




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



**Estudio funcional de Ric-8A durante la inducción de las
Crestas Neurales en *Xenopus tropicalis***

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

MARION INGRID RODRÍGUEZ CORRALES
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Marcela Eliana Torrejón Quezada
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.

Profesor tutor

Dra. Marcela Torrejón Q.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dra. Teresa Caprile E.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Fernando Cruzat C.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dra. Violeta Morín M.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La Cresta Neural (CN).....	1
1.2. Inducción de la Cresta Neural.....	3
1.3. Snail2 como marcador específico de Crestas Neurales.....	6
1.4. Migración de las células de la Cresta Neural.....	6
1.5. Proteína G Heterotrimérica.....	8
1.6. Proteína G en la embriogénesis temprana.....	9
1.7. Transducción de señales vía Gαq.....	10
1.8. Ric-8: Resistencia a Inhibidores de la Colinesterasa 8.....	12
1.9. Modelo <i>Xenopus tropicalis</i>	14
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo general.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas.....	19
4.1.1. Obtención de embriones de <i>Xenopus tropicalis</i>	19
4.1.2. Fijación de embriones.....	20
4.1.3. Microinyección de embriones.....	20
4.1.3.1. Microinyección de morfolidos.....	20
4.1.3.2. Microinyección de ARNm.....	21
4.1.4. Hibridación <i>in situ</i> (embrión completos y conjugaciones).....	22
4.1.5. Ensayos de Conjugación Mesodermo prospectivo/Animal Cap.....	24
4.1.5.1. Conjugaciones morfantes para Ric-8A.....	27
4.1.6. Lisis de embriones <i>Xenopus tropicalis</i>	27
4.1.7. Reacción de detección de actividad β-galactosidasa.....	28
4.2. Técnicas de Biología Molecular.....	28

4.2.1. Construcciones de ADN.....	28
4.2.1.1. Digestiones de ADN mediante enzimas de restricción.....	28
4.2.1.2. Extracción desde geles de agarosa.....	29
4.2.1.3. Reacción de ligación.....	29
4.2.1.4. Purificación de plásmidos a pequeña escala por técnica de minilizado.....	29
4.2.2. Transformación de bacterias quimiocompetentes	30
4.2.3. Purificación de plásmidos a gran escala.....	31
4.2.4. Síntesis de sonda marcada con digoxigenina	32
4.2.5. Síntesis de ARNm.....	33
4.2.6. Co-inmunoprecipitación desde lisado de embriones completos	34
4.2.7. Análisis de expresión de proteínas por “Western Blot”	34
4.2.8. Extracción de ARN total desde embriones completos	35
4.2.9. RT-PCR.....	36
5. RESULTADOS	38
5.1. Estudiar el efecto de la pérdida y ganancia de función de Ric-8A durante la inducción de la cresta neural.....	38
5.1.1. Estudiar la pérdida y ganancia de función de Ric-8A durante la inducción de la cresta neural en embriones completos de <i>Xenopus tropicalis</i>	38
5.1.2. Estudiar la pérdida y ganancia de función de Ric-8A durante la inducción de la cresta neural en el tejido inductor.....	44
5.2. Estudiar la pérdida y ganancia de función de Ric-8A en la expresión de genes dorso-mesodermales durante la inducción temprana de la cresta neural	51
5.2.1. Estudiar la pérdida y ganancia de función de Ric-8A en la	

expresión de diferentes genes del mesodermo dorsal durante la inducción de la cresta neural en embriones completos de <i>Xenopus tropicalis</i>	51
5.3. Estudiar si la subunidad Gαq de proteína G heterotrimérica interacciona con Ric-8A para regular la inducción de la cresta neural.....	59
5.3.1. Estudiar la participación de la subunidad Gαq durante la inducción de la cresta neural a través de ensayos de epistasis en embriones completos de <i>Xenopus tropicalis</i>	59
5.3.2. Estudiar la pérdida y ganancia de función de la subunidad Gαq durante la inducción de la cresta neural.....	63
5.3.3. Analizar la interacción de la subunidad Gαq con la proteína Ric-8A de <i>Xenopus tropicalis</i>	69
6. DISCUSIÓN	71
7. CONCLUSIONES	83
8. BIBLIOGRAFÍA	84
ANEXO	93
Anexo 1. Análisis comparativo de la expresión espaciotemporal de Ric-8A por medio de hibridación “ <i>in situ</i> ” a embriones completos.....	93
Anexo 2. Expresión de Gαq durante el desarrollo temprano de <i>Xenopus tropicalis</i>	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Formación de la Cresta Neural.....	2
Figura 2	Modelo de inducción de la Cresta Neural.....	5
Figura 3	Conjugaciones Mesodermo prospectivo/Animal Cap.....	26
Figura 4	Efecto de la pérdida de función de Ric-8A sobre la inducción de las células de la CN.....	42
Figura 5	Efecto de la sobreexpresión de Ric-8A en la inducción de crestas neurales.....	43
Figura 6	Conjugaciones “wild type” Mesodermo Prospectivo/Animal Cap.....	47
Figura 7	Estandarización de conjugaciones con MoCtl.....	48
Figura 8	Participación de Ric-8A en el tejido que entrega o recibe la señal de inducción de la CN.....	49
Figura 9	Efecto de la pérdida de función de Ric-8A en la expresión de genes mesodermales.....	54
Figura 10	Efecto de la sobreexpresión de Ric-8A en la expresión de genes mesodermales.....	56
Figura 11	Efecto de la pérdida y ganancia de función de Ric-8A en la expresión de <i>Chd</i> , <i>Gsc</i> y <i>Xbra</i> durante blástula tardía.....	58
Figura 12	Rescate del fenotipo producto del efecto del silenciamiento de Ric-8A a través de la sobreexpresión de <i>Gaq</i>	61
Figura 13	Efecto de la pérdida de función de <i>Gaq</i> sobre la inducción de las células de la CN.....	66
Figura 14	Efecto de la sobreexpresión de la subunidad <i>Gaq</i> sobre la inducción de la CN.....	68
Figura 15	Estudio de la interacción entre Ric-8A y <i>Gaq</i> en embriones de <i>Xenopus tropicalis</i>	70

ABREVIATURAS

AC	:	“Animal Cap”
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	:	ADN copia
AP	:	“Alkaline Phosphatase”, Fosfatasa alcalina
ARN	:	Ácido Ribonucleico
ARNm	:	ARN mensajero
Benzocaína	:	p-aminobenzoato de etilo
BMBR	:	“Boehringer-Mannheim Blocking Reagent”, Agente de bloqueo
BMP	:	“Bone Morphogenetic Protein”, Proteína morfogenética del hueso
CHAPS	:	“3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulphonate”
CIL	:	“Contact Inhibition of Locomotion”, Cambio de locomoción por contacto
CN	:	Cresta Neural
CNC	:	Cresta Neural Craneal
DAG	:	Diacilglicerol
DEPC	:	“Diethylpyrocarbonate”, Dietil pirocarbonato
DTT	:	Ditiotreitol
EDTA	:	Ácido Etileno Diámico Tetra-acético
EGFP	:	Proteína Fluorescente Verde Mejorada
EGTA	:	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-. N, N, N', N'- tetra-acético
EtOH	:	Etanol
FBS	:	“Fetal Bovine Serum”, Suero Fetal Bovino
FGF	:	“Fibroblast Growth Factor”, Factor de crecimiento de Fibroblastos
FzR	:	Receptor Frizzled

GAP	:	Proteína Activadora de GTPasa
GDP	:	Guanosina 5'-difosfato
GEF	:	Factor Intercambiador de Nucleótidos de Guanina
GPCR	:	Receptor Acoplado a Proteína G
GSK-3	:	Glicógeno sintasa quinasa-3
GTP	:	Guanosina 5'-trifosfato
HCG	:	“Human chorionic Gonadotropin”, Hormona Godanotropina Coriónica humana
Hepes	:	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico
HRP	:	“Horseradish Peroxidase”
IP₃	:	Inositol trifosfato
L15	:	Medio Leibovitz 15
LB	:	Medio Luria Bertani
M	:	Molar
MAB	:	“Maleic Acid Buffer”, tampón ácido maleico
MEMFA	:	Minimum Essential Medium-Formaldehyde
MI	:	Mesodermo Intermediario
mL	:	Mililitros
mM	:	Milimolar
MMP	:	Metaloproteinasa
Mo	:	Morfolino
MoCtl	:	Morfolino Control
MOPS	:	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MoRic-8A	:	Morfolino contra Ric-8A
MoXtGαq	:	Oligonucleótidos morfolino contra XtGαq
MR	:	“Modified Ringer”
NAM	:	“Normal Amphibian Medium”
NBT/BCIP	:	Nitro Blue Tetrazolium/ 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
ng	:	Nanógramos.
nM	:	Nanomolar.

PBS	:	“Phosphate Buffered Saline”, Tampón Fosfato Salino
PEG	:	Polietilenglicol
PIP₂	:	Fosfatidilinositol bifosfato
PKC	:	Proteína quinasa C
PLCβ	:	Isoforma β de la enzima fosfolipasa C
PMSF	:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTw	:	PBS, Tween-20
RGS	:	Regulador de la Señalización de proteínas G.
Ric-8	:	Resistencia a Inhibidores de Colinesterasa 8
SDS	:	Dodecil sulfato de sodio
SSC	:	“Saline-Sodium Citrate”
SSCTw	:	“Saline-Sodium Citrate, Tween-20”
TE	:	Tampón Tris-HCl – EDTA
ETM	:	Transición Epitelio Mesenquimal, “epithelial-mesenchymal transition”
Wnt	:	“Wingless-Type”
Wnt/Ca²⁺	:	Vía no canónica de Wnt, mediada por calcio
ZMD	:	Zona Marginal Dorsal
ZMDL	:	Zona Marginal Dorso-Lateral
ZML	:	Zona Marginal Lateral
μg	:	Microgramo
μL	:	Microlitros
°C	:	Grados Celsius

RESUMEN

La Cresta Neural (CN) es un tejido embrionario transitorio, pluripotencial y característico de vertebrados, originado en el borde de la placa neural y capaz de diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares. Durante el transcurso de la gastrulación y neurulación, ocurre su inducción en respuesta a un gradiente de señales moleculares provenientes del ectodermo neural, no neural y el mesodermo. Ensayos en *Xenopus* realizados por nuestro grupo de investigación permitieron identificar en el mesodermo prospectivo la presencia de la proteína Ric-8A, la cual actúa como GEF para diferentes subunidades $G\alpha$ de proteína G heterotrimérica.

Análisis de la expresión espacio-temporal de Ric-8 determinaron la presencia de su ortólogo Ric-8A de *Xenopus tropicalis* en tejido neural y tejido derivado de crestas neurales, lo que nos permitió relacionarla en el proceso de inducción de la CN. Con el fin de estudiar la función de Ric-8A durante este proceso, se realizaron ensayos de pérdida y ganancia de función en embriones de *Xenopus tropicalis*. Fue posible observar que el silenciamiento de Ric-8A inhibe la expresión del marcador de CN *Snail2*, lo que indica la inhibición en el proceso de inducción de crestas neurales. Además, ensayos de recombinación de tejidos permitieron identificar que Ric-8A se encontraría participando en este proceso desde una región específica del mesodermo prospectivo denominada Zona Marginal Dorso-lateral, y no así desde el futuro ectodermo. Con el fin de analizar la función de Ric-8A en la formación del mesodermo, se estudió el efecto de la pérdida y ganancia de función sobre genes marcadores del mesodermo dorsal como lo son *Gooseoid* y *Chordin*. Ensayos de hibridación *in situ* mostraron que la expresión de estos marcadores se inhibe tras el silenciamiento de Ric-8A, sugiriendo que Ric-8A regula la formación del mesodermo prospectivo y por lo tanto participa en la etapa temprana de inducción de la CN. Finalmente, estudios preliminares de epistasis con *Gαq* nos permitieron vincular esta vía de señalización en el proceso de inducción de crestas neurales, puesto que la sobreexpresión de esta subunidad fue capaz de rescatar el fenotipo anormal de

inducción desde embriones morfantes para Ric-8A. El nexa propuesto se vio reforzado por ensayos de co-inmunoprecipitación demostrando la interacción entre ambas proteínas. Además, hibridaciones *in situ* demostraron la inhibición de *Snail2* en embriones morfantes para $G\alpha_q$, el mismo fenotipo severo observado tras la pérdida de función de Ric-8A.

En conjunto, estos resultados evidencian la importante función de Ric-8A durante el proceso de inducción de la CN en el modelo *Xenopus tropicalis*, regulando la vía de señalización de proteína G heterotrimérica, específicamente a través de $G\alpha_q$ y por lo tanto identificando una nueva función para Ric-8A durante la embriogénesis.



SUMMARY

The Neural Crest (NC) is a transient and pluripotent embryonic tissue, typical of vertebrates that emerges at the border of the neural plate and it is able to differentiate into a wealth of cell types. During the course of gastrulation and neurulation, its induction occurs in response to a gradient of different molecular signals coming from the mesoderm, neural and non-neural ectoderm. Studies in *Xenopus* carried out by our research group have identified in the prospective mesoderm the presence of Ric-8A, which functions as a GEF for different G α subunits from heterotrimeric G protein.

Spatiotemporal analysis of this protein determined the expression of the Ric-8A orthologue from *Xenopus tropicalis* on neural tissue and NC-derived tissue which allowed us to link this protein with the induction process of NC cells. In order to study Ric-8A function during this process, gain and loss of function assays were performed in *Xenopus tropicalis* embryos. We were able to observe that Ric-8A silencing inhibits the NC marker *Snail2* expression, meaning the inhibition of neural crest induction process. On the other hand, tissue recombination assays identified Ric-8A activity in a specific region of prospective mesoderm known as Dorso-Lateral Marginal Zone, and not in future ectoderm tissue. In pursuance of studying Ric-8A function during mesoderm formation, gain and loss of function assays were performed studying their effect over dorsal mesodermal marker genes *Chordin* and *Gooseoid*. Whole mount *in situ* hybridizations showed that these marker genes expression inhibit after Ric-8A silencing, suggesting that Ric-8A regulates prospective mesoderm formation and thus participates in early NC induction.

Finally, epistasis assays using the G α q subunit allowed us to link the signaling pathway of these proteins together with the induction process, since the overexpression of G α q was able to rescue the abnormal phenotype from Ric-8A morphant embryos analyzed through the expression of the NC marker *Snail2*. This

was supported by the interaction of both proteins through Co-IP assays and *in situ* hybridizations showing *Snail2* inhibition on Gαq morphant embryos, same phenotype observed after Ric-8A's silencing.

Together these results demonstrate the important function of Ric-8A during NC cells induction in *Xenopus tropicalis*, regulating heterotrimeric G protein signaling pathway specifically Gαq and hence identifying a new function for Ric-8A during embryogenesis.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Cresta Neural (CN)

La Cresta Neural (CN) es un tejido embrionario transitorio, pluripotencial y característico de vertebrados. Esta población celular se forma entre el ectodermo neural (neuroectodermo) y no neural, en respuesta a una serie de interacciones y a un gradiente de señales moleculares que ocurren poco después de la inducción del sistema nervioso durante la etapa de neurulación (Aybar y col., 2003). Las células de la CN se originan en la zona más dorsal del tubo neural (Fig. 1), específicamente en los bordes de la placa neural, los cuales luego se fusionarán permitiendo el cierre del tubo neural conteniendo células de la CN pre-migratorias (Burstyn-Cohen y Kalcheim, 2002). Durante este proceso, éstas células sufren lo que se conoce como una Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT: “epithelial-mesenchymal transition”) para luego migrar extensamente y diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares tales como neuronas y glías del sistema nervioso periférico, tejido conectivo de la estructura cráneo facial y células pigmentarias de la piel como melanocitos (Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008). La CN se divide en 4 sub-poblaciones dependiendo de su posición a lo largo del eje antero-posterior del embrión. Éstas se denominan craneal, cardíaca, vagal, troncal y sacra; las que adoptan diferentes rutas migratorias (Gilbert, 2000). Sin embargo, para este estudio en particular se utilizará como modelo las células de la CN craneal (CNC), capaces de formar melanocitos, neuronas, glia, cartílago y hueso. Diversos estudios sugieren que este destino final de diferenciación de las células de la CN se determinaría posterior a iniciada la migración (Basch y col., 2004; Le Douarin y Kalcheim, 1999). Por lo tanto, en base a los eventos que se llevan a cabo, podemos clasificar las distintas etapas de formación de la CN como: inducción, especificación, transición epitelio-mesenquimal y migración.

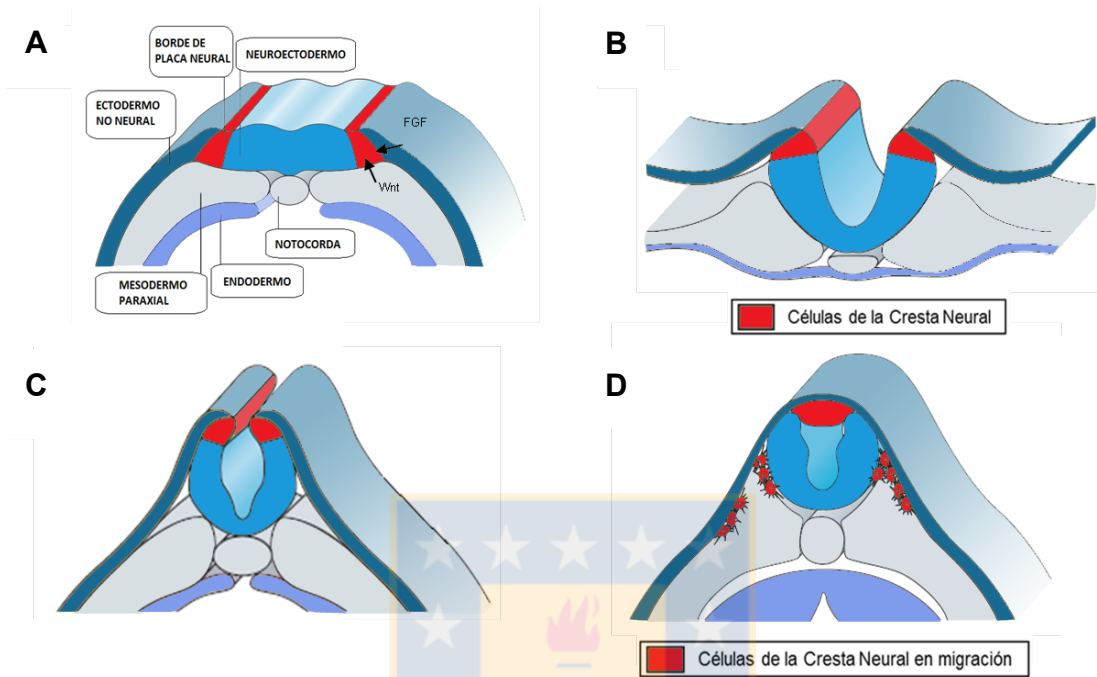


Figura 1. Formación de la Cresta Neural.

(A) El proceso de inducción de la CN se origina en el borde de la placa neural por medio de señales moleculares tales como Wnt, FGF, entre otras, provenientes de tejidos adyacentes. Éstas provienen desde el ectodermo neural, no neural y mesodermo. A medida que transcurre la etapa de neurulación, los pliegues laterales de la placa neural se elevan hacia la línea media axial (B y C), y finalmente se fusionan permitiendo el cierre del tubo neural (D), y la migración de las células de la CN (Modificación de Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008).

1.2. Inducción de la Cresta Neural

La inducción embrionaria se ha definido como un proceso en el cual un tejido inductor libera una señal capaz de provocar un cambio en la dirección de diferenciación del tejido que la recibe (Gurdon, 1987). Un ejemplo de ello es la inducción de la CN, la cual se puede definir como el proceso por el cual las células del ectodermo reciben una señal de especificación para convertirse en células precursoras de la CN, paso que incluye movimientos complejos durante la gastrulación y neurulación. De esta forma, la inducción de las crestas neurales ocurre en el borde de la placa neural por interacciones de esta región con tejidos adyacentes (Fig. 1). Diferentes estudios en *Xenopus* demuestran que, el futuro tejido mesodermal presente en etapas de gástrula, específicamente la Zona Marginal Dorso-Lateral (ZMDL), es capaz de inducir a la CN (Monsoro-Burq y col., 2003; Steventon y col., 2009). Es así como se ha determinado que este fenómeno ocurre en un modelo de tres pasos: en el primero, una serie de marcadores del borde de la placa neural durante los estadios de gástrula temprana deberán ser especificados permitiendo la inducción de este mismo tejido. Luego, en una segunda etapa, una región específica del mesodermo prospectivo denominada ZMDL se encargará de mandar señales moleculares necesarias para la inducción de la CN. Luego, los movimientos que ocurren durante la gastrulación tardía se encargarían de posicionar la ZMDL por debajo de la CN, diferenciándose a Mesodermo Intermediario (MI) (Fig. 2). Finalmente, en un tercer y último paso, señales provenientes del MI y del tejido ectodermal adyacente serán capaces de mantener la identidad de las células de la CN durante la etapa de neurulación (Steventon y col., 2009; Steventon y Mayor 2012).

Estudios realizados en *Xenopus*, pollo y pez cebra, han identificado señales moleculares que participan en este proceso de inducción tales como BMPs y otras señales de posteriorización del tubo neural como Wnt, Notch, FGF y ácido retinoico (LaBonne y Bronner-Fraser, 2000; Steventon y col., 2005). Por ejemplo, se

estableció que el mesodermo paraxial de *Xenopus laevis* induce la CN a través de una vía de señalización dependiente de FGF, probablemente regulada por FGF8 (Monsoro-Burq y col., 2003). Por otro lado, estas mismas moléculas participan en el proceso de especificación de la CN, regulando la expresión de genes especificadores del borde de la placa neural como *Zic1*, *Msx1*, *Pax3*, entre otros (Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008). Estos genes serán capaces de otorgar a las células de esta región la capacidad de recibir señales apropiadas que determinarán su destino en la formación de la CN. Al mismo tiempo, éstos controlan un segundo grupo de genes que corresponden a los especificadores de la CN, factores de transcripción comúnmente utilizados como marcadores del mismo tejido, puesto que se expresan en etapas tempranas de inducción. Entre estos genes se encuentran: *Snail1*, *Twist* y *Snail2 (Slug)* (Aybar y col., 2003; Steventon y col., 2009).



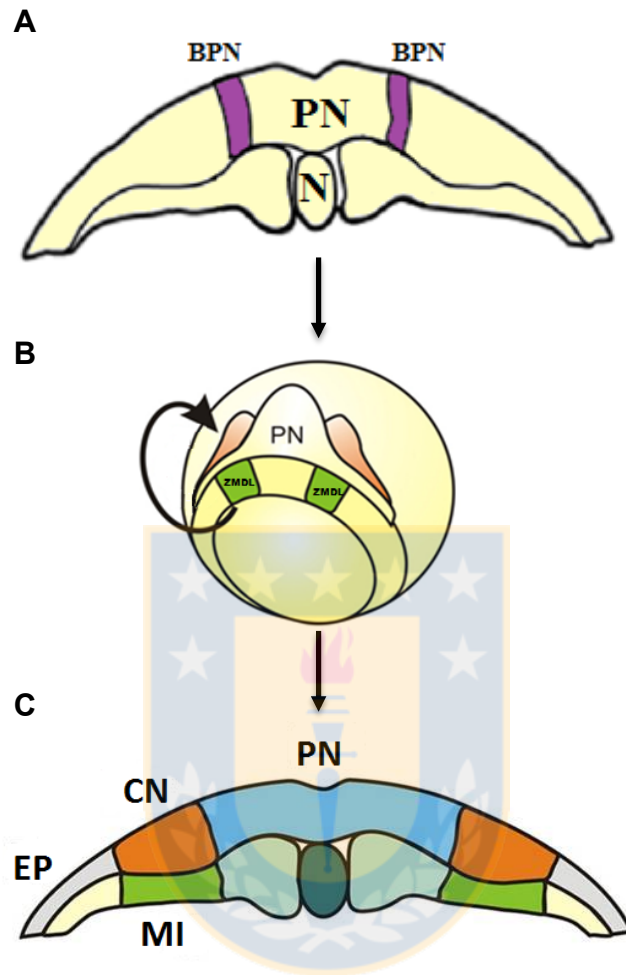


Figura 2. Modelo de inducción de la Cresta Neural.

(A) La especificación de distintos marcadores del Borde de la Placa Neural van a permitir iniciar el segundo paso de inducción (B), llevado a cabo por una región del mesodermo prospectivo, específicamente la ZMDL. Luego, en un tercer paso (C), la cresta neural se posiciona por sobre el MI diferenciado a partir de la ZMDL durante la neurulación. EP: epidermis; CN: cresta neural; PN: placa neural; MI: mesodermo intermediario; BPN: borde placa neural; ZMDL: zona marginal dorso-lateral; N: notocorda (Modificación de Steventon y col., 2009).

1.3. *Snail2* como marcador específico de Crestas Neurales

La formación de la CN prospectiva de *Xenopus* tiene como una de sus señales iniciales la expresión temprana del factor de transcripción *Snail1*, la cual ve su aparición en el arco dorsal de embriones en estadíos de gástrula temprana. Sin embargo, a medida que el embrión desarrolla y ve finalizado sus movimientos de extensión y convergencia para la formación de la placa neural, tiene su expresión *Snail2*, un gen relacionado con dominios dedos de zinc, el cual se expresa específicamente en la CN prospectiva. De esta forma, *Snail2* se encuentra en células de la CN tanto pre como post-migratorias durante la neurulación y es inducido por la Zona Marginal Lateral (ZML) o la Zona Marginal Dorsal (ZMD), lo que concuerda con los eventos de inducción de las células de la CN (Mayor y col., 1995). Cabe destacar que en el embrión se requiere no solo de uno, sino que de diversos factores de manera que exista un nivel normal de expresión de *Snail2* y por lo tanto ocurra la inducción/mantenimiento de la CN (Marchant y col., 1998). Mediante ensayos de explantes provenientes desde embriones de *Xenopus*, se ha determinado que la expresión de *Snail1* no se especificaría sino hasta estadío 12, mientras que *Snail2* se especifica a tiempos posteriores durante la neurulación (Mayor y col., 1995). Es por ello que durante esta propuesta de trabajo, hemos utilizado al marcador molecular *Snail2* (*Slug*) como un marcador específico de crestas neurales, el cual nos permitió estudiar el proceso de inducción de este mismo tejido.

1.4. Migración de las células de la Cresta Neural

Una de las características más notables que podemos observar en las células de la CN es su capacidad de migrar. Sin embargo, previo a su migración por el tubo neural, se debe gatillar un proceso en ellas que les confiere la capacidad de desplazarse. A este proceso se le conoce como Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT: “epithelial-mesenchymal transition”) (Kuriyama y Mayor 2008). Durante la

EMT, la célula epitelial se transforma en una célula mesenquimal y de esta forma se inicia la delaminación del epitelio (Aybar y col., 2003). Esta transformación comprende cambios en la polaridad, morfología y en el repertorio de moléculas de reconocimiento y adhesión en la superficie celular. En una primera instancia, la célula de la CN pre-migratoria se encuentra con una polaridad apico-basal típica, sin embargo, durante la EMT esta distribución se pierde y ocurre un reemplazo de las uniones estrechas (“tight junctions”) por uniones en hendidura (“gap junctions”) (Kuriyama y Mayor, 2008). Un elemento clave en este paso es la adhesión célula-célula mediada por cadherinas, donde para el caso de *Xenopus* cadherina-11 cumple un rol fundamental, puesto que la pérdida de expresión de esta última se correlaciona con el inicio de la migración y con una migración colectiva y direccionada de las células de la CN (Becker y col., 2013). Por otro lado, también se ha observado la expresión de ciertas metaloproteinasas (MMPs) jugando un papel importante en la migración en las células de la CN de *Xenopus* y otras especies, actuando sobre la degradación de la matriz extracelular, lo que les permitiría tener un mayor carácter invasivo y ser además un buen modelo para el estudio de la metástasis cancerosa (Kuriyama y Mayor, 2008; Alfandari y col., 2010).

La migración de las células de la Cresta Neural Craneal (CNC) es direccionada y colectiva. Esta migración tan característica y particular está dada por una sinergia de diversos mecanismos tales como una quimiotaxia colectiva, la co-atracción y por un proceso denominado Cambio de Locomoción por Contacto o CIL (“Contact Inhibition of Locomotion”). Este último proceso ocurre por el colapso de protrusiones de una célula con otra en la misma dirección, permitiendo que estas se polaricen y orienten su migración a otra dirección determinada (Carmona-Fontaine y col., 2008). Acompañado de este fenómeno, existe la presencia de ligandos quimio-atractivos capaces de provocar cambios en los filamentos de actina, impulsando así la extensión de la membrana (protusiones), lo que constituiría las filopodias y lamelipodias en el borde director de la célula. Finalmente, para el balance de estos procesos existiría un proceso de co-atracción entre las células, el cual es regulado

por un receptor acoplado a proteína G (GPCR) denominado C3R que responde al ligando C3 secretado por las mismas células de la CN (Carmona-Fontaine y col., 2011).

Dentro de las rutas implicadas y que son esenciales en la migración de las células de la CN se encuentra la vía de señalización de proteína G heterotrimérica. De la misma forma, se ha observado la implicancia de la vía de G heterotrimérica en procesos de inducción, para lo cual se detalla a continuación una breve descripción del mecanismo y las proteínas involucradas.

1.5. Proteína G Heterotrimérica

Todas las células poseen la capacidad de recibir y procesar información de sus alrededores. Señales externas como hormonas, neurotransmisores, péptidos, iones, entre otras señales, son capaces de actuar como agonistas gatillando distintas respuestas celulares a través de receptores de membrana (Hepler y col., 1992). Entre las familias de receptores de membrana más estudiados se encuentran los GPCR, que responden frente a señales externas (ligandos) funcionando como conducto físico para la transmisión de señales químicas transmembrana, modulando así a la misma proteína G (Pierce y col., 2002; Tall y col., 2003).

La proteína G es un heterotrímero conformado por tres subunidades: α , β y γ . Durante un evento de señalización intracelular, la unión de un ligando a un GPCR induce un cambio en la conformación del receptor permitiendo la activación de la subunidad $G\alpha$ y su interacción con ella. Esto se logra mediante la actividad como factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) intrínseca del receptor, la cual es capaz de promover el intercambio de GDP por GTP en $G\alpha$ y secuencialmente la separación del heterodímero $G\beta\gamma$. De esta forma, ambas subunidades quedan en disponibilidad para interactuar con distintas proteínas efectoras. El ciclo de activación es finalizado una vez que $G\alpha$ -GTP es hidrolizado a $G\alpha$ -GDP por la misma

actividad GTPasa intrínseca de $G\alpha$ (GAP) o por proteínas reguladoras de la señalización de proteína G (RGS), las cuales provocan la re-asociación del heterotrímero (Gilman, 1987; Tall y col., 2003; McCudden y col., 2005; Cotton y Claing, 2009).

Basado en la similitud de secuencia, funcionalidad y estructura, las subunidades $G\alpha$ han sido clasificadas en cinco familias: Gs, Gi/o, Gq/11, G12/13 y Gv; (Oka y col., 2009; Simon y col., 2013), y por lo menos hasta la actualidad, las cuatro primeras se han visto involucradas en procesos de migración celular (Cotton y Claing, 2009). Para efectos de esta tesis y al estudiar en modelo animal, será importante destacar la participación de este sistema de transducción de señales en la embriogénesis.

1.6. Proteína G en la embriogénesis temprana

Hoy en día, se ha descrito la participación de proteína G durante la embriogénesis de diversas especies tales como rana, mosca, ratón, humano, entre otras (Malbon, 2005). Se ha observado que su señalización sería capaz de controlar la migración colectiva y direccional de las células de la CN (Theveneau y Mayor, 2010; Toro-Tapia, 2016, tesis de doctorado). Por otro lado, se ha visto que proteína G también estaría participando en la formación y establecimiento de los ejes principales durante la embriogénesis temprana. En *Xenopus* y pez cebra se ha determinado que la activación de genes *Wnt* es esencial para el funcionamiento del centro organizador dorsal a distintos estadios del desarrollo embrionario, y por lo tanto para el establecimiento del patrón dorsal-ventral, el cual contribuye a la posterior formación del mesodermo (Gurdon, 1992; Heasman y col., 1994). Los receptores Frizzled (FzR) que participan en la vía de señalización de Wnt presentan características estructurales similares a los GPCR, y se ha determinado que estos receptores pueden transmitir señales a través de proteína G (Slusarski y col., 1997, Liu y col., 2001). También, estudios previos en pez cebra dieron a conocer que las proteínas G

estarían participando a través de la vía Wnt/ β -catenina, observando que la unión del ligando Wnt5a al receptor Fz2 provoca un aumento en la concentración celular de calcio vía fosfatidilinositol, efecto que puede ser revertido al utilizar la toxina pertussis para inhibir diferentes subunidades de la familia Gai (Slusarski y col., 1997). Por otro lado, se ha observado que IP_3 y Ca^{2+} son mediadores importantes de la vía Wnt no canónica para la formación del patrón dorso-ventral en *Xenopus* (Kühl y col., 2000). Existe evidencia que respalda la idea de que algunas de estas proteínas G estarían involucradas en la vía no canónica de Wnt, especialmente la vía Wnt/ Ca^{2+} (Soto y col., 2007). En *Xenopus* y mamíferos, la vía Wnt/ Ca^{2+} se encuentra implicada en la especificación de células ventrales (Kühl y col., 2000). Sumado a esto, en la especie *Xenopus laevis* se observó que la sobreexpresión de la vía G α_q / Ca^{2+} inhibe fuertemente la expresión de genes del mesodermo dorsal *gooseoid* y *chordin*, y que el fenotipo de ventralización observado se debería a defectos en el desarrollo de dicha capa germinal (Soto y col., 2007). Además, análisis de hibridación *in situ* en nuestro laboratorio muestran la expresión de G α_q en la ZMD en estadio de gástrula (Fuentealba y col., 2016, publicación enviada a Gene Expression Pattern). Por lo tanto, estos últimos antecedentes sugieren que la vía de transducción de esta subunidad de proteína G en particular se requiere para la correcta expresión de los genes dorso-mesodermales necesarios para la formación del mesodermo prospectivo, y en consecuencia, para la formación de la CN.

Haciendo alusión a esta última vía señalada y su importancia durante el desarrollo de *Xenopus*, será importante profundizar en los componentes de la señalización a través de G α_q y su implicancia en la regulación de diversos procesos celulares.

1.7. Transducción de señales vía G α_q

Cerca del 40% de todos los GPCRs descritos deben su señalización a la activación de subunidades G α_q para estimular la vía de fosfolípidos de inositol, incluyendo más

de 50 subtipos de receptores en respuesta a hormonas, neurotransmisores, quimioquinas, entre otros (Rhee, 2001). La familia Gαq/11 de proteína G esta compuesta por cuatro miembros: Gαq y Gα11 que se expresan de manera ubicua, Gα14 la cual se expresa en riñón, hígado y pulmón; y finalmente Gα15/16 (ortólogos de ratón/humano respectivamente) la cual se expresa únicamente en células hematopoyéticas (Hubbard y Hepler, 2006). Los efectores canónicos para esta familia de proteínas son las isoformas β de la enzima fosfolipasa C (PLCβ), a los cuales Gαq/11 se une y permite catalizar la hidrólisis de fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (Rhee, 2001). Tanto IP₃ como DAG actúan como segundos mensajeros, el primero movilizando calcio intracelular y el segundo activando a la proteína quinasa C (PKC) la cual fosforila efectores río abajo como Calmodulina para regular la señalización dependiente de calcio y así promover, entre algunas funciones, la motilidad y migración celular (Cotton y Claing, 2009).

Sin embargo, existen otras vías de señalización poco estudiadas para esta familia de proteínas, independientes de PLCβ, como lo es la activación de los RhoGEFs p63 y Trio por su interacción directa con Gαq/11. Esto último permitiría a esta vía participar en el reordenamiento del citoesqueleto de actina, proporcionando un vínculo entre GPCRs y la activación de RhoA (Lutz y col., 2007; Rojas y col., 2007; Vaqué y col., 2013). A pesar de que la mayoría de las funciones de Gαq se asocian a la activación de uno o más efectores, aun existen muchos procesos dependientes de la misma vía para los cuales no se ha podido describir efector. Tal es el caso de la activación de la glicógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), quinasa involucrada en diversos procesos celulares como migración celular y dinámica del citoesqueleto (Sun y col., 2009). Se ha observado que esta proteína sería fosforilada por la proteína tirosina quinasa Csk (quinasa Src C-terminal) que se encuentra río arriba y que también responde frente a la activación de Gαq (Fan y col., 2003).

Es importante recordar que dentro de los interactores de Gαq, y en general de todas las subunidades Gα, podemos encontrar diversas proteínas reguladoras de esta misma vía de señalización. Es así como entre ellas encontramos las ya mencionadas proteínas con dominios RGS que aceleran la actividad GAP de las subunidades Gα inactivándolas. Por el contrario, su activación puede ser mediada por proteínas moduladoras que estimulan el intercambio de GDP por GTP, denominadas GEF (Tall y col., 2003). Entre las proteínas con actividad GEF, independientes de los GPCR, se encuentra la proteína Ric-8 descrita a continuación.

1.8. Ric-8: Resistencia a Inhibidores de la Colinesterasa 8

Ric-8 es una proteína citoplasmática altamente conservada en vertebrados e invertebrados, de aproximadamente 63 kDa, que debe su nombre por identificarse inicialmente en mutantes de *Caenorhabditis elegans* que presentaban resistencia al inhibidor de la acetilcolinesterasa Aldicarb (Miller y col., 1996). Ric-8 se presenta como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), y por lo tanto, funciona como un modulador positivo muy potente para diferentes subunidades Gα de proteínas G heterotriméricas tales como Gαq, Gαi, Gαo, Gα13 y Gαs (Tall y col., 2003; Chan y col., 2011). Esta proteína posee un rol fundamental en la transmisión sináptica de individuos adultos de *C. elegans* y en la división celular asimétrica tanto de *C. elegans* como de *Drosophila melanogaster*, afectando el posicionamiento del huso mitótico durante la embriogénesis temprana (Miller y col., 2000; Wang y col., 2005). Por lo tanto, la importancia de esta proteína durante la embriogénesis, específicamente durante el desarrollo neural, la ha llevado a tomar el nombre de sinembrina. Cabe destacar que en mamíferos existen dos ortólogos de Ric-8: Ric-8A y Ric-8B. Mientras que ambas isoformas presentan mayor afinidad por la subunidad monomérica de Gα, se diferencian en la proteína G que regulan. Ric-8A funciona como GEF para las subunidades Gαi/o/q/13, pero no para Gαs, mientras que Ric-8B

funciona como GEF para Gas/q, pero no para Gai/o (Tall y col., 2003; Romo y col., 2007; Chan y col., 2011).

Estudios realizados en *Xenopus tropicalis* permitieron demostrar que Ric-8A se expresa principalmente en tejido neural y tejido derivado de crestas neurales así como también en estadios de gástrula en la ZMD, región que cumple un rol clave en la inducción de la CN (Maldonado-Agurto y col., 2011; Fuentealba, 2012, tesis de magíster, Fuentealba y col., 2016, publicación enviada a Gene Expression Pattern). Por lo demás, ensayos previos de silenciamiento utilizando un morfolino específico contra el ARN mensajero (ARNm) de esta proteína establecieron que Ric-8A participa en los procesos de inducción de la CN. Esto fue posible de observar gracias a ensayos de hibridación *in situ* donde los marcadores de CN *Twist* y *Snail2* presentaron una expresión ectópica en el lado inyectado del embrión de *Xenopus*, manifestando una alteración tanto en la inducción como en la migración de las células de la CNC (Fuentealba, 2012, tesis de magíster; Fuentealba y col., 2013). Recientemente en nuestro laboratorio, hemos descrito que Ric-8A regula la migración de las células de la CN a través de su señalización sobre G α 13 (Toro-Tapia, 2016, tesis de doctorado). Importante es destacar que el silenciamiento total de Ric-8A, tanto en ratón como en *Xenopus tropicalis* es letal durante el desarrollo, muriendo en estadios cercanos a gástrula (Tõnisso y col., 2010; Maldonado R., 2010, tesis de magíster). Por lo tanto, en conjunto, estos antecedentes nos demuestran que tanto Ric-8A como la señalización de proteína G heterotrimérica son importantes para el correcto desarrollo del embrión.

En particular y durante este trabajo de tesis nos interesa estudiar cómo Ric-8A participa en el proceso de inducción de la cresta neural en el modelo *Xenopus tropicalis*, estudiando la pérdida y ganancia de función de Ric-8A, su participación en los tejidos que regulan la inducción de la CN, y su interacción con distintas subunidades G α , y así poder contribuir al estudio del mecanismo de señalización de proteína G heterotrimérica. De esta forma, se pretende aportar en el estudio de las

funciones de Ric-8A, lo que permitirá profundizar en el mecanismo de inducción de la CN, el cual es requerido para el correcto desarrollo del embrión en *Xenopus tropicalis*.

A lo largo de este análisis, dado que Ric-8 de *Xenopus tropicalis* presenta una mayor similitud con Ric-8A que con Ric-8B de mamífero, se ha denominado a la proteína en estudio XtRic-8A. Sin embargo, por motivos de simplicidad, durante esta tesis será denominado simplemente Ric-8A.

1.9. Modelo *Xenopus tropicalis*

Para el desarrollo de esta tesis, *Xenopus tropicalis* fue determinado como modelo de estudio, dadas las ventajas que presenta frente a otros modelos comúnmente utilizados en el área de la Biología del Desarrollo. La utilización de este anfibio en particular nos permitió obtener embriones de forma inducida a través de la inyección de hormona Coriónica Gonadotropina Humana (HCG), manejar gran cantidad de individuos por progenie, los cuales, al presentar una embriogénesis externa, permitieron realizar estudios a etapas tempranas del desarrollo embrionario. Otras de las ventajas es el corto tiempo generacional de los embriones y el tamaño que estos presentan, lo que permite una fácil manipulación de ellos. Finalmente, el hecho de poseer un genoma diploide, el cual se encuentra completamente secuenciado, facilita el estudio de la función de genes de forma adecuada.

2. HIPÓTESIS

Dado que Ric-8A en estadio de gástrula se expresa en la ZMD, importante para la inducción de la CN, y que más tarde se expresa en tejido neural y tejido derivado de crestas neurales; que la subunidad α de proteína G heterotrimérica participa en diversos eventos de inducción, especificación y migración celular; y que se ha descrito a Ric-8A como una proteína con actividad GEF (independiente de GPCR) para diferentes subunidades $G\alpha$, entre ellas la subunidad $G\alpha_q$, proteína que también se expresa en la ZMD y que se ha descrito cumpliendo un rol importante en la formación del tejido mesodermal, es que en este trabajo de tesis nos planteamos la siguiente hipótesis:

“Ric-8A, a través de la regulación de la subunidad $G\alpha_q$, es esencial para la inducción de las células de la cresta neural en *Xenopus tropicalis*”.

3. Objetivos

Para responder a esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos, general y específicos:

3.1. Objetivo general:

Estudiar la función de Ric-8A durante el proceso de inducción de crestas neurales en *Xenopus tropicalis*.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Estudiar el efecto de la pérdida y ganancia de función de Ric-8A durante la inducción de la cresta neural.

3.2.2. Estudiar la pérdida y ganancia de función de Ric-8A en la expresión de genes dorso-mesodermales durante la inducción temprana de la cresta neural.

3.2.3. Estudiar si la subunidad G α q de proteína G heterotrimérica interacciona con Ric-8A para regular la inducción de la cresta neural.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

Oligonucleótidos morfolino

Oligonucleótido morfolino control (MoCtl):

5'- CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A -3'

Oligonucleótido morfolino contra Ric-8A (MoRic-8A):

5'- GAG GGT ACC CGG ATC CAT GGC TGG C -3'

Oligonucleótidos morfolino contra XtGaq (MoXtGaq):

5'-TCCAGAGTCATGCCTCCTGACTGGT-3'

Vectores plasmidiales

Plásmidos para la síntesis de sondas y ARN mensajero mediante transcripción *in vitro*:

Para la síntesis de sonda:

Gen

Slug (Snail2)

Queratina epidermal

Chordin

Goosecoid

Brachyury

Vector

pSP72/Slug

pGEM1/XK81A1

pBSS9-CHD

pBIIISK(-)-Gsc

pSP73-Xbra

Para la síntesis de ARN mensajero:

pCSC2+/6MycXtRic-8A

pCS105/EGFP-CAAX

pCS2+/mCherrymembrana

pCS2+MT/6MycXtG α q

pCS2+V5XtG α q

pCS2+- β -galactosidasa

Anticuerpos

Anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics)

Anticuerpo anti-Myc monoclonal de ratón (Santa Cruz, 9E10)

Anticuerpo anti-GAPDH de ratón (Novus Biologicals, 1D4)

Anticuerpo anti V5-probe monoclonal de ratón (Santa Cruz, sv5-pk)

Anticuerpo anti Gaq monoclonal de ratón (Santa Cruz, 10)

Anticuerpo anti-IgG de ratón cadena liviana conjugado con HRP (“Horseradish peroxidase”, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-035-003)

Anticuerpo anti IgG no relacionado de ratón (Santa Cruz)

Resinas

Proteína A-agarosa para inmunoprecipitación (Santa Cruz)

Enzimas

Enzimas de restricción: NotI, NcoI, XhoI, XbaI, BamHI (Biolabs), BglII (Promega)

Sp6 ARN polimerasa (Biolabs)

T7 ARN polimerasa (Biolabs)

Proteinasa K (Fermentas)

ADNasa I (Ambion)

T4 ADN Ligasa (Fermentas)

Transcriptasa reversa M-MLV (Promega)



4.1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas

4.1.1. Obtención de embriones *Xenopus tropicalis*

Todos los métodos utilizados para la mantención y utilización del modelo *Xenopus* se rigieron según los parámetros de las tres R (Reemplazar, Refinar y Reducir), y fueron evaluados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas. La metodología de eutanasia de anfibios se basó en los métodos descritos en el trabajo de Close y colaboradores (1996).

La obtención de embriones *Xenopus tropicalis* se realizó por medio de la técnica de fertilización *in vitro*. La ovulación de las ranas hembras seleccionadas fue inducida mediante la inyección sub-cutánea de hormona Coriónica Gonadotropina Humana (HCG). La noche anterior a la fertilización, tanto hembras como machos fueron inyectados con 20 unidades de HCG. Al día siguiente, cuatro horas previas a la obtención de huevos, nuevamente todas las ranas fueron inyectadas con 200 unidades de HCG. Para la extracción de los testículos desde los machos, el individuo fue anestesiado en benzocaína y luego sacrificado, diseccionando los testículos a través de una incisión abdominal. Luego, estos últimos fueron macerados en medio L15 suplementado con 10% de FBS. Posteriormente, los huevos fueron extraídos y fertilizados con gotas de macerado de testículo incubando por 20 minutos en 1/9x MR (0.1 M NaCl, 1.8 mM KCl, 2.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 5.0 mM Hepes-NaOH pH 7.6). A continuación, el medio de las placas de fertilización se reemplazó con lavados de una solución de cisteína al 3% en 1/9x MR pH 7.9, con el objetivo de disolver la capa gelatinosa que los protege, proceso conocido como “De-Jellying” o desgelatinización. Finalmente, los embriones fueron lavados e incubados en 1/9x MR a 26°C. Dos horas post-fertilización, el medio se reemplazó por 1/20x MR con gentamicina a 100 µg/mL, manteniendo la misma temperatura hasta alcanzar los estadíos correspondientes y ser fijados (Modificación de la metodología descrita por Sive y col., 2000).

4.1.2. Fijación de embriones

Una vez que los embriones alcanzaron el estadio requerido, fueron fijados en una solución de MEMFA (FA 3,7% p/v, 100 mM MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, pH 7.4) por 4 horas a temperatura ambiente y, posteriormente, fueron lavados y almacenados en etanol 100% a -20°C (Modificación de la metodología descrita por Sive y col., 2000).

4.1.3. Microinyección de embriones

Las microinyecciones se llevaron a cabo utilizando un microinyector Narishige IM300 observando a través de un estereoscopio de luz visible. Utilizando capilares de borosilicato como agujas finas para la microinyección, se inyectaron 2,1 nL de cada solución en embriones posicionados sobre placas de microinyección con 1/9x MR y 2% Ficoll. Posteriormente, el medio fue reemplazado por 1/20x MR con gentamicina a 100 µg/mL hasta alcanzar los estadios requeridos.

4.1.3.1. Microinyección de Morfolinos

Para el desarrollo de esta tesis, se diseñaron dos oligonucleótidos morfolino (Mo), ambos sintetizados por GeneTools®. En primera instancia, se diseñó un Mo contra Ric-8A (MoRic-8A), el cual es capaz de hibridar con el ARN mensajero de Ric-8A, impidiendo de esta forma la traducción de dicho mensajero. El mismo mecanismo de acción se consideró para sintetizar un segundo morfolino el cual sería específico contra el ARN mensajero de la proteína Gαq de *Xenopus tropicalis* (MoXtGαq).

Los niveles de silenciamiento de Ric-8A mediados por MoRic-8A fueron previamente

determinados mediante “Western Blot” (datos no mostrados, Fuentealba y col., 2013) (Maldonado-Agurto, 2010, tesis de magíster). Por otro lado, con el fin de determinar la toxicidad de ambos morfolinós utilizados, se inyectaron también concentraciones equimolares de un Mo control (MoCtl) no relacionado. Para ello, cada uno de los morfolinós fue inyectado en conjunto con el marcador de linaje Rodamina-Dextrano al 1%, permitiendo de esta forma identificar el lado inyectado del embrión mediante fluorescencia. Para los ensayos de pérdida de función, las cantidades de MoRic-8A y de MoXtG α q utilizadas fueron de 15 ng, 20 ng o 25 ng, inyectando un solo blastómero del embrión en estadio de dos células, de manera de silenciar sólo un lado del embrión y mantener el otro como lado control. Sin embargo, para los ensayos de rescate de fenotipo se utilizó una única concentración de MoRic-8A y MoXtG α q (25 ng), la cual se logró estandarizar para presentar un fenotipo de silenciamiento severo. Durante estos ensayos, el protocolo para la microinyección de embriones fue el mismo descrito previamente, teniendo en cuenta consideraciones propias de la manipulación de los oligonucleótidos morfolino. Momentos previos a la microinyección, los morfolinós fueron calentados a 65°C por varias horas, luego fueron centrifugados (centrífuga Force mini) y cuantificados realizando las respectivas diluciones a inyectar. Este procedimiento fue necesario llevarse a cabo debido a la baja solubilidad de estas moléculas y la facilidad con la que precipitan (Metodología descrita por Harland *Xenopus tropicalis* Site).

4.1.3.2. Microinyección de ARNm

Diferentes ARNm fueron utilizados durante la microinyección de embriones para los ensayos de rescate de fenotipo, o para la sobreexpresión de las distintas proteínas. Durante los ensayos de ganancia de función de Ric-8A, se microinyectó el ARNm para dicha proteína con el fin de estudiar el fenotipo resultante tanto en la etapa de inducción temprana de la CN (estadio gástrula) como en la etapa de inducción tardía (estadio néurula). En los estudios de inducción temprana, se utilizó el ARNm de β -

galactosidasa como un segundo marcador de linaje acompañando a las otras soluciones inyectadas.

Por contraparte, para los ensayos de ganancia de función de $G\alpha_q$ se empleó la misma metodología, con la diferencia de utilizar el ARNm para dicha proteína estudiando el efecto sólo en estadios de inducción tardía. Cabe mencionar que para el caso de los ensayos de rescate de fenotipo, los niveles de ARNm microinyectados no se vieron afectados por los Mo puesto que corresponden a secuencias no reconocidas por éstos. En paralelo con estos experimentos, se llevaron a cabo microinyecciones con el ARNm de la proteína GFP de membrana, y de la proteína Cherry de membrana, los cuales se utilizaron como controles de sobreexpresión y fueron luego visualizadas mediante un estereoscopio de fluorescencia. Durante los ensayos de epistasis, la microinyección del ARNm de la subunidad $G\alpha_q$ de proteína G heterotrimérica fue necesaria para estudiar su participación durante la inducción de crestas neurales. Para estos casos, se co-inyectaron concentraciones específicas de MoRic-8A en conjunto con el ARNm de $G\alpha_q$ con el objetivo de estudiar un rescate de fenotipo.

Finalmente, para los ensayos de co-inmunoprecipitación se co-inyectaron concentraciones equimolares de los ARNm para Ric-8A y V5Xt $G\alpha_q$ estandarizadas previamente. Luego, estos embriones fueron lisados, y la presencia de ambas proteínas fue determinada mediante “Western Blot”. Todos los ARNm utilizados fueron sintetizados de manera *in vitro* siguiendo las técnicas de biología molecular descritas más adelante.

4.1.4. Hibridación *in situ* (embrión completo y conjugaciones)

Se realizaron ensayos de hibridación *in situ* con el objetivo de determinar la expresión de distintos marcadores de mesodermo, ectodermo y de CN sobre

embriones de *Xenopus tropicalis*, luego de la microinyección tanto de morfolino como de los distintos ARNm. Se utilizaron sondas contra los genes del mesodermo dorsal: Chordin (*Chd*), Goosecoid (*Gsc*) y Brachyury (*Xbra*); y contra queratina epidermal (*Xk81a1*), sobre embriones completos en estadios de gástrula tardía. Así mismo, la sonda contra crestas neurales *Snail2* fue utilizada tanto sobre embriones completos como en conjugaciones de *Xenopus tropicalis* en estadios de néurula. La síntesis de las distintas sondas antisentido para estos marcadores se encuentra descrita posteriormente.

Los embriones previamente fijados y almacenados a -20°C , fueron re-hidratados a través de lavados en soluciones decrecientes de etanol disuelto en agua DEPC, y luego en PTw (PBS 1x + 0,1 %Tween). Luego, los embriones o conjugaciones debieron ser permeabilizados incubándose en $5\ \mu\text{g/ml}$ de proteinasa K por 5 minutos para permitir una mejor penetración de la sonda. Luego, se realizaron lavados en trietanolamina/anhídrido acético, los cuales permitieron neutralizar las cargas de la sonda permitiendo una unión más específica con el ARNm. Posteriormente, se incubó la sonda correspondiente a una concentración de $1\ \mu\text{g/mL}$ para el caso de embriones completos, y $3\ \mu\text{g/mL}$ para el caso de las conjugaciones, a 65°C por toda la noche, utilizando un “buffer” de hibridación (50% formamida, 5x SSC, 1 mg/mL heparina, 1x Denhart's, 0.1% Tween 20, 0.1% CHAPS, 10 mM EDTA) para las diluciones. Una vez finalizada la hibridación, la sonda fue removida con lavados de formamida, SSCTw, Ptw y MAB (Solución tampón de Ácido Maleico; 0.1 M ácido maleico, 0.15 M NaCl, pH 7.5), para luego dar inicio a la reacción de bloqueo con BMBR al 2% en MAB 1x, por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los embriones fueron incubados con un anticuerpo anti-digoxigenina (1:3000), conjugado a una fosfatasa alcalina, por toda la noche a 4°C , y al día siguiente, fueron lavados con MAB 1x. La reacción de revelado, se llevó a cabo mediante lavados con “buffer” AP, y luego se reveló con bromocloroindolil fosfato/nitroblue tetrazolium (NBT/BCIP). BCIP es un reactivo cromogénico, sustrato de la enzima fosfatasa alcalina que al ser hidrolizado forma un intermediario de color azul que es luego oxidado por NBT para

formar un compuesto insoluble color morado intenso capaz de ser observado a través de un estereoscopio. La reacción cromogénica se detuvo por cambio de pH a través de un lavado con MAB 1x, y luego los embriones fueron fijados en solución de Bouin, el cual también participa en la detención de la reacción cromogénica, y además estabiliza la sonda en el embrión. Finalmente, la tinción amarilla adquirida fue removida por medio de lavados con EtOH 70% en PTw, seguido de lavados con etanol en concentraciones decrecientes (diluido en SSC 1x), para luego continuar con el blanqueamiento. Todos los embriones fueron incubados bajo luz en una “solución blanqueadora” (0.5% formamida, 1x SSC, 1% H₂O₂), a temperatura ambiente hasta que se blanquearon lo suficiente para que la pigmentación propia no interfiriera con la señal del reactivo cromogénico. Finalmente, se realizó un último lavado con SSC 1x, y los embriones fueron luego almacenados en EtOH 100% a -20°C para su posterior observación bajo un estereoscopio de luz visible. 10x PBS: 1.25 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 35 mM NaH₂PO₄; 10xSSC: 1.5 M NaCl, 170 mM de citrato de sodio, ajustar a pH 7.0 con NaOH (Modificación de la metodología descrita por Sive y col., 2000).

4.1.5. Ensayos de Conjugación Mesodermo prospectivo/Animal Cap

Para el desarrollo de esta tesis, cabe mencionar que en nuestro laboratorio hemos estandarizado ensayos de conjugaciones Mesodermo/Animal Cap con el fin de corroborar la capacidad de inducción de la ZMDL. A pesar de que esta característica ya había sido reportada con anterioridad en la especie *Xenopus laevis* (Monsoro-Burq y col., 2003), estos ensayos nos permitieron estandarizar la técnica de conjugación por primera vez para el modelo *Xenopus tropicalis*.

Estos ensayos de conjugación, también conocidos como explantes de Keller, fueron llevados a cabo utilizando embriones completos de *Xenopus tropicalis*. Fue de gran importancia conocer previamente que, la Zona Marginal Dorso-Lateral (ZMDL)

correspondiente al mesodermo prospectivo es fundamental en el proceso de inducción de la CN. Es por eso que a través de ensayos de conjugación entre el tejido mesodermal ZMDL y tejido ectodermal inducible “Animal Cap” (AC), se pretendió estudiar la dirección de señalización de Ric-8A durante la inducción de la CN. En otras palabras, estos ensayos permitieron determinar si Ric-8A se encontraba participando en el tejido que entrega la señal de inducción o en el que la recibe. Para ello, primero se obtuvieron embriones desde ranas *Xenopus tropicalis* mediante el protocolo de fertilización *in vitro* descrita previamente (punto 4.1.1). Para este procedimiento se tuvo en cuenta realizar dos fertilizaciones continuas con una hora de desfase, de manera que mientras los embriones de la primera fertilización se encontraban en estadio 10.25, los de la segunda se encontraban en estadio 9. Para las disecciones, se trabajó con los embriones en NAM al 75% (Normal Amphibium médium 100%: 110 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 0.1 mM EDTA, y 2mM de fosfato de sodio, pH 7.4), sobre placas de petri cubiertas con plastilina hidrofóbica. Cabe mencionar que se mantuvo un grupo de embriones de estadio 9 como control, sin diseccionar con el fin de detectar el estadio deseado. Se diseccionaron regiones de AC desde embriones en estadio 9, los cuales se dejaron en plastilina para luego conjugarse con tejidos de mesodermo prospectivo. Posteriormente, se diseccionó la región marginal completa desde embriones en estadio 10.25, pudiendo diferenciar tres regiones: la Zona Marginal Dorsal (ZMD, región justo por sobre el labio del blastoporo), Zona Marginal Dorso-Lateral (ZMDL, región contigua al labio del blastoporo), y Zona Marginal Lateral (ZML, región no adyacente al labio del blastoporo). Se diseccionó la región de interés (ZMDL), la cual fue montada sobre los AC antes extraídos (Fig. 3). Una vez realizadas las conjugaciones, se incubaron en NAM al 38% a 26°C con el fin de permitir un mejor cierre de los explantes hasta que los embriones control llegaran aproximadamente a estadios 19-20. Finalmente, las conjugaciones fueron fijadas en MEMFA para un posterior análisis por hibridación *in situ* utilizando el marcador de CN *Snail2*.

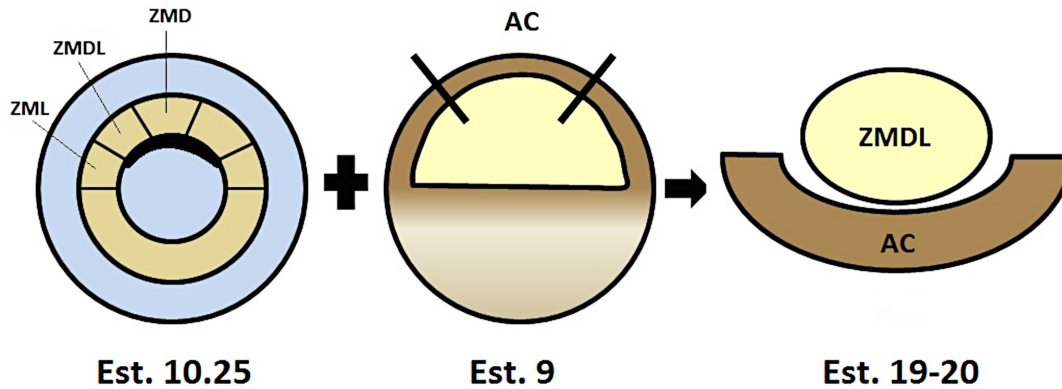


Figura 3. Conjugaciones Mesodermo prospectivo/Animal Cap

El mesodermo prospectivo de embriones en estadio 10.25 se dividió en zona marginal dorsal (ZMD), zona marginal dorso-lateral (ZMDL), y zona marginal lateral (ZML). Se extrajeron explantes correspondientes a la ZMDL y se conjugaron sobre “Animal Caps” extraídos de embriones en estadio 9. Las conjugaciones se incubaron hasta estadios de néurula (estadios 19-20), donde fue posible observar la expresión del marcador de CN *Snail2*.

4.1.5.1. Conjugaciones morfantes para Ric-8A

Para estudiar si Ric-8A se encontraba actuando en el tejido inductor (ZMDL), se realizaron ensayos de conjugación utilizando regiones ZMDL provenientes de embriones en estadio 10.25 morfantes para Ric-8A (según protocolo para microinyección descrito previamente). Por contraparte, para estudiar si dicha proteína se encontraba actuando en el tejido inducible (AC), se realizó un segundo ensayo utilizando regiones AC provenientes de embriones morfantes para Ric-8A, en estadio 9. Posteriormente, se observó el fenotipo de las conjugaciones correspondientes, a través de ensayos de hibridación *in situ* utilizando la sonda *Snail2*.

4.1.6. Lisis de embriones *Xenopus tropicalis*

Para analizar la expresión de las diferentes proteínas estudiadas, se llevaron a cabo ensayos de “Western Blot” donde los embriones debieron ser previamente lisados. Para ello, éstos fueron lisados por trituración en “buffer” de lisis (1% Tritón, 10 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 1x inhibidor de proteasas, 2 mM ortovanadato de sodio, 10 mM PMSF). Luego, se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos a 4°C para remover los gránulos de “yolk” (microcentrífuga refrigerada Smart R17). El sobrenadante fue removido a un tubo nuevo y las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C. Esta última acción se repitió por lo menos unas 3 veces. Finalmente, el sobrenadante obtenido fue cuantificado y utilizado en los ensayos de “Western Blot” correspondientes.

4.1.7. Reacción de detección de actividad β -galactosidasa

Para este ensayo, se debió tener la precaución de que los embriones fueran fijados en MEMFA por un máximo de una hora. Luego, se realizaron tres lavados en “buffer” PBS 1x pH 4.0 por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la detección de actividad β -galactosidasa a 37°C en “buffer” PBS 1x pH 4.0, conteniendo 5 mM de ferrocianuro de potasio, 5 mM de ferricianuro de potasio y 1 mg/mL X-gal. Una vez que la reacción estuvo completa, se realizaron los mismo tres lavados iniciales y se continuó con la hibridación *in situ*.

4.2. Técnicas de Biología Molecular

4.2.1. Construcciones de ADN

4.2.1.1. Digestiones de ADN mediante enzimas de restricción

Para llevar a cabo esta tesis, se debió realizar la construcción del plásmido pCS2+V5XtGaq puesto que, para la detección de las proteínas Ric-8A y Gaq en los ensayos de co-inmunoprecipitación era necesario la presencia de epítopes diferentes. Esta construcción se llevó a cabo a partir de los plásmidos pCS2+V5, el cual fue digerido con la enzima XhoI y el plásmido pCS2+MT/6MycXtGaq, digerido con las enzimas XhoI y XbaI.

Las digestiones analíticas se realizaron en un volumen final de 20 μ L con 0.5 μ g de DNA, 1 unidad de la enzima de restricción respectiva, 0.1 volúmenes de BSA10x y 0,1 volúmenes del “buffer” 10x adecuado. Luego se incubó la reacción por 2 horas a 37°C y se analizó el patrón de digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón 0.5x TAE (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1.14 mL/L ácido acético glacial, pH 7.8) teñido con bromuro de etidio.

Para el caso de las digestiones preparativas, las reacciones de digestión se realizaron en un volumen final de 100 μ l, cargando 5-10 μ g de ADN con 20 unidades de la enzima de restricción correspondiente y 0,1 volúmenes del “buffer” 10X respectivo. La incubación se realizó a 37°C por 5 horas y tanto el plásmido como el fragmento a sub-clonar fueron purificados desde gel de agarosa.

4.2.1.2. Extracción desde geles de agarosa

La extracción desde geles de agarosa fue llevada a cabo siguiendo el protocolo del kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel). Las eluciones se realizaron en agua “nanopure” pre-calentada a 55°C, y el ADN fue luego almacenado a -20°C.

4.2.1.3. Reacción de ligación

Los plásmidos purificados, junto a los fragmentos a subclonar fueron incubados en una relación molar 3:1 (inserto:vector) en presencia de la enzima T4 ADN Ligasa (Fermentas) y su buffer respectivo, a 16°C por 16 horas. Como control, se llevó a cabo la misma reacción en ausencia de los fragmentos a subclonar (vector religado). Finalmente, los productos de ligación fueron transformados en bacterias quimiocompetentes (descrito posteriormente), para luego ser purificados mediante la técnica de minilizado.

4.2.1.4. Purificación de plásmidos a pequeña escala por técnica de minilizado

Se seleccionaron 10 colonias al azar y se incubaron en 5 mL de medio LB/Ampicilina por toda la noche a 37°C. A partir de las bacterias crecidas, se tomaron 1,5 mL y se

centrifugó a 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada Smart R17). El “pellet” formado se resuspendió en 300 µl de “buffer” TENS (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0,1 N NaOH, 0,5% SDS) y se agitó por inmersión. Pasado 5 minutos, se agregaron 150 µl de Acetato de Sodio 3 M pH 5.2 agitando vigorosamente, se puso en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 12.000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le añadieron 3 volúmenes de EtOH 100%, previamente enfriado a -20°C para precipitar el ADN. Luego, se volvió a centrifugar por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el “pellet” fue resuspendido en agua “nanopure” en presencia de ARNasa (20 µg/mL). Finalmente, se realizó una digestión analítica verificando que los clones elegidos liberaran el inserto correspondiente, de manera de corroborar que se tratara de la construcción esperada. Esto se verificó mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

4.2.2. Transformación de bacterias quimiocompetentes

La transformación de bacterias quimiocompetentes fue necesaria para la preparación a gran escala de los diferentes plásmidos utilizados para la síntesis *in vitro* de los distintos ARNm inyectados. Para ello, bacterias DH5α químicamente competentes por Ca⁺² fueron transformadas con los plásmidos de interés utilizados. Se incubaron 10 ng de plásmido en 50 µL de bacterias durante 30 minutos en hielo. Luego, éstas fueron sometidas a un golpe de calor por 2 minutos a 42°C, y fueron rápidamente trasladadas a hielo por otros 2 minutos. Posteriormente, se adicionaron 250 µL de medio LB sin antibiótico y se incubaron las bacterias a 37°C por una hora en agitación. Finalmente, 50 µL de bacterias fueron sembradas en placas LB/Agar/Ampicilina e incubadas por toda una noche a 37°C.

4.2.3. Purificación de plásmidos a gran escala

Todos los plásmidos utilizados durante esta tesis, tanto el que codifica para las sondas antisentido como los distintos plásmidos utilizados para la síntesis de ARNm, fueron preparados a gran escala mediante la técnica de polietilenglicol (PEG). En primera instancia, se picó una colonia aislada de la placa con bacterias previamente transformadas y se creció en 2 mL de medio LB/Ampicilina por toda una tarde, a 37°C en agitación hasta ver turbidez. Luego, este inóculo se traspasó a 250 mL de medio LB/Ampicilina y se volvió a incubar a 37°C por toda la noche, en agitación. El cultivo fue centrifugado a 5.000 rpm (Hitachi CR226III) por 15 minutos a 4°C, y el “pellet” se resuspendió en 5 mL de solución I. Las bacterias fueron lisadas con 10 mL de solución II mezclando por inversión e incubando de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de adicionar 5 mL de solución III, se mezcló por inversión y se incubó por 10 minutos en hielo. La suspensión fue centrifugada a 10.000 rpm por 15 min a 4°C y se precipitó con 0.6 volumen de isopropanol dejando por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente centrifugando a 16.000 x g por 15 minutos a 4°C. El precipitado fue lavado con 1 mL de etanol al 70% y el “pellet” fue disuelto en 3 mL de “buffer” TE pH 8.0 más 3 mL de LiCl, dejando reposar en hielo por 10 minutos para precipitar los ARN de alto peso molecular. Se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos y luego se recuperó el sobrenadante para añadir 1 volumen de isopropanol. Se mezcló bien y se centrifugó a 10.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue desechado y se eliminó el exceso de isopropanol lavando con 1 mL de etanol al 70%. El pellet fue disuelto en 500 µL “buffer” TE pH 8.0 conteniendo 20 µg/mL de ARNasa A para digerir los ARNs de bajo peso molecular, por 30 minutos a temperatura ambiente. El ADN plasmidial fue precipitado con 500 µL de PEG8000 13% p/v NaCl 16.0 M por 10 minutos a temperatura ambiente, y fue luego centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C en una microcentrífuga. Se removió el sobrenadante y se lavó con 1 mL de etanol al 70%, centrifugando a 13.000 rpm por 10 minutos. Luego, el pellet fue disuelto en 400 µL de “buffer” TE pH 8.0, incubando toda la noche a 4°C, debido a su dificultad para

resuspender. Posteriormente, se extrajo la solución con 1 volumen de fenol-cloroformo, repitiendo este último paso unas 2 o 3 veces, y centrifugando a 13.000 x g por 5 minutos para realizar la extracción de proteínas. De esta mezcla, la fase acuosa fue recuperada evitando tomar el precipitado blanco presente en la fase intermedia. Finalmente, el ADN plasmidial fue recuperado por precipitación con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3.0 M y dos volúmenes de EtOH 100% para luego centrifugar a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. El “pellet” formado fue lavado con 1 mL de etanol al 70%, centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos y luego resuspendido en un volumen adecuado de agua “nanopure”. Finalmente, el ADN plasmidial fue cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm, y posteriormente se verificó mediante digestión con las enzimas de restricción correspondientes a través de un análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

4.2.4. Síntesis de sonda marcada con digoxigenina

Para la generación de las sondas antisentido mencionadas previamente, se utilizó 1.5 µg del plásmido correspondiente previamente purificado a gran escala y linealizado mediante enzimas de restricción. Los plásmidos codificantes para los ARNm de *Snail2* y *Xbra* fueron digeridos utilizando la enzima de restricción BglIII. Los plásmidos de *queratina epidermal* y *Chordin* fueron digeridos con EcoRI, y finalmente el plásmido codificante para *Goosecoid* fue digerido con la enzima BamHI. La reacción de transcripción *in vitro* se realizó incubando el ADN linealizado en tampón de transcripción 1x, 0.02 M ditiotreitól (DTT), 625 µM de mix de rNTPs con ribonucleótidos de uridina marcados con digoxigenina, ARNsin y la ARN polimerasa correspondiente: ARN pol Sp6 para la sonda de CN *Snail2* y la sonda ectodermal de *queratina epidermal*; y ARN pol T7 para las sondas de genes dorso-mesodermales *Chordin*, *Goosecoid* y *Brachyury*. Esta mezcla se incubó por 2 horas a 37°C y el templado de ADN fue digerido mediante la acción de la endonucleasa ADNasa I por 15 minutos a 37°C. A continuación, se procedió con la purificación de la sonda a

través de la precipitación de ARN por LiCl, mezclando bien e incubando por toda la noche a -20°C. Luego, se centrifugó por 15 minutos a 4°C a máxima velocidad (centrífuga refrigerada Smart R17) de manera de remover el sobrenadante y el pellet fue lavado con etanol al 70% dos veces. Finalmente, se removió el sobrenadante nuevamente y se resuspendió el “pellet” en agua libre de nucleasas o agua DEPC. Para la cuantificación de la sonda generada, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando un marcador de peso molecular para ARN (RiboRuler HR Fermentas) y de esta forma se calculó la concentración necesaria para realizar los ensayos de hibridación *in situ*.

4.2.5. Síntesis de ARNm

Al igual que para la generación de sonda, los diferentes plásmidos utilizados debieron ser previamente linealizados para luego llevar a cabo la reacción de transcripción *in vitro*. Los plásmidos codificantes para las proteínas Ric-8A, mCherry, membrana, 6mycXtGaq y V5Xt Gq fueron digeridos utilizando la enzima de restricción NotI. Por otro lado, el plásmido codificante para la proteína GFP de membrana fue digerido con la enzima NcoI y el plásmido de β -galactosidasa con la enzima XhoI. Los distintos ARNm utilizados durante las microinyecciones fueron sintetizados a partir de 1 μ g de ADN plasmidial utilizando el kit mMessage mMachine SP6 (Ambion), el cual permitió generar un ARN mensajero con un “cap” en el extremo 5'. Luego, estos ARNm fueron purificados a través de la precipitación por LiCl proporcionado por el mismo kit. Finalmente, los ARNm fueron resuspendidos en agua libre de nucleasas.

4.2.6. Co-inmunoprecipitación desde lisado de embriones completos

Se lisaron embriones previamente sobreexpresados con Ric-8A y V5XtG α q mediante trituración y resuspensión con tampón de lisis de embriones (descrito previamente), y luego se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos (centrífuga refrigerada Smart R17). Para cada vez se recuperó el sobrenadante y se repitió la centrifugación hasta observar un lisado homogéneo. La concentración proteica fue determinada mediante la técnica de Bradford, considerándose 2 mg de proteína total para realizar la co-inmunoprecipitación.

Para estos ensayos, se equilibró la resina de proteína A agarosa y se realizó un “Pre-Clearing” de 1 hora. La incubación que permitió la unión de las proteínas a la resina unida al anticuerpo se llevó a cabo por 2 horas a 4°C. Como uno de los controles de inmunoprecipitación se empleó el anticuerpo anti IgG no relacionado de ratón (Santa Cruz). La detección de las proteínas inmunoprecipitadas se realizó mediante “Western Blot”, técnica descrita a continuación.

4.2.7. Análisis de expresión de proteínas por “Western Blot”

Las muestras a analizar mediante “Western Blot” fueron previamente incubadas a 95°C por 10 minutos con “Buffer” de carga (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.01% azul de bromofenol) en presencia de DTT (Ditiotreitol). Estas muestras, junto al estándar pre-teñido (Fermentas) fueron cargados en un gel denaturante de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%, y corridas a 140 V constantes en solución de corrida (25 mM Tris, 250 mM glicina, 0.1% SDS) hasta que el frente haya caído. La concentración de proteína total cargada varió entre el tipo de ensayo realizado. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en solución de transferencia a 4°C (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol) durante 2 horas a 250 mA. Para determinar una correcta transferencia, la membrana fue

teñida con solución de rojo Ponceau y luego se lavó con agua destilada. La membrana fue posteriormente bloqueada con leche descremada al 5% en TBS-Tween20 (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.05% Tween20) durante 1 hora.

Para reconocer la expresión tanto de 6MycXtRic-8A como de 6MycXtG α q se utilizó un anticuerpo anti-myc preparado en ratón (Santa Cruz) en una dilución 1:10.000 y posteriormente, se empleó un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con HRP (“Horseradish peroxidase”, Jackson I.R) en una dilución 1:10.000. Para la detección de la proteína V5XtG α q se utilizó el anticuerpo anti V5probe en una dilución 1:5.000 como también un anticuerpo anti G α q monoclonal en una dilución 1:1.000 (para el caso de las co-inmunoprecipitaciones).

Finalmente, las membranas se revelaron con los líquidos quimioluminiscentes (Pierce ECL, Thermo scientific y “Western Lighting Plus-ECL”, PerkinElmer) y se expusieron en films autoradiográficos (CL-Xposure Film, Thermo scientific). Para poder evaluar un control de carga de las muestras, se procedió a realizar la remoción de anticuerpo desde la membrana utilizando una solución de “stripping” (62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 100 mM β -mercaptoetanol) a 4°C por 20 minutos en agitación suave. Se realizaron lavados con TBS-Tween20 para posteriormente proceder con un segundo “Western Blot” desde la etapa de bloqueo con leche. Para este caso, el control de carga fue analizado mediante la utilización de un anticuerpo anti-GAPDH preparado en ratón (Santa Cruz) a una dilución 1:1.000.

4.2.8. Extracción de ARN total desde embriones completos

Para estudiar la expresión de los genes del mesodermo: *Chordin*, *Gooseoid* y *Brachyury* de *Xenopus tropicalis*, fue necesario la extracción de ARN total desde embriones completos para luego obtener ADN copia (ADNc) monohebra y posteriormente la amplificación de dichos genes. Para ello, se seleccionaron embriones de *Xenopus tropicalis* en estadio 10, en condiciones morfantes para Ric-

8A, en condición de rescate de fenotipo y en condición de sobreexpresión de Ric-8A. Como condición control, también se seleccionó la misma cantidad de embriones “Wild type”. Se lisaron 10 embriones por condición y luego se homogenizaron en 600 μ l de buffer de lisis del kit NucleoSpin® TriPrep (Macherey Nagel). Posteriormente, se procedió a una etapa de remoción de ADN genómico y purificación de ARN utilizando tratamiento con Dnasa recombinante (rDNasa) del mismo kit. La integridad y concentración del ARN purificado se determinó mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

4.2.9. RT-PCR

Para la obtención de ADNc monohebra se utilizó como templado el ARN total de embriones *Xenopus tropicalis* purificado mediante el kit NucleoSpin® TriPrep Macherey Nagel (descrito previamente). La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo según el protocolo para la enzima transcriptasa reversa M-MLV de Promega. Para ello, se incubó 1 μ g de ARN total de cada condición en presencia de oligo(dT) a 70°C por 5 minutos para remover estructuras secundarias del templado. Luego, la mezcla de templado/partidor fue incubada en presencia de 10 mM de dNTPs, 25 unidades de inhibidor de ribonucleasa (Rnasin), buffer de reacción M-MLV 1X y 200 UI de transcriptasa reversa M-MLV en un volumen final de 25 μ L. La reacción se llevó a cabo por 1 hora a 42°C y luego la enzima fue inactivada por 10 minutos a 70°C.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó como templado 2 μ L de una dilución 1/10 del ADNc sintetizado previamente. Se realizó una mezcla de 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM de mix de dNTPs, 0.5 μ M de cada partidor, “buffer” Green Gotaq flexi y 0.5 UI de ADN polimerasa Gotaq en un volumen final de reacción de 20 μ L. El programa utilizado contempló una denaturación inicial a 95°C por 5 min y luego 25 ciclos repetitivos de una denaturación (95°C por 30 segundos), “annealing” o

alineamiento (55°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 21 segundos). El proceso se dio por terminado con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Se cargaron 5 µL del producto de PCR en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se realizó la cuantificación por densitometría. Como control interno, se amplificó el gen *rpl8* (proteína ribosomal L8) de *Xenopus*.



5. RESULTADOS

5.1. Estudiar el efecto de la pérdida y ganancia de función de Ric-8A durante la inducción de la cresta neural.

5.1.1. Estudiar la pérdida y ganancia de función de Ric-8A durante la inducción de la cresta neural en embriones completos de *Xenopus tropicalis*.

Para estudiar la participación de Ric-8A en la inducción de la CN se realizaron ensayos de pérdida y ganancia de función, analizando el patrón de expresión del marcador de CN *Snail2* a través de la técnica de hibridación *in situ* a embriones en etapa de néurula, específicamente en estadio 16. A pesar de que en nuestro laboratorio se había previamente reportado un fenotipo de inhibición en la inducción de la CN tras el silenciamiento de Ric-8A en *Xenopus* (Fuentealba, 2012, tesis de magíster), se repitieron los ensayos de pérdida de función con el fin de analizar este fenotipo a profundidad y estandarizar la concentración de MoRic-8A a la cual se lograba un silenciamiento severo en embriones de *Xenopus tropicalis*. En base a ello, se observó el efecto que el morfolino contra Ric-8A (MoRic-8A) tiene sobre la inducción de las células de la CN a través de la expresión del marcador molecular de CN *Snail2*. Previo a ser sometidos a hibridación *in situ*, los embriones fueron inyectados con MoRic-8A o morfolino control (MoCtl) en un blastómero en estadio de 2 células y se incubaron hasta estadio 16 para ser fijados.

Al estudiar el patrón de expresión de *Snail2*, se observó que existe una alteración en la inducción de las células de la CN en embriones inyectados con 15 ng, 20 ng o 25 ng de MoRic-8A (Fig. 4A-C). Sin embargo, un fenotipo severo de inhibición de *Snail2* se alcanzó silenciando con 25 ng de MoRic-8A (Fig. 4C) donde se observó que no hay inducción de la CN. Cabe destacar también que para obtener un máximo efecto de silenciamiento por morfolino, éste debió ser calentado por aproximadamente 8 horas previas al ensayo de microinyección y ser bien resuspendido (ver metodología

4.1.3.1), ya que en experimentos donde no se mantuvieron estas condiciones, los niveles de silenciamiento alcanzados fueron menores. Así mismo, podemos descartar que estos fenotipos de inducción severa se deban a posibles efectos citotóxicos de las concentraciones de morfolino utilizadas, debido a que cantidades equimolares de MoCtl no provocaron ningún efecto en la expresión del marcador *Snail2* (Fig. 4D).

Considerando la concentración de MoRic-8A (25 ng) a la cual observamos el mayor nivel de silenciamiento para dicho ARNm sin afectar la viabilidad del embrión durante los estadios estudiados, podemos cuantificar el número de embriones afectados. Para el análisis de estos ensayos, se consideraron dos fenotipos principales: un fenotipo de inducción normal de las células de la CN y un fenotipo sin inducción de estas mismas células. El primero, se ve reflejado por la expresión normal del marcador molecular *Snail2*, mientras que el segundo se caracteriza por una inhibición en la expresión de éste. En base a ello se cuantificó y se obtuvo que aproximadamente un 82% (n=298) de los embriones inyectados con 25 ng de MoRic-8A no presentaron inducción de la CN en el lado inyectado, en comparación al lado control o a embriones inyectados con 25 ng de MoCtl donde el 100% (n=62) presentó un fenotipo normal (Fig. 4F). En consecuencia, los resultados anteriores demuestran que la pérdida de función de Ric-8A provoca una alteración en la expresión de *Snail2* en estadios de néurula, sugiriendo que esta proteína estaría involucrada en la etapa de inducción de las crestas neurales. Sin embargo, para validar estas observaciones, fue pertinente realizar ensayos de rescate del fenotipo a través de la sobreexpresión de Ric-8A.

Con el fin de asegurar que el fenotipo de inducción observado anteriormente es producto del silenciamiento de Ric-8A, es decir, que corresponde a un efecto específico del morfolino empleado, se realizaron ensayos de rescate co-inyectando 25 ng de MoRic-8A junto con 300 pg de ARNm para Ric-8A en un blastómero en estadio de 2 células, concentración que había sido previamente probada en nuestro

laboratorio para ensayos de sobreexpresión en embriones en estadio de 8 células (Toro-Tapia, 2016, tesis de doctorado). Los embriones fueron incubados hasta estadio 16, donde fueron fijados y sometidos a ensayos de hibridación *in situ* utilizando el marcador *Snail2*. En aquellos embriones en que se co-inyectó tanto morfolino como ARN mensajero para Ric-8A fue posible observar un rescate parcial en la expresión de *Snail2* con respecto a su lado control sin inyectar (Fig. 4E) y a embriones control inyectados sólo con 25 ng de MoRic-8A (Fig. 4C). Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos podemos observar que 300 pg de ARN mensajero para Ric-8A son suficientes para rescatar el fenotipo sin inducción de la CN provocado por el silenciamiento de dicho ARNm con 25 ng del morfolino correspondiente. Estos efectos también pudieron ser cuantificados en función de la expresión observada tras el rescate, en comparación a embriones morfantes para Ric-8A (Fig. 4F). El rescate de fenotipo se evidencia por una disminución del fenotipo sin inducción, el cual disminuye de un 82% (n=298) en los embriones morfantes para Ric-8A, a un 35% (n=43) en los embriones rescatados (Fig. 4F). Estos resultados muestran que el fenotipo morfante observado sobre la inducción de las crestas neurales es específico, producto del silenciamiento de Ric-8A.

Complementando estos últimos estudios, se procedió a realizar ensayos de ganancia de función a través de la sobreexpresión de Ric-8A para luego estudiar la expresión del marcador *Snail2* en estadios de néurula y observar su efecto en la inducción de crestas neurales. Para ello, se inyectaron 300 pg o 350 pg de ARNm para Ric-8A en un blastómero de embriones en estadio de 2 células. De la misma forma anteriormente descrita estos embriones fueron fijados en MEMFA y luego sometidos a ensayos de hibridación *in situ* utilizando la misma sonda que en los ensayos previos (Fig. 5A, B). El mismo procedimiento fue llevado a cabo para los controles de sobreexpresión que correspondieron a embriones inyectados con cantidades equimolares (350 pg) de ARNm para la proteína Cherry de membrana (Fig. 5C). Dada una gran mortandad de los embriones control, se realizaron los mismos ensayos probando con la inyección de ARNm para la proteína GFP de membrana

(datos no mostrados), sin embargo la mortandad se mantuvo, por lo que se mantuvieron las condiciones originales utilizando 350 pg de ARNm para Cherry de membrana. Los niveles de sobreexpresión de Ric-8A fusionado al epítipo 6myc fueron determinados mediante "Western Blot" utilizando lisados de embriones inyectados con el ARNm para Ric-8A (Fig. 5D). La sobreexpresión de Ric-8A a las concentraciones utilizadas no provocó alteraciones notorias en el proceso de inducción de la CN, al menos no detectables por hibridación *in situ*. Esto fue reflejado a través de la expresión normal del marcador en el 100% (n=30) de los embriones sobreexpresados con 300 pg de ARNm para Ric-8A (Fig. 5A, E). Sin embargo, cabe mencionar que la sobreexpresión con 350 pg de ARNm para Ric-8A causó una mortandad elevada, además de presentar un fenotipo sin inducción de la CN en algunos de los embriones inyectados (44%, n=9). Esto último fue cuantificado para 3 ensayos distintos (Fig. 5E). Por lo tanto, por medio de estos resultados se concluye que, la sobreexpresión de Ric-8A a la concentración utilizada (300 pg) es inocua en el proceso de inducción de la CN, manteniendo un patrón de expresión normal del marcador analizado a lo largo de este estudio. Sin embargo, no se descarta que el fenotipo de inhibición de crestas neurales observado en estos ensayos de sobreexpresión a concentraciones mayores se deba a un efecto citotóxico por las altas concentraciones de ARNm inyectado, puesto que altas concentraciones de ARNm control provocaron el mismo efecto y gran mortandad de embriones.

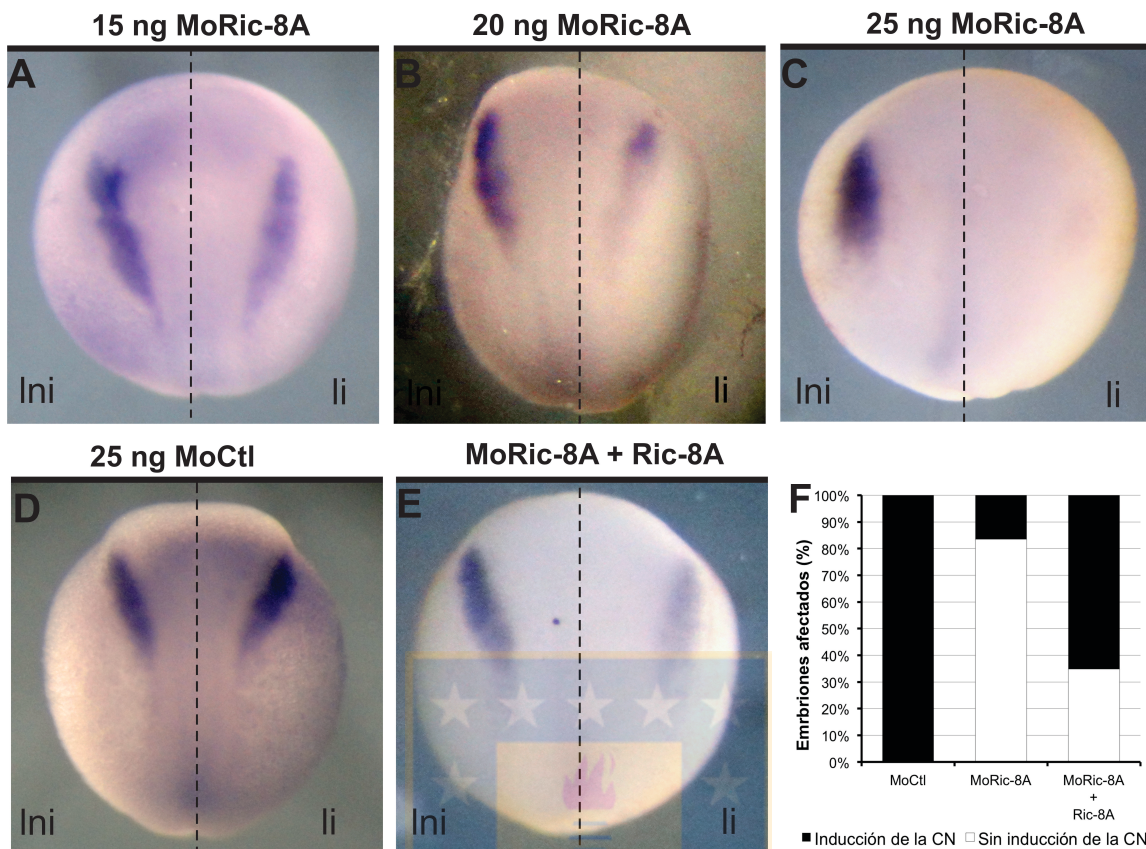


Figura 4. Efecto de la pérdida de función de Ric-8A sobre la inducción de las células de la CN.

Se muestran hibridaciones *in situ* de embriones completos *Xenopus tropicalis* en estadio 16 utilizando el marcador de CN *Snail2*. Embriones inyectados con (A) 15 ng, (B) 20 ng o (C) 25 ng de MoRic-8A vieron afectada la inducción de la CN en el lado inyectado, a diferencia de embriones control inyectados con 25 ng de MoCtl (D). Un rescate parcial de fenotipo se logró co-inyectando 25 ng de MoRic-8A y 300 pg de ARNm para la misma proteína (E). En (F) se grafica, para 6 ensayos independientes, el número de embriones morfantes para Ric-8A que presentaron un fenotipo severo de inhibición en la inducción de la CN (82%, n=298), en comparación a embriones control, donde el 100% (n=62) presentó una expresión normal de este marcador. Finalmente, se graficó el número de embriones que presentan inducción de la CN en condición de rescate (65%, n=43). Lni: lado no inyectado; li: lado inyectado.

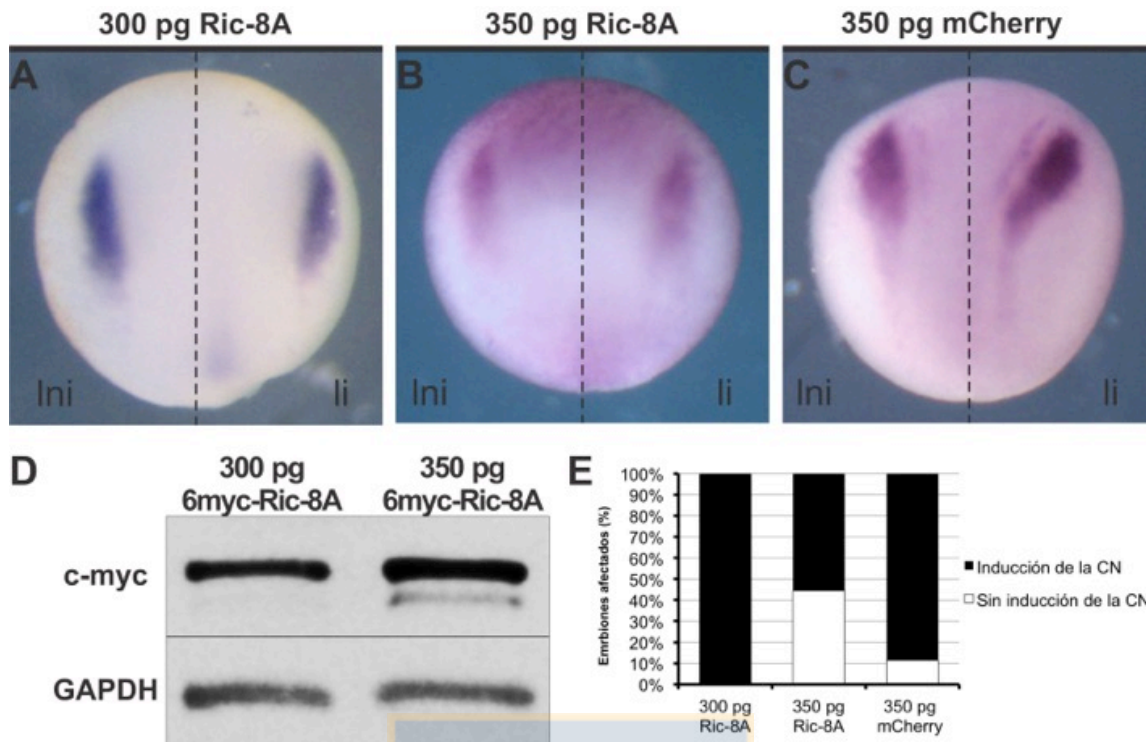


Figura 5. Efecto de la sobreexpresión de Ric-8A en la inducción de crestas neurales.

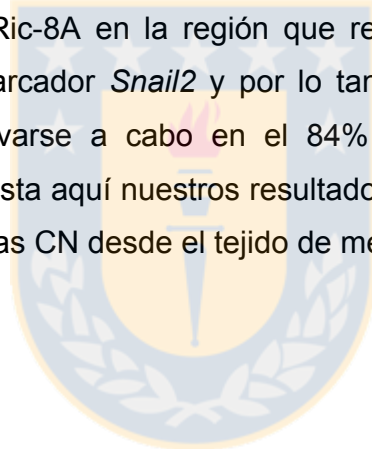
Los ensayos se llevaron a cabo inyectando en un blastómero de embriones en estadio de 2 células, **(A)** 300 pg o **(B)** 350 pg de ARNm para Ric-8A. Como control de sobreexpresión se utilizó la microinyección de 350 pg de ARN mensajero para Cherry de membrana **(C)**. **(D)** “Western Blot” correspondiente a los ensayos de sobreexpresión, utilizando un anticuerpo c-myc sobre lisado de embriones bajo las condiciones descritas previamente. Como control de carga, se determinaron los niveles de expresión de la proteína GAPDH. Los fenotipos fueron cuantificados para 3 ensayos diferentes **(E)**, donde el 100% (n=30) de los embriones sobreexpresados con 300 pg de ARNm para Ric-8A presentaron una inducción normal de la CN. Este porcentaje disminuyó al 56% (n=9) en embriones sobreexpresados con 350 pg de ARNm para la misma proteína, puesto que aumentó un fenotipo sin inducción de la CN. Un 88% (n=26) de los embriones control (Cherry de membrana) fueron capaces de tener una inducción normal de las células de la CN. Lni: lado no inyectado; li: lado inyectado.

5.1.2. Estudiar la pérdida y ganancia de función de Ric-8A durante la inducción de la cresta neural en el tejido inductor.

Como se menciona en la introducción, la ZMDL proveniente del mesodermo prospectivo, cumple un rol esencial durante la etapa de inducción de las CN, debido a esto se hace importante estudiar si la señalización de Ric-8A es importante en el tejido que entrega la señal o en el que recibe la señal durante la inducción de la CN. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de conjugación entre el tejido de mesodermo prospectivo y regiones “Animal Cap” (AC), tejido ectodermal que posee un alto potencial inducible. Esto es, entre la región que entrega la señal de inducción y el tejido que es capaz de diferenciarse en base a las señales moleculares que recibe. En una primera instancia, y con el fin de estandarizar la técnica en el modelo *Xenopus tropicalis* se prosiguió a realizar conjugaciones con tejidos “wild type” y corroborar la inducción de crestas neurales a través de la expresión del marcador de CN *Snail2* (Fig. 6). Para ello, se diseccionó la ZMDL desde embriones “wild type” en estadio 10.25 (gástrula temprana) y se conjugaron con regiones AC de embriones “wild type” en estadio 9 (blástula tardía). Luego, éstas se incubaron en NAM al 38% hasta diferentes estadios de néurula: 16, 19-20 y 22-23, con el fin de estudiar en qué etapa existe una mejor expresión del marcador de CN en respuesta a la inducción por el mesodermo prospectivo en las conjugaciones (Fig. 6A). El 100% de las conjugaciones, a todos los estadios estudiados fueron capaces de expresar el marcador de CN *Snail2* (Fig. 6B-D), sin embargo una marca más definida y dirigida en la región del AC fue posible de observar en las conjugaciones incubadas hasta estadios entre 19 y 20 (Fig. 6C). En base a estas observaciones, se comprobó que la ZMDL correspondiente al mesodermo prospectivo es capaz de inducir a células de la CN a través de una recombinación de tejidos con la región de AC en *Xenopus tropicalis*. Es importante mencionar que, desde este ensayo en adelante se decidió incubar las conjugaciones hasta estadio aproximadamente 19-20 para así analizar de mejor forma la inducción de las crestas neurales.

Dado que es primera vez que se realizan este tipo de ensayos en el modelo de *Xenopus tropicalis*, se repitieron los experimentos de conjugación, esta vez inyectando una concentración determinada de MoCtl. Para ello, se inyectó 25 ng de MoCtl en un blastómero de embriones en estadio de 2 células (concentración estandarizada previamente en embrión completo). Éstos se incubaron hasta estadio 10.25, y a través del seguimiento con Rodamina Dextrano, se identificó el lado inyectado para diseccionar la región de ZMDL correspondiente. Luego, estos explantes se incubaron con regiones “Animal Cap” provenientes de embriones “wild type” hasta que se desarrollaron a etapas de néurula y se les realizó las hibridaciones *in situ* correspondientes (Fig. 7A). Al igual que en los ensayos llevados a cabo con embriones “wild type”, la expresión del marcador *Snail2* se presentó en todas las conjugaciones (100%, n=33) realizadas con tejido de mesodermo prospectivo inyectado con MoCtl. Sin embargo, fue posible observar una expresión más intensa de este marcador en algunas conjugaciones por sobre otras (Fig. 7B). Una vez estandarizada la técnica de conjugación para tejido “wild type” y tejido inyectado con MoCtl, se prosiguió a realizar los mismos ensayos utilizando embriones morfantes para Ric-8A y de esta forma estudiar en qué dirección de la señalización estaría participando esta proteína. En primer lugar, se estudió si es que Ric-8A estaría participando desde el tejido que entrega la señal de inducción, es decir si es que esta proteína estaría induciendo la formación de crestas neurales desde la ZMDL. Esto se logró inyectando 25 ng de MoRic-8A en un blastómero de embriones en estadio de 2 células. Al igual que la metodología anterior, se hizo un seguimiento del lado inyectado por medio del marcador de linaje Rodamina Dextrano y se procedió a diseccionar la ZMDL morfante para Ric-8A. Estas regiones fueron incubadas con “Animal Caps” provenientes desde embriones “wild type” hasta estadio 19-20 y fueron sometidos a ensayos de hibridación *in situ* (Fig. 8A). A partir de esto, se observó que el silenciamiento de Ric-8A en la región del mesodermo es capaz de inhibir la inducción de crestas neurales, fenotipo caracterizado por la leve expresión *Snail2* o la completa ausencia de éste en las conjugaciones realizadas (87%, n=30) (Fig. 8B, D). Por lo tanto, en base a estas observaciones, se puede

apuntar a que la región del mesodermo prospectivo denominada ZMDL requiere de la señalización de Ric-8A de manera que ocurra la inducción de las células de la CN. Sin embargo, estas observaciones no descartan que esta proteína en estudio pudiese también estar participando en las células del ectodermo prospectivo, el cual actúa como tejido inducible. Para contestar a esta última interrogante, esta vez se realizaron conjugaciones utilizando “Animal Caps” provenientes desde embriones morfantes para Ric-8A. Embriones en estadio de 1 célula, fueron inyectados con 50 ng de MoRic-8A e incubados hasta estadio 9. Los “Animal Caps” morfantes fueron diseccionados e incubados en conjunto con regiones ZMDL provenientes desde embriones “wild type” hasta estadio 19-20 y luego sometidos a ensayos de hibridación *in situ* (Fig. 8A). A diferencia de lo observado en la figura 8B, notamos que el silenciamiento de Ric-8A en la región que recibe la señal de inducción no afecta la expresión del marcador *Snail2* y por lo tanto la inducción de las crestas neurales es capaz de llevarse a cabo en el 84% (n=25) de las conjugaciones analizadas (Fig. 8C, D). Hasta aquí nuestros resultados indicarían que Ric-8A estaría regulando la inducción de las CN desde el tejido de mesodermo prospectivo.



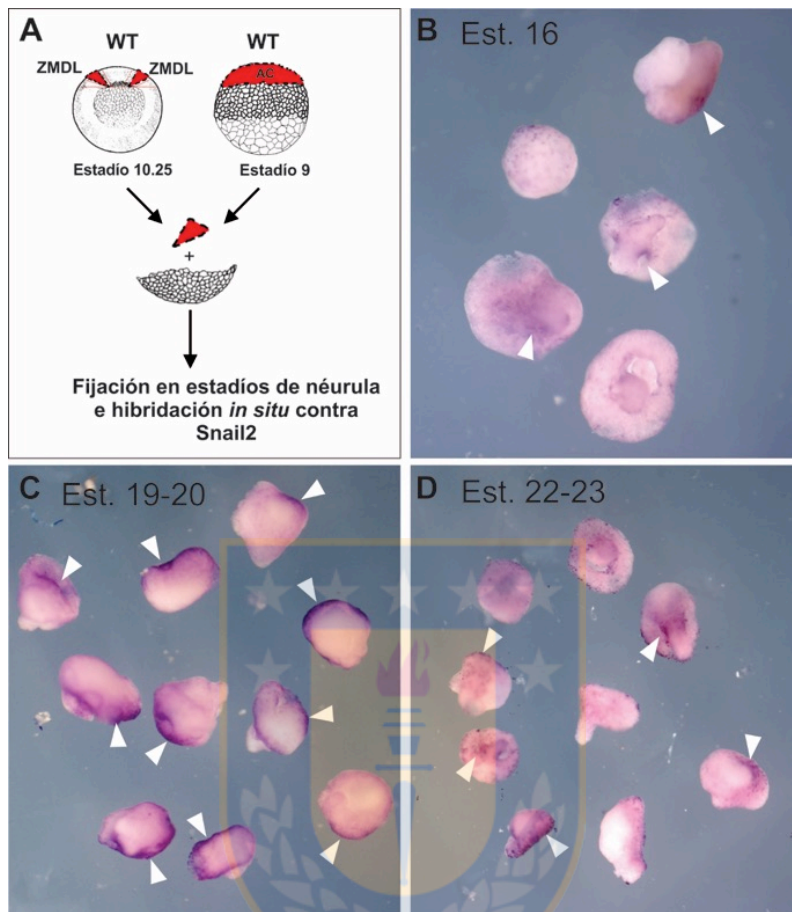


Figura 6. Conjugaciones “wild type” Mesodermo Prospectivo/Animal Cap.

Las conjugaciones se realizaron con tejido proveniente desde embriones “wild type”, diseccionando la región del mesodermo prospectivo ZMDL de embriones en estadio 10.25 y la región de AC desde embriones en estadio 9 (A). Luego, ambos cortes en conjunto se incubaron hasta diferentes estadios de néurula para ensayos de hibridación *in situ*. (B) Todas las conjugaciones en estadio 16 (n=5), (C) en estadio 19-20 (n=10) y (D) en estadio 22-23 (n=9) fueron capaces de expresar el marcador de CN *Snail2* (ver flechas), sin embargo una marca más definida y localizada en la región del AC fue observada en los estadios mostrados en (C). Las cuantificaciones corresponden a dos ensayos independientes. AC: “Animal Cap”; Est: Estadio.

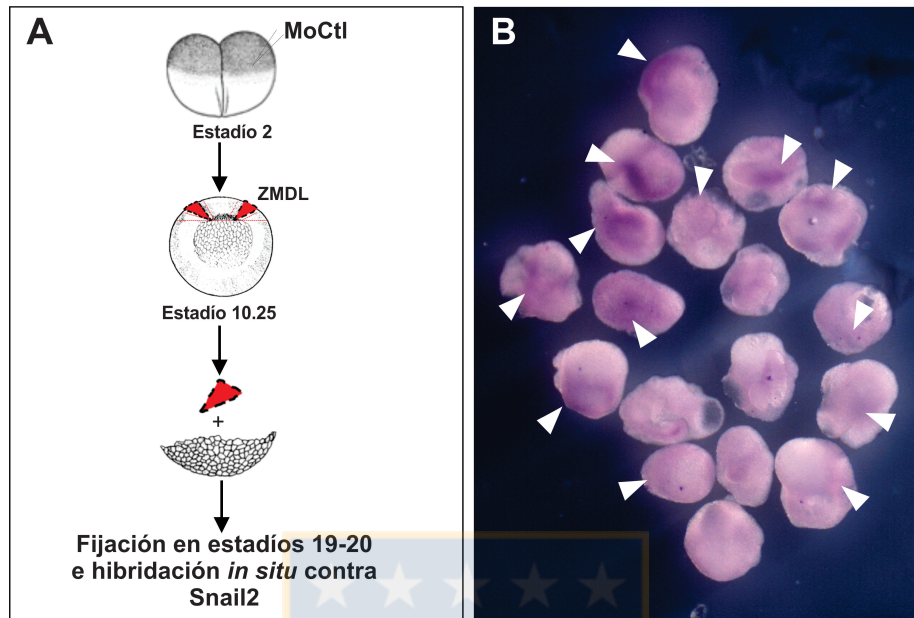


Figura 7. Estandarización de conjugaciones con MoCtl.

Se realizaron conjugaciones utilizando regiones ZMDL inyectadas con MoCtl u “Animal Caps” “wild type”. **(A)** Se inyectaron 25 ng de MoCtl en un blastómero de embriones en estadio de 2 células. Estos se incubaron hasta estadio 10.25 y se diseccionó la ZMDL desde el lado inyectado el cual fue identificado tras el seguimiento del marcador de linaje Rodamina Dextrano. Estos explantes se conjugaron con “Animal Caps” provenientes desde embriones “wild type” y juntos se incubaron hasta estadio 19-20 para someterse a ensayos de hibridación *in situ*. **(B)** Todas las conjugaciones con MoCtl en el mesodermo (100%, n=33) fueron capaces de expresar el marcador de CN *Snail2* (ver flechas), encontrándose también niveles diferenciales de expresión. La cuantificación corresponde a dos ensayos independientes.

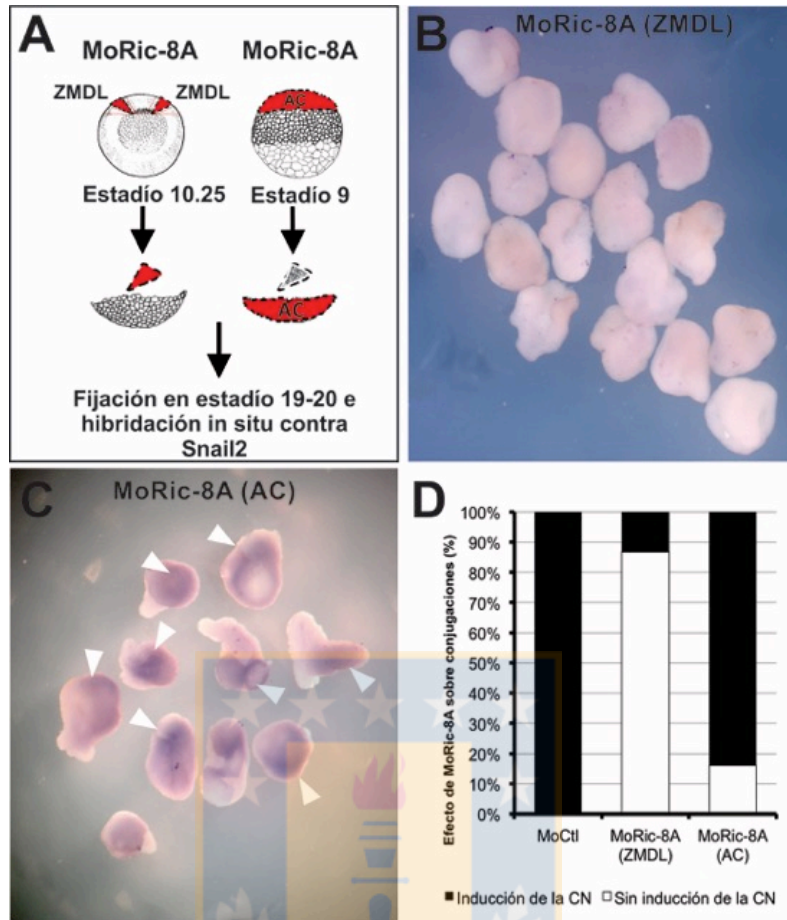


Figura 8. Participación de Ric-8A en el tejido que entrega o recibe la señal de inducción de la CN.

Se realizaron conjugaciones utilizando regiones ZMDL o “Animal Caps” morfantes para Ric-8A. Los primeros se lograron utilizando la misma metodología que para las conjugaciones con MoCtl, con la diferencia de la inyección de 25 ng de MoRic-8A para el silenciamiento de esta proteína en la ZMDL, los cuales fueron conjugadas con AC de embriones “wild type”. Para las conjugaciones con “Animal Caps” morfantes, se inyectaron 50 ng de MoRic-8A en embriones en estadio de 1 célula. Estos embriones se incubaron hasta estadio 9 y se diseccionó el AC. Luego, estos últimos explantes se conjugaron con regiones ZMDL desde embriones “wild type” y se esperó su desarrollo hasta estadio 19-20 (A). (B, D) El 87% (n=30) de las conjugaciones con regiones ZMDL morfantes para Ric-8A presentaron inhibida la expresión de *Snail2* y por lo tanto la inducción de las células de la CN. (C, D) El 84%

(n=25) de las conjugaciones llevadas a cabo con “Animal Caps” morfantes para Ric-8A fueron capaces de inducir células de la CN (ver flechas).



5.2. Estudiar la pérdida y ganancia de función de Ric-8A en la expresión de genes dorso-mesodermales durante la inducción temprana de la cresta neural.

5.2.1. Estudiar la pérdida y ganancia de función de Ric-8A en la expresión de diferentes genes del mesodermo dorsal durante la inducción de la cresta neural en embriones completos de *Xenopus tropicalis*.

Tras observar que Ric-8A se encuentra participando en el tejido que entrega la señal de inducción de la CN, se decidió evaluar si este efecto corresponde a una función directa de Ric-8A en el mesodermo prospectivo durante la inducción de la CN o si se trata de un efecto previo, correspondiente a la formación del mesodermo. Para evaluar esto se dio paso al estudio de la expresión de dos genes dorso-mesodermales en respuesta a la pérdida de función de Ric-8A, y así evaluar si Ric-8A cumple alguna función en la formación del mesodermo dorsal. Los genes estudiados correspondieron a *Chordin* (*Chd*) y *Goosecoid* (*Gsc*), los cuales se expresan en la región del mesodermo dorsal del embrión. Los ensayos de pérdida de función se llevaron a cabo mediante el silenciamiento de Ric-8A tras la inyección de 25 ng de MoRic-8A en un blastómero de embriones en estadio de 2 células. Se le hizo un seguimiento con rodamina dextrano a los embriones inyectados, los cuales fueron crecidos hasta estadio 10 (blástula tardía) y fijados para realizar una posterior hibridación *in situ* contra *Chd* y *Gsc* (Fig. 9A, recuadros a, b). El lado afectado pudo ser también corroborado mediante la actividad β -galactosidasa cuyo ARNm fue inyectado como marcador de linaje en conjunto con el morfolino estudiado. La expresión tanto de *Chd* como de *Gsc* se vio afectada en el lado inyectado del embrión (Fig. 9B, recuadros b, f) en comparación a sus controles “wild type” (Fig. 9B, recuadros a, e) donde la expresión se vio localizada a lo largo del mesodermo dorsal. Un rescate de fenotipo se logró mediante la co-inyección de MoRic-8A y ARNm para la misma proteína (Fig. 9B, recuadros c, g). Los efectos recién observados pudieron cuantificarse en base a la expresión de los marcadores mesodermales *Gsc* y *Chd* sobre embriones afectados. La expresión de *Gsc* se vio alterada en un 80% de los

embriones (n=25) morfantes para Ric-8A, porcentaje que disminuyó a un 42% (n=24) en los embriones que fueron rescatados con el ARNm para la misma proteína (Fig. 9B, recuadro d). La misma tendencia se observó en embriones con hibridación *in situ* contra *Gsc*, cuyo porcentaje de embriones afectados tras el silenciamiento de Ric-8A fue del 77% (n=30), el que disminuyó a un 36% (n=14) tras el rescate de fenotipo con el ARNm para Ric-8A (Fig. 9B, recuadro h). Con el fin de verificar que la pérdida de función de Ric-8A se encuentra afectando únicamente la región del mesodermo dorsal y no éste en su totalidad se prosiguió a estudiar la expresión del gen *Brachyury (Xbra)* el cual presenta una expresión normal “pan-mesodermal” en embriones de *Xenopus tropicalis*. Independiente de la inyección de morfolino para Ric-8A en los embriones, la expresión de *Xbra* se mostró normal en toda la región del mesodermo (Fig. 8B, recuadro i, j), lo que sugiere que el silenciamiento de Ric-8A estaría afectando específicamente la región dorsal de este tejido. Por otro lado, se observó que el tejido ectodermal tampoco fue afectado puesto que la expresión del gen de *Queratina epidermal (XK81A1)* ocurrió de forma normal en la región del “Animal Cap” (Fig. 9B, k-l).

El mismo grupo de marcadores mesodermales fue luego estudiado sobre embriones en condiciones de sobreexpresión de Ric-8A. El lado inyectado de los embriones se identificó mediante rodamina dextrano y actividad β -galactosidasa. La sobreexpresión de 300 pg y 350 pg de ARNm para Ric-8A no provocó alteración en el patrón de expresión de *Chd*, *Gsc* o *Xbra*, sugiriendo que la ganancia de función de Ric-8A a las concentraciones utilizadas no provoca efecto alguno en la región del mesodermo (Fig. 10A-F). Los niveles de sobreexpresión de Ric-8A utilizados fueron determinados mediante “Western Blot” desde lisados de embriones inyectados a ambas concentraciones de ARNm (Fig. 10G).

Complementando los estudios de expresión mediante hibridación *in situ*, se realizaron ensayos de RT-PCR con el fin de cuantificar la expresión de los genes *Chordin*, *Goosecoid* y *Brachyury* tras el silenciamiento o sobreexpresión de Ric-8A

(Fig. 11). Para ello, embriones de *Xenopus tropicalis* en estadio de 2 células fueron inyectados en ambos blastómeros con morfolino para Ric-8A y/o ARN mensajero para la misma proteína. Éstos se incubaron hasta estadio 10 donde mediante un seguimiento con rodamina dextrano se seleccionaron los embriones inyectados para luego ser lisados y extraer el ARN total según lo descrito en la metodología 4.2.8. Se utilizaron partidores internos específicos para la amplificación de *Chd*, *Gsc* y *Xbra*; y partidores para amplificar el gen de la proteína ribosomal L8 (*RPL8*) utilizado como control interno, dado que sus niveles de expresión se mantienen constantes hasta estadio de neurula en embriones de *Xenopus* (Sindelka y col. 2006), permitiendo hacer una comparación semi-cuantitativa y poder verificar la integridad del ARN. En primera instancia, se detectaron los niveles de ARNm de *Chordin* (Fig. 11A), cuya expresión se vio disminuida bajo las condiciones morfantes de Ric-8A en comparación a los niveles control observados en los embriones “wild type”. Por el contrario, los niveles de *Chd* aumentaron en embriones con fenotipo de rescate y sobreexpresión de Ric-8A, observándose una leve disminución de expresión de *Chd* a los 350 pg de Ric-8A, lo que se pudo deber a la cantidad de ARNm total inyectado, puesto que una inhibición similar se observó en embriones bajo las mismas condiciones tras estudiar la expresión de *Snail2* mediante hibridación *in situ* (Fig. 4). La misma tendencia que *Chd* se observa en los niveles de expresión de *Gsc*, pero en menor nivel (Fig. 11B), lo que a su vez concuerda con lo expuesto en las hibridaciones *in situ* realizadas para los mismos genes (Fig. 9 y 10). Para el caso de *Brachyury* los niveles de expresión se mantienen constantes independiente de la condición estudiada, a excepción de la sobreexpresión con 350 pg de ARNm de Ric-8A cuyas diferencias son significativas con respecto a embriones morfantes y en condición de rescate (Fig. 11C).

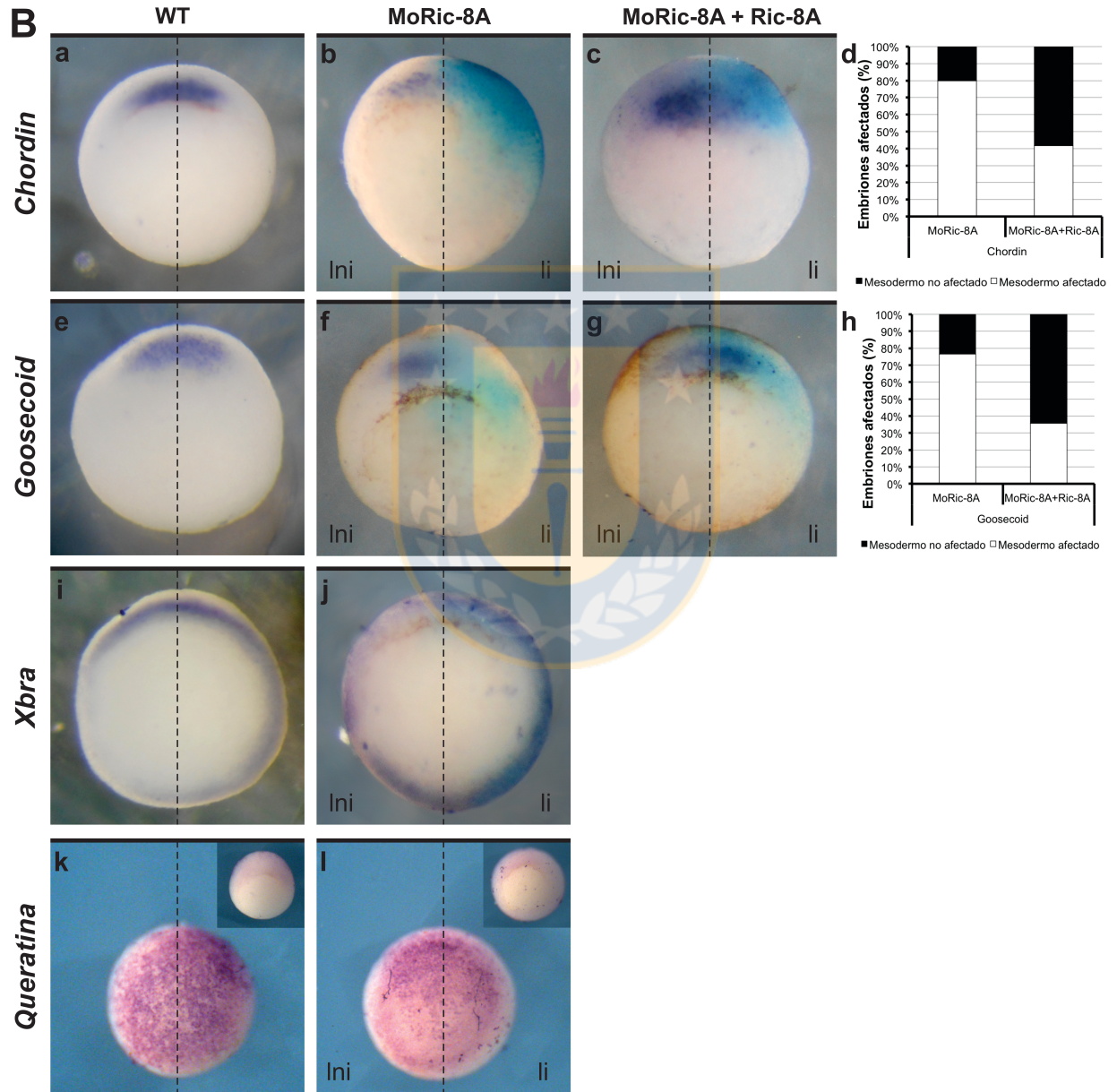
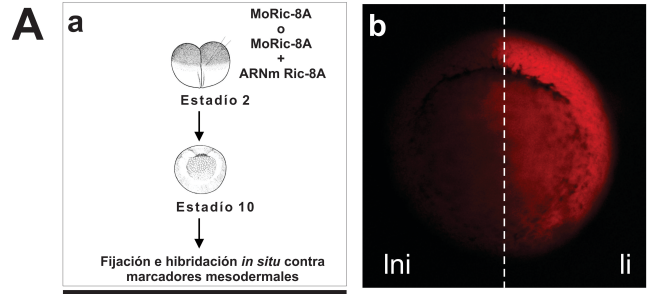


Figura 9. Efecto de la pérdida de función de Ric-8A en la expresión de genes mesodermales.

Se inyectó un blastómero de embriones *Xenopus tropicalis* en estadio de 2 células con MoRic-8A en presencia o ausencia de ARNm de Ric-8A. Los embriones se incubaron hasta estadio 10 y fueron fijados para realizar los ensayos de hibridación *in situ* correspondientes **(A, a)**. Los embriones inyectados fueron identificados mediante el seguimiento de rodamina dextrano en el lado inyectado del embrión y a través de actividad β -galactosidasa **(A, b)**. Se realizaron hibridaciones *in situ* a embriones completos en estadio 10, utilizando marcadores para los genes mesodermales **(B, a-c)** *Chordin*, **(B, e-g)** *Goosecoid* y **(B, i-j)** *Xbra*, sobre embriones “wild type”, morfantes y en condición de rescate de fenotipo. Los efectos pudieron ser cuantificados en base a la expresión de los genes dorso-mesodermales **(B, d)** *Chordin* y **(B, h)** *Goosecoid*. Para el caso de *Chd* se observa un 80% (n=25) de embriones con mesodermo afectado en condición morfante para Ric-8A, porcentaje que disminuye al 42% (n=24) en embriones con rescate de fenotipo **(B, d)**. En el caso de *Gsc*, el 77% (n=30) de los embriones vio afectado la región del mesodermo dorsal, efecto que disminuye al 36% (n=14) en embriones morfantes rescatados por ARNm de Ric-8A **(B, h)**. **(B, j)** Embriones con sonda para *Xbra* no mostraron efectos tras silenciamiento con MoRic-8A (n=20). El ectodermo se estudió utilizando una sonda contra queratina **(B, k-l)**. Ninguno de los embriones morfantes para Ric-8A se vio afectado (n=26). Lni: lado no inyectado; li: lado inyectado; WT: “wild type”. Insets vista polo vegetal **(B, k-l)**.

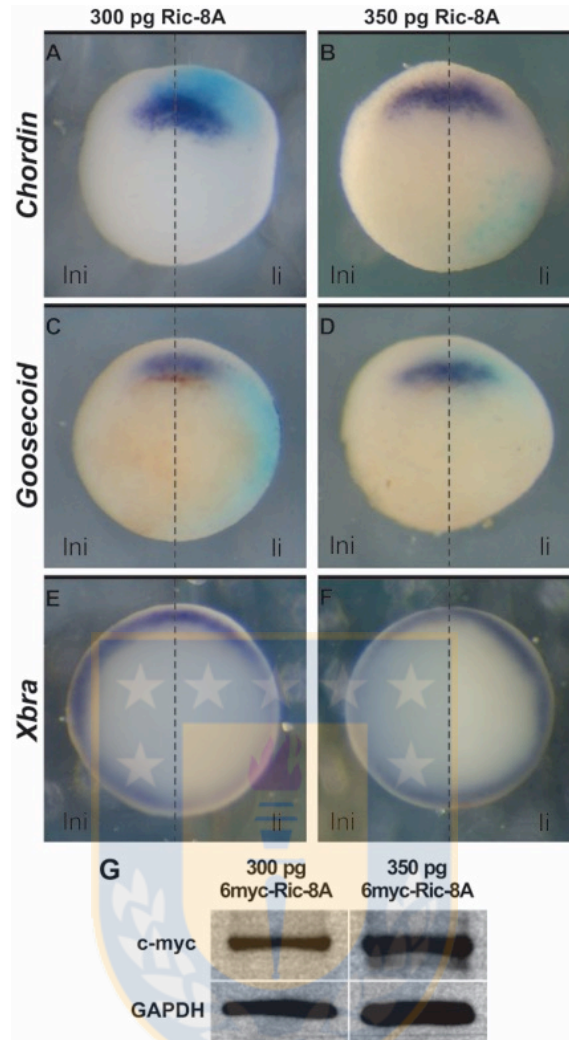


Figura 10. Efecto de la sobreexpresión de Ric-8A en la expresión de genes mesodermales.

Los ensayos se llevaron a cabo inyectando en un blastómero de embriones en estadio de 2 células 300 pg o 350 pg de ARNm para Ric-8A, en conjunto con β -galactosidasa como marcador de linaje. Éstos se incubaron hasta estadio 10 y se realizó hibridación *in situ* contra **(A, B)** *Chordin* (n=18), **(C, D)** *Goosecoid* (n=30) y **(E, F)** *Xbra* (n=97). Ninguno de los embriones presentó alteraciones en la expresión de los genes dorso-mesodermales ni del gen “pan-mesodermal”. **(G)** “Western Blot” correspondiente a los ensayos de sobreexpresión, utilizando un anticuerpo c-myc sobre lisado de embriones bajo las condiciones descritas previamente. Como control

de carga, se determinaron los niveles de expresión de la proteína GAPDH. Los fenotipos fueron cuantificados para 3 ensayos diferentes. Lni: lado no inyectado; li: lado inyectado.



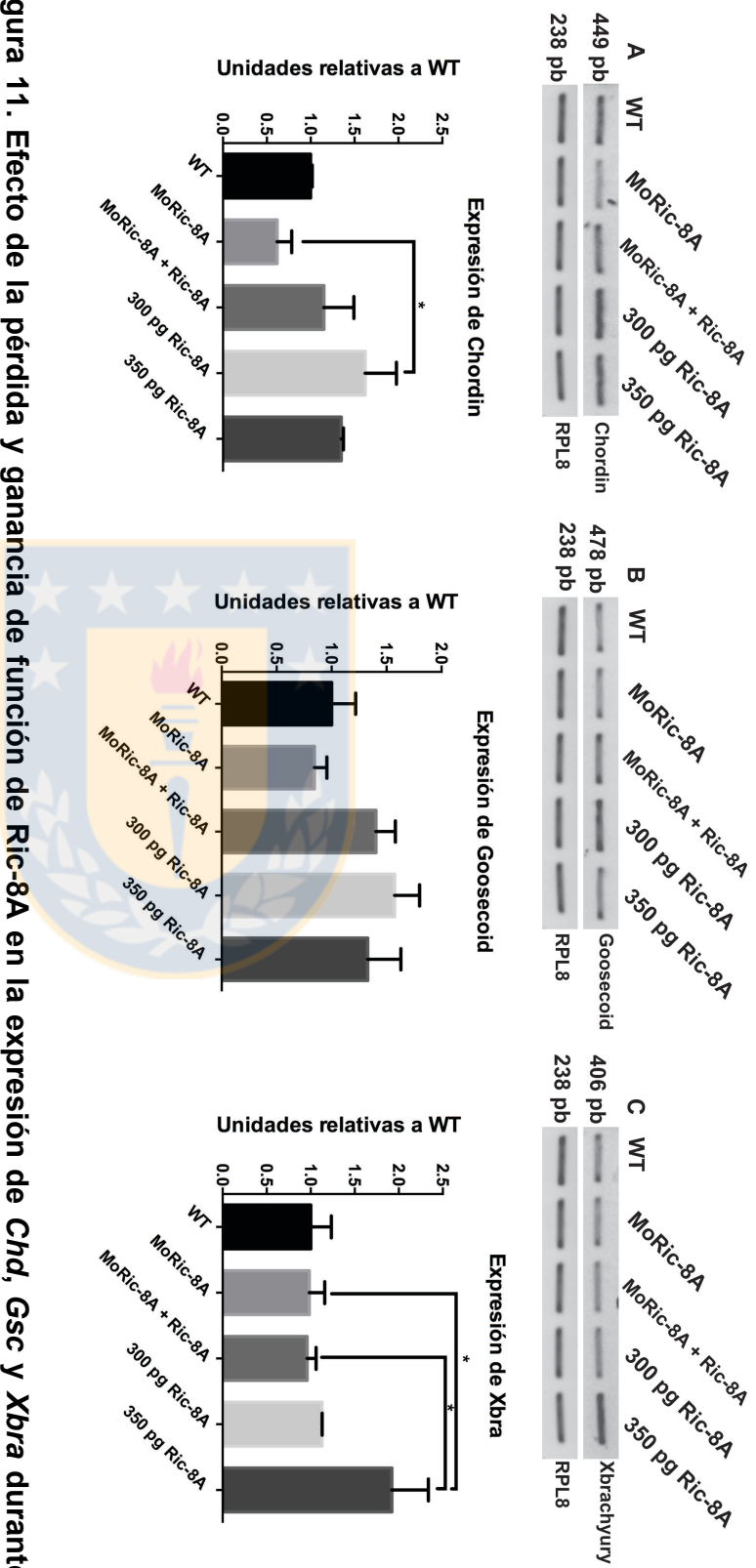


Figura 11. Efecto de la pérdida y ganancia de función de Ric-8A en la expresión de *Chd*, *Gsc* y *Xbra* durante blástula tardía.

Embriones inyectados con MoRic-8A y/o ARNm para Ric-8A fueron incubados hasta estadio 10 (blástula tardía) y luego lisados para la extracción de ARN total y generación de ADNc. Se utilizaron 10 embriones por cada condición. Se cuantificaron los niveles de **(A) *Chordin***, **(B) *Goosecoid*** y **(C) *Xbra*** utilizando partidores específicos. Como control interno, se amplificó el gen *rpl8* (proteína ribosomal L8) de *Xenopus*. La significancia estadística está indicada por * ($P < 0.05$).

5.3. Estudiar si la subunidad Gαq de proteína G heterotrimerica interacciona con Ric-8A para regular la inducción de la cresta neural.

5.3.1. Estudiar la participación de la subunidad Gαq durante la inducción de la cresta neural a través de ensayos de epistasis en embriones completos de *Xenopus tropicalis*.

Dado que Ric-8A actúa como GEF para distintas subunidades Gα, que se reportó la interacción entre Ric-8A y Gαq a través de ensayos de doble híbrido (Tall y col., 2003) y que Gαq se expresa en el mesodermo dorsal en estadíos de blástula tardía (Fuentealba y col., 2016, publicación enviada a Gene Expression Pattern) regulando la formación de dicho tejido (Soto y col., 2007), se decidió estudiar si la vía de señalización de Ric-8A estaría regulando la inducción de la CN a través de Gαq. Para ello, se realizó un estudio de epistasis funcional, el cual refiere a una interacción molecular que dos proteínas (u otros elementos genéticos) puedan tener, operando dentro de la misma vía de señalización. Por ello, se realizaron ensayos tratando de recuperar el fenotipo normal de expresión de *Snail2* por medio de la sobreexpresión de Gαq en embriones morfantes para Ric-8A. Un blastómero de embriones en estadio de 2 células fueron inyectados con 25 ng de MoRic-8A en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de ARNm para Gαq (Fig. 12). Luego, éstos se incubaron hasta estadio 16, fueron fijados y sometidos a ensayos de hibridación *in situ*. En aquellos embriones donde se co-inyectó tanto morfolino para Ric-8A como 100 pg, 150 pg, 200 pg, 250 pg o 300 pg de ARNm para Gαq fue posible observar un rescate parcial del fenotipo siendo el más alto a los 250 pg basado en la expresión de *Snail2*, comparándose con el lado control sin inyectar y con embriones controles inyectados sólo con MoRic-8A (Fig. 12A-F). Si bien hubo un 100% de rescate en los embriones inyectados con 200 pg de ARNm para Gαq, se debe considerar el bajo número de embriones analizados (n=4). Aunque la mayoría de los embriones rescatados con Gαq fueron capaces de presentar inducción de las células de la CN, en su gran mayoría presentaron problemas de adhesión celular en el lado inyectado

(Fig. 12D,E), provocando problemas durante su desarrollo. Los fenotipos de rescate pudieron ser cuantificados en base a la expresión o no expresión del marcador de CN *Snail2* (Fig. 12G), comparándose con embriones controles con fenotipo severo de inhibición, los cuales fueron inyectados sólo con 25 ng de MoRic-8A.



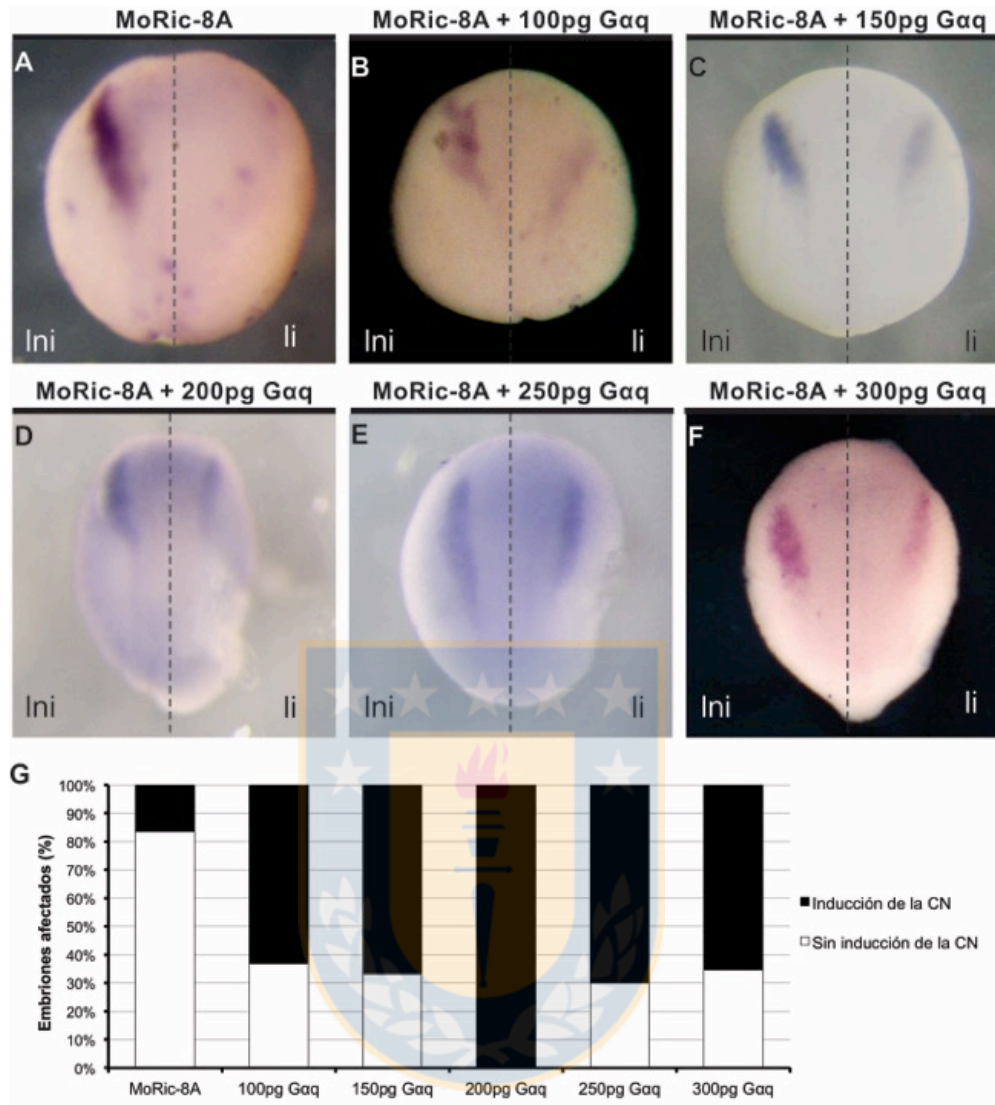


Figura 12. Rescate del fenotipo producto del efecto del silenciamiento de Ric-8A a través de la sobreexpresión de Gaq.

Mediante ensayos de hibridación *in situ* se determinó la expresión de *Snail2* en embriones controles morfantes para Ric-8A (A) y en embriones rescatados con (B) 100 pg, (C) 150 pg, (D) 200 pg, (E) 250 pg o (F) 300 pg de ARNm para Gaq. A través de ellos, se observa un rescate parcial del fenotipo en comparación al lado no inyectado o a los embriones controles. (G) Finalmente, se grafica el número de embriones en condición de rescate en base a la expresión de *Snail2* en el lado inyectado del embrión. Como control, se grafican embriones morfantes para Ric-8A

inyectados con 25 ng del morfolino respectivo, donde sólo el 18% (n=298) de los embriones fue capaz de inducir a las células de la CN. Sin embargo, este porcentaje aumenta en embriones co-inyectados con el ARNm de Gαq. Las concentraciones de 100 pg, 150 pg, 200 pg, 250 pg y 300 pg presentaron un 63% (n=19), 66% (n=24), 100% (n=4), 70% (n=20) y un 65% (n=26) respectivamente, de embriones con inducción de las células de la CN. Lni: lado no inyectado; li: lado inyectado.



5.3.2. Estudiar la pérdida y ganancia de función de la subunidad Gαq durante la inducción de la cresta neural.

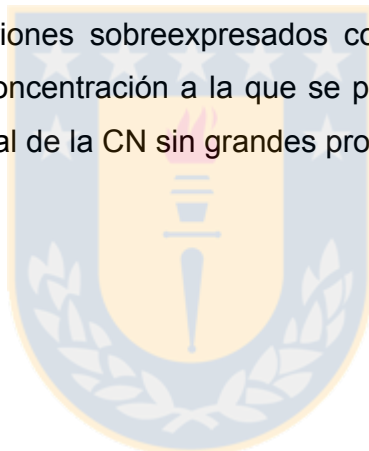
Luego de establecer la participación de la proteína Gαq en la señal de inducción de la cresta neural río abajo de Ric-8A, se prosiguió a estudiar la participación de esta subunidad de proteína G a través de ensayos de pérdida y ganancia de función. Para ello, embriones en estadio de 2 células fueron inyectados en un blastómero con concentraciones crecientes de morfolino contra Gαq (MoGαq), desde los 15 ng hasta los 25 ng. Una vez inyectados los embriones, fueron incubados hasta estadio 16 y sometidos a ensayos de hibridación *in situ* analizando el patrón de expresión del marcador *Snail2* en el lado inyectado. Similar a lo observado en los ensayos de pérdida de función de Ric-8A, el silenciamiento de Gαq provocó una inhibición en la expresión de *Snail2* de forma gradual a medida que aumentó la concentración de morfolino inyectado, observándose así una inhibición leve a los 15 ng y 20 ng de MoGαq (Fig. 13A, B) y un fenotipo de inhibición severa sin inducción de la CN a los 25 ng de MoGαq (Fig. 13C). Los embriones afectados se cuantificaron en base a la expresión de *Snail2* en aquellos que presentaron un fenotipo de inhibición severa, para tres ensayos independientes (Fig. 13F). Como embriones controles se utilizaron embriones inyectados con concentraciones equimolares de MoCtl (datos no mostrados), morfolino estandarizado en ensayos previos. Por lo tanto, en base a lo observado en estos ensayos de pérdida de función, sumado a los ensayos previos de epistasis, se sugiere que Gαq se encuentra participando en la misma vía de señalización río abajo de Ric-8A para la señal de inducción de las células de la CN. Dado que durante estos ensayos se utilizó un morfolino específico sintetizado para los ensayos de inducción, fue necesario realizar los ensayos de rescate de fenotipo con el fin de asegurar que el efecto de silenciamiento de Gαq observado sea producto del morfolino utilizado.

Los rescates de fenotipo se realizaron inyectando 25 ng de MoGαq en conjunto con 200 pg o 300 pg de ARNm para Gαq en un blastómero de embriones en estadio de 2

células. Estos embriones se incubaron hasta estadio 16 y se les realizó ensayos de hibridación *in situ* analizando la expresión del marcador *Snail2* (Fig. 13D, E). Las concentraciones de ARNm de Gαq utilizadas se determinaron en base a los resultados obtenidos durante los ensayos de epistasis, donde la sobreexpresión con 250 pg de ARNm para Gαq fue suficiente para rescatar la mayor expresión de *Snail2* tras el silenciamiento con MoRic-8A (Fig. 12E). Una concentración de 200 pg de ARNm de Gαq fue suficiente para rescatar de forma parcial la expresión de *Snail2* con respecto a su lado control sin inyectar (Fig. 13D) o a embriones controles inyectados con 25 ng de MoGαq (Fig. 13C). Cabe mencionar que tras el silenciamiento de Gαq, el rescate de fenotipo a las concentraciones utilizadas fue capaz de recuperar la señal de inducción de la CN sin generar problemas en la adhesión celular como lo observado previamente. Si bien los ensayos de rescate a las concentraciones utilizadas fueron capaces de recuperar la señal de inducción de la CN sin generar problemas en la adhesión celular, los embriones rescatados con 300 pg de ARNm de Gαq presentaron problemas de exogástrula durante el desarrollo (Fig. 13E), lo que en algunos casos afectó la viabilidad de los embriones. Esto se vio reflejado tras la cuantificación de los embriones afectados en función de la expresión del marcador de crestas neurales. El rescate de fenotipo se evidenció por una disminución del fenotipo sin inducción, el cual disminuye de un 69% (n=152) en los embriones morfantes para Gαq, a un 24% (n=91) en los embriones rescatados 200 pg y a un 33% (n=12) en los embriones rescatados con 300 pg de ARNm para Gαq (Fig. 13F), lo que finalmente demuestra que el efecto observado producto del silenciamiento de Gαq es específico.

Con el fin de complementar estos estudios, se realizaron ensayos de sobreexpresión de Gαq inyectando 100 pg, 150 pg, 200 pg, 250 pg o 300 pg de ARNm para esta subunidad en un blastómero de un embrión en estadio de 2 células (Fig. 14A-E). Los ensayos de hibridación *in situ* correspondientes a estas microinyecciones demostraron que esta sobreexpresión no provoca una alteración en el patrón de expresión de *Snail2* a ninguna de las concentraciones utilizadas. No obstante, es

importante señalar que algunos embriones inyectados con 300 pg de ARNm para esta subunidad presentaron un fenotipo de inhibición de la CN en el lado inyectado (datos no mostrados). Al igual que en los ensayos de rescate de fenotipo a través de epistasis, los embriones sobreexpresados con Gαq expusieron problemas de adhesión celular en el lado inyectado provocando la ruptura del tejido a partir de los 150 pg de ARNm, efecto que se volvió más severo al ir aumentando estas concentraciones (Fig. 14B-E). Estos ensayos también tuvieron repercusiones en cuanto a la viabilidad de los embriones, teniendo que repetir varios ensayos para alcanzar un número de muestras adecuado para el análisis. Finalmente, con el fin de verificar la correcta traducción del ARNm inyectado, los niveles de sobreexpresión de Gαq fusionado al epítotope 6myc fueron determinados mediante “Western Blot” utilizando lisados de embriones sobreexpresados con 150 pg de Gαq (Fig. 14F), puesto que fue la mayor concentración a la que se pudo obtener embriones con un fenotipo de inducción normal de la CN sin grandes problemas de adhesión celular.



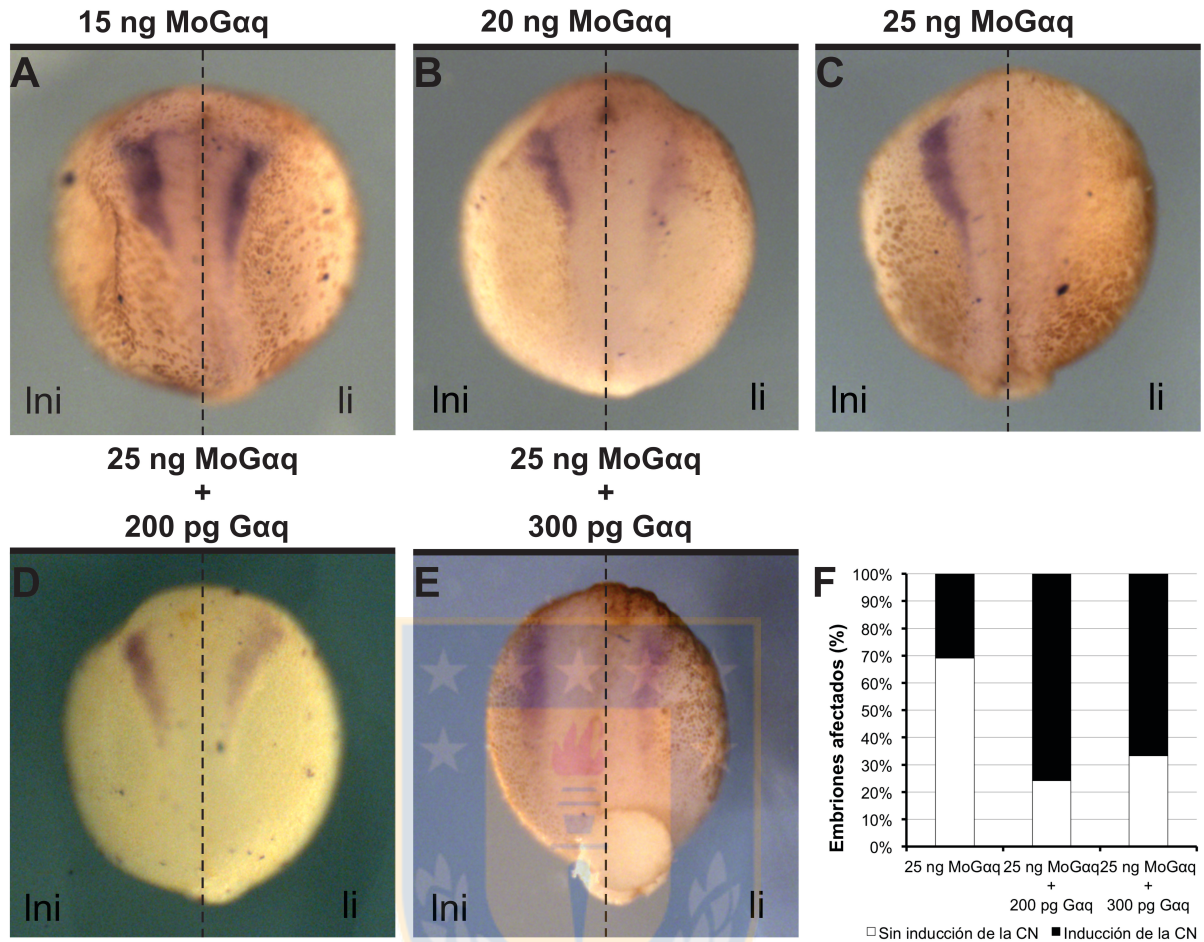


Figura 13. Efecto de la pérdida de función de Gaq sobre la inducción de las células de la CN.

Se realizaron hibridaciones *in situ* a embriones completos de *Xenopus tropicalis* en estadio 16 utilizando el marcador de CN *Snail2*. Los recuadros corresponden a embriones morfantes con **(A)** 15 ng , **(B)** 20 ng o **(C)** 25 ng de MoGaq, los cuales presentaron un fenotipo de inhibición de la inducción de las células de la CN en el lado inyectado, en comparación al lado control. Un rescate de fenotipo se logró co-inyectando 25 ng de MoGaq y **(D)** 200 pg o **(E)** 300 pg de ARNm para la misma proteína, lo que no provocó un efecto visible sobre la inducción. En **(F)** se grafica el número de embriones morfantes para Gaq que presentaron un fenotipo severo de inhibición en la inducción de la CN (69%, n=152). Finalmente, se graficó el número de embriones en condición de rescate, donde un rescate parcial de fenotipo se refleja

en una disminución del porcentaje de embriones afectados, disminuyendo a un 24% (n=91) en aquellos embriones inyectados con 200 pg de ARNm de Gαq y a un 33% (n=12) en aquellos inyectados con 300 pg de ARNm para Gαq. Las cuantificaciones corresponden a tres ensayos independientes. Lni: lado no inyectado; li: lado inyectado.



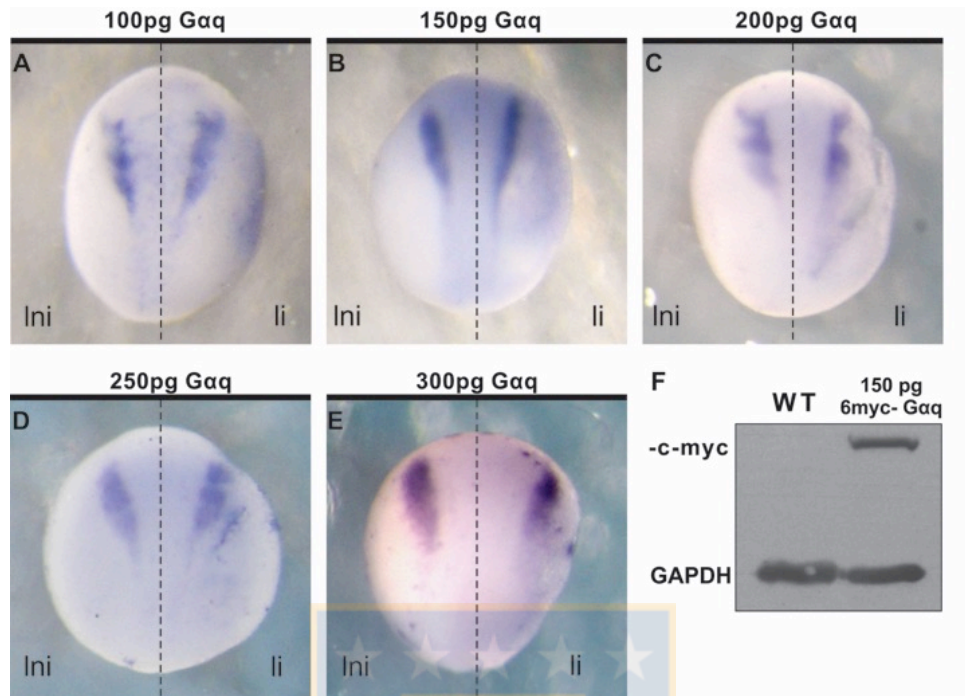


Figura 14. Efecto de la sobreexpresión de la subunidad Gαq sobre la inducción de la CN.

Embriones de *Xenopus tropicalis* fueron inyectados con (A) 100 pg, (B) 150 pg, (C) 200 pg, (D) 250 pg o (E) 300 pg de ARNm para la subunidad Gαq, en un blastómero en estadio de 2 células. Se realizaron hibridaciones *in situ* a estadio 16, observando que las concentraciones utilizadas no provocaron alteraciones en la inducción de las células de la CN en ninguna de las condiciones, pero sí en la adhesión celular. El 100% de los embriones en (A) n=42, (B) n=9, (C) n=24, (D) n=30 presentaron una inducción normal de la CN, salvo en (E) donde un 14% (n=14) de los embriones presentó un fenotipo de inhibición severo (no mostrado). (F) "Western Blot" correspondiente al ensayo de sobreexpresión. El primer carril corresponde a lisado de embriones "wild type", mientras que el segundo corresponde a lisado de embriones sobreexpresados con 150 pg de ARNm para 6Myc-Gαq. En ambos casos se cargaron 100 µg de proteína total, utilizando el anticuerpo contra c-myc. Como control de carga, se determinaron los niveles de expresión de la proteína GAPDH. Lni: lado no inyectado; li: lado inyectado.

5.3.3 Analizar la interacción de la subunidad Gαq con la proteína Ric-8A de *Xenopus tropicalis*.

Los ensayos hasta ahora muestran que ambas proteínas, tanto Ric-8A como Gαq estarían regulando juntas la inducción de la CN, de aquí que el siguiente paso fue analizar la interacción entre estas proteínas, para lo cual se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) a partir de lisados totales de embriones completos bajo condiciones de sobreexpresión. Para ello, se inyectó un blastómero de embriones en estadio de 2 células con 150 pg de ARNm para Ric-8A fusionado al epítipo 6myc (6mycXtRic-8A) en conjunto con 150 pg de ARNm para Gαq, fusionado al epítipo V5 (V5XtGαq). Luego, los embriones fueron incubados hasta estadio 16 donde se identificó aquellos correctamente inyectados mediante el seguimiento del marcador de linaje Rodamina Dextrano. Estos se lisaron y se realizó la Co-IP correspondiente. Análisis por “Western Blot” utilizando los anticuerpos para los epítopes respectivos sugieren que existe interacción entre las proteínas sobreexpresadas 6mycXtRic-8A y V5XtGαq en un contexto celular específico, o que forman parte de un mismo complejo de proteínas (Fig. 15). Al inmunoprecipitar el lisado de embriones con el anticuerpo c-myc fue posible inmunodetectar la proteína Gαq tanto con el anticuerpo monoclonal para la proteína respectiva como con el anticuerpo para el epítipo V5. De forma complementaria, se realizaron los ensayos de Co-IP adhiriendo a la resina el anticuerpo para Gαq o el epítipo V5. En ambos casos se observó una banda positiva para la inmunodetección de Ric-8A con el anticuerpo c-myc. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que existe una interacción entre las proteínas sobreexpresadas Ric-8A y Gαq, sin embargo no se descarta que al inmunoprecipitar con el anticuerpo para Gαq pudiese estar adhiriéndose tanto la proteína sobreexpresada como la endógena.

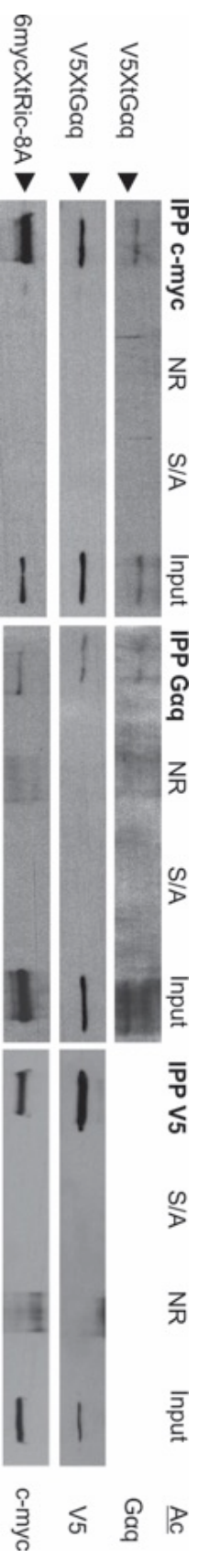


Figura 15. Estudio de la interacción entre Ric-8A y Gag en embriones de *Xenopus tropicalis*.

Ensayo de co-immunoprecipitación entre 6mycXtRic-8A y V5XtGag en embriones de *Xenopus tropicalis* inyectados con 150 pg de ARNm para 6MycRic-8A y 150 pg de ARNm para V5XtGag. Se muestra el análisis por “Western Blot” utilizando el anticuerpo para Gag y el anticuerpo contra el epítipo V5 sobre lisados inmunoprecipitados con el anticuerpo c-myc. De forma complementaria, se realizaron “Western Blots” utilizando el anticuerpo c-myc tras la inmunoprecipitación de lisados con el anticuerpo V5 y con el anticuerpo para Gag. IPP: inmunoprecipitación, NR: anticuerpo no relacionado, S/A: sin anticuerpo, Ac: anticuerpo, flecha negra: proteína detectada.

6. DISCUSIÓN

La CN es una población celular embrionaria y transitoria cuya evolución tiene un papel fundamental en el desarrollo neural de organismos vertebrados. Este tejido se origina en el borde de la placa neural, entre el futuro tejido ectodermal y epidermis. Tras la especificación de la CN mediante la expresión de marcadores como FoxD3, Snail1/2 y Sox8/9/10 (Simões-Costa y Bronner, 2015), las células atraviesan por una transición epitelio-mesenquimal y posterior migración, lo que daría inicio a su diferenciación y por lo tanto a la generación de diversos tipos celulares, actuando en su mayor parte como células progenitoras del sistema nervioso periférico. El desarrollo de la CN en vertebrados es controlado por una red de regulación génica conservada, donde diferentes estudios han permitido evidenciar que su formación ocurre en respuesta a un gradiente de señales moleculares tales como FGF, BMP y Wnt (Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008). Los niveles de señalización de este gradiente serían importantes puesto que generarían un balance entre señales activadoras e inhibitorias, permitiendo el paso de una etapa a otra para la formación de la CN. A través de un estudio en el desarrollo temprano de *Xenopus*, Steventon y colaboradores (2009, 2012) pudieron plantear un modelo de tres pasos para la inducción de la CN. Se postula que durante la etapa de gástrula temprana una serie de genes de la placa neural se expresarían con el fin de permitir la inducción de esta misma región, proceso denominado especificación. Luego, durante gástrula tardía, la región del mesodermo prospectivo ZMDL participaría directamente en la inducción de la CN, y cuando se ha diferenciado a mesodermo intermediario, lo haría en la mantención de identidad de estas células. Por lo tanto la región del mesodermo dorsal cumpliría una función fundamental en la inducción de la CN (Steventon y col., 2009). Involucrada en la formación de este último tejido se encuentra la vía de señalización de proteína G heterotrimérica, la cual se ha implicado en distintos procesos durante la embriogénesis temprana: entre ellos, la formación de los centros organizadores como el centro dorsal y por lo tanto el establecimiento de los

ejes principales como el patrón dorsal-ventral en *Xenopus* (Gurdon, 1992; Heasman y col., 1994). Una de las proteínas involucradas en la vía de señalización de proteínas G heterotriméricas, con actividad GEF para distintas subunidades G α , pero independiente de GPCR es la proteína Ric-8A. Estudios previos reportando la expresión espacial de Ric-8A en la zona marginal del mesodermo prospectivo (Maldonado-Agurto y col., 2011) y su participación en la migración de las células de la CN craneal (Fuentealba y col., 2013) llevaron a sugerir que Ric-8A estaría involucrada en el proceso de inducción de dicho tejido. Es por ello que durante este trabajo de tesis se tuvo como objetivo aportar al estudio de la embriogénesis, específicamente al proceso de inducción de crestas neurales mediante el estudio de la función Ric-8A en embriones de *Xenopus tropicalis*. Los objetivos se llevaron a cabo mediante hibridaciones *in situ* en estudios de pérdida y ganancia de función, tanto en embrión completo como en conjugaciones incluyendo el tejido inductor, estudiando la expresión del marcador de CN *Snail2* y otros marcadores dorso-mesodermales.

Teniendo en consideración que durante la neurulación Ric-8A se expresa en la región del ectodermo neural, específicamente en el tubo neural y crestas neurales de embriones de *Xenopus tropicalis* (Maldonado-Agurto, 2011) y que posteriormente controla la migración de éstas mismas células, se sugiere que esta proteína cumple alguna función en el proceso previo correspondiente a la inducción de la CN. Esto se confirmó tras la pérdida de función de Ric-8A mediante un morfolino específico (MoRic-8A), el cual provocó un fenotipo severo de inhibición (Fig. 4). De esta forma, cabe la posibilidad de que el silenciamiento de dicha proteína pudiera estar afectando directamente las células del neuroectodermo que participan en la formación de la CN, desregulando el gradiente equilibrado de señalización requerido para este proceso a esta etapa del desarrollo (Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008) .

Dado que se ha descrito la interacción de Ric-8A con distintas subunidades G α , además de presentar actividad GEF sobre ellas *in vitro* (Tall y col, 2003), se cree que Ric-8A podría afectar el proceso de inducción de la CN vía señalización de proteína G. Lo anterior se vio reforzado por experimentos que describieron a Ric-8A y G α q promoviendo la transmisión sináptica en *C. elegans*, probablemente por la misma vía de señalización, postulando que Ric-8 actúa como activador río arriba de G α q (Miller y col, 2000). Por lo tanto, la actividad GEF de Ric-8A sobre G α q está en concordancia con lo propuesto anteriormente, lo que sugiere que la función de la proteína Ric-8A tiene un efecto positivo en esta vía de señalización.

Por otro lado, la importante función que Ric-8A cumple durante el proceso de gastrulación en ratón y en *Xenopus tropicalis* (Maldonado-Agurto y col., 2011; Tõnisso y col., 2010) sugiere que podría tener una función en la formación del mesodermo, tejido que participa directamente en la inducción de la CN. Considerando los antecedentes de que Ric-8A también es capaz de expresarse en la región del mesodermo prospectivo durante blástula tardía (Maldonado-Agurto y col., 2011; Anexo 1) , no se descartó de que el silenciamiento estuviera dado por un efecto indirecto sobre el proceso de inducción de la CN, afectando en estadíos más tempranos la formación del tejido inductor. Al igual que Ric-8A, G α q se expresa en la región marginal dorsal durante blástula tardía (Fuentealba y col., 2016, publicación enviada a Gene Expression Pattern; Anexo 2) y participa en la formación del mesodermo dorsal (Soto y col., 2007), tejido que se requiere para una inducción temprana de la CN. Por lo que postulamos que Ric-8A podría estar regulando la inducción de la CN vía G α q, a estadíos tempranos durante la formación de los tejidos inductores. Esta pregunta, fue estudiada durante esta tesis a través de ensayos de conjugación y epistasis.

Resulta interesante ver que la sobreexpresión de Ric-8A a las concentraciones de ARNm utilizadas no provoque una alteración en la inducción de la CN ni en el desarrollo general del embrión hasta estadíos de néurula (Fig. 5), siendo que ésta corresponde a una proteína que se ha descrito participando en diversos procesos durante el desarrollo tales como la transmisión sináptica y movilización del centrosoma durante la embriogénesis temprana de *C. elegans*, en la división celular asimétrica y en la regulación de la maduración del ovocito para el caso de *Xenopus laevis* (Miller y col., 2000; Wilkie y col., 2005; Romo y col., 2007). Sin embargo, un pequeño porcentaje de embriones sin expresión de *Snail2* se observó tras la microinyección de mayores concentraciones de ARNm, sugiriendo que a concentraciones mayores de 300 pg de ARNm de Ric-8A, y en consecuencia los altos niveles codificados de esta proteína, tienen una regulación negativa sobre la inducción de la CN. Estudios en células embrionarias de riñón humano reportan que Ric-8A es capaz de potenciar la vía de Gαq mediante la activación por GPCR, además de prevenir su ubiquitinación y estabilizar los niveles de esta proteína (Nishimura y col., 2006; Chishiki y col., 2013). De tener el mismo comportamiento *in vivo*, al sobreexpresar Ric-8A a determinadas concentraciones pudiera encontrarse estabilizando a la subunidad Gαq, aumentando así los niveles intracelulares de esta subunidad y provocando los mismos efectos que la sobreexpresión de la vía Gαq/Ca⁺² sobre los genes del mesodermo reportados por Soto y colaboradores (2007). Por otro lado, cabe mencionar que, en los ensayos controles de sobreexpresión se observó una alta mortandad en los embriones inyectados con ARNm para Cherry de membrana lo que pudo deberse a un efecto citotóxico dado por la alta estabilidad en el tiempo de la proteína fluorescente, sumado a la alta cantidad de ARNm inyectado.

Por otro lado, la presencia de diferentes fenotipos de inducción (variabilidad en la expresión de *Snail2*) para una misma concentración de morfolino inyectada se podría explicar debido a la diferencia de carga genética propia de cada embrión.

Tanto en los ensayos de pérdida como de ganancia de función, un número reducido de embriones presentó un fenotipo de exogástrula (datos no mostrados). Si bien esta observación corresponde a un defecto en el proceso de gastrulación, y posiblemente a una saturación de la maquinaria de transcripción para el caso de las sobreexpresiones, no fue un impedimento para la viabilidad del embrión en estadios de néurula durante el estudio de la inducción de la CN. Sin embargo, estos hechos nos permiten sugerir que probablemente Ric-8A y por ende la proteína G podrían estar regulando otros eventos tempranos como la migración celular durante la etapa de gastrulación, basándose además en el hecho que hemos reportado una importante función de esta proteína durante la migración de las células de la CN craneal durante la neurulación en *Xenopus* (Fuentealba y col., 2013; Toro-Tapia, 2016, tesis de doctorado). Esto podría sugerir también que Ric-8A afecta los procesos de migración temprana durante la gastrulación, para los cuales se ha reportado la participación de Gα12/13 durante el proceso de epibolia en pez cebra (Lin y col., 2009)

Tomando en consideración una expresión ubicua de Ric-8A en la zona del mesodermo, pero preferentemente en la zona marginal (Maldonado-Agurto y col., 2011), se quiso estudiar su participación en la inducción de la CN a través del mesodermo prospectivo. Si bien la capacidad inductora de la ZMDL se había comprobado previamente en *Xenopus laevis* (Steventon y col., 2009), durante el desarrollo de esta tesis puso a prueba la capacidad inductora de este tejido por primera vez en *Xenopus tropicalis*. La fuerte expresión de *Snail2*, tanto en las conjugaciones “wild type” como en las morfantes control (Fig. 6 y Fig. 7) demuestran que esta región del mesodermo prospectivo es capaz de inducir a las células de la CN en este modelo de estudio. Esto apunta a que la secreción de ligandos en forma de gradiente equilibrado es capaz de ocurrir aún a nivel de explantes de tejido mesodermal e inducir a las células de la CN sobre un tejido inducible. No obstante, la variabilidad en la expresión del marcador de crestas neurales sobre estos ensayos puede haber estado influida por la concentración de

señales moleculares necesarias para inducir las crestas neurales, la que fue definida por los límites de disección comprendidos en los explantes de ZMDL (según la metodología descrita por Steventon y col., 2009).

Complementando estos ensayos, se analizó si la función de Ric-8A estaría implicada en las células que liberan la señal de inducción (ZMDL) o en aquellas que la reciben (AC). En base a ello se determinó que el silenciamiento en la ZMDL es incapaz de inducir a las células de la CN (Fig.8) sugiriendo que la participación de esta proteína en la región del mesodermo prospectivo es suficiente y necesaria para que ocurra el proceso de inducción. Estos resultados concuerdan con la expresión de Ric-8A en el mesodermo, específicamente en la región dorsal en la etapa de gástrula en *Xenopus tropicalis* (Maldonado-Agurto, 2011; Anexo 2) sugiriendo que en esta etapa del desarrollo y en esta región en particular, esta proteína participa en vías de señalización requeridas para la inducción de la CN. Sin embargo, dada las funciones pleiotrópicas que Ric-8A tiene durante el desarrollo, no se descarta que pudiera estar regulando otros procesos celulares, dependiendo de su localización subcelular o la subunidad $G\alpha$ que se encuentre regulando.

A pesar de que se ha descrito la presencia de Ric-8A en el hemisferio animal de embriones en etapas tempranas del desarrollo durante el clivaje y estadios de blástula, su expresión se especifica en tejido neural durante la neurulación (Maldonado-Agurto y col., 2011). Esto explicaría la expresión de *Snail2* en conjugaciones con Ric-8A silenciado en la región de "Animal Cap", sin afectar la inducción (Fig. 8). Sin embargo, su especificación a estos estadios, adoptando una localización en el neuroectodermo y en crestas neurales sugiere que pudiera estar participando en el tercer paso de inducción: el proceso de mantención de la identidad de las células de la CN craneal descrito por Steventon y Mayor (2012).

Hasta aquí, los resultados muestran que Ric-8A jugaría un rol esencial en el tejido que entrega la señal de inducción: la ZMDL. Sin embargo, fue necesario verificar si

lo observado fue producto de un efecto a estadíos más tempranos de una vez iniciado el proceso de inducción, es decir verificar si el tejido dorso-mesodermal prospectivo se formó correctamente. Una de las propuestas para evaluar la implicancia de Ric-8A en el mesodermo fue analizar la expresión de los genes del mesodermo dorsal *Gooseoid* y *Chordin* en embriones morfantes para Ric-8A.

El silenciamiento de Ric-8A inhibió la expresión tanto de *Gsc* como *Chd*, reforzando la idea de que Ric-8A participa en la formación del mesodermo prospectivo y por lo tanto en el proceso de inducción de la CN, sin embargo aún se desconoce mediante qué mecanismo podría estar afectando la correcta formación de este tejido. Ensayos de sobreexpresión de *Gαq* en *Xenopus laevis* han demostrado que esta vía de señalización participa en la formación del mesodermo dorsal, evidenciado por la alteración en la expresión de *Gsc* y *Chd* y afectando específicamente la vía $Gαq/Ca^{+2}$ (Soto y col., 2007), similar a lo observado por la pérdida de función de Ric-8A (Fig. 9). Sin embargo, en los mismos estudios se reportó la implicancia de la vía no canónica de Wnt/Ca^{2+} regulando la formación de los ejes principales del embrión y movimientos de gastrulación durante el desarrollo temprano de *Xenopus*. Esto, sumado a la función GEF de Ric-8A sobre *Gαq*, no descarta que el proceso de formación de mesodermo dorsal este regulado por la vía no canónica de *Wnt*. Es posible que este proceso esté involucrado también en el primer paso de inducción, en la especificación de genes necesarios para la CN (Steventon y col., 2012). Por lo tanto, sería interesante considerar estudiar la participación temporal de Ric-8A durante el proceso de inducción, analizando si se encuentra o no regulando la expresión de los genes especificadores de la placa neural. Complementado y reforzando resultados previos, la correcta expresión de *Queratina epidermal* bajo condiciones morfantes de Ric-8A sugieren que la formación del tejido ectodermal no es regulado por esta proteína a estos estadíos del desarrollo, lo que concuerda con que Ric-8A no regula la inducción de crestas neurales desde el tejido ectodermal, según lo observado en los ensayos de conjugación (Fig. 8C).

La sobreexpresión de Ric-8A a las concentraciones utilizadas no tuvo efectos en la expresión de los genes del mesodermo *Chd*, *Gsc* y *Xbra* estudiados en las hibridaciones *in situ* (Fig. 10). No obstante, el análisis de embriones bajo estas mismas condiciones a través de ensayos de RT-PCR permitieron dar cuenta que tras la sobreexpresión de Ric-8A aumentó la expresión de los tres marcadores (Fig. 11). Estas diferencias en los resultados de sobreexpresión pudieron deberse a que los ensayos de RT-PCR nos permitieron realizar un análisis semi-cuantitativo de los transcritos a determinado momento de los genes mesodermales estudiados. No así con las hibridaciones *in situ*, que si bien nos permiten observar la expresión de un gen a determinado momento, corresponde a un análisis cualitativo que se observa a través del embrión completo.

Ensayos de rescate de fenotipo con Gαq sobre embriones morfantes para Ric-8A realizados durante este trabajo de tesis nos permitieron reforzar la idea de que Ric-8A se encontraría río arriba en la cascada de señalización de Gαq. Esto sumado a evidencia de que la sobreexpresión de Gαq inhibe a los genes marcadores mesodermales *Chd*, *Gsc*, pero no *Xbra* (Soto y col., 2007), sugieren que Ric-8A, en los ensayos realizados (Fig. 9 y Fig.10), hubieran teniendo el efecto contrario. Sin embargo, esta contradicción se puede explicar si consideramos que Ric-8A interacciona y participa en la vía de señalización de diferentes subunidades Gα (Tall y col., 2003; Romo y col., 2007; Chan y col., 2011), por lo que variaciones en sus niveles podría desregular más de una vía, potenciando el efecto de la subunidad que se encuentre en mayor cantidad en determinado proceso del desarrollo y región del embrión. Para llegar a mayores conclusiones, sería interesante estudiar el efecto de la sobreexpresión de otras subunidades Gα sobre embriones morfantes para Ric-8A, y así analizar si la inducción de la CN es regulada también por otras vías de señalización de proteína G. Como uno de los precedentes, se sabe que Gαo, subunidad también regulada por Ric-8 en *C.elegans*, regula negativamente la vía de Gαq/PLCβ (Miller y col., 2000), por lo

que alteraciones en esta vía de señalización por medio de Ric-8A también pudiesen estar afectando de forma antagónica lo observado para la subunidad Gαq.

Teniendo en cuenta que la vía de señalización de proteína G participa en los procesos de embriogénesis a lo largo del desarrollo y a la importancia de Gαq durante la formación del mesodermo (Soto y col., 2007), en este trabajo de tesis se pretendió estudiar la implicancia de la vía de Gαq en la formación de la CN por medio de Ric-8A. Para ello, se realizaron estudios de epistasis funcional, probando diferentes concentraciones de esta subunidad sobre embriones morfantes para Ric-8A. Si bien, todas las concentraciones ARNm de Gαq utilizadas (en escala de picogramos) fueron capaces de rescatar parcialmente la expresión del marcador *Snail2* (Fig. 12), existe variación en el porcentaje de embriones capaces de inducir a la CN. Observamos un aumento creciente de este rescate de fenotipo hasta inyectar los 200 pg de ARNm para Gαq, donde a concentraciones mayores, el fenotipo de inhibición vuelve a aumentar. Esto podría estar dado por la sobreactivación de la vía canónica de Gαq, provocando el mismo efecto observado por Soto y colaboradores (2007) en embriones de *Xenopus laevis*, donde la sobreexpresión de Gαq mediante la microinyección de ARNm o la activación endógena vía acoplamiento del receptor muscarínico M1 estimulada por carbacol, inhibe a los genes marcadores mesodermales *Chd* y *Gsc*. De ser este el caso, podríamos esperar defectos en la formación del tejido inductor (mesodermo dorsal) y por lo tanto en el proceso de inducción de la CN. Por otro lado, se encuentra la alta descompensación del embrión dada por problemas de desarrollo en el lado inyectado, lo que hizo que el número de embriones a analizar decreciera considerablemente. La alta mortandad observada puede adjudicarse a las altas concentraciones de Gαq utilizadas, a su alta toxicidad y a la cantidad de procesos que se ven activados al momento de la sobreexpresión. La versatilidad de interacción que Gαq tiene con otras proteínas, le permite tener diversidad en cuanto a su actividad funcional (Vogt y col., 2003; Waldo y col., 2010). Se ha

descrito su interacción con proteínas efectoras (canónicas y no canónicas), proteínas RhoGEFs, proteínas inhibitorias de unión a sus efectores, componentes del citoesqueleto y organizadores de microdominios de membrana, entre otros, desencadenando una cascada de señales (Lutz y col., 2007; Guzmán y col., 2014). Si bien Ric-8 tiene un efecto positivo en la liberación de neurotransmisores en *C. elegans* vía Gαq, no se ha dilucidado bien el rol que su homólogo Ric-8A tendría sobre esta misma vía de señalización en otros organismos. Estudios realizados en células de ratón han demostrado que Ric-8A es capaz de translocar a la membrana plasmática en respuesta a la activación del receptor acoplado a Gαq, donde potencia la activación de ERK estimulada por el mismo GPCR (Nishimura y col., 2006). Estas evidencias determinan a Ric-8A como un amplificador de señales en localizaciones subcelulares específicas en un proceso que puede ser importante en la polarización celular. Por lo tanto, vemos que al momento de sobreexpresar Gαq, se activa una gran cantidad de vías que son las que pueden estar afectando al embrión incluso a momentos muy tempranos del desarrollo. El rescate del fenotipo de inducción de crestas neurales mediante la sobreexpresión de Gαq en embriones morfantes para Ric-8A apoyan el hecho de que Ric-8A estaría actuando río arriba de la vía de señalización de Gαq para el desencadenamiento de la cascada de señales necesarias para la inducción de la CN. Además, estas observaciones se ven apoyadas con los resultados obtenidos de los ensayos de pérdida de función de la subunidad Gαq en embrión completo, donde la falta de esta proteína inhibe la inducción de la CN (Fig. 13), independiente de los niveles de Ric-8A presentes. Habría sido interesante analizar la expresión de *Snail2* en embriones morfantes para Gαq con sobreexpresión de Ric-8A, en lo que se esperaría una inhibición en la expresión del marcador y por lo tanto la no inducción de la CN.

Otra de las observaciones a destacar, durante este trabajo de tesis, es el problema en la adhesión celular observado en la mayoría de los embriones sobreexpresados con Gαq (Fig. 14). A pesar de que ninguna de las concentraciones de ARNm para Gαq utilizadas en sobreexpresión fue capaz de alterar el patrón de expresión del

marcador de CN, hubo rompimiento de tejido en el lado inyectado de los embriones. Estudios previos en la sobreexpresión de esta vía en *Xenopus laevis* habían reportado problemas de adhesión celular, presentando una disgregación de las células del ectodermo tanto *in vivo* como *in vitro* (Rizzoti y col., 1998). Cabe mencionar que la vía canónica de Wnt cumple funciones importantes en la adhesión celular, donde β -catenina se encarga de estabilizar el complejo de E-cadherina en la membrana plasmática (Brembeck y col., 2006). Análisis de la interacción entre las vías de señalización de proteína G heterotrimérica, específicamente de G α q y la vía canónica de Wnt han demostrado que la proteína Calpaína actúa como efector negativo de la vía de señalización de G α q, inhibiendo la vía canónica de Wnt a través de la degradación de β -catenina (Li e Iyengar, 2002). Además, existen evidencias que implican a la vía de G α q controlando la reorganización del citoesqueleto de actina mediante la regulación de las proteínas G pequeñas Rho (Cotton y Claing., 2009; Takashima y col., 2008). Por lo tanto, en base a estas observaciones, podemos sugerir que la sobreexpresión de G α q estaría altamente implicada en los problemas de adhesión celular presentados en los diferentes fenotipos de ganancia de función de esta subunidad, siendo muy importante niveles altamente regulados de expresión de G α q para un correcto desarrollo embrionario.

Finalmente la interacción entre G α q y Ric-8A observada a través de ensayos de co-inmunoprecipitación (Fig. 15) permiten apoyar la participación de ambas proteínas en una misma vía de señalización regulando el proceso de inducción de crestas neurales en *Xenopus tropicalis*. Si bien para la detección de ambas proteínas se trabajó bajo condiciones de sobreexpresión, no se descarta que exista una interacción efectiva entre Ric-8A y G α q endógena, lo cual fue difícil de corroborar por la falta de un anticuerpo específico para la detección.

En conjunto todos estos resultados nos permitieron demostrar que Ric-8A regula la inducción de las crestas neurales, a través de la señalización de la subunidad G α q

de proteína G heterotrimérica, desde estadios tempranos de formación del tejido mesodermal prospectivo, y con ello permitiendo un correcto desarrollo embrionario en *Xenopus tropicalis*.



7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos durante esta tesis, podemos concluir que:

- Ric-8A se requiere para una correcta inducción de las células de la Cresta Neural Craneal en *Xenopus tropicalis*.
- Ric-8A es necesario, por lo menos en la región del mesodermo prospectivo, específicamente en la ZMDL con el fin de inducir correctamente a las células de la CN en una etapa temprana de inducción en *Xenopus tropicalis*.
- Ric-8A y Gαq son requeridos en estadios tempranos del desarrollo de *Xenopus tropicalis*, para la formación del tejido mesodermal y así regular la inducción de la cresta neural.
- Que Ric-8A interacciona en el mismo complejo proteico con Gαq y regula la vía de señalización de esta subunidad controlando la correcta expresión de genes dorso-mesodermales y por lo tanto la inducción temprana de las células de la CN.
- Que niveles específicos de Gαq son necesarios para mantener la correcta adhesión celular durante etapas tempranas de la embriogénesis. A su vez, niveles mínimos de esta proteína se requieren para que ocurra la inducción de crestas neurales, sugiriendo que actuaría río abajo en la cascada de la señalización de Ric-8A.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alfandari, D., Cousin, H., Marsden, M. (2010) Mechanism of *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Cell Adh Migr* 4: 553-560.

Aybar, M., Nieto, M. y Mayor, R. (2003). Snail precedes slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the *Xenopus* neural crest. *Development* 130: 483-494.

Basch, L., García-Castro, M., Bronner-Fraser, M. (2004). Molecular Mechanisms of neural crest induction. *Birth Def Res.* 72: 109-123.

Becker, S., Mayor, R., Kashef, J. (2013) Cadherin-11 Mediates Contact Inhibition of Locomotion during *Xenopus* Neural Crest Cell Migration . *PLoS ONE* 8(12): e85717.

Brembeck, F., Rosario, M., Birchmeier W. (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. *Current Opinion in Genetics and Development.* 16:51–59.

Burstyn-Cohen, T. y Kalcheim, C. (2002). Association between the cell and neural crest delamination through specific regulation of G1/S transition. *Dev. Cell.* 3:383-395.

Carmona-Fontaine, C., Matthews, H., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G., Parsons, M., Stern, C., Mayor, R. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature* 456: 957-961.

Carmona-Fontaine, C., Theveneau, E., Tzekou, A., Tada, M., Woods, M., Page, K., Parsons, M., Lambris, J., Mayor, R. (2011) Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration. *Dev Cell* 21: 1026-1037.

Chan, P., Gabay, M., Wright, F., Tall, G. (2011). Ric-8B is a GTP-dependent G protein α s guanine nucleotide exchange factor. *The Journal of Biological Chemistry* 226: 19932–19942.

Chishiki, K., Kamakura, S., Yuzawa, S., Hayase, J. y Sumimoto, H. (2013). Ubiquitination of the heterotrimeric G protein alpha subunits Galphai2 and Galphaq is prevented by the guanine nucleotide exchange factor Ric-8A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435 (3): 414-419

Close, B., Banister, K., Baumans V., Bernoth, E.M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton D. y Warwick, C. (1996). Recommendations for the Euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals.* 30: 293-316

Cotton, M. y Claing, A. (2009). G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cellular Signalling* 21: 1045–1053.

Fan, G., Ballou, L., Lin, R. (2003). Phospholipase C-independent activation of glycogen synthase kinase-3beta and C-terminal Src kinase by Galphaq. *J Biol Che.* 278(52):52432-6.

Fuentealba, J. (2012). Participación de Ric-8A en la formación de la Cresta Neural durante el desarrollo embrionario de *Xenopus*. Tesis para obtener el grado de Magíster, Universidad de Concepción. 83pp.

Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, L., Henriquez, JP., Caprile, T., Mayor, R., Marcellini, S., Hinrichs, MV., Olate, J., Torrejón, M. (2013) Ric-8A, a

Guanine Nucleotide Exchange Factor for Heterotrimeric G proteins, is critical for Cranial Neural Crest cell migration. *Developmental Biology*, 378(2):74-82.

Fuentealba, F., Toro-Tapia, G., Rodriguez, M., Arriagada, C., Maureira, A., Beyer, A., Villaseca, S., Leal, J., Hinrichs, Maria V., Olate, J., Caprile, T. y Torrejón, M. (2016). Expression profiles of the G α subunits during *Xenopus tropicalis* embryonic development. *Enviada a Gene Expression Pattern*.

Gilbert S. (2000). *Developmental Biology*. 6th edition. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachussets.

Gilman, A. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 614–649.

Gurdon, J. (1992). The generation of diversity and pattern in animal development; *Cell*. 68: 185-199.

Gurdon, J. (1987). Embryonic induction. *Molecular prospects. Development* 99: 285-306.

Guzmán Sánchez-Fernández, S., García-Hoz, C., Benincá, C., Aragay, A. (2014). G α q signaling: The new and the old. *Cellular signaling* 26: 833-848.

Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C., Noro, C. Y., and Wylie, C. (1994). Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 79: 791-803.

Hepler, J. and Gilman A. (1992). G proteins. *Trends Biochem Sci*. Oct;17(10):383-7.

Hubbard, K., Hepler, J. Cell. (2006). Cell signalling diversity of the Gq α family of heterotrimeric G proteins. Signal. 18:135–150.

Kühl, M., Sheldahl, L., Park, M., Miller, J.R., y Moon, R.T. 2000. The Wnt/Ca²⁺ pathway: A new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. Trends Genet. 16: 279–283.

Kuriyama, S., Mayor, M. (2008). Molecular analysis of neural crest migration. Phil. Trans. R. Soc. B 363: 1349–1362.

LaBonne, C. y Bronner-Fraser, M. (2000). Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. Dev. Biol. 221: 195–205.

Le Douarin, N., Kalcheim, Chaya. (1999). The Neural Crest. Cambridge University Press. 445pp.

Li, G., Iyengar, R. (2002). Calpain as an effector of the Gq signaling pathway for inhibition of Wnt/beta-catenin-regulated cell proliferation. Proc Natl Acad Sci. 99(20):13254-9.

Lin, F., Songhai, C., Sepich, D., Ray, J., Clendenon, S., Marrs, J., Hamm, H., Solnica-Krezel, L. (2009). G α 12/13 regulate epiboly by inhibiting E-cadherin activity and modulating the actin cytoskeleton. J Cell Biol. 184(6): 909-921.

Liu, T., DeCostanzo, A., Liu X, Wang, H., Hallagan, S., Moon, R., Malbon, C. (2001) G Protein Signaling from Activated Rat Frizzled-1 to the β -Catenin-Lef-Tcf Pathway. Science 292: 1718.

Lutz, S., Shankaranarayanan, A., Coco, C., Ridilla, M., Nance, M., Vettel, C., Baltus, D., Evelyn, C., Neubig, R., Wieland, T., Tesmer, J. (2007). Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science*, 318(5858):1923-7.

Malbon, C. (2005) G proteins in development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 689-701

Maldonado R. (2010). Caracterización de la participación de XtRIC8 durante el desarrollo embrionario en *Xenopus tropicalis*. Tesis para obtener el grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática. Universidad de Concepción, Chile. 84pp.

Maldonado-Agurto, R., Toro, G., Fuentealba, J., Arriagada, C., Campos, T., Albistur, M., Henriquez, J.P., Olate, J. Hinrichs, M.V. y Torrejón, M. (2011). Cloning and Spatiotemporal expression of RIC-8 in *Xenopus* embryogenesis. *Gene Expr Patterns*, 11(7):401-8.

Marchant, L., Linker, C., Ruiz, P., Guerrero, N., and Mayor, R. (1998). The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Dev. Biol.* 198: 319–329.

Mayor, R., Morgan, R., Sargent, M. G. (1995). Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121: 767–777.

McCudden, C., Hains, M., Kimple, R., Siderovski, D. Y Willard, F. (2005). G-protein signalling: back to the future. *Cell Mol Life Sci.* 62(5):551-577.

Miller, K., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J., Johnson, C., Rand, A. (1996) A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 12593–12598

Miller K., Rand J. (2000). A Role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (Goa) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 156: 1649–1660.

Monsoro-Burq, A.H., Fletcher, R.B. and Harland, R.M. (2003). Neural crest induction by paraxial mesoderm requires FGF signals. *Development* 130: 3111-3124.

Nishimura, A., Okamoto, M., Sugawara, Y., Mizuno, N., Yamauchi, J., Itoh, H. (2006). Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells. *Genes Cells* 11:487–498.

Oka, Y., Saraiva, L., Kwan, Y., Korsching, S. (2009). The fifth class of G proteins. *PNAS*. 106: 1484-1489.

Pierce, K., Premont R., Lefkowitz R. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Sep;3(9):639-50.

Rhee, S. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Ann. Rev. Biochem.* 70:281-312.

Rizzoti, K., Paquereau, L., Shaw, A., Knibiehler, B., Audigier, Y. (1998). A constitutively activated mutant of Gαq down-regulates EP-cadherin expression and decreases adhesion between ectodermal cells at gastrulation. *Mech. Dev.* 76: 19–31.

Rojas, R., Yohe, M., Gershburg, S., Kawanos, T., Kozasa, T., Sondek, J. (2007). Gq directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated Pleckstrin homology domain. *Journal of Biological Chemistry* 282:29201:29210.

Romo, X., Pastén, P., Martínez, S., Soto, X., Lara, P., Ramírez de Arellano, A.,

Torrejón, M., Montecino, M., Hinrichs, M., Olate, J. (2008). XRic-8 is a GEF for Gsa and participates in maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 214:673-680.

Sauka-Spengler, T. y Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 557-568.

Slusarski, D. C., Corces, V.G. y Moon, R. T. (1997). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410–413.

Simões-Costa, M., Bronner, M. (2015). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development* 142, 242-257.

Simon, M., Strathmann, M., Gautam N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252:802-808.

Sive, H., Grainger, R., Harland, R. (2000). *Early Development of Xenopus laevis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 338pp.

Soto, X., Mayor, R., Torrejón, M., Montecino, M., Hinrichs, M.V., Olate, J. (2007). Gaq Negatively Regulates the Wnt-b-Catenin Pathway and Dorsal Embryonic *Xenopus laevis* Development. *Journal of Cellular Physiology* 214: 483–490.

Steventon, B., Carmona-Fontaine, C. and Mayor, R. (2005). Genetic network during neural crest induction: from cell specification to cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16: 647.

Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuryama S. y Mayor R. (2009). Differential requirements of BMP and Wnt signaling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development* 136: 771-779.

Steventon, B., Mayor R. (2012). Early neural crest induction requires an initial inhibition of Wnt signals. *Developmental Biology* 365: 196–207.

Tall, G.G., Krumins, A.M., Gilman, A.G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. *Journal of Biological Chemistry* 278: 8356–8362.

Takashima, S., Sugimoto, N., Takuwa, N., Okamoto, Y., Yoshioka, K., Takamura, M., Takata, M., Kaneko, S. y Takuwa, Y. (2008). G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase. *Cardiovasc Res.* 79:689-697

Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., y Mayor R. (2010) Collective Chemotaxis Requires Contact-Dependent Cell Polarity. *Dev Cell.* 19(1): 39–53.

Tõnisso, 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 Dynamic* 239: 3404-3415.

Toro-Tapia, G. (2016). Estudio de la función de Ric-8A y G α 13 durante la migración de las células de la cresta neural craneal en *Xenopus*. Tesis para obtener el grado de Doctorado, Universidad de Concepción. 83pp.

Vaqué, J., Dorsam, R., Feng, X., Iglesias-Bartolome, R., Forsthoefel, D., Chen, O., Debant, A., Seeger, M., Ksander, B., Teramoto, H., Gutking, J. (2013). A genome-

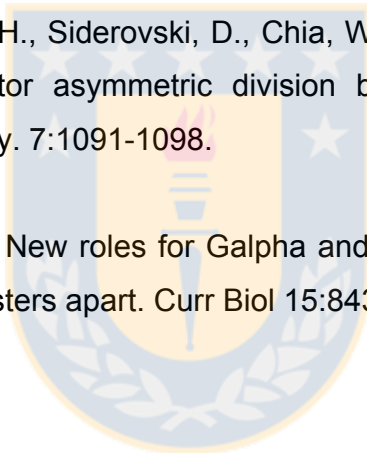
wide RNAi screen reveals a Trio-regulated RhoGTPase circuitry transducing mitogenic signals initiated by G protein-coupled receptors. *Molecular Cell* 49:94-108.

Vogt, S., Grosse, R., Schultz, G., Offermanns, S. (2003). Receptor-dependent RoA activation in G12/G13-deficient cells: genetic evidence for an involvement of Gq/G11. *J Biol Chem*, 278(31):28743-9.

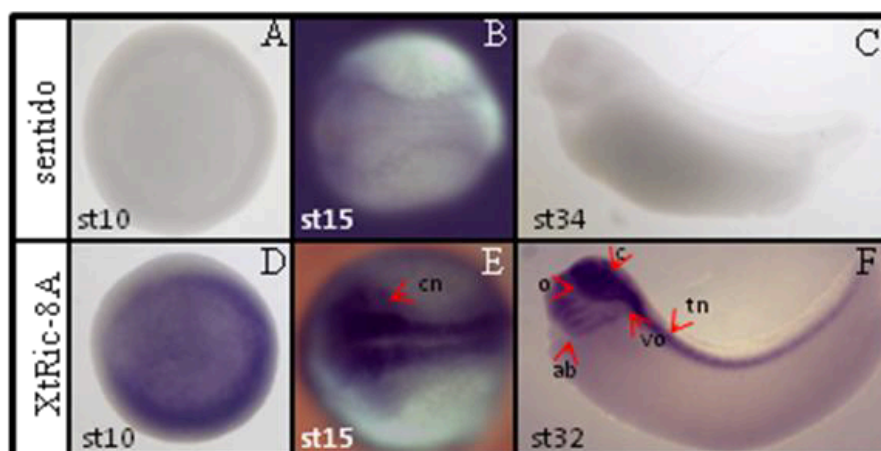
Waldo, G., Ricks, T., Hicks, S., Cheever, M., Kawano, T., Tsuboi, K., Wang, X., Montell, C., Kozasa, T., Sondek, J., Harden, T. (2010). Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C-beta and Gq signaling complex. *Science*, 330(6006):974-80.

Wang, H., Hong, K., Qian, H., Siderovski, D., Chia, W., Yu, F. (2005). Ric-8 controls *Drosophila* neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nature Cell Biology*. 7:1091-1098.

Wilkie, T, Kinch, L. (2005). New roles for Galpha and RGS proteins: communication continues despite pulling sisters apart. *Curr Biol* 15:843–854

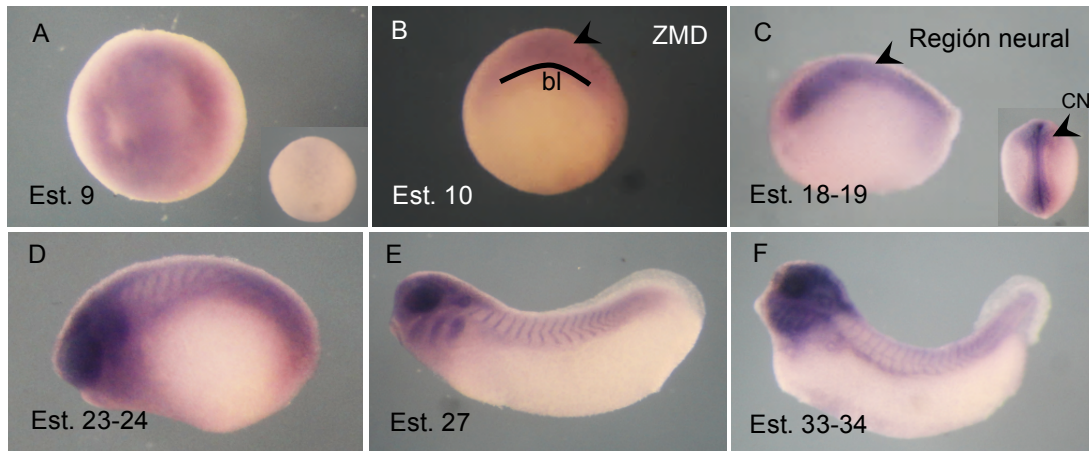


ANEXO



Anexo 1. Análisis comparativo de la expresión espaciotemporal de Ric-8A por medio de hibridación “*in situ*” a embriones completos.

Paneles (A-C) muestran controles de hibridación *in situ* utilizando la sonda sentido. Ric-8A se expresa en el mesodermo a estadios tempranos st10 (D), posteriormente se expresa en células de la cresta neural (E) y sus derivados, arcos branquiales (F). Los marcadores se muestran en el lado izquierdo de la figura y los estadios se indican abajo a la izquierda de cada panel. Para embriones en estadio 10 (A, D), se muestran vistas vegetales. Para embriones en estadio 15 (B, E) se muestran vistas dorsales. Para embriones en estadio 32 y 34, (F, C) se muestran vistas laterales. Las flechas rojas indican estructuras rotuladas de la siguiente forma: cn (cresta neural), o (ojo), tn (tubo neural), ab (arcos branquiales), vo (vesícula ótica) y c (cerebro). Maldonado-Agurto y col., 2011.



Anexo 2. Expresión de Gaq durante el desarrollo temprano de *Xenopus tropicalis*.

Se observa la expresión de Gaq en embriones *Xenopus tropicalis* a diferentes estadios del desarrollo temprano, a través de hibridaciones *in situ*. Esta expresión se localiza en la región animal a estadio 9, la cual posteriormente se especifica en la zona marginal dorsal a estadio 10. Luego, a estadios de néurula, Gaq se especifica en la región neural y cresta neural (“inset” en panel C), y en estadios posteriores, en sus derivados de crestas neurales (Fuentealba y col., 2016, publicación enviada a Gene Expression Pattern). Vistas de paneles corresponden a **(A)** polo animal, “inset” vista polo vegetal; **(B)** vista dorsal; **(C)** vista lateral, “inset” vista dorsal; **(D-F)** vista lateral del embrión. Est.: Estadio; CN: Cresta neural; bl: blastoporo.