cuantificados a las 10 horas (figura 5b). De la misma forma, la relación entre el área final y el área inicial de los triángulos provenientes del análisis de este ensayo, tanto a las 5 como las 10 horas es mucho menor en las células morfantes que la relación obtenida para los controles, siendo esta diferencia muy significativa para ambos casos de silenciamiento. Si se analiza la relación (área final/inicial) a las 10 horas, se puede concluir que no existe diferencia entre la dispersión en los explantes al tiempo final e inicial para las células morfantes para Ric-8A, manteniéndose las células en promedio a la misma distancia al inicio y al final del experimento (figura 5c), indicando que prácticamente las células no migraron en el tiempo. De la misma forma, al realizar el análisis con las células morfantes para $G\alpha 13$, se puede concluir que las células se encuentran levemente más dispersas que para el caso morfante de Ric-8A, pero que esta área no supera más de una vez su estado inicial (aproximadamente 0,5 veces). Por otro lado, al analizar los controles se observa que el área es de aproximadamente 2 veces más que su estado inicial, dejando explícita las diferencias en la migración celular que existen al compararlo con los casos de células morfantes (figura 5c).

Al realizar el mismo análisis con los explantes co-inyectados con el morfolino contra Ric-8A y el mRNA de $G\alpha 13$ se puede observar que hubo rescate del fenotipo, demostrando recuperación de la migración celular de manera similar a lo observado en los ensayos *in vivo*. Al analizar la triangulación de Delaunay generada en estos ensayos de epistasis, se puede observar que las áreas a las 10 horas son similares al área de los controles, y que la relación final/inicial de los explantes también se acerca al de los controles. Por otro lado, al graficar estos resultados del ensayo de epistasis, los resultados son significativos con respecto al fenotipo morfante de Ric-8A, y no son significativos con respecto a los controles, en ambos tiempos, lo que reafirma la recuperación de la dispersión celular (figura 5c).

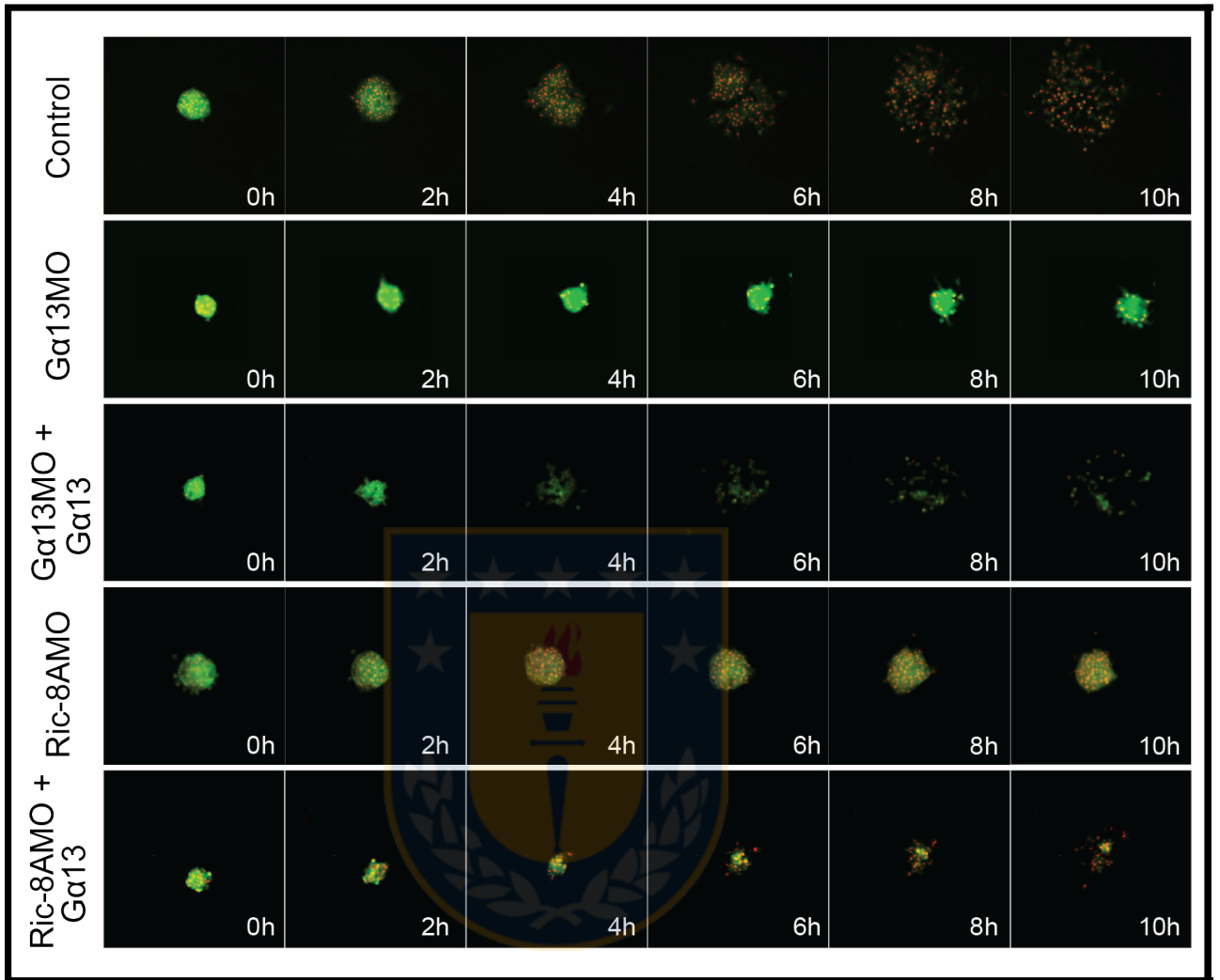
Finalmente, el efecto de ambos morfolinós se rescata empleando el RNA mensajero correspondiente a cada gen en ambas especies, lo que se muestra para $G\alpha 13MO$ (datos de Ric-8AMO no mostrados, publicados en Fuentealba J., 2013), y con ello demostrando que el fenotipo observado es específico tanto para Ric-8A como para $G\alpha 13$.

Cabe destacar, que al analizar el comportamiento de los explantes donde se sobreexpresó $G\alpha 13$, se pudo observar una dispersión levemente mayor que en los controles, en especial a las 5 horas de migración, pero sin embargo esta diferencia no es significativa al compararla con la condición control (barras $G\alpha 13[-]$: control; $G\alpha 13[+]$: sobreexpresión, en figura 5c).

En resumen, del conjunto de estos resultados, podemos concluir que tanto Ric-8A como $G\alpha 13$ son necesarios para la migración celular de las CNC, demostrado tanto con ensayos *in vivo* como por ensayos *in vitro*. Además, es importante destacar que, $G\alpha 13$ rescata la migración de las CNC de embriones y de explantes morfantes para Ric-8A, corroborando que ambos son parte de la misma vía de señalización y que Ric-8A estaría río arriba de $G\alpha 13$.



a



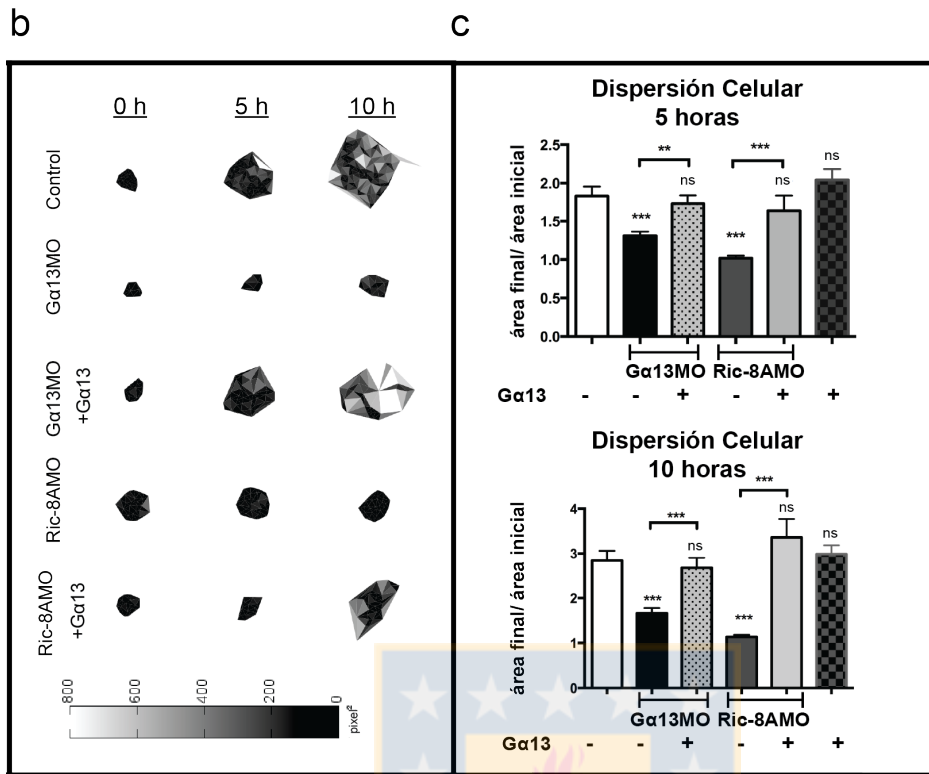


Figura 5: Estudio del efecto del silenciamiento de Ric-8A y $G\alpha 13$ sobre la migración de las CNC *in vitro* y ensayos de epistasis empleando la subunidad $G\alpha 13$ en embriones morfantes para Ric-8A

Explantos de CNC se extrajeron desde embriones de *X. laevis* previamente inyectados, se cultivaron sobre fibronectina y cada condición fue evaluada durante 10 horas a través de microscopía de epifluorescencia “time-lapse”. Todos los embriones fueron inyectados con fluoresceína y RFP nuclear. Se evaluaron diferentes condiciones: Control, morfolino contra $G\alpha 13$ ($G\alpha 13MO$), morfolino contra $G\alpha 13$ más mRNA para $G\alpha 13$ ($G\alpha 13MO + G\alpha 13$), morfolino contra Ric-8A ($Ric-8AMO$), morfolino contra Ric-8A más mRNA para $G\alpha 13$ ($Ric-8AMO + G\alpha 13$), y mRNA para $G\alpha 13$ ($G\alpha 13$, data no mostrada). Fotografías de cada condición son mostradas cada 2 horas por 10 horas totales (a). Representación de la triangulación de Delaunay de un explante representativo de cada condición a las 5 y a las 10 horas de experimento (b). El radio entre las áreas promedio correspondientes entre el tiempo inicial y final fueron graficadas a las 5 y a las 10 horas (c). Cada condición se comparó con el control (barra blanca), y luego se realizaron comparaciones entre ellas (señaladas con corchetes). Se indica bajo cada barra la presencia de cada morfolino y la presencia (+) o ausencia (-) de $G\alpha 13$. Se evaluó la significancia con el test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples empleando el test Dunn (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, no significativa). Barras de error: Error estándar. Aumento 10X.: *N total por condición*: Control $n=38$; $G\alpha 13MO$ $n=64$; $G\alpha 13MO + G\alpha 13$ $n=32$, $Ric-8AMO$ $n=45$; $Ric-8AMO + G\alpha 13$ $n=50$; $G\alpha 13$ $n=35$.

Para establecer las posibles diferencias que podrían existir entre el comportamiento grupal y el comportamiento individual de las células durante la migración, se evaluó los efectos que tiene el silenciamiento de Ric-8A y $G\alpha 13$ sobre la motilidad celular, pero esta vez sobre células disgregadas de CNC.

Un punto importante a destacar con respecto a este ensayo, es que su ejecución implicaba un bajo rendimiento, observándose una alta mortalidad celular. Por lo tanto, se realizó la cuantificación sólo sobre las células que sobrevivieron al tratamiento, dentro de las cuales se pudo determinar la trayectoria celular y cuantificar los diferentes parámetros que se muestran en la figura 6; tales como direccionalidad, velocidad, la distancia acumulada (distancia total de la trayectoria) y distancia Euclidiana (distancia lineal entre dos puntos). Se observó que la direccionalidad y la distancia Euclidiana, no se vió alterada entre células morfantes y controles. Por otro lado, observamos que la velocidad y la distancia acumulada por cada célula es diferente para la condición morfante de $G\alpha 13$ comparada con las células controles.

Los análisis obtenidos desde la microcopía de “time-lapse” en general demuestran que para todas las condiciones se observa motilidad y desplazamiento celular, pero particularmente para los casos morfantes existe un movimiento distinto a los controles, donde las células “tambalean” sobre su eje antes de desplazarse o avanzan más rápido en algunos segmentos (tramos) lo que aumenta su velocidad y distancia acumulada, los cuales se ven reflejados para las células morfantes para $G\alpha 13$.

Por lo tanto, con estos resultados, se puede observar que $G\alpha 13$ y Ric-8A son necesarios para la migración celular, como se demostró en los ensayos anteriores, pero que su función es principalmente requerida para la migración grupal de CNC. La ausencia de diferencias significativas en la distancia Euclidiana (que indica el desplazamiento de la célula), sugiere que $G\alpha 13$ y Ric-8A no son esenciales para la migración individual de las CNC, sin embargo más estudios son necesarios para indagar en esta pregunta.

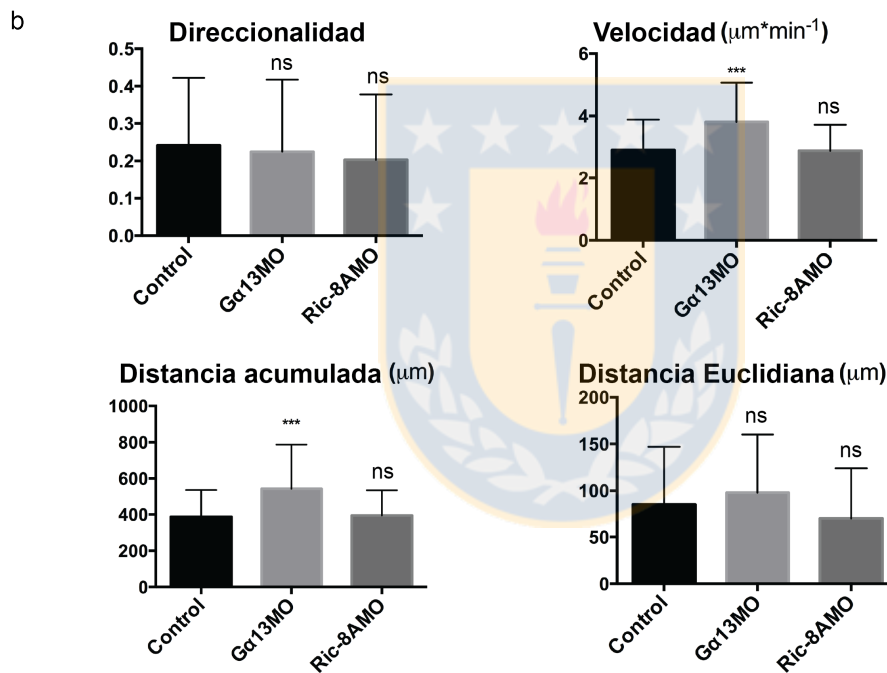
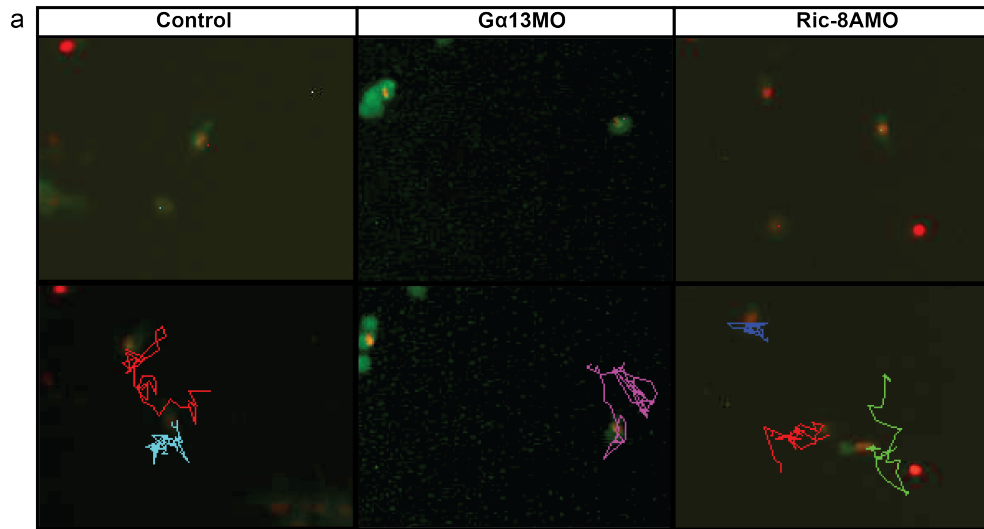


Figura 6: Análisis de motilidad en células individuales de CNC.

Se disgregaron las células desde explantes de CNC y se realizó seguimiento de células individuales de controles, células morfantes para $G\alpha 13$ ($G\alpha 13MO$) y células morfantes para Ric-8A ($Ric-8AMO$) y se evaluó su motilidad en el tiempo. Observamos en el panel superior, las células a tiempo cero; y en el panel inferior las células al final de su desplazamiento, donde se señalan en diferentes colores la trayectoria celular individual (a). Cuantificación de la direccionalidad del movimiento, la velocidad celular, la distancia acumulada y la distancia Euclidiana (b). Se evaluó la significancia con el test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples empleando el test Dunn (***, $p < 0,001$; ns, no significativa). Barras de error: Desviación estándar. *N total por condición (células)*: Control $n=144$; $G\alpha 13MO$ $n=83$; $Ric-8AMO$ $n= 85$.

OBJETIVO 2: Estudiar la función de Ric-8A y la subunidad Gα13 sobre la morfología celular y en el establecimiento de las adhesiones focales durante la migración de las células de la cresta neural craneal de *Xenopus*.

En primera instancia, para responder este objetivo y con el fin de estudiar en más detalle la función de Ric-8A y Gα13 durante la migración celular, se comenzó con el estudio de la localización sub-celular de ambas proteínas.

Como no poseemos un anticuerpo específico contra Ric-8A, se sobreexpresó el gen empleando 100pg de mRNA 6-Myc-Ric-8A a través de inyecciones en un blastómero dorsal y ventral del polo animal de embriones en estadio de 8 células, y posteriormente se realizaron explantes desde embriones en estadio 17 y evaluó la localización celular a través de ensayos de inmunocitoquímica sobre las células explantadas usando un anticuerpo anti-Myc. Es importante destacar que, como se demostró en la figura 1, la sobreexpresión de Ric-8A a las concentraciones utilizadas en esta tesis, no afecta la migración de las CNC, por lo que no se altera el fenotipo normal de la célula. Al mismo tiempo, para analizar la localización de Gα13, se empleó un anticuerpo específico para detectar Gα13 endógena. Finalmente en este ensayo se co-expresó además GFP de membrana, para demarcar los límites de la célula.

Como se muestra en la figura 7, tanto Ric-8A como Gα13 se observan principalmente en la corteza celular, co-localizando en las protrusiones que se encuentran dirigidas hacia el frente de migración (borde anterior o director). Es así como también, se observa una proporción de ambas proteínas localizada en el citoplasma. También se puede observar que estas proteínas tienen una baja localización en la unión célula a célula (figura 7a,b). Eso se concluye debido a que se observa una mayor señal para GFP de membrana en esa área, a diferencia de las otras dos proteínas (Ric-8A y Gα13).

Por otro lado, para complementar los ensayos de co-localización, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación, en el cual se demuestra que ambas proteínas se encuentran interaccionando o siendo parte del mismo complejo proteico. Se realizó el ensayo inmunoprecipitando tanto Ric-8A (a través del epítopo 6myc) como Gα13 (empleando el anticuerpo anti-Gα13) y detectando a las proteínas con un anticuerpo anti-His y/o el anti-Gα13, para detección de Gα13 y anti-Myc, para la detección de Ric-8A. El ensayo se realizó tanto en células HEK-293T (figura 7c) como en embriones de *Xenopus tropicalis* (figura 7d).

Debido a que se ha descrito que Ric-8 puede actuar como una chaperona molecular para las diferentes subunidades de Gα (Chan, P., y col., 2013; Gabay, M., y col., 2011), se procedió a evaluar el efecto del silenciamiento de Ric-8A sobre la localización de Gα13, para lo cual se analizó la

localización sub-celular de $G\alpha 13$ en explantes de CNC morfantes para Ric-8A. Como es posible observar en la figura 8a, la localización de $G\alpha 13$ se vió alterada en las células morfantes para Ric-8A, donde la proteína no se observa en la membrana celular, ni en las protrusiones, relocalizándose en el citoplasma. Para descartar que $G\alpha 13$ haya disminuido su expresión en comparación con las células controles, se realizó un “western blot” para comparar ambas condiciones. Como se muestra en la Figura 8c, los niveles de $G\alpha 13$ se mantienen prácticamente invariables entre la condición control y la condición morfante para Ric-8A, y tal como se había observado previamente, desciende notablemente al emplear el morfolino para $G\alpha 13$. Además, este último resultado se validó a través de inmunofluorescencia sobre explantes morfantes para $G\alpha 13$, donde se demuestra nuevamente el silenciamiento de esta proteína (figura 8b)

Estos resultados, por lo tanto, nos permiten concluir que $G\alpha 13$ y Ric-8A interaccionan y co-localizan en el borde anterior o también llamado frente de migración de las CNC, y el silenciamiento de Ric-8A provoca la deslocalización de $G\alpha 13$ en las células.



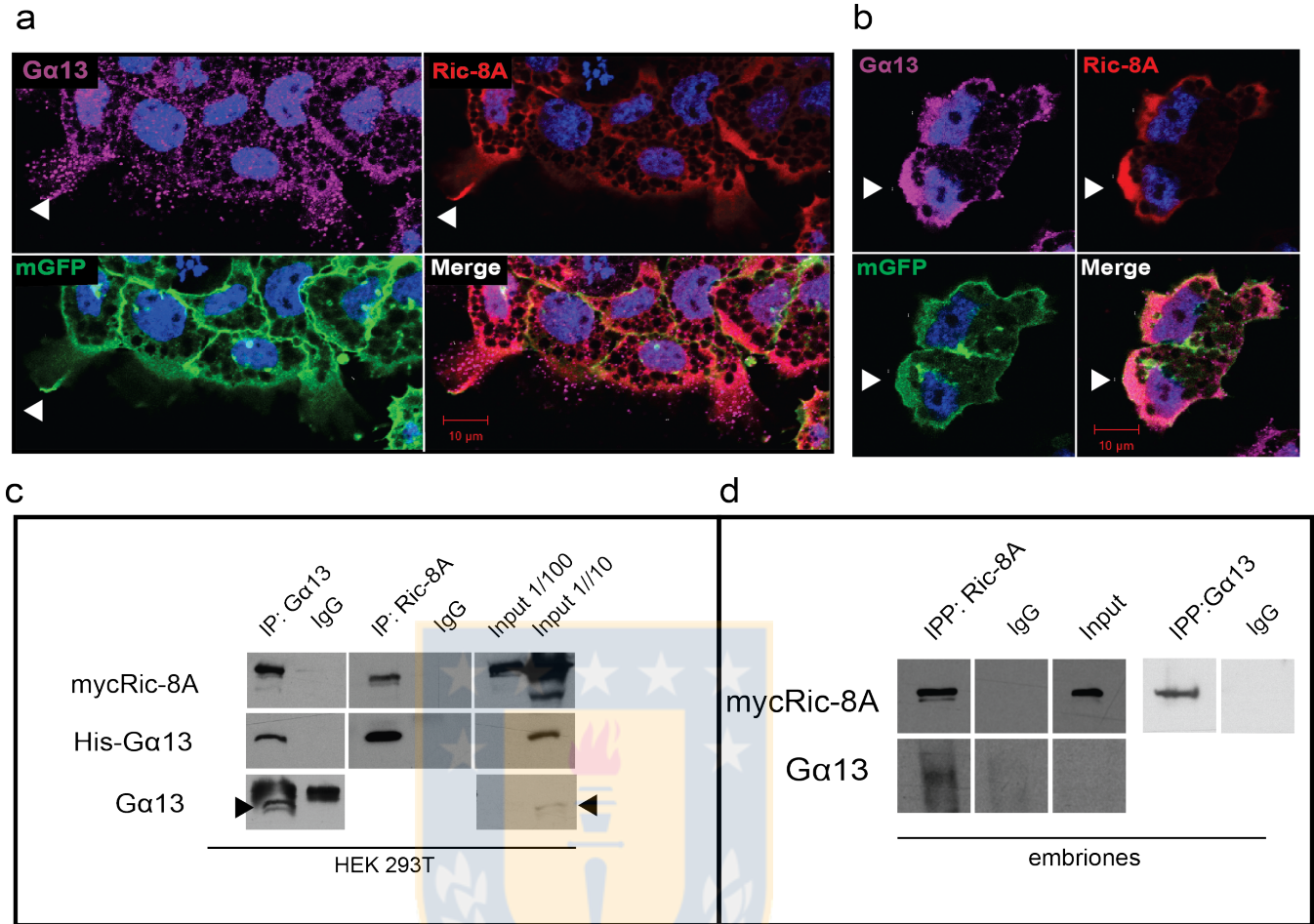


Figura 7: Localización sub-celular de $G\alpha 13$ y Ric-8A en células de la CNC y evaluación de la interacción de ambas proteínas.

Se realizó una inmunofluorescencia sobre explantes de CNC usando un anticuerpo anti-Myc para detectar Ric-8A (rojo) y anti- $G\alpha 13$ (magenta). En verde se observa GFP en la membrana celular. Las puntas de flecha blancas muestran la co-localización de ambas proteínas en la corteza celular, en las protrusiones del borde director (**a** y **b**). Se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en células HEK293T (**c**) y en embriones a estadio 16-17 (**d**), previamente transfectadas con 6myc-Ric-8A y His- $G\alpha 13$ o inyectados con el RNA mensajero de 6Myc-Ric-8A, respectivamente. Se detectaron las proteínas empleando el anticuerpo anti-Myc y anti- $G\alpha 13$.

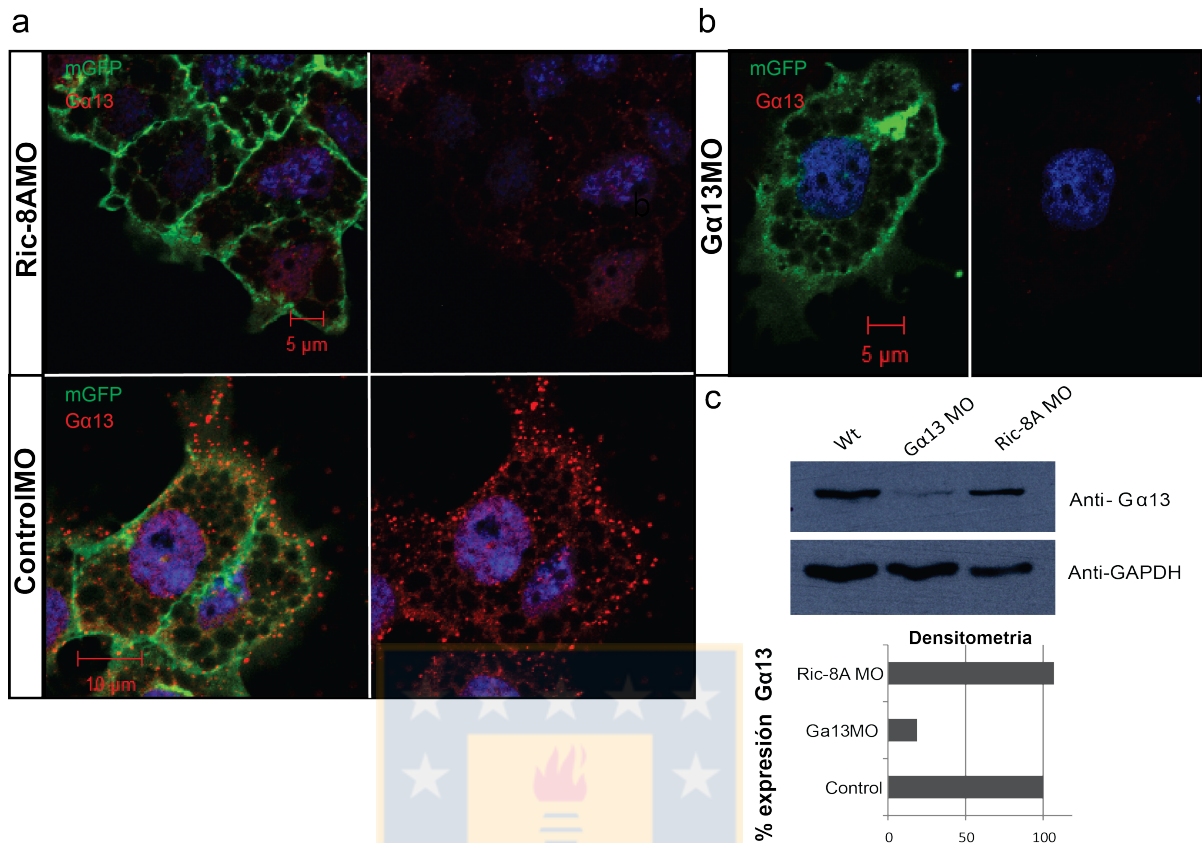


Figura 8: Localización sub-celular de Ga13 en células morfantes para Ric-8A.

Se realizó inmunofluorescencia sobre explantes de células de la CNC usando anticuerpo anti-Ga13 (rojo) para evaluar su localización en ausencia de Ric-8A (a). En verde se observa GFP de membrana. También se evaluó la expresión de Ga13 a través de inmunofluorescencia en células morfantes para Ga13 (b). “Western blot” representativo que muestra los niveles de Ga13 endógena en embriones controles, morfantes para Ga13 y morfantes para Ric-8A (c). En el gráfico se muestra la cuantificación por densitometría del “western blot” mostrado (representativo).

El siguiente paso en este objetivo fue analizar la morfología celular en explantes morfantes tanto para Ric-8A como para Gα13, y de esta manera determinar si existe alguna función de ambas proteínas a este nivel, para lo cual se estudió cambios en el citoesqueleto de actina para cada condición a través de inmunocitoquímica.

Como es posible observar en la figura 9, las células morfantes para Gα13 y Ric-8A, presentan severos problemas en la organización del citoesqueleto de actina. Las células morfantes para cada proteína, presentan anomalías morfológicas al compararlas con las células controles, tales como la disminución de la actina cortical, menor número de protrusiones y protrusiones más pequeñas. Al analizar el área de las protrusiones a las distintas condiciones se puede observar que en las células morfantes para Ric-8A, las protrusiones tienen en promedio $81\mu\text{m}^2$ (± 51.70 , $n=68$), mientras que en las células morfantes para Gα13 es de $61\mu\text{m}^2$ (± 41.37 , $n=62$). En ambas condiciones, las protrusiones son evidentemente más pequeñas que las protrusiones de las células control, las cuales alcanzan en promedio $145\mu\text{m}^2$ (± 92.05 , $n=56$), cuya diferencia es estadísticamente significativa con respecto al control (test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples empleando el test Dunn; ***, $p<0,001$). Por el contrario al sobreexpresar Gα13, se puede observar un aumento en el tamaño de las protrusiones, incrementando el área promedio de las lamelipodias a $260\mu\text{m}^2$ (± 160.9 , $n=60$), al compáralo con la condición control (test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples empleando el test Dunn; ***, $p<0,001$). Similar a los experimentos obtenidos anteriormente, el mRNA de Gα13 fue capaz de rescatar el fenotipo morfante de Ric-8A, recuperando las características de las protrusiones y la estructura del citoesqueleto de actina (figura 9).

Para realizar un análisis en más detalle de este fenotipo, se analizó la estabilidad y morfología de las protrusiones de las CNC, usando microscopía de “time-lapse” de epifluorescencia empleando Life-Act, péptido que reconoce la F actina y que no interfiere con su dinámica, permitiendo su visualización. Para ello, se microinyectó Life-Act en conjunto con el morfolino contra Ric-8A, morfolino contra Gα13, condición de epistasis y control, cultivando los explantes de CNC como se describió en la sección de métodos.

En la figura 10, se observa la estabilidad de las protrusiones en la condición control, donde inclusive se aprecia el crecimiento de estas en el tiempo, permaneciendo prácticamente a lo largo de todo el experimento (promedio de 23 minutos con desviaciones estándar hasta los 30 minutos). Por el contrario, es posible observar la baja estabilidad de las protrusiones en ambas condiciones morfantes, donde se distingue claramente cómo las protrusiones no se sostienen en el tiempo, colapsando en promedio a los 10 minutos. La cuantificación de la estabilidad de las protrusiones se observa en el gráfico de la figura 10 para las distintas condiciones. Al igual que lo mostrado en experimentos anteriores, el mRNA de Gα13 fue capaz de rescatar el fenotipo morfante de Ric-8A, aumentando la

duración de las protrusiones en el tiempo, y generando estructuras similares a las observadas en el caso control.

Con el fin de estudiar en mas detalle el efecto observado del silenciamiento de Ric-8A y $G\alpha 13$ sobre las protrusiones, se decidió evaluar la adhesión de los explantes a la matriz extracelular, considerando que el problema observado se puede deber a una deficiente unión de las protrusiones a las matriz extracelular.

Para ello, se realizaron ensayos de adhesión, a través de los cuales se determinó que la disminución de los niveles de $G\alpha 13$ producen una disminución de la adhesión de los explantes a la matriz extracelular y este efecto resultó ser concentración dependiente, es decir, que a concentraciones crecientes de morfolino contra $G\alpha 13$, los explantes presentaron una menor adhesión a la matriz extracelular, efecto estadísticamente significativo al comparar con los explantes controles (figura 11). Se hace importante destacar que, al igual que lo observado en los experimentos de migración celular, es posible rescatar el fenotipo morfante de $G\alpha 13$ co-inyectando con el RNA mensajero de $G\alpha 13$, afirmando nuevamente que el efecto es específico para esta proteína.

Sin embargo, el efecto del silenciamiento de $G\alpha 13$ sobre la adhesión de los explantes a la matriz extracelular, puede ser revertido si se suplementa el medio con manganeso (figura 11), el cual incrementa la afinidad entre la integrina y la fibronectina (Mould, A. P., y col., 1998; Mould, A. P., y col., 2002), aumentando la unión de los explantes a la matriz extracelular, y por consiguiente rescatando el fenotipo morfante. Es importante destacar que la recuperación del fenotipo morfante es dependiente de las dosis de manganeso empleadas y que estadísticamente no existen diferencias entre la adhesión observada para los explantes control y los explantes morfantes tratados con manganeso. Este resultado sugiere fuertemente que $G\alpha 13$ puede regular la adhesión y ejercer su función sobre integrinas.

En resumen, con estos resultados se puede afirmar que las células donde se ha silenciado a $G\alpha 13$ y a Ric-8A presentan un citoesqueleto de actina alterado, donde las protrusiones son más pequeñas que en la condición control y que además estas protrusiones son inestables en el tiempo. Además, los explantes morfantes para $G\alpha 13$ presentan una adhesión disminuida a la matriz extracelular, similar a lo observado en explantes morfantes para Ric-8A (Fuentealba J., 2013).

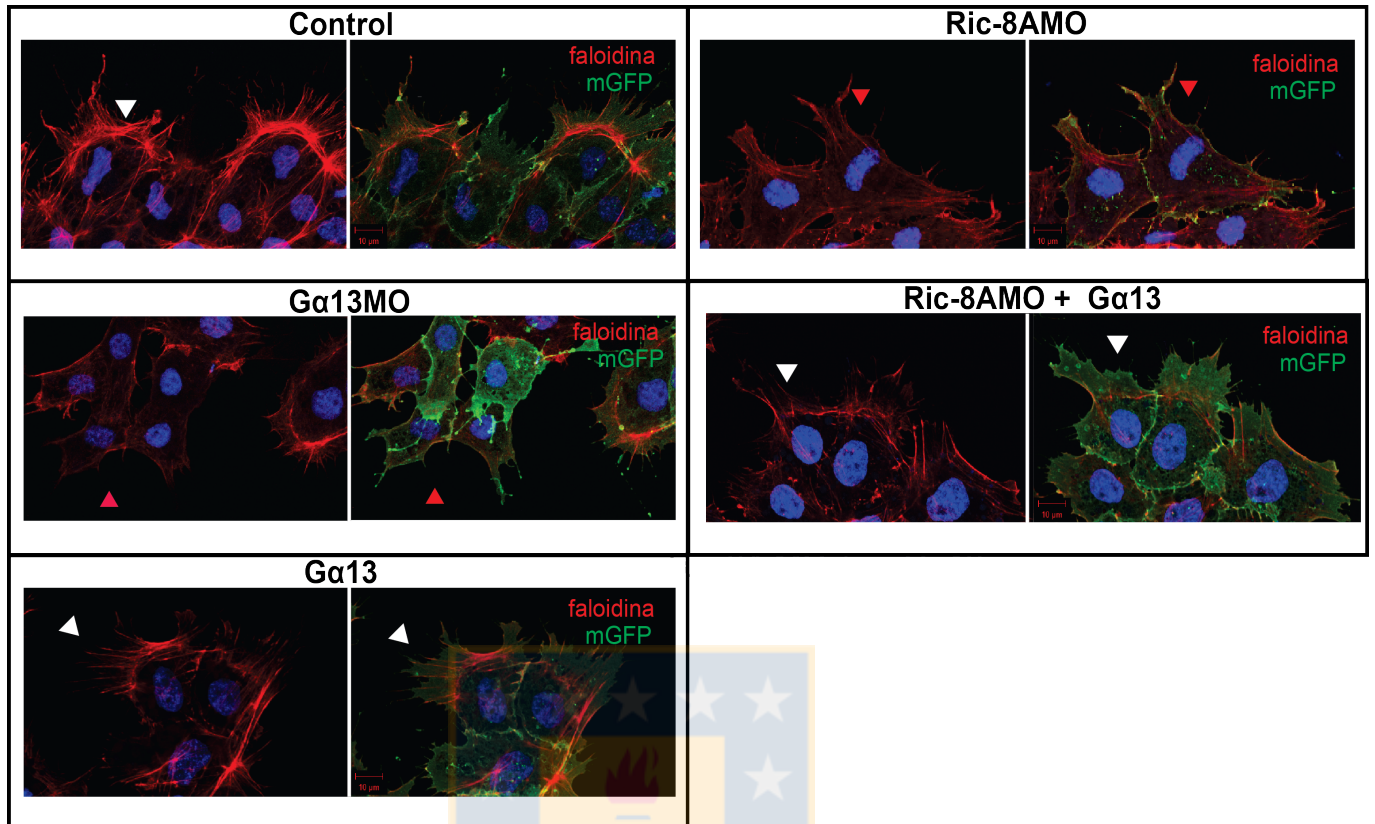


Figura 9: Evaluación de cambios en la estructura del citoesqueleto de actina en células morfantes para $G\alpha 13$ y morfantes para Ric-8A.

Se realizó una inmunofluorescencia para evaluar cambios en la estructura del citoesqueleto de actina, empleando faloidina (rojo) y observando a GFP en la membrana celular (verde), para diferenciar con este último, el contorno de cada célula. Las condiciones analizadas fueron: células controles, células morfantes para Ric-8A (Ric-8AMO), células morfantes para $G\alpha 13$ ($G\alpha 13MO$), sobreexpresión de $G\alpha 13$ ($G\alpha 13$) y epistasis de Ric-8MO con mRNA para $G\alpha 13$ (Ric-8AMO + $G\alpha 13$). Se muestra a la izquierda de cada panel el canal rojo y a la derecha la superposición de todos los canales. Las puntas de flechas blancas muestran las protrusiones normales. Las puntas de flechas rojas protrusiones anormales.

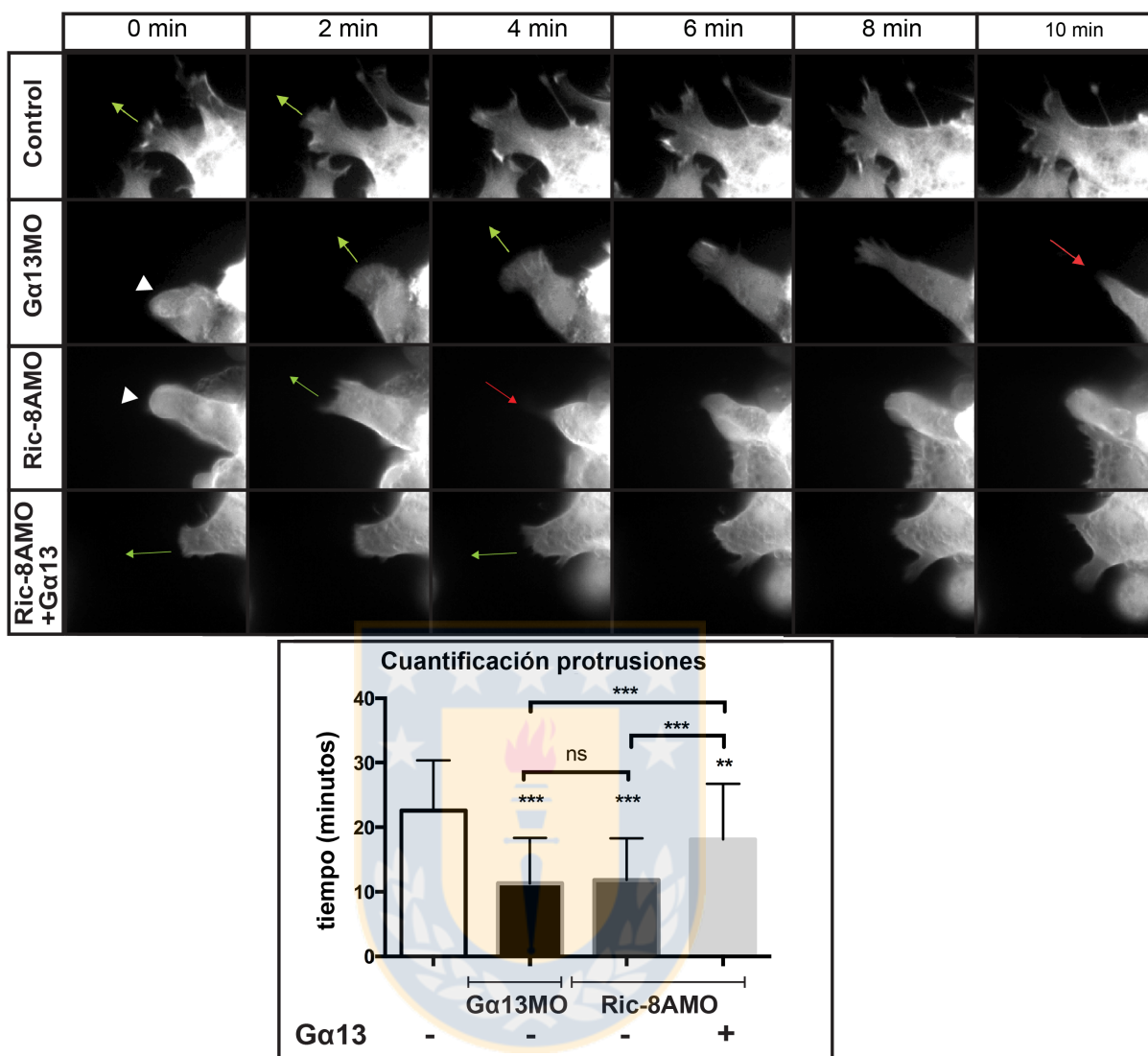


Figura 10: Evaluación del fenotipo del citoesqueleto de actina en las protrusiones de células morfantes para *Gα13* y morfantes para Ric-8A por medio de “time-lapse”.

Se realizaron explantes de embriones previamente inyectados con Life-Act RFP y se analizaron las condiciones: Control (barra blanca), células morfantes para Ric-8A (Ric-8AMO), células morfantes para *Gα13* (*Gα13MO*), y epistasis de Ric-8AMO con mRNA para *Gα13* (Ric-8AMO + *Gα13*). Se cuantificaron las protrusiones en el tiempo, y se graficó la duración promedio en minutos de ellas a las distintas condiciones, de un total de al menos 100 protrusiones medidas, en dos experimentos para cada condición. La flecha de color verde indica la protrusión en crecimiento mientras que en rojo se observa la protrusión colapsada. Se evaluó la significancia con el test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples empleando el test Dunn (**, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$; ns, no significativa). Barras de error: desviación estándar.

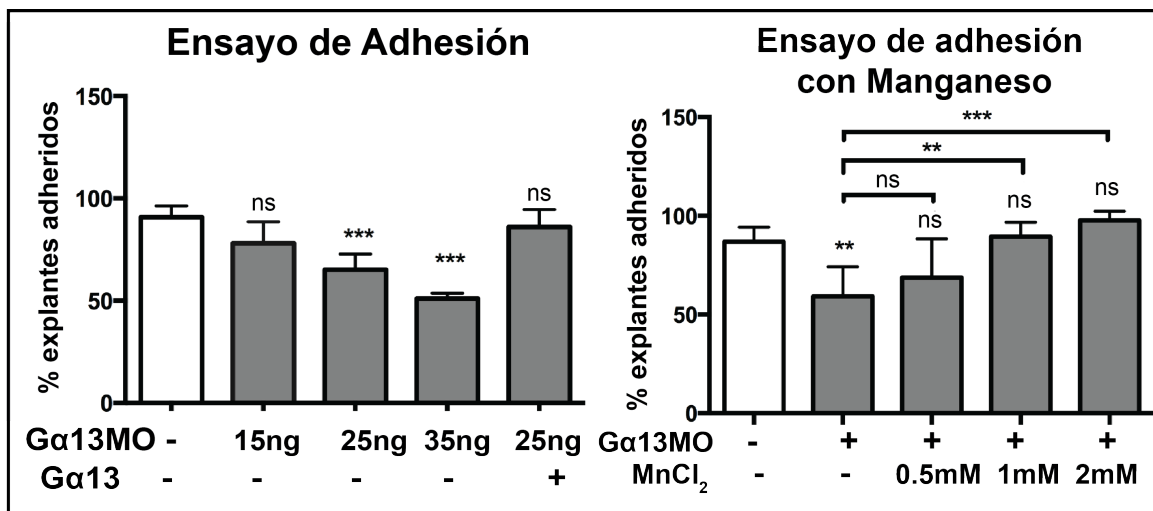


Figura 11: Ensayo de adhesión a la matriz extracelular de explantes morfantes para $G\alpha 13$.

Se realizaron ensayos de adhesión para cuantificar la cantidad de explantes que permanecen adheridos a la matriz extracelular. Se emplearon diferentes concentraciones de morfolino contra $G\alpha 13$ (gráfico de la izquierda) y se suplementó el medio con manganeso (gráfico de la derecha). Tanto para la condición de rescate ($G\alpha 13MO + G\alpha 13$ mRNA) en el gráfico de la izquierda, como para las condiciones con cloruro de manganeso, se empleó la concentración de 25ng de $G\alpha 13MO$ correspondiente a la dosis habitual usada para inhibir la migración de las CNC en *Xenopus laevis*. Los ensayos fueron realizados en triplicado usando entre 30 a 50 explantes por condición. Cada condición se comparó con el control (barra blanca), y para el caso del tratamiento con manganeso, además se realizaron comparaciones entre ellas (señaladas con corchetes). Se evaluó la significancia con el test ANOVA de una vía y se realizaron comparaciones múltiples empleando el test Dunnett (**, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$; ns, no significativa). Barras de error: desviación estándar.

Debido al efecto del silenciamiento de $G\alpha 13$ observado sobre la estabilidad de las protrusiones y también al severo efecto en la adhesión de los explantes a la matriz extracelular, se procedió a estudiar los cambios a nivel de la formación de las adhesiones focales en células morfantes para Ric-8A y $G\alpha 13$, a través de inmunocitoquímica utilizando al anticuerpo contra fosfopaxilina.

En la figura 12a y 12b se puede observar que las células morfantes para Ric-8A y para $G\alpha 13$, presentan una severa disminución en las adhesiones focales, las cuales se ven reducidas tanto en número como en el área ocupada por cada célula (figura 12c), diferencias que son estadísticamente significativas al compararlas con los controles. De forma similar a los resultados descritos anteriormente, el mRNA de $G\alpha 13$ es capaz de rescatar el fenotipo morfante de Ric-8A, donde las células recuperan tanto el número como el área total ocupada por las adhesiones focales, diferencia que es significativa al compararlas con las células morfantes (figura 12c). Sin embargo, esta recuperación no es total si se compara con las células controles (figura 12c). Al mismo tiempo se analizaron la adhesiones focales en la condición de sobreexpresión de $G\alpha 13$, donde se puede observar que la cantidad de adhesiones focales no varía con respecto al control, sin embargo el área total ocupada por estas estructuras sí aumenta (figura 12c).

Con el fin de poder estudiar en mayor detalle las diferencias entre el fenotipo morfante y el control, se realizó una reconstrucción 3D de cada una de estas condiciones. En la figura 12b se puede observar una morfología anormal en las células morfantes para $G\alpha 13$, donde el citoesqueleto de actina se encuentra alterado y se aprecia una considerable disminución de las adhesiones focales al compararlo con las células controles, reafirmando el efecto observado en el análisis de la estructura del citoesqueleto, y a la vez lo observado en las adhesiones focales.

Debido al efecto que tiene el silenciamiento de $G\alpha 13$ sobre las adhesiones focales, es por lo cual se estudió con más detalle, a través de ensayos de “time-lapse”, la dinámica de estas estructuras en el tiempo, empleando el constructo FAK-GFP (que codifica para la quinasa de adhesiones focales fusionada a GFP). Para ello, por lo tanto se microinyectó mRNA de FAK-GFP en conjunto a $G\alpha 13$ MO o control y Life-act para visualizar el citoesqueleto.

Como se observa en la figura 13, las adhesiones focales provenientes de las células controles permanecen estables a lo largo del tiempo, manteniendo a las protrusiones en la dirección de la migración. Por el contrario, las células en donde ha sido silenciado $G\alpha 13$ presentan problemas en la dinámica de las adhesiones focales, las cuales son de menor duración y más pequeñas que en las células control (figura 13a,b). Es interesante recalcar que esta diferencia es significativa, donde la vida media y el tamaño máximo alcanzado por las adhesiones focales está disminuida a la mitad en las células donde ha sido silenciado $G\alpha 13$.

Posteriormente, con el fin de poder estudiar más a fondo la relación entre $G\alpha 13$ y FAK, se decidió realizar una inmunocitoquímica e inmunoprecipitación para evaluar la localización sub-celular

y la interacción de ambas proteínas en las CNC. Como se observa en la figura 13c y 13d, ambas proteínas co-localizan parcialmente en el borde director de las células, en especial en el área de las protrusiones tanto en *Xenopus laevis* como *Xenopus tropicalis*.

A través de ensayos de co-inmunoprecipitación, se logró detectar que ambas proteínas están interaccionando o al menos forman parte del mismo complejo proteico, sin embargo, esta interacción no es tan fuerte como la encontrada entre $G\alpha 13$ y Ric-8A. Además Ric-8A, también estaría formando parte del mismo complejo, lo que se demuestra en la figura 13e. Por otro lado, con el fin de estudiar si para interaccionar con FAK, G13 necesita estar en su forma activa o inactiva, se realizó el mismo ensayo anterior pero usando $G\alpha 13$ constitutivamente activa ($G\alpha 13QL$) o $G\alpha 13$ nativa (sin modificaciones). Como es posible observar en el “western blot” de la inmunoprecipitación, FAK interacciona más fuertemente con $G\alpha 13$ nativa que con su forma constitutivamente activa QL (figura 13f).

En resumen, con estos resultados demostramos que los niveles de $G\alpha 13$ controlan la formación/estabilidad de las adhesiones focales, regulando principalmente la dinámica de estas estructuras, de manera que el silenciamiento de $G\alpha 13$ disminuye tanto el área, como el número y la duración de las adhesiones focales en el tiempo. Además, $G\alpha 13$ co-localiza e interacciona con componentes de las adhesiones focales como lo es FAK, corroborando la importancia que tiene $G\alpha 13$ para la formación de estas estructuras.

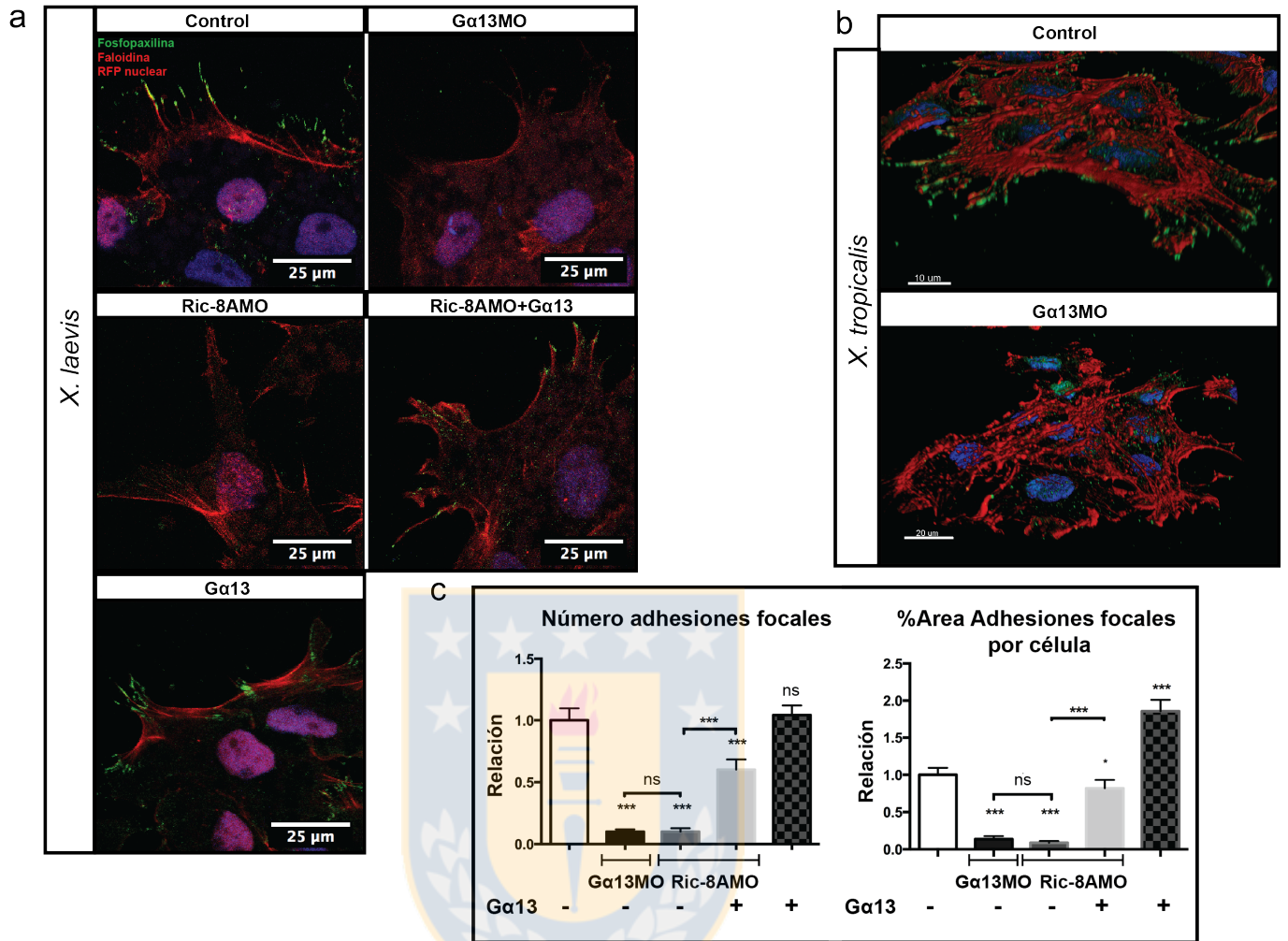


Figura 12: Efecto del silenciamiento de $G\alpha 13$ y Ric-8A sobre las adhesiones focales en células de la CNC.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en explantes de CNC desde embriones tratados con morfolino contra $G\alpha 13$ ($G\alpha 13MO$), morfolino contra Ric-8A ($Ric-8AMO$), morfolino contra RIC-8A más mRNA de $G\alpha 13$ ($Ric-8AMO + G\alpha 13$), y sobreexpresión de $G\alpha 13$ ($G\alpha 13$) para observar la presencia de adhesiones focales utilizando un anticuerpo anti-fosfopaxilina. Se observa en verde a fosfopaxilina, en rojo el citoesqueleto de actina (faloidina) y en azul los núcleos (a). Reconstrucción 3D de explantes de células de la CNC controles y tratadas con morfolino contra $G\alpha 13$ (b), las cuales fueron construidas a través del software IMARIS. Se cuantificó el número de adhesiones focales y el área que ellas ocupan por célula, y se normalizó con respecto al control (barra blanca) (c). Cada condición se comparó con el control, y luego se realizaron comparaciones entre ellas (señaladas con corchetes). Se evaluó la significancia con el test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples empleando el test Dunn (*, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$; ns, no significativa). Barras de error: error estándar. *N total por condición*: Control $n=111$; $G\alpha 13MO$ $n=117$; $Ric-8AMO$ $n=94$; $Ric-8AMO + G\alpha 13$ $n=116$; $G\alpha 13$ $n=193$.

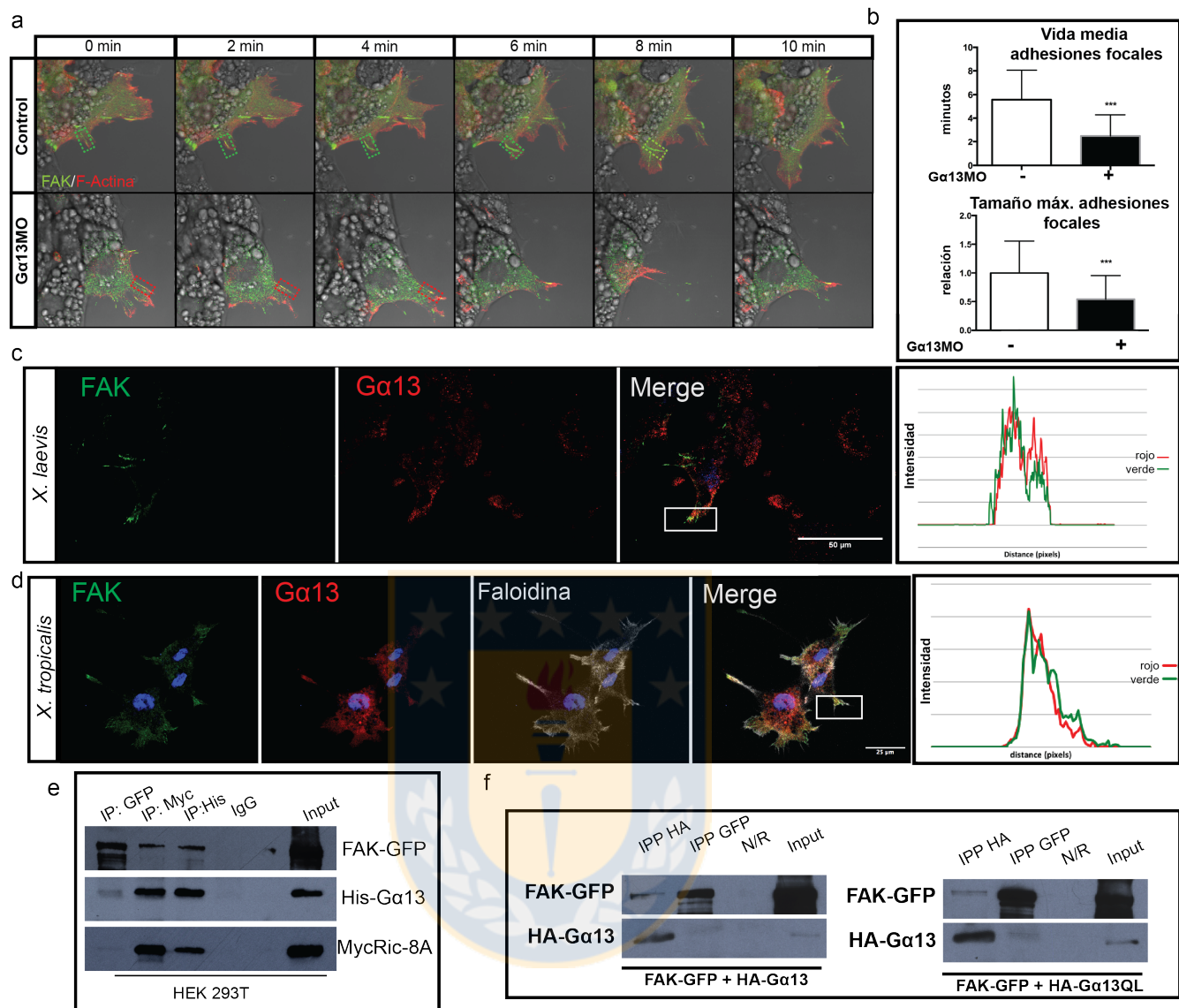


Figura 13: Análisis de la dinámica de las adhesiones focales en células morfantes para $\text{Ga}13$ y estudio de la localización sub-celular e interacción de $\text{Ga}13$ con FAK.

Para observar las adhesiones focales en el tiempo, se realizaron ensayos de “time-lapse” en células de la CNC bajo microscopía TIRF empleando a FAK-GFP (verde) y LifeACT-RFP (rojo), analizando la condición control y la condición morfante para $\text{Ga}13$ ($\text{Ga}13\text{MO}$) (a). Los rectángulos verdes muestran una adhesión focal estable en el tiempo, mientras que los rectángulos rojos muestra una adhesión focal inestable en el tiempo. La cuantificación de la vida media de cada adhesión focal y el área máxima alcanzada por cada una de ellas se grafica en (b). Se analizaron más de 40 adhesiones focales por condición y el experimento fue realizado en duplicado. La condición morfante se comparó con el control. Los datos fueron procesados y comparados empleando la prueba T de Student no pareada (***, $p < 0.001$). Barras de error: desviación estándar. Se analizó a través de ensayos de inmunofluorescencia la localización sub-celular de FAK (verde) y $\text{Ga}13$ (rojo) en células de la CNC de *Xenopus laevis* (c) y *Xenopus tropicalis* (d). El gráfico en cada panel (c) y (d) muestra la intensidad de cada canal en el área seleccionada del panel “merge”, mostrando la co-localización de ambas proteínas. Co-immunoprecipitación de FAK-GFP, $\text{Ga}13$ y Ric-8A empleando células HEK-293T (e). Co-immunoprecipitación de FAK-GFP con $\text{Ga}13$ nativa o constitutivamente activa (QL) en células HEK-293T (f).

Las integrinas son parte fundamental en la formación de las adhesiones focales y como se describió en la introducción, Src es una proteína que se encuentra en esta ruta de señalización y es activada durante la vía de transducción “outside-in” de las integrinas (Parsons, J. T., y col., 2010). Por lo tanto, dentro de este mismo objetivo, y como una forma de indagar en los posibles efectores río abajo que podrían estar involucrados en el mecanismo de cómo Ric-8A y Gα13 regulan la formación de adhesiones focales y con ello la migración de estas células, es que se procedió a analizar si estas proteínas actúan sobre la ruta de señalización de las integrinas. Por este motivo, en embriones morfantes para Gα13, se co-inyectó a Src constitutivamente activa (SrcY527F), proteína que está presente es la vía de señalización de integrinas.

Como se puede observar en la figura 14, los embriones morfantes para Gα13 que fueron inyectados con Src constitutivamente activa, recuperan la migración de las CNC, comparado con los embriones morfantes para Gα13, tanto para *X. tropicalis* (figura 14a) como *X. laevis* (figura 14b). Los gráficos demuestran que sólo un 20% de los embriones de *X. tropicalis* inyectados con el morfolino contra Gα13 presentan una migración normal. Por el contrario, cuando se co-inyecta el morfolino con el RNA mensajero para Src constitutivamente activa, este número se incrementa a un 50%, demostrando que se rescata el fenotipo. Igualmente, observamos un efecto similar en los embriones de *X. laevis*, demostrando que ocurre rescate en ambos modelos (figura 14c). También se analizó la sobreexpresión de Src constitutivamente activa, donde se observa que a las concentraciones utilizadas, no se altera la migración de las CNC (figura 14 b y 14c).

Posteriormente, se realizó una inmunocitoquímica para analizar las adhesiones focales de las diferentes condiciones en presencia de Src constitutivamente activa (figura 15a). Al igual que lo mostrado en los experimentos anteriores, las células morfantes para Gα13 disminuyen el número y el área ocupada por las adhesiones focales en las células de la CNC. Por el contrario, Src constitutivamente activa fue capaz de rescatar el fenotipo morfante de Gα13, donde tanto el número de las adhesiones focales como el área se ven incrementadas significativamente (figura 15b).

En conjunto estos resultados, muestran que Ric-8A y Gα13 regulan la formación de las adhesiones focales y con ello la estabilidad de las protrusiones durante la migración de las células de la CNC. Los experimentos además sugieren que esta regulación sería través de la interacción con la vía de transducción de señales de las integrinas.

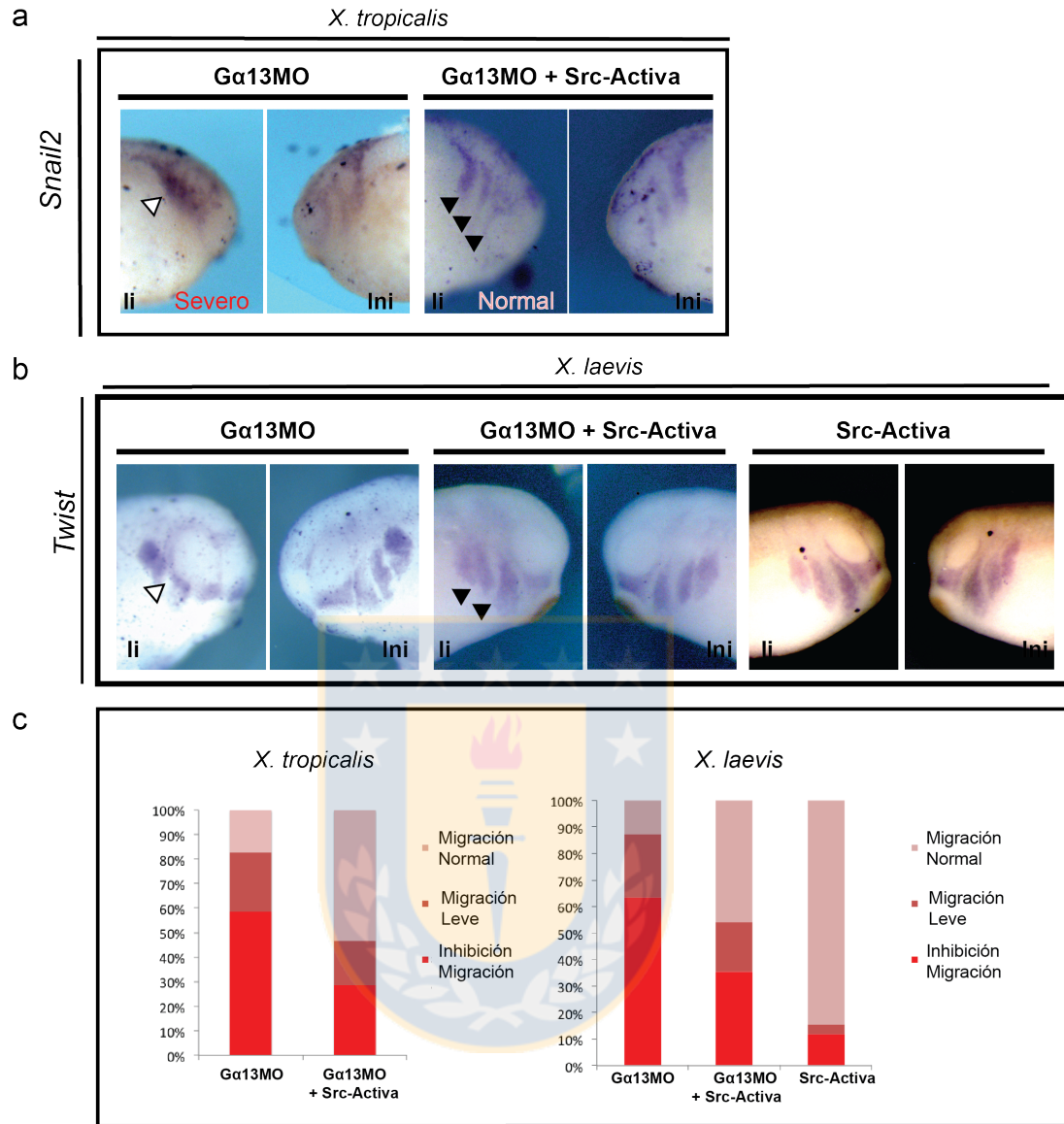


Figura 14: Ensayo de epistasis co-inyectando a Src constitutivamente activa en embriones donde ha sido silenciado Gα13 para analizar la migración *in vivo* de CNC.

Hibridaciones *in situ* fueron realizadas en estadio st23-24 para *X. tropicalis* (a) y estadio st26 en *X. laevis* (b) usando sondas para *snail2* y *twist* como marcadores de CNC, respectivamente. Los embriones fueron inyectados con morfolino contra Gα13 (Gα13MO), morfolino contra Gα13 más mRNA de Src constitutivamente activa (Gα13MO + Active Src) y mRNA de Src constitutivamente activa (ActiveSrc). Se realizó una cuantificación del fenotipo observado con respecto al total de embriones inyectados por condición (c). *N total por condición para X. tropicalis*: Gα13MO: n=69; Gα13MO + Src constitutivamente activa: n=72. *N total por condición para X. laevis*: Gα13MO n= 63; Gα13MO + Src constitutivamente activa n= 107; Src constitutivamente activa n=77. Cabezas de flechas negras: Migración normal de las CNC. Cabeza de flecha blancas: Migración alterada de las CNC. li: Lado inyectado; lns: Lado no inyectado.

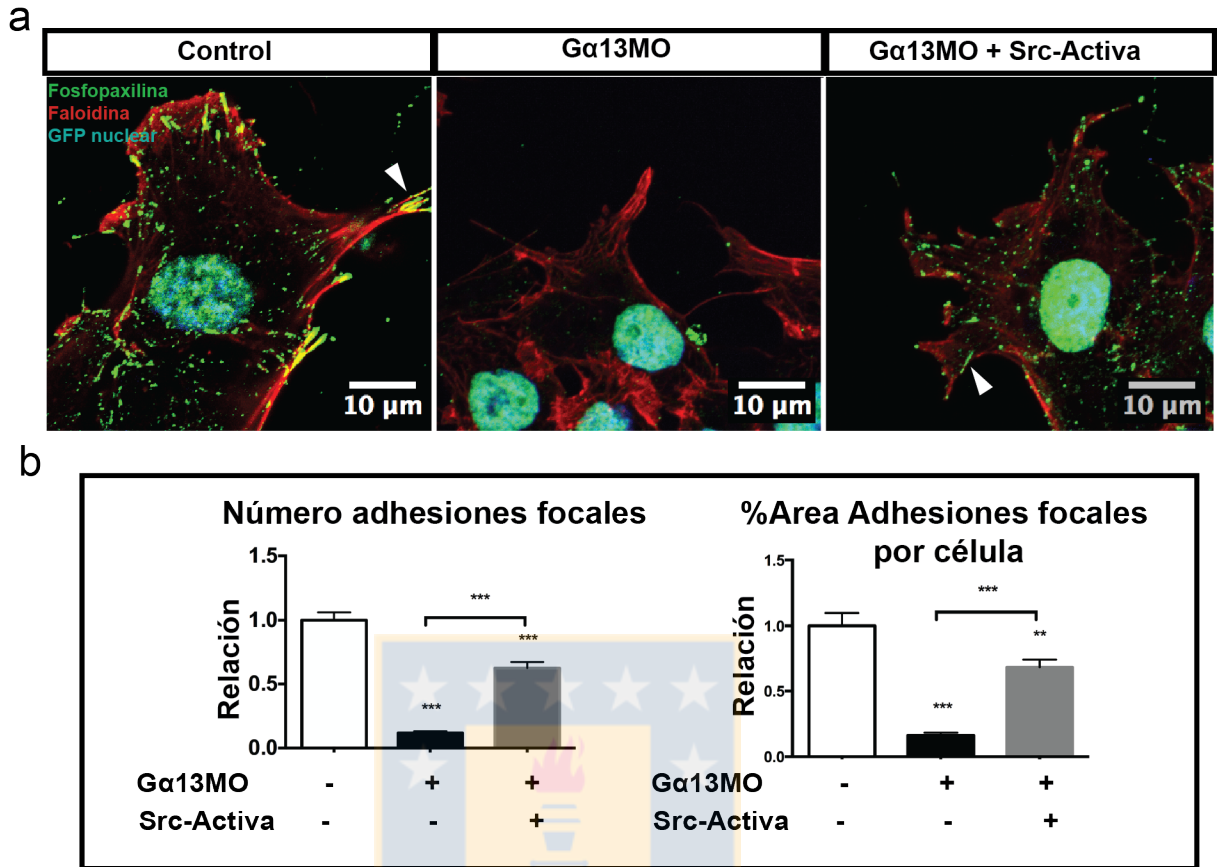


Figura 15: Ensayo de epistasis co-inyectando a Src constitutivamente activa en células donde ha sido silenciado Gα13 para analizar adhesiones focales en células de CNC.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en células tratadas con morfolino contra Gα13 (Gα13MO), morfolino contra Gα13 más mRNA de Src constitutivamente activa (Gα13MO + Src-Activa), y células control para analizar las adhesiones focales en explantes de CNC en migración. Se puede observar en verde a fosfopaxilina, en rojo al citoesqueleto de actina (faloidina) y también en verde los núcleos (a). Se cuantificaron el número de adhesiones focales y el área que ellas ocupan por célula, y se normalizaron con respecto al control (barra blanca) (b). Cada condición se comparó con el control, y luego se realizaron comparaciones entre ellas (señaladas con corchetes). Se evaluó la significancia con el test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples empleando el test Dunn (**, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$). Barras de error: error estándar. *N total por condición*: Control $n=134$; Gα13MO $n=234$; Gα13MO+ Src constitutivamente activa: $n=210$.

OBJETIVO 3: Analizar la función de Ric-8A y Gα13 sobre la polaridad celular durante la migración de las células de la cresta neural craneal de *Xenopus*.

Las células de la CNC migran direccionadamente, incluso en explantes *in vitro* donde no existe un quimioattractante, y para esto es esencial que se establezca una polaridad celular (Ridley, A. J., y col., 2003). Para poder determinar el efecto que tiene Gα13 y Ric-8A sobre la polaridad celular de las CNC durante la migración, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en explantes empleando un anticuerpo anti-aPKC como marcador de polaridad. Considerando que esta proteína está involucrada directamente en la polaridad celular en los procesos migratorios, se estudió su localización en embriones morfantes para Ric-8A y para Gα13.

Como podemos observar en la figura 16, las células control presentan una localización de aPKC en la corteza celular, principalmente en el borde director de las CNC, co-localizando con GFP de membrana, similar a la localización observada para Ric-8A y Gα13, como se describió previamente en esta tesis. Por otro lado, en ambas condiciones, en células donde ha sido silenciado tanto Ric-8A como Gα13, se observa que aPKC pierde esta localización (Figura 16, Gα13MO y Ric-8AMO). Además, similar a lo observado en los resultados previamente descritos, el mRNA para Gα13 es capaz de recuperar parcialmente el fenotipo morfante para Ric-8A, observándose el rescate del fenotipo nuevamente, pero esta vez sobre el marcador de polaridad celular aPKC (Figura 16, Ric-8AMO + Gα13). Finalmente, se analizó la localización de aPKC en explantes donde se sobreexpresó a Gα13, observándose que a las concentraciones utilizadas, no se altera la localización del marcador de polaridad, permaneciendo esta proteína en la corteza celular del borde director.

Se ha descrito que las células de la CNC en su ambiente embrionario, son capaces de migrar de forma direccionada y colectiva hacia la quimioquina Sdf-1, debido a que expresan a CXCR4, un GPCR (Theveneau, E., y col, 2010). Por lo tanto, con el fin de determinar la participación de Gα13 en este proceso, donde la polaridad celular cumple un rol fundamental, se decidió realizar ensayos de quimiotaxia en CNC. Para ello, se enfrentaron explantes de células morfantes para Gα13 y células controles a esferas conjugadas con Sdf-1 y se analizó la migración mediante microscopía de “time-lapse”.

Como se observa en la figura 17, las células de explantes controles migran normalmente a la fuente quimotáctica Sdf-1 durante las 5 horas y media de migración, mientras que las células tratadas con el morfolino contra Gα13 no migran, permaneciendo prácticamente en el mismo lugar donde fueron sembradas. El porcentaje de explantes que tuvieron una correcta migración quimiotáctica en la condición control fue de un 68%, decayendo este porcentaje a 36% en las células morfantes para Gα13, corroborando el efecto que tienen los niveles de esta proteína en el proceso de migración. Este resultado es similar al que se obtuvo para el silenciamiento de Ric-8A, donde también se observó un

severo efecto sobre la quimiotaxia (Fuentelba J., y col. 2013). Además se realizaron ensayos de rescate, donde el RNA mensajero de $G\alpha 13$ es capaz de recuperar el fenotipo morfante de $G\alpha 13$, demostrando, que el efecto morfante es específico para $G\alpha 13$. Para esta condición se observó un 91% de migración de los explantes hacia Sdf-1, mostrando la eficiencia que tubo este ensayo de rescate.

Resumiendo, considerando los resultados de este objetivo se puede concluir que tanto Ric-8A y $G\alpha 13$ están involucrados en procesos de polaridad celular, debido a que ambas proteínas se requieren para la correcta localización del marcador de polaridad aPKC. Por otro lado, Ric-8A y $G\alpha 13$ son necesarios para una apropiada migración hacia la fuente quimiotáctica Sdf-1, probablemente debido a su función en la formación de adhesiones focales y en el adecuado establecimiento de la polaridad celular.



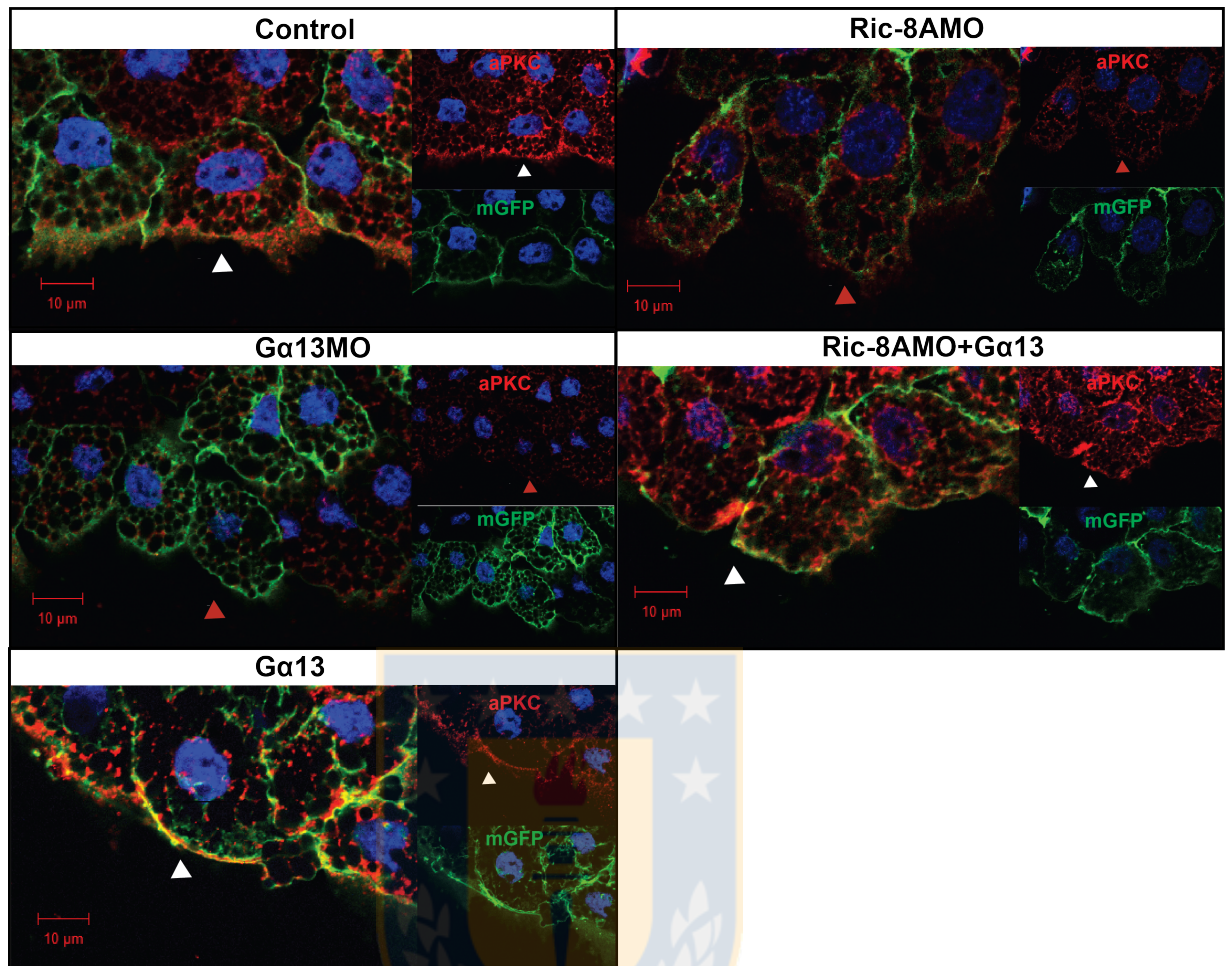


Figura 16: Análisis funcional de Ric-8A y $G\alpha 13$ en la polaridad celular a través de la detección de aPKC en células morfantes.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo anti-aPKC sobre diferentes condiciones: Control, células tratadas con morfolino contra Ric-8A (Ric-8AMO), células tratadas con morfolino contra $G\alpha 13$ ($G\alpha 13$ MO), células tratadas con mRNA para $G\alpha 13$ más morfolino contra Ric-8A (Ric-8AMO + $G\alpha 13$), y células tratadas sólo con mRNA para $G\alpha 13$. Se puede observar en rojo a aPKC (PKC ξ), en verde a GFP de membrana y en azul los núcleos. En cada caso, los paneles grandes muestran la sobreposición de cada condición y los paneles pequeños el canal rojo y verde por separado. Cabezas de flecha blancos: aPKC en corteza celular del frente de migración. Cabeza de flecha rojo: Pérdida de localización de aPKC.

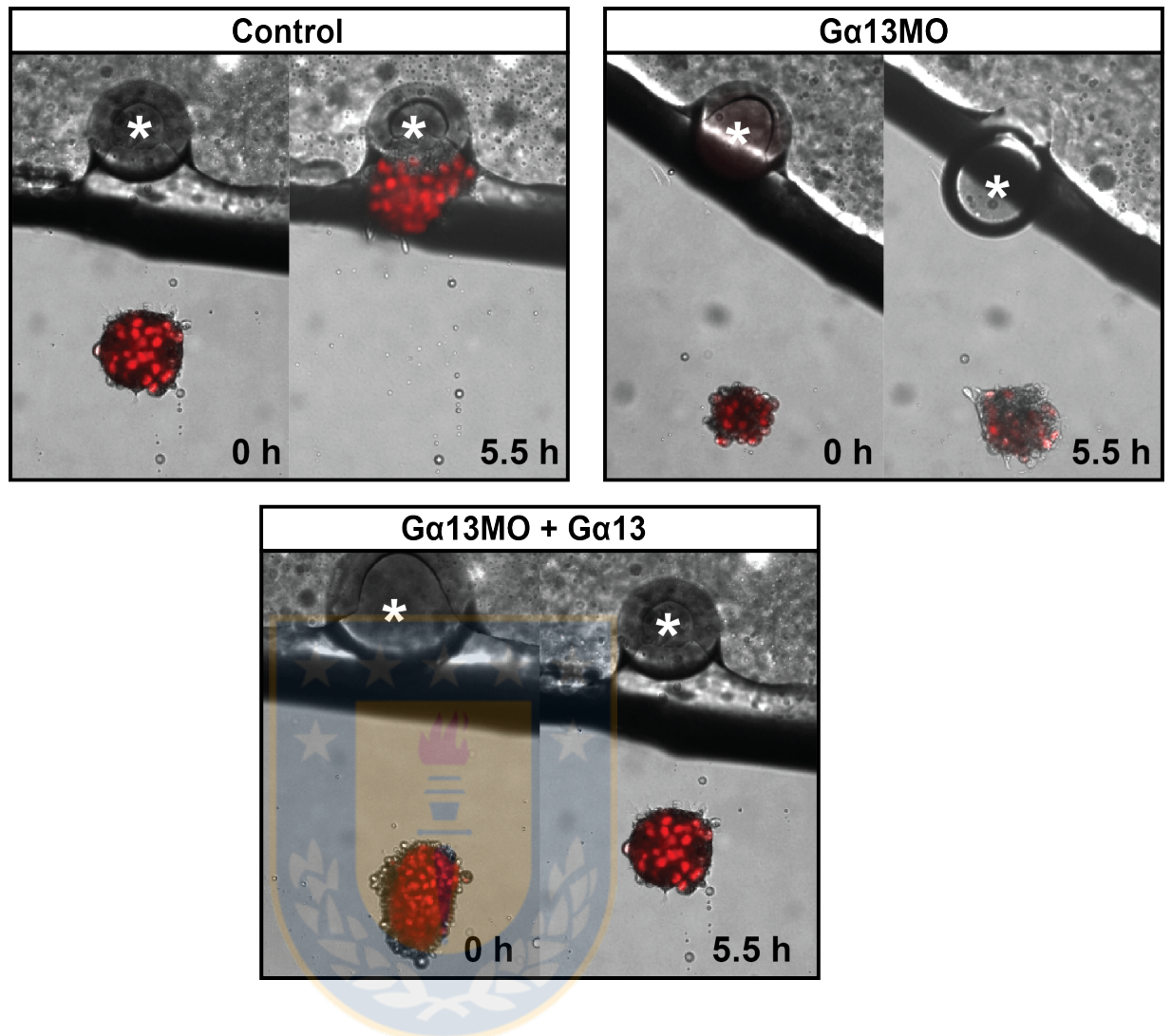


Figura 17: Ensayo de quimiotaxia en explantes morfantes para $G\alpha 13$.

Se realizaron ensayos de quimiotaxia en explantes extraídos desde embriones previamente co-inyectados con RFP-nuclear (H2B), morfolino contra $G\alpha 13$, o morfolino contra $G\alpha 13$ y mRNA para $G\alpha 13$ para el caso de la condición de rescate. En la parte superior, se puede observar la condición control y la condición morfante, y en la parte inferior el rescate del fenotipo morfante de $G\alpha 13$. En cada caso se muestra la posición de los explantes, al tiempo cero a la izquierda y la posición de los explantes a las 5 horas y media a la derecha. El asterisco muestra a la esfera conjugada a Sdf1. *N por condición*: Control n=28; $G\alpha 13MO$ n=22; $G\alpha 13MO + G\alpha 13$ n= 11.

V) DISCUSIÓN

i) *Ric-8A actúa corriente arriba de Gα13 y ambas son necesarias para una correcta migración*

Desde el evento de fertilización, hasta la generación de conexiones nerviosas durante la formación del cerebro, la migración celular cumple un rol fundamental a través de toda la embriogénesis y para esto, se requiere de una fina regulación a través de distintas vías de señalización. Una de las vías de señalización descritas cumpliendo un papel importante durante la migración es la vía de señalización de las proteínas G heterotriméricas.

La mayoría de los estudios de la proteína G heterotrimérica en migración celular durante el desarrollo embrionario se han realizado durante los movimientos de gastrulación, proceso en el cual también se ha visto involucrado a Ric-8A, proteína GEF relativamente nueva cuya función ha sido descrita en múltiples procesos celulares. Sin embargo, estudios de su función durante la embriogénesis en vertebrados, al momento de comenzar este trabajo de tesis habían sido relativamente escasos. En nuestro grupo de investigación, reportamos una nueva función para Ric-8A durante el desarrollo embrionario en el organismo modelo anfibio *Xenopus*, donde se comprobó que esta proteína es esencial para la migración celular de una población que es altamente migratoria durante la embriogénesis, la CNC. Uno de los mayores descubrimientos fue el considerable efecto inhibitorio sobre la migración de las CNC, una vez que Ric-8A es silenciado (Fuentealba, J., y col. 2013), sin embargo el mecanismo por el cual Ric-8A regula la migración celular, hasta el momento no había sido develado. En el marco de este trabajo de tesis, corroboramos lo observado anteriormente en nuestro laboratorio, donde el silenciamiento de Ric-8A inhibe la migración de las CNC, demostrando por el contrario que la sobreexpresión no produce efecto sobre este proceso al menos en las condiciones analizadas. Esto concuerda con varios trabajos donde se ha silenciado a Ric-8A, lo cual afecta considerablemente la migración de células fibroblásticas de embriones de ratón (Wang, L., y col. 2011), la migración de linfocitos B (Boullaran, C., y col., 2015) y la migración de células durante los movimientos de gastrulación en pez cebra (Kanesaki, T., y col., 2013; Peters, K. A., & Rogers, S. L., 2013).

Durante el desarrollo de esta tesis se identificó a la subunidad Gα13 cumpliendo un rol importante en la misma ruta de señalización de Ric-8A, la cual fue capaz de rescatar el fenotipo provocado por el silenciamiento de esta última, recuperando la migración de las CNC tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, Ric-8A no es capaz de rescatar el fenotipo inducido por el silenciamiento de Gα13, sugiriendo que Gα13 se encuentra río abajo de la cascada de señalización, lo que es compatible con un modelo según el cual Ric-8A actuaría como GEF para Gα13. Este hallazgo sobre Gα13 y Ric-8A involucradas en el procesos de migración, no es el primero, ya que existen otros

trabajos que han vinculado a ambas proteínas participando en conjunto durante la migración celular en otros tipos celulares (Peters, K. A., & Rogers, S. L., 2013; Wang, L., y col. 2011). Los trabajos antes mencionados, además de demostrar la participación de estas proteínas en la misma vía de señalización, muestran a través de ensayos de inmunoprecipitación y “GST-pulldown”, que ambas proteínas se encuentran interaccionando y forman parte de un mismo complejo, similar a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis. Otro importante hallazgo de nuestro trabajo de tesis, es que la pérdida de función de $G\alpha 13$, produce el mismo efecto que el silenciamiento de Ric-8A descrito en Fuentealba y col., 2013, impidiendo que las células de la CNC respondan a señales provenientes de los tejidos circundantes, demostrando así el comportamiento de autonomía celular que adoptan estas células en ausencia de $G\alpha 13$. Si se analiza y compara la función que cumplen ambas proteínas durante el desarrollo embrionario con estudios realizados en otros modelos animales, es interesante resaltar que tanto los ratones deficientes para $G\alpha 13$ como ratones “knock-out” para Ric-8A mueren durante estadios tempranos de embriogénesis (Gabay, M., y col., 2011; Gu, J. L., y col., 2002; Tõnissoo, T., y col., 2010). Sin embargo, la diferencia radica, en que los embriones “knock-out” para $G\alpha 13$ mueren en estadios cercanos al E10, cuyos fenotipos anormales son asociados principalmente a defectos angiogénicos (Gu, J. L., y col., 2002), mientras que los embriones “knock-out” para Ric-8A mueren en estadios entre E6.5-E8.5 (Tõnissoo, T., y col., 2010). Aunque ambas proteínas son importantes durante la embriogénesis, los embriones “knock-out” para Ric-8A mueren en estadios aún más tempranos (cerca de la gástrula), sugiriendo que Ric-8A no sólo controla la señalización de $G\alpha 13$, si no que probablemente se encuentra asociada a la señalización de otras proteínas G heterotriméricas. Este efecto puede deberse a la pleiotropía que se ha asociado a Ric-8A, actuando sobre las diferentes subunidades α de las proteínas G heterotriméricas y así regulando diferentes procesos durante la embriogénesis (Offermanns, S., 2001).

Por otro lado, se ha estudiado la función de la familia $G\alpha 12/13$ acoplada al receptor de endotelina durante el desarrollo de las CN en ratón, empleando animales “knock-out” condicionales para el silenciamiento específico de esta familia de $G\alpha$ en ese tejido, durante etapas de migración posteriores a su separación del neuroepitelio (Dettlaff-Swiercz, D. A., y col., 2005). A diferencia de nuestros hallazgos, estos investigadores demostraron que la familia $G\alpha 12/13$ escasamente participa en el desarrollo de las CNC, debido a que los embriones presentan pocos defectos craneo-faciales, presentando defectos principalmente en tejidos derivados de CN cardiacas (Dettlaff-Swiercz, D. A., y col., 2005). No obstante, se necesitan más análisis para concluir ciertamente sobre la participación de la familia $G\alpha 12/13$ en el desarrollo de las CNC en ratón. Si comparamos los resultados del trabajo de Dettlaff-Swiercz, D. A., y col., 2005, con los nuestros, las diferencias entre ambos resultados nos podrían indicar que; 1) $G\alpha 12/13$ podría ser factor clave durante la EMT y por ese motivo esta proteína

no produce efectos durante la migración de las CNC en ratón, o 2) La participación de $G\alpha_{12/13}$ durante el proceso de migración de las CNC en *Xenopus* es diferente al proceso ocurrido en mamíferos. Avalando al primer punto, se ha descrito que $G\alpha_{13}$ participa del des-ensamblaje de las uniones adherentes en células del endotelio (VE-cadherina), incrementando la permeabilidad del tejido (Gong, H., y col., 2014). Gong H., y col. (2014), describieron que $G\alpha_{13}$ es capaz de interactuar con VE-cadherina, y que la vía de la señalización de $G\alpha_{13}$ la cual es dependiente de ligandos pro-inflamatorios, induce la fosforilación de VE-cadherina vía Src, proceso que es responsable de la internalización de la proteína. Además se ha reportado, que la familia $G\alpha_{12/13}$ interactúa directamente con la cola citoplasmática de cadherinas, causando la liberación de β -catenina (Meigs, T. E., y col., 2001) y también regulando negativamente las propiedades adhesivas de E-cadherina (Meigs, T. E., y col., 2002), proceso que explicaría como esta proteína podría estar contribuyendo a la EMT. Adicionalmente, se sabe que en las CNC, la ausencia de E-cadherina en las células mesenquimales, provoca la activación de Rac-1 y la formación de protrusiones y adhesiones focales polarizadas hacia el lado contrario de la unión célula-célula, con altas fuerzas de tracción que permiten la separación de ambas células (Scarpa, E., 2015), dando paso eventualmente a la migración. Los antecedentes mostrados sugieren fuertemente que $G\alpha_{13}$ podría estar participando en la EMT y de esta forma promoviendo la migración celular en las CNC, y también podría ser una explicación al por qué las células morfantes para $G\alpha_{13}$ no se dispersan adecuadamente, así como se observó en este trabajo de tesis.

Es interesante destacar, que tanto en explantes de células morfantes para Ric-8A como en explantes morfantes para $G\alpha_{13}$, se observó inhibición de la dispersión radial y por ende inhibición de la migración celular. Por otro lado, al evaluar las mismas condiciones de dispersión pero sacando a las células de su contexto grupal, las CNC recuperan su capacidad de migrar. Este resultado sugiere que, probablemente ambas proteínas son requeridas para algunos de los mecanismos descritos para la regulación de la migración de las CNC, ya sea CIL o CoA, y por esa razón las células no pueden migrar cuando se encuentran en grupo. Debemos considerar también, que para realizar los análisis de migración en células individuales, se eliminó el calcio del medio en donde se incubó las CNC para facilitar la disgregación celular. La ausencia de calcio impide la formación de las uniones adherentes (Hyafil, F., y col., 1981) y este protocolo podría inducir hipotéticamente un rescate del fenotipo producido por silenciamiento de $G\alpha_{13}$, sólo si consideramos a esta proteína como un factor clave en la EMT, como se describió previamente. En este caso en las CNC, si se considera a $G\alpha_{13}$ necesaria para la EMT, las células morfantes para esta proteína presentarían una mayor expresión de E-cadherinas probablemente provocados por defectos en su internalización y/o problemas en la regulación de las propiedades adhesivas de las cadherinas, tal como describió Meigs, T. E., y col., (2002) y Gong, H., y

col., (2014). Para contribuir a este punto, y avalar o descartar la participación de $G\alpha 13$ en la EMT, es necesario evaluar la presencia de E-cadherina en las uniones célula a célula de las CNC.

Además dentro de los análisis realizados en células individuales, se cuantificó tanto la velocidad como la distancia acumulada por las células morfantes, las cuales resultaron ser ligeramente mayores que las de los controles, en especial las silenciadas para $G\alpha 13$. Este punto se analizará más adelante, debido a que posiblemente el efecto de “tambaleo” observado, pueda deberse a problemas de interacción de las CNC con la matriz extracelular.

ii) *Ric-8A y $G\alpha 13$ se localizan en la corteza celular en el frente de migración*

La localización subcelular tanto de Ric-8A como de $G\alpha 13$ en las CNC corresponde a la corteza celular, principalmente en el borde director de estas células, consistente con lo publicado previamente (Fuentealba, J., y col., 2013; Woodard, G. E., y col., 2010). Además, se conoce que $G\alpha 13$ presenta palmitoilación, modificación lipídica que afecta la localización subcelular, asociando a la proteína modificada a la membrana, la cual también es necesaria para la translocación de proteínas efectoras de $G\alpha 13$ como p115RhoGEF (Suzuki N., y col., 2009). Al mismo tiempo, en esta tesis reportamos que la localización subcelular de $G\alpha 13$ presenta un patrón “punteado” en las inmunocitoquímicas, similar al de radixin, una proteína de unión a actina miembro de la familia ERM (Ezrin- Radixin-Moesin), con la cual co-localiza (Vaiskunaite, R., y col., 2000).

Por otro lado, observamos que la deficiencia en Ric-8A en las CNC impidió la translocación de $G\alpha 13$ a la corteza celular, similar a los observado por Wang, L., y col. (2011) y Peters, K. A., y Rogers, S. L., (2013), efecto que también se ha visto sobre otras subunidades $G\alpha(s)$ (Gabay, M., y col., 2011; Saare, M., y col., 2015; Wang, H., y col., 2005). Esto se podría explicar debido a que se ha postulado que Ric-8A tiene actividad chaperona sobre las diferentes subunidades $G\alpha$, (Gabay, M., y col., 2011), la cual ayuda en la estabilidad de la proteína y su unión temprana a endomembranas, lo que permite su eficiente llegada a la corteza celular. Avalando lo anterior, también se ha observado que Ric-8A tiene actividad chaperona sobre $G\alpha i 2$, $G\alpha i 3$ y $G\alpha q$, mientras que los niveles de $G\alpha s$ y $G\alpha 12$ permanecen estables sin variación en células del bazo y macrófagos derivados de la médula ósea (Boullaran, C., y col., 2015). Cabe destacar, que el efecto observado sobre la localización de $G\alpha 13$ en CNC morfantes para Ric-8A es similar a lo descrito por Peters, K. A., y Rogers, S. L (2013), donde no se observaron cambios en los niveles de expresión de $G\alpha 13$, apoyando la posibilidad que Ric-8A ayuda en la translocación de $G\alpha 13$ a la membrana, pero sugiriendo que Ric-8A no protege a $G\alpha 13$ de la degradación, similar a los resultados obtenidos en esta tesis. Por otro lado, respecto a que no observamos cambios en los niveles proteicos de $G\alpha 13$, no descartamos el hecho, que debido a que para obtener una cantidad de proteína endógena detectable por “western blot”, se emplearon a varios

embriones inyectados con el morfolino, y cada individuo puede responder de diferente manera (silenciando en mayor o menor medida a la proteína en cuestión). También existe la posibilidad que no todos los embriones regulan de igual manera la degradación de la proteína. Y por último, se debe considerar que los niveles de degradación de $G\alpha 13$ podrían no variar considerablemente entre los embriones controles y embriones morfantes para Ric-8A, y por ende la técnica de “western blot” empleada puede no haber sido lo suficientemente sensible para detectar la diferencia de expresión de $G\alpha 13$ en este análisis. Por otro lado, a pesar que los estudios descritos por Gabay M., y col., (2011) muestran que los cambios en los niveles de expresión de $G\alpha 13$ entre las células controles y aquellas donde se silenció Ric-8A son evidentes, esta diferencia no es tan drástica como los observados para las otras subunidades $G\alpha(s)$ como $G\alpha i$ o $G\alpha q$, lo que nos indicaría que puede que nuestros ensayos requieran de una mayor sensibilidad para determinar tales cambios en la expresión de $G\alpha 13$, y que posiblemente Ric-8A actúa como chaperona a cargo principalmente de la translocación más que de su estabilidad.

iii) *Ric-8A y $G\alpha 13$ regulan la morfología celular durante la migración*

En este trabajo de tesis demostramos que el silenciamiento de Ric-8A y de $G\alpha 13$ afecta considerablemente la estructura de la actina cortical, cambiando completamente la morfología celular de las CNC. Esto es consistente con lo descrito por otros investigadores, quienes demostraron la participación de Ric-8 y $G\alpha 13$ en la migración celular en otros tipos celulares, en los cuales esta ruta de señalización estaría remodelando fuertemente el citoesqueleto de actina en las células, ya sea por el recambio de los “ruffles” de membranas durante la migración celular como de la formación de la actomiosina cortical necesaria para la contracción celular durante los movimientos de gastrulación (Peters, K. A., & Rogers, S. L., 2013; Wang, L., y col. 2011). Complementando estos estudios Kanesaki y col., el año 2013, demostraron que la señalización de la proteína G heterotrimérica, incluyendo la participación de Ric-8, organiza la actina cortical, y por lo tanto, estas proteínas se encargan de reforzar la resistencia de las células contra la deformación. En este estudio se demostró que el silenciamiento de componentes de la señalización de proteína G heterotrimérica, resulta en la formación de “blebs” en la superficie de las células. Estas estructuras se forman por la perturbación de la actina cortical, la cual es inducida por la contracción local de la superficie, proponiendo que la organización cortical de actina proveniente de la señalización de las proteínas G heterotriméricas, es necesaria para reforzar la corteza de la célula, de manera de soportar el estrés hidrostático durante el plegamiento del tejido en la gastrulación (Kanesaki, T., y col., 2013). Por otro lado, históricamente se ha relacionado a $G\alpha 13$ con la reorganización del citoesqueleto, modulando directamente a proteínas RhoGEFs, tales como p115RhoGEF y LARG las cuales son capaces de activar a la proteína G pequeña

Rho, clásico modulador de la actina (Suzuki N., y col., 2009). Adicionalmente, se ha reportado a $G\alpha 13$ interaccionando y activando directamente a Radixina, proteína que cumple una función importante en la unión del citoesqueleto de actina a receptores de la membrana plasmática (Vaiskunaite, R., y col., 2000). Estudios recientes, además han demostrado que Radixina promueve la migración, regulando la polaridad celular y la formación de uniones adherentes de células epiteliales mediadas por Vav-GEF, conocido activador de Rac-1 (Valderrama, F., y col., 2012), con lo cual no se descarta la posible relación de Radixina con nuestro sistema celular. Por otra parte, en este trabajo de tesis se logró detectar mediante análisis de “time-lapse” de las protrusiones de las CNC, una fuerte disminución en la estabilidad en el tiempo de la protrusiones durante su formación, lo que nos condujo a analizar las estructuras que determinan la unión de las células a la matriz extracelular: las adhesiones focales.

iv) *Ric-8A y $G\alpha 13$ regulan la adhesión a la matriz*

Similar a lo descrito por Fuentealba y col. (2013) en células morfantes para Ric-8A, las células morfantes para $G\alpha 13$, presentan defectos en la adhesión a la matriz extracelular, fenotipo que puede ser rescatado con el mensajero respectivo, así como también por el ion divalente manganeso en las CNC, sugiriendo la participación de integrinas en este proceso.

Las integrinas son una gran familia de receptores de adhesión celular compuesto por un heterodímero $\alpha\beta$ altamente conservado. Estas estructuras presentan una región extracelular y una intracelular, las que se encargan de la unión con el ligando y de la interacción con proteínas adaptadoras-activadoras de la señalización del receptor, respectivamente (Takada, Y., y col., 2007). La región extracelular además presenta dominios de unión a iones metálicos divalentes tales como magnesio, calcio y manganeso, los cuales están encargados de mediar la unión del ligando al receptor, (Takada, Y., y col., 2007). Se sugiere que Mn^{2+} actúa como un potente activador de las integrinas, debido a que pueden inducir cambios en la estructura, en especial de $\beta 1$, modulando una unión persistente sobre el ligando, dejándola en una conformación de alta afinidad (Mould, A. P., y col., 1998; Mould, A. P., y col., 2002). Otros reportes sugieren que la acumulación de integrinas (agrupación formada post-unión al ligando) dependientes de manganeso, no necesariamente se vincula a F-actina como un contacto focal real, debido a que proteínas adaptadoras de las adhesiones focales, tales como vinculina, paxilina, y FAK, no se asocian con las agrupaciones formadas *de novo* inducidas por este ion (Cluzel, C., y col., 2005). Por otro lado, también existen publicaciones, donde el tratamiento con manganeso activa a las integrinas, promoviendo la formación de adhesiones focales normales, reclutando a proteínas adaptadoras y fibras de estrés (Dormond, O., y col., 2004; Lydolph, M. C., y col., 2009). Ya sea por acción directa de la formación de nuevas adhesiones focales o realizando un desvío en la señalización para promover una fuerte unión entre las integrinas y la matriz

extracelular, el tratamiento de las células morfantes para $G\alpha 13$ con manganeso realizado en esta tesis, incrementó la unión de las células a la matriz extracelular, quedando aún por indagar, si este rescate involucra también una recuperación de la migración celular y de la formación de nuevas adhesiones focales.

Como se mencionó en la introducción, recientemente se ha descrito que células de la glía proveniente del cerebelo deficientes en Ric-8A, muestran una disminución de la afinidad por componentes de la membrana basal (Ma, S., y col., 2012). Dentro de los experimentos realizados en esta tesis como una forma de estudiar en más detalle la unión a la matriz extracelular, se evaluó en células morfantes para $G\alpha 13$ y para Ric-8A, la expresión del marcador de adhesiones focales maduras fosfopaxilina. Estos experimentos mostraron que ambas condiciones de silenciamiento disminuyen considerablemente el número y el área ocupada por las adhesiones focales, lo que podría explicar los defectos que presentan estas células en la unión a la matriz extracelular. Hace 20 años atrás, se describió que la sobreexpresión de $G\alpha 12$ y $G\alpha 13$ estimula la formación de las fibras de estrés y de las adhesiones focales a través de la activación de la proteína G pequeña Rho (Buhl, A. M., y col., 1995). Estos autores, utilizaron las formas activadas de $G\alpha 13$ y de Rho, donde se observó un claro aumento de las fibras de estrés en las células microinyectadas, y por consecuencia, en la formación de adhesiones focales (Buhl, A. M., y col., 1995). Sin embargo, este estudio no analiza el efecto de la pérdida de función de $G\alpha 13$, ni tampoco analiza en más detalle a las adhesiones focales, sólo su localización a través de vinculina. Por otro lado, y avalando lo observado en este trabajo de tesis, se ha descrito que la activación de $G\alpha 13$ puede mediar la fosforilación de tirosinas en proteínas relacionadas con adhesiones focales, dentro de ellas FAK y Paxilina, proceso que es dependiente de la integridad del citoesqueleto de actina y de la activación de Rho (Needham, L. K., & Rozengurt, E.; 1998). Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos a través de inmunocitoquímicas realizadas contra fosfopaxilina en las CNC, que podrían explicar que la ausencia de la señal de detección de fosfopaxilina puede ser provocada por una deficiencia en la fosforilación de la proteína debido directamente a la ausencia de la señalización de $G\alpha 13$. Para contribuir y corroborar este fenómeno, se podría evaluar la presencia de paxilina total en la células (mediante el uso de un anticuerpo) y verificar si la proteína es reclutada en el complejo proteico asociado a las adhesiones focales, y así poder indagar más en relación a la señalización y función de $G\alpha 13$ en las CNC de *Xenopus*.

Diversos estudios relacionan a la señalización de las proteínas G heterotriméricas y G pequeñas con proteínas que participan en la activación de las adhesiones focales. Dentro de los primeros hallazgos, se encuentran los realizados por el grupo de Chikumi, H. Y. col. (2002), quienes identificaron que FAK puede ser activada por trombina, $G\alpha 12$, $G\alpha 13$ y $G\alpha q$ a través de mecanismos dependientes e independientes de Rho. Además, se describió que LARG y PDZ-RhoGEF pueden ser

fosforilados por FAK en respuesta a trombina, proponiendo la existencia de un “feed-back” positivo entre Rho y FAK (Chikumi, H., y col., 2002). Posteriormente, se describió a la ruta mediada por LPA (“Lysophosphatidic acid”) y $G\alpha_{12/13}$ -RhoA-ROCK mediando la autofosforilación de FAK (Y397, modificación que permite la interacción con proteínas de la familia Src), activando a la proteína y contribuyendo de esta forma a la migración de células provenientes de cáncer de ovario (Bian, D., y col., 2006). También se ha identificado a Rgnef (p190RhoGEF) como un nuevo efector de la cascada de transducción de $G\alpha_{13}$ río abajo de gastrina y del receptor de colecistoquinina (CCK2R), señalización que se encarga de activar a FAK. En ese trabajo se dilucidó, que en células de carcinoma de colon DLD-1 que fueron silenciadas para $G\alpha_{13}$, redujeron la fosforilación en FAK (pY397) y paxilina (pY31, que promueve la activación de Rac) inducida por gastrina, ambas necesarios para una correcta migración celular (Masià-Balagué, M., y col., 2015). Por otro lado, estudios previos donde se emplearon ratones “knock-out” para Rgnef, mostraron que células MEF provenientes de estos ratones, presentaron menos adhesiones focales tempranas al sembrarlas sobre matrices de fibronectina (Miller, N. L. G., y col., 2012). Además es importante destacar, que Rgnef presenta sitios de unión para FAK, demostrando que es necesaria la activación de Rho para el establecimiento de las adhesiones focales y la migración celular dependiente de integrinas (Miller, N. L. G., y col., 2012). Estos resultados concuerdan con los fenotipos obtenidos en células morfantas tanto para $G\alpha_{13}$ como para Ric-8A durante este trabajo de tesis, donde observamos una severa disminución en el número y tamaño de las adhesiones focales, lo que podría indicar que Rgnef también podría estar involucrada en la ruta de señalización caracterizada durante este trabajo.

Recientemente, se ha descrito una nueva función para $G\alpha_{13}$, donde controla la señalización mediada por integrinas (β_1 y β_3), a través de la interacción directa de ambas proteínas (Gong, H., y col., 2010). En este artículo se describió, que $G\alpha_{13}$ es necesaria para impulsar la señalización “outside-in” de las integrinas, activando a Src e inhibiendo de forma momentánea a la proteína RhoA, en contraste a lo que se conocía tradicionalmente de la señalización de RhoA dependiente de GPCRs (Gong, H., y col., 2010; Shen, B., y col., 2015). La señalización “outside-in” de las integrinas consta de la unión de un ligando al dominio extracelular, el cual causa cambios conformacionales que modifican los sitios de interacción con proteínas del dominio citoplasmático, resultando en la activación de la señal (Shen, B., y col., 2012). Ambos estudios publicados referentes a esta nueva señalización, indican que $G\alpha_{13}$ cumple una función dual, primero estimulando vía GPCR la activación de RhoA y luego inhibiendo la actividad de RhoA a través de la vía dependiente de integrinas, regulación que sería crítica para la migración celular (Gong, H., y col., 2010; Shen, B., y col., 2015). Concordando con estos resultados, durante esta tesis, se pudo corroborar que Src constitutivamente activa pudo rescatar el fenotipo morfante de $G\alpha_{13}$, recuperando parcialmente tanto la migración *in vivo* de las CNC, como

la formación de las adhesiones focales. Estos antecedentes no son los únicos en los cuales se ha observado un “crosstalk” entre $G\alpha 13$ y Src, ya que Gong, H. y col. (2014), describieron que en el proceso de desensamblaje de las uniones adherentes, la vía de transducción dependiente de $G\alpha 13$ induce la activación de Src y demostraron además que ambas proteínas interactúan (Gong, H., y col., 2014). Además, recientemente se publicó que la señalización de $G\alpha 13$ promueve la fosforilación de Ric-8A mediada por Src quinasas, y que esta modificación post-traduccional es necesaria para la translocación de Ric-8A a la membrana plasmática (Yan M., y col., 2015). A pesar que en nuestros estudios no logramos observar a través de inmunoprecipitación interacción de Src constitutivamente activa con $G\alpha 13$ (datos no mostrados), sí observamos la interacción y co-localización de $G\alpha 13$ con FAK, indicando que probablemente estas proteínas forman parte del mismo complejo, en conjunto a las integrinas, sugiriendo que median la señalización “outside-in” de esta última.

Con el fin de analizar en más detalle el efecto del silenciamiento de $G\alpha 13$ sobre la dinámica de las adhesiones focales, se realizaron estudios utilizando una proteína de fusión FAK-GFP en células morfantes para $G\alpha 13$. Estas células presentaron estructuras de adhesión focal menos estables en el tiempo y de menor tamaño en relación a los controles. Estos resultados sugieren que los contactos que se forman con la matriz extracelular son menos estables en el tiempo, debido principalmente al quiebre en la señalización dependiente de integrinas “outside-in”, evitando de esta forma la fosforilación de las diversas proteínas que son necesarias para crear una adhesión focal madura, anclada correctamente al citoesqueleto de actina. Además, otra alternativa a considerar, es que $G\alpha 13$ y $\beta\gamma$ también podrían estar afectando a la señalización “inside-out” de las integrinas (Kim, C., y col., 2012; Shen, B., y col., 2012). Como se ha descrito en varios reportes, la acción de segundos mensajeros provenientes de la señalización de diversos GPCRs, podrían finalmente activar a talina y kindlina, proteínas que se unen a los dominios citoplasmáticos de la subunidad β de las integrinas, permitiendo a este receptor su unión al ligando (Kim, C., y col., 2012; Shen, B., y col., 2012).

Considerando la interacción de $G\alpha 13$ con FAK-GFP, en nuestros estudios observamos que $G\alpha 13QL$ (forma constitutivamente activa) presenta una menor interacción con FAK que la versión “wild-type” de la proteína. Esto es contradictorio con respecto a lo observado en diversos trabajos, donde generalmente $G\alpha 13$ activa es la que se une a los diversos efectores proteicos, como se observa por ejemplo en la interacción de $G\alpha 13$ con β integrina (Gong, H., y col., 2010). Podemos especular, que la unión de $G\alpha 13$ al complejo proteico de las adhesiones focales ocurre en forma cíclica, y que la activación/desactivación de $G\alpha 13$ sea necesaria para el reclutamiento/activación del complejo proteico de adhesiones focales, sin embargo es necesario realizar más experimentos que nos permitan determinar este mecanismo con más detalle. Hay que considerar además, que la interacción observada entre $G\alpha 13$ y FAK es muy débil, si se compara con la interacción de Ric-8A con $G\alpha 13$. Esto sugiere,

que la interacción entre ambas proteínas no es directa, y que $G\alpha 13$ puede estar interaccionando con otras proteínas como lo es integrina, a la cual luego se acoplaría FAK. A pesar de que se ha descrito a FAK interaccionando con un péptido sintético del dominio citoplasmático de β integrina *in vitro* (Schaller, M. D., y col., 1995), los antecedentes indican que lo más probable es que FAK se una indirectamente a esta proteína, a través de su asociación con paxilina u otra proteína perteneciente al complejo (Legate, K. R., & Fässler, R. 2009; Parsons, J. T., 2003).

Ric-8A no ha sido el único GEF para proteínas G heterotriméricas que ha sido relacionado con la señalización de las integrinas. GIV/Girdin es una proteína que está involucrada en diversos eventos metastásicos y en señalizaciones iniciadas por factores de crecimiento, activando a $G\alpha i3$ (Leyme, A., y col., 2015). Los fenotipos observados al inhibir la función de esta proteína, tienen mucha similitud con los resultados encontrados en esta tesis. En ese reporte se describió que GIV intensifica la respuesta dependiente de integrina, una vez que éstas entran en contacto con la matriz extracelular. GIV, en conjunto a $G\alpha i3$, son reclutadas en los complejos proteicos activos dependientes de integrina, haciendo a las células más invasivas. Se comprobó que GIV participa en el remodelamiento del citoesqueleto y en la activación de la señalización de PI3K, contribuyendo de esta manera a la haptotaxis (Leyme, A., y col., 2015). Por otro lado, GIV co-localiza con las adhesiones focales y se requiere para la integridad de estas estructuras (Lopez-Sanchez, I., y col., 2015). Estos autores describieron que GIV es un sustrato para FAK, además que co-localiza y se une con $\beta 1$ integrina. La fosforilación de GIV es requerida para el aumento de la señalización de PI3K-Akt, la integridad de las adhesiones focales y la adhesión celular. Importante es destacar que la señalización de $G\alpha i3$ aumenta la actividad de FAK y la haptotaxis inducida en colágeno, señales que son incrementadas durante la progresión metastásica (Lopez-Sanchez, I., y col., 2015).

v) ***Ric-8A y $G\alpha 13$ controlan la polaridad celular y migración quimiotáctica***

Para efectuar una adecuada migración celular, como se explicó al principio de este trabajo, es necesario que las células establezcan una apropiada polaridad. Nuestros resultados apuntan a que existe un problema en el establecimiento de la polaridad celular, debido a que, al silenciar tanto Ric-8A como a $G\alpha 13$ observamos problemas en la formación de protrusiones y en la estabilidad de las adhesiones focales, impidiendo la formación de un borde director o frente migratorio correcto y funcional. Se ha descrito que Ric-8 es necesario para trasladar a la membrana a diferentes proteínas que están directamente relacionadas con la polaridad celular, tales como $G\alpha i$, Pins y $G\beta 13F$, en progenitores neurales de *Drosophila* durante la división asimétrica, presumiblemente debido a la regulación que ejerce Ric-8 sobre la subunidad $G\alpha$ y su translocación a la membrana (Wang H., y col., 2005). Recientemente, se describió que linfocitos B donde se ha silenciado Ric-8A, presentan una

polarización menos marcada que las células controles durante la diferenciación celular (Boullaran, C., y col., 2015). Estos estudios demuestran que la pérdida de expresión de Ric-8A disminuye la tendencia de las células a efectuar una distribución asimétrica de aPKC (PKC ζ) luego de su estimulación con LPS o CD40 plus IgM (Boullaran, C., y col., 2015). Similar a estos estudios, en este trabajo de tesis se pudo observar que las células morfantas para Ric-8A y para G α 13 presentan una pérdida en la localización cortical de aPKC, demostrando los defectos que presentan estas células en establecer una apropiada polaridad celular.

Como se mencionó en este trabajo, se ha descrito la participación de G α 12/13 en la migración quimiotáctica de diversos tipos celulares, como en la respuesta de linfocitos hacia esfingosina 1-fosfato (S1P) (Gräler, M. H., y col., 2003), neutrófilos hacia formil-metionil-leucina-fenilalanina (fMLP), (Xu, J., y col., 2003), y cultivos fibroblásticos embrionarios hacia trombina (Offermanns, S., y col., 1997) donde se indica que estos ligandos ayudan a establecer la polaridad, remodelando el citoesqueleto, y orientando en el sentido correcto al borde director y las protrusiones de las células. Dentro de los pocos estudios abordados en esta área para Ric-8A, linfocitos B “knock-out” para este gen generan una fallida respuesta quimiotáctica y una reducción en la motilidad celular, demostrando la importancia de la señalización de las proteínas G heterotriméricas en estos procesos (Boullaran, C., y col., 2015). Al igual que lo observado por Fuentealba J., y col. (2013) en las CNC morfantas para Ric-8A, nuestros resultados demostraron que el silenciamiento de G α 13 disminuye la migración quimiotáctica hacia Sdf-1, sugiriendo nuevamente, al igual que los resultados previos, que ambas proteínas se encuentran regulando la misma vía de transducción de señales. Consistente con nuestros resultados, estudios donde se analizó la quimiotaxia de células MEF provenientes de ratones “knock-out” para G α 13, confirmaron que esta proteína media la migración inducida por trombina y por LPA, observándose el rol que cumple G α 13 durante este proceso (Gu, J. L., y col., 2002). En base a nuestros resultados, desconocemos si esta pérdida en la respuesta quimiotáctica es debido al propio proceso que reorienta a la célula para formar la respectiva polaridad, o sólo debido a la pérdida de las adhesiones focales como se describió previamente. Por lo tanto, se necesitan más análisis y experimentos para corroborar, primero si G α 13 se encuentra bajo la vía de transducción de CXCR4, para luego discernir si participa sólo en la formación de las adhesiones focales o también en el establecimiento de la polaridad celular. Para ello, análisis de interacción proteica entre G α 13 y CXCR4 son necesarios para evaluar la participación de Ric-8A/G α 13 en la ruta de señalización requerida para la quimiotaxia hacia Sdf-1.

vi) De la biología del desarrollo al cáncer

En los últimos años, el estudio de la señalización durante la embriogénesis ha tomado gran importancia debido a que muchas de las ruta presentes en esta etapa son activadas durante los procesos cancerosos, lo que ayuda a comprender la función de diversas proteínas en procesos patológicos (Kelleher, F. C., y col., 2006). La primera proteína G heterotrimérica identificada con la capacidad de inducir transformación oncogénica fue la familia $G\alpha_{12/13}$. Muchos estudios de la función biológica de esta familia se han centrado en la proliferación celular, la migración celular y los cambios morfológicos, abordados tanto en procesos fisiológicos, como lo son los efectuados durante el desarrollo embrionario, y patológicos, en diversas líneas celulares derivadas de cáncer (Suzuki N., y col., 2009). Uno de los eventos cruciales durante la invasión y la metástasis en cáncer es la migración celular. Pese a que $G\alpha_{12/13}$ no promueven la proliferación en líneas celulares de cáncer de próstata ni cáncer de mamas, sí promueven la invasión en los dos tipos celulares *in vitro* (Kelly, P., y col., 2006). Estudios de células de carcinoma mamario de ratón implantado en la grasa mamaria de los ratones, el cual crece y hace metástasis de manera similar al cáncer de mama humano, han demostrado que la inhibición de la señalización de $G\alpha_{12/13}$ por expresión estable del dominio RH de p115RhoGEF en las células del carcinomas, reduce la tasa de diseminación metastásica. Estos estudios sugieren que la activación de Rho a través de $G\alpha_{12/13}$ es crítica para los procesos de invasión (Kelly, P., y col., 2006). Por otro lado, la señalización dependiente de integrinas y del complejo FAK-Src han sido también relacionados con eventos de migración, especialmente con cáncer. Estas proteínas han sido descritas activadas en muchas líneas tumorales generando señales que permiten el crecimiento tumoral y la metástasis (Mitra, S. K., & Schlaepfer, D. D., 2006; Huttenlocher, A., & Horwitz, A. R., 2011). Como se describió previamente, la vía de señalización de gastrina-CCK2R, activa a $G\alpha_{13}$, estimula a su proteína efectora Rgnef, y actúa sobre la señalización de integrinas induciendo la fosforilación de FAK y Paxilina, modulando la migración celular (Masià-Balagué, M., y col., 2015). Puesto que estas proteínas son esenciales para la migración celular, se convierten en perfectos blancos para poder modular y eventualmente tratar diferentes tipos de cáncer, alterando principalmente la función de estas proteínas.

vii) Modelo final: Ric-8A y $G\alpha_{13}$ regulan la formación de las adhesiones focales durante la migración de las células de la cresta neural craneal

Finalmente, presentando todos estos antecedentes y el análisis realizado en esta discusión, proponemos como modelo final que: $G\alpha_{13}$ actúa rio abajo de Ric-8A, y ambas proteínas probablemente se encuentren en la misma vía de señalización dependiente de Sdf-1/CXCR4, donde Ric-8A se encarga, además de su rol como GEF, de translocar a $G\alpha_{13}$ a la membrana dejándola cerca

de sus efectores. El ciclo de activación y desactivación de G α 13, actúa sobre las adhesiones focales, promoviendo la señalización “outside-in” de las integrinas, interaccionando con el complejo proteico para la formación de estas estructuras. G α 13 y Ric-8A activan la cascada de fosforilación inicial de los contactos focales, entre ellos a Src y FAK, que le permiten posteriormente anclarse al citoesqueleto de actina y formar una adhesión focal madura. Esto permite que la célula tenga una adecuada unión a la matriz extracelular regulando la formación y estabilidad de las protrusiones, que en conjunto con una correcta polarización, en la cual Ric-8A y G α 13 también estarían involucradas, generan una apropiada migración de las CNC en el modelo *Xenopus* (Figura 18).



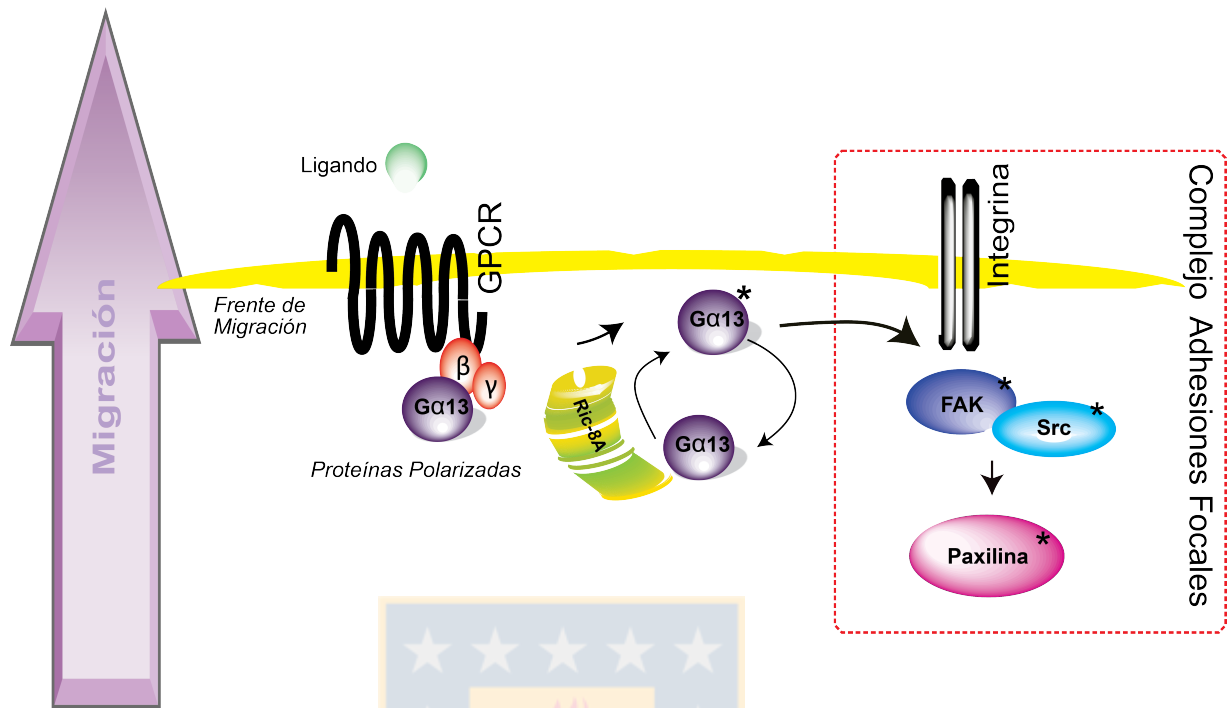
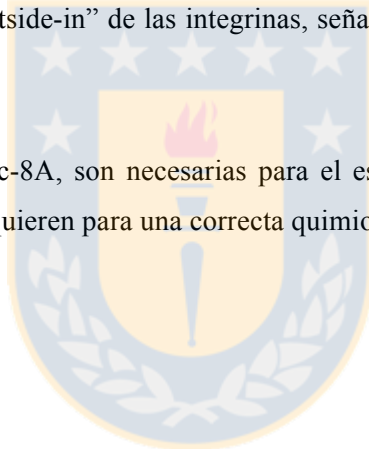


Figura 18: Modelo final de la función de Ric-8A y $G\alpha 13$ en la migración de las CNC.

$G\alpha 13$ es activado por la unión del ligando a un receptor acoplado a proteína G. Dentro de las posibilidades, proponemos que el par quimiotáctico Sdf-1-CXCR4, podrían ser los candidatos involucrados en esta señalización. Una vez activada la señalización, Ric-8A cumpliría su función GEF sobre $G\alpha 13$, potenciando el ciclo “ON-OFF” de la subunidad $G\alpha 13$, manteniéndola disociada del dímero $\beta\gamma$. Además, Ric-8A transloca a $G\alpha 13$ a la corteza celular del borde director de la célula en migración (estableciendo la polaridad celular), a modo de chaperona, situando a Ric-8A río arriba de la cascada de señalización. Luego, $G\alpha 13$ interacciona con proteínas del complejo perteneciente a las adhesiones focales, donde estaría actuando directamente en la señalización “outside-in” de integrina, activando a las diversas proteínas situadas río abajo de la señalización, tales como FAK y Src, regulando la formación y estabilidad de las protrusiones. Por lo tanto, dado los antecedentes mencionados en la discusión, sugerimos que $G\alpha 13$ se encuentra interaccionado con integrina (y al complejo proteico asociado), mediando de esta forma la señalización en una nueva vía no-canónica de las proteínas G heterotrómicas. De esta forma, Ric-8A/ $G\alpha 13$ regulan la formación de las adhesiones focales entre las células y la matriz extracelular, modulando la formación de las protrusiones y estableciendo la polaridad celular que le permite a la CNC una correcta migración celular.

VI) CONCLUSIONES GENERALES

- Ric-8A y Gα13 interactúan en el borde director y actúan en la misma vía de señalización controlando la migración de las CNC en *Xenopus*.
- Ric-8A y Gα13 controlan la morfología celular, regulando la formación y la estabilidad de las protrusiones a través de la correcta formación de las adhesiones focales, modulando la adhesión de la célula a la matriz extracelular. Además Ric-8A y Gα13 forman parte del mismo complejo con componentes proteicos de las adhesiones focales, como lo es FAK.
- Src participa en la misma vía de señalización de Gα13, promoviendo la migración celular y la formación de adhesiones focales en CNC, lo que sugiere que ambas proteínas están río abajo de la señalización “outside-in” de las integrinas, señal requerida para la correcta formación de las adhesiones focales.
- Gα13 al igual que Ric-8A, son necesarias para el establecimiento de la polaridad celular, y ambas proteínas se requieren para una correcta quimiotaxia hacia Sdf-1 en células de la CNC.



VII) AGRADECIMIENTOS

Primero, quisiera agradecer a todos los financiamientos que hicieron posible el desarrollo de esta tesis. Dentro de ellos, a los proyectos DIUC 212.037.015-10 y FONDECYT N°1140394 y a la beca CONICYT para estudios de doctorado en Chile, la que también ayudó en el financiamiento del proyecto a través de los gastos operacionales asociados a la beca N° 2111042, al financiamiento de la pasantía doctoral y de la mayoría de los congresos a los que asistí durante el programa. Por otro lado, agradecer a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción, quien apoyó constantemente en todas las asistencia a eventos, tanto nacionales como internacionales. Y por último a la beca MECESUP UCO 1311, la cual financió el último semestre de este doctorado.

Luego, quisiera agradecer a mi tutora, Dra. Marcela Torrejón, por el respaldo y la confianza que me dio para realizar este proyecto. También quiero agradecer a nuestro colaborador, Dr. Roberto Mayor, quien me dio la posibilidad de realizar una estadía en su laboratorio en UCL (University College London) y la oportunidad de aprender múltiples técnicas, las cuales fueron esenciales para el desarrollo de esta tesis. Agradecer a mi co-tutor Dr. Sylvain Marcellini, quien me prestó su ayuda y me aconsejó en múltiples instancias, teniendo todo su apoyo durante el transcurso del doctorado. Además, agradecer a mi laboratorio, LABORATORIO DE SEÑALIZACIÓN Y DESARROLLO (EX GENETICA MOLECULAR) de nuestra facultad y a todos sus integrantes, tantos pasados como presentes, quienes ayudaron, aportaron y estuvieron conmigo durante todo el proceso de formación, desde pregrado hasta ahora.

Finalmente quisiera agradecer a mi familia y amigos, los cuales siempre se mantuvieron a mi lado, quienes fueron un gran soporte para la realización de esta tesis, y que gracias a su apoyo, sin duda facilitaron este proceso.

VIII) BIBLIOGRAFÍA

Abbruzzese, G., Becker, S. F., Kashef, J., & Alfandari, D. (2015). ADAM13 cleavage of cadherin-11 promotes CNC migration independently of the homophilic binding site. *Developmental Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.07.018>

Alfandari, D., Cousin, H., Gaultier, A., Hoffstrom, B. G., & DeSimone, D. W. (2003). Integrin $\alpha 5\beta 1$ supports the migration of *Xenopus* cranial neural crest on fibronectin. *Developmental Biology*, 260(2), 449–464. [http://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00277-X](http://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00277-X)

Alfandari, D., Cousin, H., & Marsden, M. (2010). Mechanism of *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Cell Adhesion & Migration*, 4(4), 553–560. <http://doi.org/10.4161/cam.4.4.12202>

Arriagada, C. Tesis de Magister Bioquímica y Bioinformática, Universidad de Concepción.

Barriga, E. H., Maxwell, P. H., Reyes, A. E., & Mayor, R. (2013). The hypoxia factor Hif-1 α controls neural crest chemotaxis and epithelial to mesenchymal transition. *The Journal of Cell Biology*, 201(5), 759–776. <http://doi.org/10.1083/jcb.201212100>

Basch, M. L., García-Castro, M. I., & Bronner-Fraser, M. (2004). Molecular mechanisms of neural crest induction. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today : Reviews*, 72(2), 109–123. <http://doi.org/10.1002/bdrc.20015>

Becker, S. F. S., Mayor, R., & Kashef, J. (2013). Cadherin-11 mediates contact inhibition of locomotion during *Xenopus* neural crest cell migration. *PloS One*, 8(12), e85717. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0085717>

Bellaïche, Y., & Gotta, M. (2005). Heterotrimeric G proteins and regulation of size asymmetry during cell division. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 658–663. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.10.002>

Berndt, J. D., Clay, M. R., Langenberg, T., & Halloran, M. C. (2008). Rho-kinase and myosin II affect dynamic neural crest cell behaviors during epithelial to mesenchymal transition in vivo. *Developmental Biology*, 324(2), 236–244. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.09.013>

Betschinger, J., & Knoblich, J. A. (2004). Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Current Biology : CB*, 14(16), R674–85. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2004.08.017>

Bian, D., Mahanivong, C., Yu, J., Frisch, S. M., Pan, Z. K., Ye, R. D., & Huang, S. (2006). The G12/13-RhoA signaling pathway contributes to efficient lysophosphatidic acid-stimulated cell migration. *Oncogene*, 25(15), 2234–2244. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1209261>

Boullaran, C., & Kehrl, J. H. (2014). Implications of non-canonical G-protein signaling for the immune system. *Cellular Signalling*, 26(6), 1269–1282. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.02.010>

Boullaran, C., Hwang, I.-Y., Kamenyeva, O., Park, C., Harrison, K., Huang, Z., & Kehrl, J. H. (2015). B Lymphocyte-Specific Loss of Ric-8A Results in a G α Protein Deficit and Severe Humoral Immunodeficiency. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(5), 2090–2102. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1500523>

- Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N., & Johnson, G. L. (1995). G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 24631–24634.
- Carmona-Fontaine, C., Matthews, H. K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G. A., Parsons, M., et al. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature*, 456(7224), 957–961. <http://doi.org/10.1038/nature07441>
- Carmona-Fontaine, C., Theveneau, E., Tzekou, A., Tada, M., Woods, M., Page, K. M., et al. (2011). Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration. *Developmental Cell*, 21(6), 1026–1037. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.012>
- Cattaneo, M. G., Chini, B., & Vicentini, L. M. (2008). Oxytocin stimulates migration and invasion in human endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*, 153(4), 728–736. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707609>
- Chaffin, K. E., & Perlmutter, R. M. (1991). A pertussis toxin-sensitive process controls thymocyte emigration. *European Journal of Immunology*, 21(10), 2565–2573. <http://doi.org/10.1002/eji.1830211038>
- Chan, P., Gabay, M., Wright, F. A., & Tall, G. G. (2011). Ric-8B is a GTP-dependent G protein alpha guanine nucleotide exchange factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19932–19942. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.163675>
- Chan, P., Thomas, C. J., Sprang, S. R., & Tall, G. G. (2013). Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein α subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), 3794–3799. <http://doi.org/10.1073/pnas.1220943110>
- Chikumi, H., Fukuhara, S., & Gutkind, J. S. (2002). Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 12463–12473. <http://doi.org/10.1074/jbc.M108504200>
- Chishiki, K., Kamakura, S., Yuzawa, S., Hayase, J., & Sumimoto, H. (2013). Ubiquitination of the heterotrimeric G protein α subunits Gai2 and Gaq is prevented by the guanine nucleotide exchange factor Ric-8A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(3), 414–419. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.103>
- Cluzel, C., Saltel, F., Lussi, J., Paulhe, F., Imhof, B. A., & Wehrle-Haller, B. (2005). The mechanisms and dynamics of $(\alpha)v(\beta)3$ integrin clustering in living cells. *The Journal of Cell Biology*, 171(2), 383–392. <http://doi.org/10.1083/jcb.200503017>
- Cotton, M., & Claing, A. (2009). G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cellular Signalling*, 21(7), 1045–1053. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.02.008>
- Crane, J. F., & Trainor, P. A. (2006). Neural crest stem and progenitor cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1), 267–286. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.103814>

- De Calisto, J., Araya, C., Marchant, L., Riaz, C. F., & Mayor, R. (2005). Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development (Cambridge, England)*, 132(11), 2587–2597. <http://doi.org/10.1242/dev.01857>
- Dettlaff-Swiercz, D. A., Wettschureck, N., Moers, A., Huber, K., & Offermanns, S. (2005). Characteristic defects in neural crest cell-specific $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ - and $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -deficient mice. *Developmental Biology*, 282(1), 174–182. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.006>
- Dillenburg-Pilla, P., Patel, V., Mikelis, C. M., Zárata-Bladés, C. R., Doçi, C. L., Amornphimoltham, P., et al. (2015). SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/Gai/mTORC1 axis. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(3), 1056–1068. <http://doi.org/10.1096/fj.14-260083>
- Dormond, O., Ponsonnet, L., Hasmim, M., Foletti, A., & Rüegg, C. (2004). Manganese-induced integrin affinity maturation promotes recruitment of alpha V beta 3 integrin to focal adhesions in endothelial cells: evidence for a role of phosphatidylinositol 3-kinase and Src. *Thrombosis and Haemostasis*, 92(1), 151–161. <http://doi.org/10.1267/THRO04070151>
- Dow, L. E., & Humbert, P. O. (2007). Polarity regulators and the control of epithelial architecture, cell migration, and tumorigenesis. *International Review of Cytology*, 262, 253–302. [http://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)62006-3](http://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)62006-3)
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2003). Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(1), 67–72.
- Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, L., Beyer, A., Henriquez, J. P., et al. (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. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.005>
- Gabay, M., Pinter, M. E., Wright, F. A., Chan, P., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., et al. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein α subunit membrane association. *Science Signaling*, 4(200), ra79–ra79. <http://doi.org/10.1126/scisignal.2002223>
- Gammill, L. S., Gonzalez, C., & Bronner-Fraser, M. (2007). Neuropilin 2/semaphorin 3F signaling is essential for cranial neural crest migration and trigeminal ganglion condensation. *Developmental Neurobiology*, 67(1), 47–56. <http://doi.org/10.1002/dneu.20326>
- Gilbert, S. F. (2013). *Developmental Biology*. (10 ed., pp. 242–270) Sinauer Associates.
- Gong, H., Gao, X., Feng, S., Siddiqui, M. R., Garcia, A., Bonini, M. G., et al. (2014). Evidence of a common mechanism of disassembly of adherens junctions through $G\alpha_{13}$ targeting of VE-cadherin. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(3), 579–591. <http://doi.org/10.1084/jem.20131190>
- Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S. C.-T., Voyno-Yasenetskaya, T. A., et al. (2010). G protein subunit $G\alpha_{13}$ binds to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and mediates integrin “outside-in” signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5963), 340–343. <http://doi.org/10.1126/science.1174779>
- Gräler, M. H., Grosse, R., Kusch, A., Kremmer, E., Gudermann, T., & Lipp, M. (2003). The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to G_i and $G_{12/13}$. *Journal of Cellular Biochemistry*, 89(3), 507–519. <http://doi.org/10.1002/jcb.10537>

Groysman, M., Shoval, I., & Kalcheim, C. (2008). A negative modulatory role for rho and rho-associated kinase signaling in delamination of neural crest cells. *Neural Development*, 3(1), 27. <http://doi.org/10.1186/1749-8104-3-27>

Gu, J. L., Muller, S., Mancino, V., Offermanns, S., & Simon, M. I. (2002). Interaction of G α 12 with G α 13 and G α q signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9352–9357. <http://doi.org/10.1073/pnas.102291599>

Hall, B. K. (2008). The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *Journal of Biosciences*, 33(5), 781–793.

Han, S.-B., Moratz, C., Huang, N.-N., Kelsall, B., Cho, H., Shi, C.-S., et al. (2005). Rgs1 and Gnai2 regulate the entrance of B lymphocytes into lymph nodes and B cell motility within lymph node follicles. *Immunity*, 22(3), 343–354. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.017>

Helbling, P. M., Tran, C. T., & Brändli, A. W. (1998). Requirement for EphA receptor signaling in the segregation of Xenopus third and fourth arch neural crest cells. *Mechanisms of Development*, 78(1-2), 63–79.

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. <http://doi.org/10.1002/jcb.24162>

Huttenlocher, A., & Horwitz, A. R. (2011). Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(9), a005074–a005074. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a005074>

Hyafil, F., Babinet, C., & Jacob, F. (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell*, 26(3 Pt 1), 447–454.

Kamps, A. R., & Coffman, C. R. (2005). G protein-coupled receptor roles in cell migration and cell death decisions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1049(1), 17–23. <http://doi.org/10.1196/annals.1334.003>

Kanesaki, T., Hirose, S., Grosshans, J., & Fuse, N. (2013). Heterotrimeric G protein signaling governs the cortical stability during apical constriction in Drosophila gastrulation. *Mechanisms of Development*, 130(2-3), 132–142. <http://doi.org/10.1016/j.mod.2012.10.001>

Kashef, J., Köhler, A., Kuriyama, S., Alfandari, D., Mayor, R., & Wedlich, D. (2009). Cadherin-11 regulates protrusive activity in Xenopus cranial neural crest cells upstream of Trio and the small GTPases. *Genes & Development*, 23(12), 1393–1398. <http://doi.org/10.1101/gad.519409>

Kelleher, F. C., Fennelly, D., & Rafferty, M. (2006). Common critical pathways in embryogenesis and cancer. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 45(4), 375–388. <http://doi.org/10.1080/02841860600602946>

Kelly, P., Casey, P. J., & Meigs, T. E. (2007). Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric g proteins: growth, migration, and metastasis. *Biochemistry*, 46(23), 6677–6687. <http://doi.org/10.1021/bi700235f>

Kelly, P., Moeller, B. J., Juneja, J., Booden, M. A., Der, C. J., Daaka, Y., Dewhirst, M. W., Fields, T. A., and Casey, P. J. (2006). The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer

- invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8173–8178. <http://doi.org/10.1073/pnas.0510254103>
- Kelly, P., Stemmler, L. N., Madden, J. F., Fields, T. A., Daaka, Y., (2006). A role for the G12 family of heterotrimeric G proteins in prostate cancer invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26483–26490. <http://doi.org/10.1074/jbc.M604376200>
- Kerosuo, L., & Bronner-Fraser, M. (2012). What is bad in cancer is good in the embryo: importance of EMT in neural crest development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(3), 320–332. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.03.010>
- Kim, C., Ye, F., & Ginsberg, M. H. (2011). Regulation of integrin activation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 321–345. <http://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104104>
- Kloc, M., & Kubiak, J. Z. (2014). *Xenopus Development*. (1st ed., pp. 239–263). Oxford: John Wiley & Sons. <http://doi.org/10.1002/9781118492833>
- LaBonne, C., & Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development (Cambridge, England)*, 125(13), 2403–2414.
- Lawson, C. D., & Burridge, K. (2014). The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases*, 5(1), e27958. <http://doi.org/10.4161/sgtp.27958>
- Legate, K. R., & Fassler, R. (2009). Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 2), 187–198. <http://doi.org/10.1242/jcs.041624>
- Leyme, A., Marivin, A., Perez-Gutierrez, L., Nguyen, L. T., & Garcia-Marcos, M. (2015). Integrins activate trimeric G proteins via the nonreceptor protein GIV/Girdin. *The Journal of Cell Biology*, 210(7), 1165–1184. <http://doi.org/10.1083/jcb.201506041>
- Lin, F., Chen, S., Sepich, D. S., Panizzi, J. R., Clendenon, S. G., Marrs, J. A., et al. (2009). α 12/13 regulate epiboly by inhibiting E-cadherin activity and modulating the actin cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*, 184(6), 909–921. <http://doi.org/10.1083/jcb.200805148>
- Lin, F., Sepich, D. S., Chen, S., Topczewski, J., Yin, C., Solnica-Krezel, L., & Hamm, H. (2005). Essential roles of G α 12/13 signaling in distinct cell behaviors driving zebrafish convergence and extension gastrulation movements. *The Journal of Cell Biology*, 169(5), 777–787. <http://doi.org/10.1083/jcb.200501104>
- Liu, J. P., & Jessell, T. M. (1998). A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development (Cambridge, England)*, 125(24), 5055–5067.
- Lopez-Sanchez, I., Kalogiropoulos, N., Lo, I.-C., Kabir, F., Midde, K. K., Wang, H., & Ghosh, P. (2015). Focal adhesions are foci for tyrosine-based signal transduction via GIV/Girdin and G proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 26(24), 4313–4324. <http://doi.org/10.1091/mbc.E15-07-0496>
- Lydolph, M. C., Morgan-Fisher, M., Høye, A. M., Couchman, J. R., Wewer, U. M., & Yoneda, A. (2009). α 9 β 1 integrin in melanoma cells can signal different adhesion states for migration and anchorage. *Experimental Cell Research*, 315(19), 3312–3324. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.09.022>

- Ma, S., Kwon, H. J., & Huang, Z. (2012). Ric-8a, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, regulates bergmann glia-basement membrane adhesion during cerebellar foliation. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(43), 14979–14993. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1282-12.2012>
- Macara, I. G. (2004). Parsing the polarity code. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(3), 220–231. <http://doi.org/10.1038/nrm1332>
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., et al. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature*, 461(7260), 99–103. <http://doi.org/10.1038/nature08242>
- Malbon, C. C. (2005). G proteins in development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(9), 689–701. <http://doi.org/10.1038/nrm1716>
- Maldonado-Agurto, R., Tesis de Magister Bioquímica y Bioinformática, Universidad de Concepción.
- Maldonado-Agurto, R., Toro, G., Fuentealba, J., Arriagada, C., Campos, T., Albistur, M., et al. (2011). Cloning and spatiotemporal expression of RIC-8 in *Xenopus* embryogenesis. *Gene Expression Patterns : GEP*, 11(7), 401–408. <http://doi.org/10.1016/j.gep.2011.06.001>
- Masià-Balagué, M., Izquierdo, I., Garrido, G., Cordoní, A., Pérez-Benito, L., Miller, N. L. G., et al. (2015). Gastrin-stimulated Ga13 Activation of Rgnef Protein (ArhGEF28) in DLD-1 Colon Carcinoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(24), 15197–15209. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.628164>
- Matthews, H. K., Marchant, L., Carmona-Fontaine, C., Kuriyama, S., Larraín, J., Holt, M. R., et al. (2008). Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development (Cambridge, England)*, 135(10), 1771–1780. <http://doi.org/10.1242/dev.017350>
- Mayor, R., & Theveneau, E. (2013). The neural crest. *Development (Cambridge, England)*, 140(11), 2247–2251. <http://doi.org/10.1242/dev.091751>
- McCusker, C., Cousin, H., Neuner, R., & Alfandari, D. (2009). Extracellular cleavage of cadherin-11 by ADAM metalloproteases is essential for *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Molecular Biology of the Cell*, 20(1), 78–89. <http://doi.org/10.1091/mbc.E08-05-0535>
- McKeown, S. J., Wallace, A. S., & Anderson, R. B. (2013). Expression and function of cell adhesion molecules during neural crest migration. *Developmental Biology*, 373(2), 244–257. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.10.028>
- Meigs, T. E. (2001). Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(2), 519–524. <http://doi.org/10.1073/pnas.021350998>
- Meigs, T. E., Fedor-Chaikin, M., Kaplan, D. D., Brackenbury, R., & Casey, P. J. (2002). G 12 and G 13 Negatively Regulate the Adhesive Functions of Cadherin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24594–24600. <http://doi.org/10.1074/jbc.M201984200>

- Milet, C., & Monsoro-Burq, A. H. (2012). Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Developmental Biology*, 366(1), 22–33. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.01.013>
- Miller, K. G., & Rand, J. B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 156(4), 1649–1660.
- Miller, K. G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J. A., Johnson, C. D., & Rand, J. B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12593–12598.
- Miller, K. G., Emerson, M. D., McManus, J. R., & Rand, J. B. (2000). RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)alpha signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron*, 27(2), 289–299.
- Miller, N. L. G., Lawson, C., Chen, X. L., Lim, S.-T., & Schlaepfer, D. D. (2012). Rgnef (p190RhoGEF) knockout inhibits RhoA activity, focal adhesion establishment, and cell motility downstream of integrins. *PloS One*, 7(5), e37830. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0037830>
- Mitra, S. K., & Schlaepfer, D. D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(5), 516–523. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.08.011>
- Moore, R., Theveneau, E., Pozzi, S., Alexandre, P., Richardson, J., Merks, A., et al. (2013). Par3 controls neural crest migration by promoting microtubule catastrophe during contact inhibition of locomotion. *Development (Cambridge, England)*, 140(23), 4763–4775. <http://doi.org/10.1242/dev.098509>
- Mould, A. P., Askari, J. A., Barton, S., Kline, A. D., McEwan, P. A., Craig, S. E., & Humphries, M. J. (2002). Integrin activation involves a conformational change in the alpha 1 helix of the beta subunit A-domain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19800–19805. <http://doi.org/10.1074/jbc.M201571200>
- Mould, A. P., Garratt, A. N., Puzon-McLaughlin, W., Takada, Y., & Humphries, M. J. (1998). Regulation of integrin function: evidence that bivalent-cation-induced conformational changes lead to the unmasking of ligand-binding sites within integrin alpha5 beta1. *The Biochemical Journal*, 331 (Pt 3)(Pt 3), 821–828.
- 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. <http://doi.org/10.1242/dev.031203>
- Needham, L. K., & Rozengurt, E. (1998). Galpha12 and Galpha13 stimulate Rho-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130 Crk-associated substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14626–14632.
- O'Neill, P. R., & Gautam, N. (2014). Subcellular optogenetic inhibition of G proteins generates signaling gradients and cell migration. *Molecular Biology of the Cell*, 25(15), 2305–2314. <http://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0870>

- Offermanns, S. (2001). In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in $G\alpha$ -deficient mice. *Oncogene*, 20(13), 1635–1642. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1204189>
- Offermanns, S., Mancino, V., Revel, J.P., Simon, M. (1997). Vascular System Defects and Impaired Cell Chemokinesis as a Result of $G\alpha 13$ Deficiency. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5299), 533–536. <http://doi.org/10.1126/science.275.5299.533>
- 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. <http://doi.org/10.1038/nrm2299>
- Parks, S., & Wieschaus, E. (1991). The drosophila gastrulation gene *concertina* encodes a $G\alpha$ -like protein. *Cell*, 64(2), 447–458. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90652-F](http://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90652-F)
- Parri, M., & Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 8(1), 23. <http://doi.org/10.1186/1478-811X-8-23>
- Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 8), 1409–1416.
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R., & Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(9), 633–643. <http://doi.org/10.1038/nrm2957>
- Penzo-Mendèz, A., Umbhauer, M., Djiane, A., Boucaut, J.-C., & Riou, J.-F. (2003). Activation of $G\beta\gamma$ signaling downstream of Wnt-11/Xfz7 regulates Cdc42 activity during *Xenopus* gastrulation. *Developmental Biology*, 257(2), 302–314. [http://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00067-8](http://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00067-8)
- Peters, K. A., & Rogers, S. L. (2013). *Drosophila* Ric-8 interacts with the $G\alpha 12/13$ subunit, *Concertina*, during activation of the *Folded* gastrulation pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 24(21), 3460–3471. <http://doi.org/10.1091/mbc.E12-11-0813>
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., et al. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5651), 1704–1709. <http://doi.org/10.1126/science.1092053>
- Rogers, C. D., Jayasena, C. S., Nie, S., & Bronner, M. E. (2012). Neural crest specification: tissues, signals, and transcription factors. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 1(1), 52–68. <http://doi.org/10.1002/wdev.8>
- Romo, X., Pastén, P., Martínez, S., Soto, X., Lara, P., de Arellano, A. R., et al. (2008). xRic-8 is a GEF for $G\alpha 13$ and participates in maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 214(3), 673–680. <http://doi.org/10.1002/jcp.21257>
- Ruisu, K., Kask, K., Meier, R., Saare, M., Raid, R., Veraksitš, A., et al. (2013). Ablation of RIC8A function in mouse neurons leads to a severe neuromuscular phenotype and postnatal death. *PloS One*, 8(8), e74031. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0074031>
- Saare, M., Lulla, S., Tõnissoo, T., Meier, R., Kask, K., Ruisu, K., et al. (2015). Expression Pattern and Localization Dynamics of Guanine Nucleotide Exchange Factor RIC8 during Mouse Oogenesis. *PloS One*, 10(6), e0129131. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0129131>

- 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. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.012>
- Schaller, M. D., Otey, C. A., Hildebrand, J. D., & Parsons, J. T. (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *The Journal of Cell Biology*, 130(5), 1181–1187.
- Shen, B., Delaney, M. K., & Du, X. (2012). Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5), 600–606. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.08.011>
- Shen, B., Estevez, B., Xu, Z., Kreutz, B., Karginov, A., Bai, Y., et al. (2015). The interaction of Ga13 with integrin β 1 mediates cell migration by dynamic regulation of RhoA. *Molecular Biology of the Cell*, 26(20), 3658–3670. <http://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0274>
- Siller, K. H., & Doe, C. Q. (2009). Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nature Cell Biology*, 11(4), 365–374. <http://doi.org/10.1038/ncb0409-365>
- Smith, A., Robinson, V., Patel, K., & Wilkinson, D. G. (1997). The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Current Biology : CB*, 7(8), 561–570.
- Spangrude, G. J., Sacchi, F., Hill, H. R., Van Epps, D. E., & Daynes, R. A. (1985). Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 135(6), 4135–4143.
- Spiering, D., & Hodgson, L. (2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhesion & Migration*, 5(2), 170–180. <http://doi.org/10.4161/cam.5.2.14403>
- Steventon, B., & Mayor, R. (2012). Early neural crest induction requires an initial inhibition of Wnt signals. *Developmental Biology*, 365(1), 196–207. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.02.029>
- Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuriyama, S., & Mayor, R. (2009). Differential requirements of BMP and Wnt signalling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development (Cambridge, England)*, 136(5), 771–779. <http://doi.org/10.1242/dev.029017>
- Suzuki, N., Hajicek, N., & Kozasa, T. (2009). Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *Neuro-Signals*, 17(1), 55–70. <http://doi.org/10.1159/000186690>
- Szabó, A., & Mayor, R. (2015). Cell traction in collective cell migration and morphogenesis: The chase and run mechanism. *Cell Adhesion & Migration*, 9(5), 380–383. <http://doi.org/10.1080/19336918.2015.1019997>
- Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biology*, 8(5), 215. <http://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>
- Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 102(4), 639–655.

Tall, G. G., Krumins, A. M., & Gilman, A. G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8356–8362. <http://doi.org/10.1074/jbc.M211862200>

Theveneau, E., & Mayor, R. (2012). Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology*, 366(1), 34–54. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.041>

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. <http://doi.org/10.1002/wdev.28>

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. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.06.012>

Theveneau, E., Steventon, B., Scarpa, E., Garcia, S., Trepast, X., Streit, A., & Mayor, R. (2013). Chase-and-run between adjacent cell populations promotes directional collective migration. *Nature Cell Biology*, 15(7), 763–772. <http://doi.org/10.1038/ncb2772>

Tõnissoo, T., Lulla, S., Meier, R., Saare, M., Ruisu, K., Pooga, M., & Karis, A. (2010). Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. *Developmental Dynamics : an Official Publication of the American Association of Anatomists*, 239(12), 3404–3415. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22480>

Tõnissoo, T., Meier, R., Talts, K., Plaas, M., & Karis, A. (2003). Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. *Gene Expression Patterns : GEP*, 3(5), 591–594.

Vaiskunaite, R., Adarichev, V., Furthmayr, H., Kozasa, T., Gudkov, A., & Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2000). Conformational activation of radixin by G13 protein alpha subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 26206–26212. <http://doi.org/10.1074/jbc.M001863200>

Valderrama, F., Thevapala, S., & Ridley, A. J. (2012). Radixin regulates cell migration and cell-cell adhesion through Rac1. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 14), 3310–3319. <http://doi.org/10.1242/jcs.094383>

Vladar, E. K., Antic, D., & Axelrod, J. D. (2009). Planar cell polarity signaling: the developing cell's compass. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(3), a002964–a002964. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a002964>

Wang, H., Ng, K. H., Qian, H., Siderovski, D. P., Chia, W., & Yu, F. (2005). Ric-8 controls Drosophila neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nature Cell Biology*, 7(11), 1091–1098. <http://doi.org/10.1038/ncb1317>

Wang, L., Guo, D., Xing, B., Zhang, J. J., Shu, H.-B., Guo, L., & Huang, X.-Y. (2011). Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A (Ric-8A) is critical for growth factor receptor-induced actin cytoskeletal reorganization. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 31055–31061. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.253427>

- Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews*, 85(4), 1159–1204. <http://doi.org/10.1152/physrev.00003.2005>
- Wiege, K., Le, D. D., Syed, S. N., Ali, S. R., Novakovic, A., Beer-Hammer, S., et al. (2012). Defective macrophage migration in *Gai2*- but not *Gai3*-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(2), 980–987. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1200891>
- Wilkie, T. M., & Kinch, L. (2005). New roles for Galpha and RGS proteins: communication continues despite pulling sisters apart. *Current Biology : CB*, 15(20), R843–54. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.008>
- Winklbauer, R., Medina, A., Swain, R. K., & Steinbeisser, H. (2001). Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation. *Nature*, 413(6858), 856–860. <http://doi.org/10.1038/35101621>
- Woodard, G. E., Huang, N.-N., Cho, H., Miki, T., Tall, G. G., & Kehrl, J. H. (2010). Ric-8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Molecular and Cellular Biology*, 30(14), 3519–3530. <http://doi.org/10.1128/MCB.00394-10>
- Woods, M. L., Carmona-Fontaine, C., Barnes, C. P., Couzin, I. D., Mayor, R., & Page, K. M. (2014). Directional collective cell migration emerges as a property of cell interactions. *PloS One*, 9(9), e104969. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0104969>
- Xing, B., Wang, L., Guo, D., Huang, J., Espenel, C., Kreitzer, G., et al. (2013). Atypical protein kinase C λ is critical for growth factor receptor-induced dorsal ruffle turnover and cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 32827–32836. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.489427>
- Xu, C., Zhao, H., Chen, H., & Yao, Q. (2015). CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 4953–4964. <http://doi.org/10.2147/DDDT.S84932>
- Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., and Bourne, H. R. (2003). Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell*, 114(2), 201–214.
- Xu, X., & Jin, T. (2012). A shortcut from GPCR signaling to Rac-mediated actin cytoskeleton through an ELMO/DOCK complex. *Small GTPases*, 3(3), 183–185. <http://doi.org/10.4161/sgtp.20271>
- Yan M., Hee J., Dhanasekaran D.N. (2015). $G\alpha_{13}$ Stimulates the Tyrosine Phosphorylation of Ric-8A. *Journal of Molecular Signaling*, 10 (3), 1–17. <http://dx.doi.org/10.5334/1750-2187-10-3>
- Yan, J., & Jin, T. (2012). Signaling network from GPCR to the actin cytoskeleton during chemotaxis. *Bioarchitecture*, 2(1), 15–18. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.11.007>

IX. ANEXOS

i) PUBLICACIONES (los trabajos publicados están anexados al final de este capítulo)

Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, L., Beyer, A., Henriquez, J. P., et al. (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. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.005>

Fuentealba, J.*, Toro-Tapia, G.*, Rodríguez, M., Arriagada, C., Maureira, A., Beyer, A., Villaseca, S., Leal, J., Hinrichs, M., Olate, J., Caprile, T., Torrejón, M. (2016). Expression profiles of the $G\alpha$ subunits during *Xenopus tropicalis* embryonic development. *Developmental Dynamics* (*co-autoría, paper enviado)

ii) PRESENTACIONES A CONGRESOS DURANTE LA PERMANENCIA EN EL PROGRAMA DE DOCTORADO

A) Congresos internacionales

Study of XtRic-8 during the neural development of *X. tropicalis*. Gabriela Toro-Tapia, Cecilia Arriagada, Jaime Fuentealba, M. Victoria Hinrichs, Juan Olate and Marcela Torrejón. 70th Annual Meeting of Society for Developmental Biology. Chicago, IL, USA. 21-25 de Julio, 2011.

XtRic-8A, a protein required during *Xenopus* primary neurogenesis. Gabriela Toro, Jaime Fuentealba, Juan Olate and Marcela Torrejón. VI International Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology. Montevideo, Uruguay. 26-29 de Abril, 2012.

Ric-8A, a protein required for neural crest cells migration. Jaime Fuentealba, Gabriela Toro-Tapia, Cecilia Arriagada, Lester Riquelme, Marion Rodriguez, Roberto Mayor, Maria Victoria Hinrichs, Juan Olate and Marcela Torrejon. 14th International *Xenopus* Conference. Giens Peninsula, France. 9-13 de Septiembre, 2012.

Ric-8A is required for the neural crest cell migration. Toro-Tapia G., Fuentealba J., Rodriguez M., Hinrichs MV., Olate J., Marcellini S., Torrejón M. 72nd Annual Meeting/17th International Congress of Developmental Biology. Cancún, Mexico. 16–20 de Junio, 2013.

Ric-8A/G α 13 signaling pathway is required to proper cranial neural crest migration in *Xenopus*. Toro-Tapia G., Marcellini S., Mayor R., Torrejón M. 15th International *Xenopus* Conference. Pacific Grove, California, USA. 24-28 de Agosto, 2014.

Ric-8A/G α 13 signaling pathway is required to proper cranial neural crest migration in *Xenopus*. Toro-Tapia G., Rodríguez M., Mayor R., Torrejón M. Neural Crest and Cranial Placodes meeting. Gordon Research Conference. Bentley University Waltham, MA, USA. 19-24 de Julio, 2015.

B) Congresos Nacionales

Study of X α Ric-8A during the neural development of *X. tropicalis*. Gabriela Toro, Lester Riquelme, Juan Olate, and Marcela Torrejón. XXV Annual Meeting of the Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. 1-5 de Noviembre, 2011.

Ric-8A is required for neural crest cells migration. Gabriela Toro, Jaime Fuentealba, Lester Riquelme, Marion Rodriguez, Juan Olate, Marcela Torrejón. XXVI Annual Meeting of the Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. 23-27 de Octubre, 2012.

Dinámica de la migración de células de la cresta neural: Ric-8A molécula esencial de señalización en *Xenopus*. (Neural crest cell migration dynamics: Ric-8A as a key signaling molecule in *Xenopus*). Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, L., Rodriguez, M., Mayor, R., Olate, J., Torrejón, M. LV Annual Meeting of the Sociedad de Biología de Chile. Puerto Varas, Chile. 19-21 de Noviembre, 2012.

Ric-8A regulates G α 13 signaling during neural crest cell migration in *Xenopus tropicalis* embryos. Toro-Tapia G., Rodríguez M., Marcellini S., Torrejón M. XXVII Annual Meeting of the Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. 23-27 de Octubre, 2013.

Ric-8A/G α 13 signaling pathway is required to proper cranial neural crest migration in *Xenopus*. Toro-Tapia G, Rodriguez M, Beyer A, Villaseca S, Marcellini S, Mayor R., Torrejón M. XXIX Annual Meeting of the Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. 25-29 de Octubre, 2015. (Trabajo premiado: “Mejor presentación oral”).

iii) VERSION DIGITAL: VIDEOS “TIME-LAPSE”

Video 1: Estudio del efecto del silenciamiento de Ric-8A y $G\alpha 13$ sobre la migración de las CNC *in vitro* y ensayos de epistasis empleando la subunidad $G\alpha 13$ en embriones morfantes para Ric-8A. "Time-lapse" correspondiente a la figura 5.

Video 2: Análisis de motilidad en células individuales de CNC. “Time-lapse” correspondiente a la figura 6.

Video 3: Evaluación del fenotipo del citoesqueleto de actina en las protrusiones de células morfantes para $G\alpha 13$ y morfantes para Ric-8A por medio de “time-lapse”. “Time-lapse” correspondiente a la figura 10.

Video 4: Efecto del silenciamiento de $G\alpha 13$ sobre las adhesiones focales en células de la CNC. Reconstrucción 3D obtenido de la condición morfante para $G\alpha 13$ y control correspondiente a la figura 12.

Video 5: Análisis de la dinámica de las adhesiones focales en células morfantes para $G\alpha 13$ y estudio de la localización sub-celular e interacción de $G\alpha 13$ con FAK. “Time-lapse” correspondiente a la figura 13a

Video 6: Ensayo de quimiotaxia en explantes morfantes para $G\alpha 13$. “Time-lapse” correspondiente a la figura 17.

“Link” de descarga de videos:

https://drive.google.com/folderview?id=0B3IjFObyNj_AT09rRkpPckNfX0E&usp=sharing

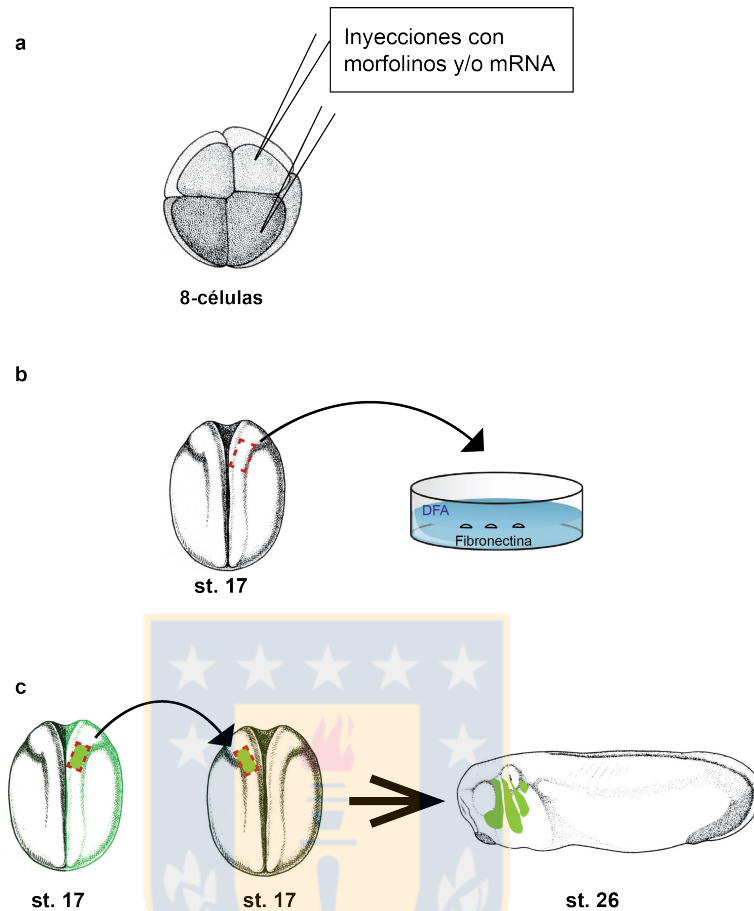


Figura anexo I: Metodología para microinyección y disección de CNC desde embriones de *Xenopus*.

Se inyectaron embriones en estadio de 8 células para dirigir el mayor efecto de las moléculas inyectadas (morfolino y/o mRNA) hacia la población de las CNC (A). La extracción de las CNC se realizaron desde embriones previamente inyectados al estadio de 17 (B), para luego cultivarlas sobre fibronectina en medio DFA por 4 horas (*X. tropicalis*) o 10 horas (*X. laevis*). Los ensayos de trasplante se realizaron empleando a un embrión previamente inyectado como donante y a un embrión “wildtype” como receptor (C). El injerto se realizó en estadios entre st.16-17 y se observó la migración de las CNC al st.26.