



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

**Análisis funcional de Ric-8A en la polaridad celular  
durante la migración de la cresta neural en *Xenopus  
tropicalis***

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

JUAN IGNACIO LEAL HENRÍQUEZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2018

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 Laboratorio de Señalización y Desarrollo del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

---

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

Comisión Evaluadora:



---

Dr. Sylvain Marcellini L.  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

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

Director de Programa

---

Dra. Elena Amparo Uribe P.  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## TABLA DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Migración celular .....	1
1.2 Cresta Neural (CN) .....	3
1.2.1 Inducción y especificación .....	6
1.2.2 Migración de la cresta neural.....	7
1.2.3 Polaridad celular.....	9
1.3 Señalización mediada por proteína G heterotrimérica .....	12
1.4 Proteína G heterotrimérica durante la migración celular .....	13
1.5 Ric-8, un GEF no-canónico para proteínas G heterotriméricas ..	14
1.6 Función de Ric-8A.....	16
<b>2 HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	18
3.1 Objetivo general .....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
<b>4 MATERIALES</b> .....	19
4.1 Reactivos y Soluciones .....	19
4.2 Enzimas .....	22
4.3 Plásmidos.....	22
4.4 Medios de cultivo .....	23
4.5 Oligonucleótidos.....	23
4.5.1 Oligonucleótidos de ADN.....	23
4.5.2 Oligonucleótidos Morfolino .....	24
4.6 Anticuerpos y Fluoróforos .....	24

<b>5</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	25
5.1	Manipulación de animales y técnicas embriológicas.....	25
5.1.1	Obtención de embriones de <i>Xenopus tropicalis</i> .....	25
5.1.2	Microinyección de embriones .....	26
5.1.3	Fijación de embriones.....	27
5.1.4	Hibridación <i>in situ</i> .....	28
5.1.5	Explantes de Crestas Neurales Craneales .....	29
5.1.6	Localización espacio-temporal de la actividad de RhoA y Rac1 .....	30
5.2	Técnicas de Biología Molecular .....	31
5.2.1	Electroforesis en gel de Agarosa.....	31
5.2.2	Construcción del plásmido pCS2+RhoA-FRET .....	31
5.2.3	Purificación de ADN plasmidial a gran escala por Maxiprep.....	34
5.2.4	Secuenciación .....	35
5.2.5	Síntesis de sonda y ARN mensajero in vitro.....	35
5.3	Técnicas de Biología Celular.....	36
5.3.1	Cultivo celular .....	36
5.3.2	Transfección de cultivos celulares con Lipofectamina.....	37
5.3.3	Inmunocitoquímica .....	38
5.3.4	Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).....	38
5.3.5	Reducción de autofluorescencia.....	41
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	42
6.1	Ric-8A no es requerida para la TEM .....	42
6.2	Ric-8A regula la polaridad celular .....	44
6.3	Análisis espaciotemporal de la actividad de Rac1 y RhoA por FRET.....	46
6.3.1	Estandarización del método FRET en células HeLa .....	47
6.3.2	Sensibilidad del método FRET frente a activadores.....	49
6.3.3	La expresión de los biosensores FRET no afecta la inducción y migración de la CN en <i>Xenopus</i> .....	51

6.3.4	Autofluorescencia de las células de CN impiden realizar FRET en este modelo celular .....	53
6.4	Detección de las proteínas G pequeñas Rac1 y RhoA activas con sondas a base de proteínas de fusión .....	56
6.4.1	Efecto de las sondas sobre la inducción y migración de CN de <i>Xenopus</i> .....	57
6.4.2	Ric-8A controla la localización de Rac1 y RhoA activadas durante la migración de CN en <i>Xenopus</i> .....	59
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>72</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Formación de la Cresta Neural .....	5
<b>Figura 2:</b>	Actividad espaciotemporal de RhoA y Rac1 establece la polaridad celular.....	11
<b>Figura 3:</b>	Ciclo de activación y desactivación de proteínas G heterotriméricas .....	15
<b>Figura 4:</b>	Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET)	39
<b>Figura 5:</b>	Ric-8A no regula el cambio de cadherinas durante la TEM..	43
<b>Figura 6:</b>	Los niveles de Ric-8A regulan la localización de marcadores de polaridad .....	45
<b>Figura 7:</b>	GSK3 $\beta$ incrementa la actividad de Rac1 y RhoA en células HeLa. ....	48
<b>Figura 8:</b>	Activación específica de Rac1 y RhoA en células HEK 293T	50
<b>Figura 9:</b>	Sobreexpresión de biosensores de Rac1 y RhoA no afecta la inducción y migración de CN de <i>Xenopus tropicalis</i> .....	52
<b>Figura 10:</b>	Autofluorescencia en células de cresta neural de <i>Xenopus</i> ..	55
<b>Figura 11:</b>	Sobreexpresión de las sondas pGBD-GFP y rGBD-mCherry no afectan la inducción ni la migración de la CN .....	58
<b>Figura 12:</b>	Cambios en los niveles de expresión de Ric-8A afectan la localización de Rac1 activa.....	60
<b>Figura 13:</b>	La pérdida y ganancia de función de Ric-8A afecta la invasión celular mediada por Rac1 .....	61
<b>Figura 14:</b>	Cambios en los niveles de expresión de Ric-8A afectan la localización de RhoA activa .....	63
<b>Figura 15:</b>	Ric-8A controla la polaridad celular durante la migración de CNC .....	70

## ABREVIATURAS

<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>aPKC:</b>	Proteína quinasa C atípica
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm:</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BMP:</b>	Proteína morfogenética del hueso
<b>BSA:</b>	Albúmina del suero de Bovino
<b>CFP:</b>	Proteína cian fluorescente
<b>CIL:</b>	Inhibición de la locomoción por contacto
<b>CN:</b>	Cresta neural
<b>CNC:</b>	Cresta neural craneal
<b>CoA:</b>	Co-atracción
<b>DFA:</b>	“Danilchik's for Amy”
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA:</b>	Ácido etilen-diamino-tetracético
<b>FAK:</b>	Quinasa de adhesión focal
<b>FBS:</b>	Suero fetal bovino
<b>FGF:</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FRET:</b>	Transferencia de energía de resonancia de Förster
<b>GAP:</b>	Proteína activadora de GTPasas
<b>GDI:</b>	Proteína inhibidora de la disociación de nucleótidos de guanina
<b>GDP:</b>	Guanosina 5'-difosfato
<b>GEF:</b>	Proteína factor intercambiador de nucleótidos de guanina
<b>G<math>\alpha</math>:</b>	Subunidad $\alpha$ de proteína G heterotrimérica
<b>GPCR:</b>	Receptor Acoplado a Proteína G
<b>GTP:</b>	Guanosina 5'-trifosfato
<b>GTPasa:</b>	Guanosina trifosfatasa
<b>HCG:</b>	Gonadotrofina coriónica humana

<b>HEPES:</b>	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico
<b>L15:</b>	“Leibovitz 15”
<b>LB:</b>	“Luria-Bertani”
<b>MAB:</b>	Ácido maleico tamponado
<b>MEC:</b>	Matriz extracelular
<b>MEMFA:</b>	Minimum Essential Medium-Formaldehyde
<b>MO:</b>	Morfolino
<b>MR:</b>	“Modified Ringer’s solution”
<b>MTOC:</b>	Centro organizador de microtúbulos
<b>NBT/BCIP:</b>	Nitro Blue Tetrazolium/ 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
<b>Par3:</b>	Partición defectiva 3
<b>PBS:</b>	Amortiguador salino fosfato
<b>PCP</b>	Polaridad celular planar
<b>PEG:</b>	Polietilenglicol
<b>PMSF:</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PTw:</b>	PBS, Tween-20
<b>Ric-8:</b>	Proteínas de resistencia a inhibidores de la colinesterasa 8
<b>ROCK:</b>	Quinasa asociada a Rho
<b>Sdf1:</b>	Factor derivado de estroma 1
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SSC:</b>	Citrato sodio salino
<b>TAE:</b>	Solución amortiguadora de Tris base, Ácido acético y EDTA
<b>TE:</b>	Amortiguador Tris-HCl – EDTA
<b>TEM:</b>	Transición Epitelio Mesenquimal
<b>YFP:</b>	Proteína amarilla fluorescente
<b>Wnt:</b>	“Wingless-Type”



## RESUMEN

La cresta neural (CN) es una población celular embrionaria transitoria, pluripotencial y característica de vertebrados, que migra extensivamente durante el desarrollo embrionario. Se ha demostrado que Ric-8A, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) para diferentes subunidades  $G\alpha$  heterotriméricas, regula la migración celular de la CN craneal (CNC) en *Xenopus* mediante mecanismos que permanecen aún por dilucidar.

Para migrar apropiadamente, las células de la CNC establecen un eje de polarización y se someten a cambios morfológicos para generar protrusiones en el borde director y retracción en la zona posterior. Este remodelamiento del citoesqueleto durante la migración es regulado por proteínas de la familia Rho GTPasas, las cuales requieren activación localizada y específica para regular la reorganización del citoesqueleto de actina y la contractibilidad de la actomiosina en las células que migran de forma direccionada. En esta tesis, nos propusimos estudiar el rol de Ric-8A en la polaridad durante la migración de las células de la CNC. Para ello, se evaluó el efecto de la pérdida y ganancia de función de Ric-8A sobre la localización espaciotemporal de Rac1 y RhoA activadas, y sobre la localización de las proteínas marcadoras de polaridad aPKC y Par3.

Demostramos que las proteínas aPKC y Par3 pierden su localización con el silenciamiento de Ric-8A. Por otro lado, las proteínas Rac1 y RhoA activadas cambiaban su localización cuando se silencia o sobreexpresa Ric-8A. Por lo que los niveles de Ric-8A son críticos durante la migración y afectan la localización tanto de los marcadores de polaridad como de la localización subcelular de la actividad de las Rho GTPasas, sugiriendo que Ric-8A, probablemente a través de señalización mediada por proteína G heterotrimérica, regula la polaridad celular durante la migración de CNC.

## ABSTRACT

The neural crest (NC) is a pluripotent and transient embryonic cell population, characteristic of vertebrates, that migrates extensively during embryonic development. It has been shown that Ric-8A, a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for different G $\alpha$  subunits regulates cranial NC (CNC) cell migration in *Xenopus* through a mechanism that still remains to be elucidated.

To properly migrate, CNC cells establish an axis of polarization and undergo morphological changes to generate protrusions at the leading edge and retraction of the cell rear. This cytoskeleton remodeling during cell migration is regulated by Rho GTPase proteins, which are required spatio-temporal activated to regulate actin polymerization and actomyosin contractibility in cells that migrate in a directed way. In this thesis we aim to study the role of Ric-8A in cell polarity during CNC cell migration. For this, we evaluated the effect of the loss and gain of function of Ric-8A on the spatio-temporal localization of active Rac1 and RhoA, and on the localization of cell polarity marker proteins aPKC and Par3.

We showed that the proteins aPKC and Par3 lose their localization with the silencing of Ric-8A. On the other hand, active Rac1 and RhoA proteins changed their location when Ric-8A is silenced or overexpressed. Therefore, Ric-8A levels are critical during migration and affect the localization of polarity markers and the subcellular localization of Rho GTPase activity, suggesting that Ric-8A, probably through heterotrimeric G-protein signaling, regulates cell polarity during CNC migration.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Migración celular

La migración celular es un proceso fundamental tanto en el desarrollo embrionario como a lo largo de la vida del organismo. Lograr comprender los mecanismos moleculares implicados en la migración es de suma importancia, debido a que participa en procesos como la morfogénesis, la respuesta inmune y la reparación de tejidos, y su desregulación está implicada en diversas enfermedades, incluyendo enfermedades vasculares, enfermedades inflamatorias crónicas, neurocristopatías, y procesos de invasión y metástasis en la enfermedad del cáncer [Chang y col., 2013; Mayor y Etienne-Manneville, 2016; Ridley y col., 2003; Trainor, 2010; Vedula y col., 2013]. Las células migran *in vitro* e *in vivo* como células individuales o como grupos, esta última se denomina migración colectiva [De Pascalis y Etienne-Manneville, 2017; Friedl y Mayor, 2017]. A su vez, para migrar a través de los tejidos, las células a menudo tienen que degradar la matriz extracelular (MEC), y generar estructuras especializadas conocidas como invadopodia y podosomas [Paterson y Courtneidge, 2017].

Varios estudios han demostrado que los filamentos de actina y microtúbulos son reguladores maestros de la forma y movilidad celular, regulando las protrusiones celulares en el borde director y las adhesiones con la MEC, que son pasos esenciales para la migración celular [Etienne-Manneville, 2013; Le Clainche y Carlier, 2008]. El remodelamiento del citoesqueleto durante la migración es regulada por proteínas G pequeñas de la familia Rho, principalmente Rac1, Cdc42 y RhoA, que controlan la polaridad celular, la polimerización de la actina, y la contractibilidad de la actomiosina [Rodríguez y col., 2003]. Para que el proceso sea eficiente ocurren múltiples y coordinados pasos de interacciones regulatorias, ya que requiere una determinada

localización y activación para cada una de las GTPasas [Donnelly y col., 2014]. Esta activación espaciotemporal está dada por la capacidad de las Rho GTPasas de actuar como interruptores que ciclan entre su estado activo e inactivo. Como toda proteína G, las Rho GTPasas inicialmente interactúan con su GEF (factor intercambiador de nucleótidos de guanina), activándose mediante el intercambio de GDP por GTP, para posteriormente actuar sobre su efector blanco, y finalmente, con su GAP (proteína activadora de GTPasas) que le permite hidrolizar el GTP devolviéndola a su estado inactivo [Lawson y Ridley, 2018].

Entre esta familia de GTPasas de la familia Rho, la proteína Cdc42 ha sido descrita como un regulador maestro de la polaridad mediante el reclutamiento del complejo proteico, Par6/Par3/aPKC. Este complejo posiciona el centro organizador de microtúbulos (MTOC), y la localización del aparato de Golgi cerca del núcleo hacia el borde director, promoviendo el crecimiento de microtúbulos hacia el lamelipodio y la liberación de vesículas que contienen las proteínas requeridas para regular la migración [Etienne-Manneville y Hall, 2003; Lawson y Ridley, 2018; Ridley y col., 2003]. La activación de Rac1 está relacionada con la formación de lamelipodios y de *ruffles* (surcos de membrana) mediante la activación de proteínas río abajo, tales como WAVE y Arp2/3, y de esta manera, promoviendo la polimerización de filamentos de actina hacia el borde director [Parri y Chiarugi, 2010]. Además, RhoA activa a ROCK (Proteína quinasa asociada a Rho), la cual fosforila a RLC (cadena liviana regulatoria de miosina), controlando las fibras de estrés para regular la contracción celular y la formación de adhesiones focales [Parri y Chiarugi, 2010; Spiering y Hodgson, 2011]. Cabe destacar que, las tres Rho GTPasas se regulan entre sí, por lo que Cdc42 activa Rac1, que inhibe RhoA y viceversa [Spiering y Hodgson, 2011]. En la actualidad, el estudio de Rho GTPasas ha progresado considerablemente debido al desarrollo de biosensores capaces de determinar la activación espaciotemporal de las proteínas G pequeñas en células vivas [Donnelly y col., 2014].

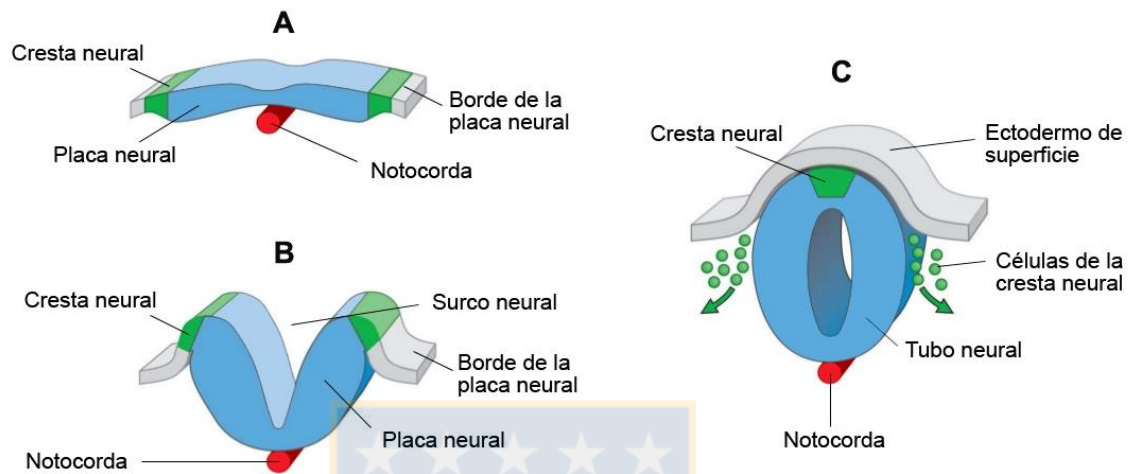
## 1.2 Cresta Neural (CN)

En los últimos años, uno de los modelos más utilizados para entender cómo ocurre la migración celular *in vivo* es la Cresta Neural, debido tanto a su importancia durante el desarrollo embrionario, como por su similitud con la progresión tumoral [Barriga y col., 2013; Gallik y col., 2017; Kelleher y col., 2006; Mayor y Theveneau, 2013]. El desarrollo embrionario temprano es similar en los organismos vertebrados, por lo cual, para su estudio suelen utilizarse distintos modelos animales, como lo es *Xenopus*, un modelo anfibio altamente utilizado por sus características ventajosas, como la fertilización externa de cientos de huevos, rápido desarrollo embrionario y gran tamaño celular que facilita la manipulación de los embriones y la extracción de sus tejidos [Gilbert, S. F. 2013].

La Cresta Neural (CN) es un tejido embrionario transitorio, pluripotencial y característico de vertebrados. Esta población celular se forma entre el neuroectodermo y el ectodermo 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, estas células sufren lo que se conoce como Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM) para luego migrar extensamente (Fig. 1C), y diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares, como neuronas y células gliales en el sistema nervioso periférico, el tejido conectivo de estructuras cráneo-faciales, células pigmentadas de la piel, tejido muscular liso, cartílago y hueso [Fuentealba J., 2012; Le Douarin y Kalcheim, 1999; Steventon y col., 2009]. Debido a la amplia migración de este tipo celular a lo largo de todo el cuerpo del embrión, las células

de la CN pueden ser divididas en 4 tipos principales según sus regiones anatómicas, cada una de ellas con características funcionales diferentes: las CNs craneales (CNC), las CNs cardíacas, las CNs troncales, y las CNs sacral-vagales [Gilbert, S. F. 2013, Theveneau, E., y Mayor, R, 2012a]. Dentro de este trabajo de tesis sólo se estudiaron las CNC, las cuales migran para producir la mesénquima craneofacial, que se diferencia a cartílago, hueso, neuronas craneales, glía, células pigmentadas, y tejido conectivo de la cara [Hall, 2008].





**Figura 1: Formación de la Cresta Neural.**

Diagrama que muestra una sección transversal de un embrión de vertebrados en etapa de néurula. **(A)** El proceso de inducción de la cresta neural se origina en el borde de la placa neural por medio de señales moleculares provenientes 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 dando forma al surco neural **(B)**, y finalmente se fusionan permitiendo el cierre del tubo neural **(C)**, donde ocurre la TEM, y la posterior migración de las células de la cresta neural por todo el embrión [Gilbert, 2013].

### 1.2.1 Inducción y especificación

La inducción de la CN es el proceso por el cual las células del ectodermo reciben señales de los tejidos adyacentes para convertirse en células precursoras de la CN. Principalmente, ocurre durante la gastrulación temprana, en el borde entre la placa neural (ectodermo neural), y la epidermis (ectodermo no-neural) [Hall, 2008]. Diferentes estudios realizados en *Xenopus*, pollo y pez cebra han identificado que en la inducción de la CN participan señalizaciones de la vía BMP, Wnts y FGF, siendo importantes tanto el tiempo como el gradiente producido por ellas para llevar a cabo la correcta formación de las CN [LaBonne y Bronner-Fraser, 2000; Milet y Monsoro-Burq, 2012; Steventon y col., 2009; Steventon y Mayor, 2012]. Estas mismas moléculas regulan 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 son 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 especificadores de la CN, entre los se encuentran: *foxD3*, *sox9*, *sox10*, *snail*, *snail2 (slug)* y *twist* [Steventon y col., 2009]. Estos factores de transcripción se expresan en etapas de inducción y/o migración, permiten a las células adquirir características de CN y, por lo tanto, suelen utilizarse como marcadores para este tipo de tejidos [Aybar y col., 2003; Milet y Monsoro-Burq, 2012]. Mediante ensayos de explantes provenientes desde embriones de *Xenopus*, se ha determinado que la expresión de *snail1* no se especificaría sino hasta estadio 12, mientras que *snail2* se especifica a tiempos posteriores durante la neurulación [Mayor y col., 1995]. Es por ello que, durante este trabajo, hemos utilizado al marcador molecular *snail2 (slug)* como un marcador específico de crestas neurales, el cual nos permitió estudiar el proceso de inducción y migración de este mismo tejido.



## 1.2.2 Migración de la cresta neural

Las células de la CN adquieren una gran capacidad migratoria luego de sufrir un proceso denominado transición epitelio-mesénquimal (TEM), durante el cual las células epiteliales se transforman en células mesenquimales, y de esta forma inician la delaminación del epitelio. Esto ocurre en la zona más dorsal del tubo neural, donde cambian su patrón de expresión génica y fenotipo para adquirir las características necesarias para iniciar la migración a zonas mesodermales [Aybar y col., 2003; Bronner-Fraser y Saika-Aoyama, 2008; Kuriyama y Mayor., 2008; Strobl-Mazzulla y Bronner, 2012]. La TEM requiere la actividad coordinada de diferentes factores de transcripción y vías de transducción de señales que permiten generar cambios en la morfología, polaridad celular, y en la adhesión celular [Clay y Halloran, 2011; Kuriyama y Mayor 2008]. La GTPasa RhoA participa en el proceso de delaminación en las CN aviares, la cual a través de ROCK modula tanto las fibras de estrés como las adhesiones focales [Groysman y col., 2008; Liu y Jessell, 1998]. Además, también se ha observado la expresión de varias metaloproteinasas (MMPs), 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 [Alfandari y col., 2010; Kuriyama y Mayor, 2008]. La migración de la CNC es colectiva, por lo que no existe la pérdida total de adhesiones célula-célula al momento de migrar, sino que hay un recambio de E-cadherina por N-cadherina, disminuyendo así la adhesividad célula-célula, con lo cual se pierde la polaridad apico-basal y se aumenta la movilidad [Becker y col., 2013; Nandadasa y col., 2009; Scarpa y col., 2015; Theveneau y Mayor, 2012a]. En *Xenopus*, la cresta neural craneal (CNC) aparece durante la gastrulación, y su migración comienza alrededor del estadio 19 del desarrollo según Nieuwkoop P. y Faber J. (1994). Las CNC migran en sentido dorso-

lateral, separándose entre ellas a través de tres rutas migratorias: mandibular, hioidea y branquial [Gilbert, 2013; Le Douarin y Kalcheim, 1999].

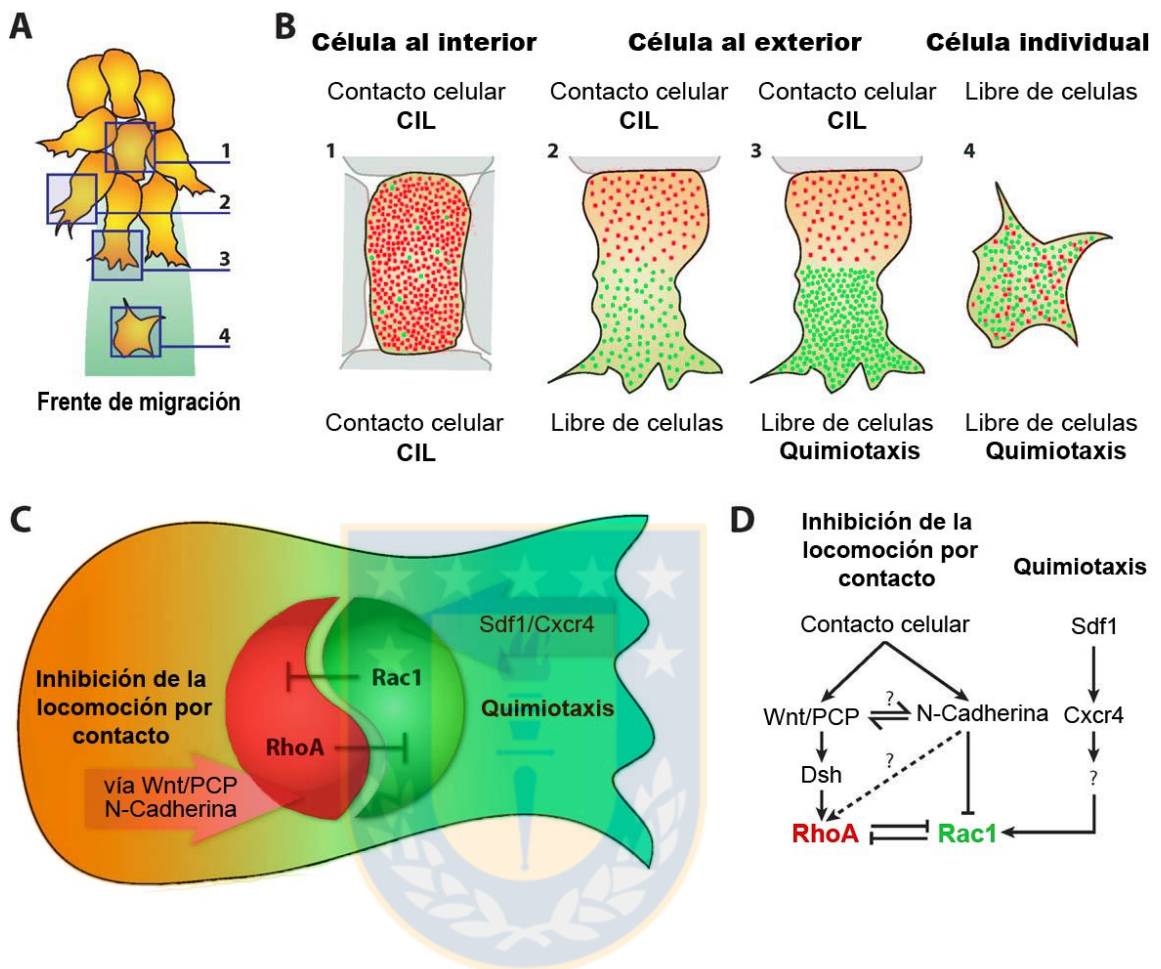
Para una eficiente migración de las células de la CNC a través de sus tres rutas, las células integran señales intracelulares y extracelulares [Gilbert, 2013; Kuriyama y Mayor., 2008; Theveneau y Mayor, 2012b]. La señalización molecular le proporciona direccionalidad a la migración consistente en señales positivas y negativas que están presentes a lo largo de las rutas preestablecidas por donde las células han de migrar. Las señales negativas, que restringen el paso de la CN a zonas específicas del embrión, son efrinas y semaforinas, como *Eph*, *neuropilinas/plexinas*, *versican*, etc. [Gammill y col., 2007; Kuriyama y Mayor, 2008; Theveneau y Mayor, 2011; Szabó y col., 2016]. En cambio, las señales positivas de la migración promueven la movilidad grupal e individual, donde se encuentran componentes de la matriz extracelular y quimioatrayentes, que son los encargados de conducir las células de la CN hacia lugares específicos. Las células de la CNC responden a gradientes de la quimioquina Sdf1 (Factor derivado del estroma 1), ya que expresan el receptor Cxcr4 (Receptor acoplado a proteína G heterotrimérica). Particularmente en *Xenopus*, la señalización del par quimiotáctico Sdf1/Cxcr4 es esencial para la migración de este tipo celular y fuentes locales de Sdf1 son suficientes para atraer a las células de la cresta neural *in vivo* e *in vitro* [Theveneau y col., 2010]. Las células de la placoda, un tejido epitelial adyacente a la CNC, son la fuente de Sdf1 *in vivo*, y se ha descrito que ambos tejidos en conjunto presentan un mecanismo llamado “Chase and Run”, en el que las CNC son atraídas por las placodas vía quimiotaxia, y a su vez las placodas se repelen alejándose de la CNC [Szabó y Mayor, 2015; Theveneau y col., 2013].

### 1.2.3 Polaridad celular

Las células de la CN deben estar polarizadas para poder migrar de forma direccionada. Se han descrito al menos dos mecanismos por los cuales estas células pueden migrar grupalmente: la inhibición de la locomoción por contacto (CIL) y la co-atracción (CoA) [Theveneau y Mayor, 2012b]. La **CIL** consiste en el colapso de las protrusiones y repolarización después del contacto con otra célula mediante colisiones, restringiendo las protrusiones hacia el espacio libre de células [Mayor y Carmona-Fontaine, 2010; Theveneau y Mayor, 2011]. Es el principal mecanismo por el cual las células de la CNC llevan a cabo su migración en ausencia de señales externas. Cuando hay alta densidad celular, se forman protrusiones hacia los extremos libres generando migración hacia afuera del grupo en forma de dispersión radial (Fig. 2) [Carmona-Fontaine y col., 2008; Mayor y Carmona-Fontaine, 2010; Mayor y Theveneau, 2013]. Componentes de la vía Wnt no canónica/PCP (Polaridad Celular Planar), como Frizzled-7 (Fz-7) y Dishevelled (Dsh), serían factores claves y esenciales para CIL en la cresta neural, ambas proteínas están localizadas en los puntos de contacto con células vecinas, provocando la activación de RhoA en el borde posterior-lateral de las células durante la migración [Carmona-Fontaine y col., 2008]. También N-cadherina es esencial para CIL, y participa en la activación de RhoA en el contacto célula-célula [Theveneau y Mayor, 2010]. Por otro lado, la **CoA** (Co-Atracción), es el mecanismo por el cual las células se mantienen en grupos cohesivos y permiten contrabalancear la tendencia natural de dispersión de las células provocado por CIL [Carmona-Fontaine y col., 2011]. Las CNC son co-atraídas debido a que las mismas células secretan el fragmento del complemento C3a y a la vez expresan al receptor C3aR (Receptor acoplado a proteína G heterotrimérica), los cuales activan a Rac1, formando protrusiones en dirección al grupo celular. Cuando este mecanismo es bloqueado, interrumpe los movimientos coordinados y colectivos de estas células,

perdiendo la capacidad de responder eficientemente a las señales extracelulares [Carmona-Fontaine y col., 2011]. Modelos computacionales demuestran que, en conjunto, los mecanismos opuestos de CIL y CoA son suficientes y necesarios *in silico* para generar la migración direccional efectiva por las corrientes migratorias, las cuales además pueden interactuar con tejidos específicos y señales permisivas que contribuyen a una migración de largo alcance [Woods y col., 2014].

En las células de la CNC, durante el establecimiento de la polaridad celular y la formación de protrusiones, Rac1 está activo en la zona anterior promoviendo la formación de lamelipodios y estabilización de protrusiones celulares, mientras que la actividad RhoA se encuentra en la parte posterior involucrada en la contracción celular y controlando la formación de fibras de estrés [Shoval y Kalcheim, 2012; Theveneau y Mayor, 2010]. Por lo tanto, la activación local de pequeñas GTPasas representa una lectura útil para estudiar la polaridad celular durante la migración [Clay y Halloran, 2011; Spiering y Hodgson, 2011]. El proceso de CIL se ha relacionado con la activación de RhoA y la inhibición de las protrusiones por inactivación de la proteína Rac1 [Carmona-Fontaine y col., 2008]. Además, la proteína Trio, GEF de Rac1, es inhibido por Par3 en el contacto célula-célula contribuyendo al CIL [Moore y col., 2013]. Trio además es regulado por cadherina-11, estimulando la actividad de Rac1 hacia las protrusiones reforzando la polaridad celular [Kasef y col., 2009]. Por otro lado, se ha descrito en CN aviar, que la inhibición de Rho/ROCK *in vivo* e *in vitro* estimula la formación de lamelipodios, corroborando la acción antagónica existente entre la actividad RhoA y Rac1 [Shoval y Kalcheim, 2012].



**Figura 2: Actividad espaciotemporal de RhoA y Rac1 establece la polaridad celular.**

(A) Crestas neurales migran colectivamente hacia un gradiente de quimioattractante, los números se refieren a las células mostradas en B. (B) Distribución de la actividad RhoA (rojo) y Rac1 (verde) en la célula de cresta neural rodeada por otras células {1}, cuando están en contacto por un borde y libre por el otro {2 y 3}, y cuando la célula está individual {4}. La quimiotaxis refuerza la polaridad celular {3}, pero es incapaz de producirla por sí sola {4}. (C) Relación antagónica entre RhoA y Rac1 en la polaridad celular. (D) Cascada de señalización controlando a RhoA y Rac1 mediante quimiotaxis e inhibición de locomoción por contacto [Adaptado de Theveneau y Mayor, 2011].

### 1.3 Señalización mediada por proteína G heterotrimérica

Las proteínas G heterotriméricas se encuentran formadas por tres subunidades, denominadas  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ , y estas tienen diferentes parálogos, los que presentan distintas propiedades regulatorias. En mamíferos, por ejemplo, se conocen 20 subunidades  $G\alpha$ , 5  $G\beta$ , y 12  $G\gamma$  diferentes, que se asocian en distintas combinaciones para generar una población variada de proteínas G heterotriméricas y obtener así una respuesta celular específica frente a distintos estímulos externos [Birnbaumer, 2007]. Los sistemas de transducción de señales, mediados por proteínas G heterotriméricas, interpretan y propagan señales externas a través de complejos proteicos asociados a la membrana plasmática. Están compuestos por el receptor, una proteína G transductora de la señal y un efector, que es el sistema que amplifica la señal [Birnbaumer, 2007; Offermanns, 2003]. Cuando a un receptor acoplado a proteína G se le une su ligando específico, ocurre un cambio conformacional en su dominio intracelular que desencadena el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$  junto con la disociación del heterotrímero (activación canónica de la proteína G). El resultado de la disociación son dos especies activas,  $G\alpha$ -GTP y  $G\beta\gamma$ , capaces de regular la actividad de distintos efectores [Goldsmith & Dhanasekaran, 2007]. La señalización se acaba por la hidrólisis de GTP a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad  $G\alpha$ .  $G\alpha$ -GDP luego se vuelve a asociar con  $G\beta\gamma$ , volviendo a conformarse un heterotrímero inactivo (Fig. 3) [Sato y col., 2006]. Las subunidades  $G\alpha$  en mamíferos se agrupan en cinco subfamilias ( $G_{ai/o}$ ,  $G_{aq}$ ,  $G_{\alpha 12/13}$ ,  $G_{as}$  y  $G_{av}$ ), diferenciándose entre ellas en la identidad de secuencias y la especificidad por proteínas efectoras [Oka y col., 2009; Oldham y Hamm, 2008].

Por otra parte, existen otras proteínas que son capaces de regular la actividad de la proteína G heterotrimérica de forma independiente del receptor



[Miller y col., 2000]. Entre ellas existen proteínas accesorias denominadas Factores Intercambiadores de Nucleótidos de Guanina (GEF), que son los encargados de inducir el cambio de GDP por GTP, promoviendo así la activación de la subunidad  $G\alpha$  de la proteína G. Estos activadores de proteína G constituyen lo que llamamos GEF no-canónicos, entre los cuales destaca la proteína citosólica Ric-8 [Miller y col., 2000; Pierce y col., 2002].

#### **1.4 Proteína G heterotrimérica durante la migración celular**

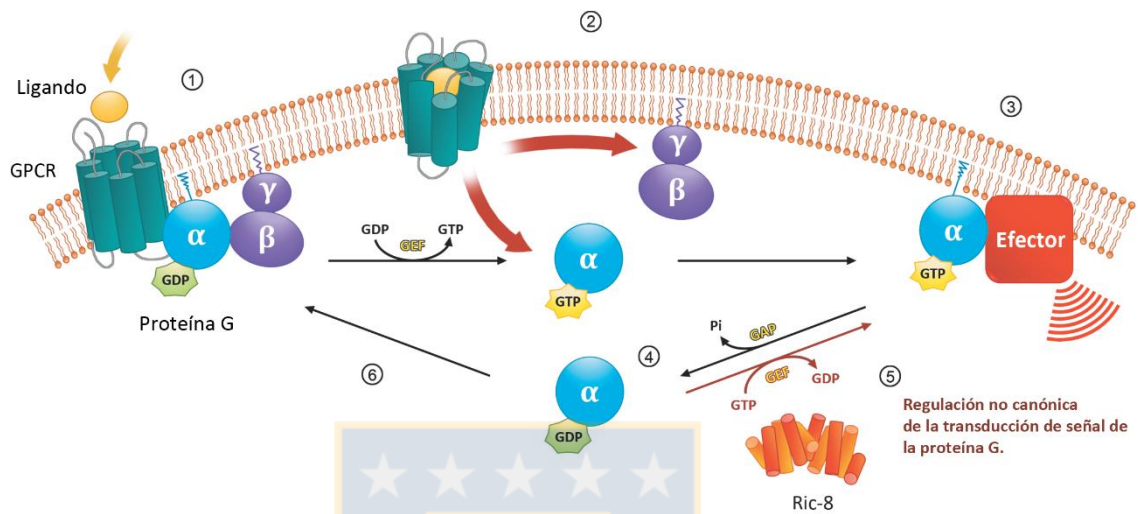
El remodelamiento del citoesqueleto durante la migración celular es controlado por una gran variedad de proteínas celulares [Theveneau y Mayor, 2013]. Cuatro de las cinco familias de proteínas G heterotriméricas ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i/o$ ,  $G\alpha_q/11$  y  $G\alpha_{12/13}$ ) se han visto involucradas en la migración de distintos tipos celulares, donde efectores de las distintas cascadas de señalización acaban activando o inhibiendo a miembros de la familia de las proteínas Rho GTPasas, regulando así la remodelación del citoesqueleto durante el movimiento celular [Cotton y Claing, 2009]. Las familias de proteínas G más estudiadas en el proceso de migración corresponden a  $G\alpha_{12/13}$  y  $G\alpha_i/o$ . Ambas familias se han vinculado a la migración y dispersión de células del sistema inmune, como también en el caso particular de  $G\alpha_{12/13}$  en el proceso de gastrulación (epibolia) en el pez cebra [Lin y col., 2005]. Para el caso del sistema inmune, por un lado,  $G\alpha_{12/13}$  se ha descrito en la migración de neutrófilos y leucocitos [Kelly y col., 2007], mientras que por otro lado se ha relacionado a la familia de las proteínas  $G\alpha_i$  con la migración quimiotáctica en leucocitos y macrófagos. Específicamente se ha asociado al subtipo  $G\alpha_i2$  (el más abundante en sistema inmune) regulando la polarización en respuesta a diferentes quimioattractantes, paso necesario para la reorganización del citoesqueleto durante la migración de macrófagos [Wiege K. y col., 2012]. Además,  $G\alpha_o$  es requerida para la migración de neuronas entéricas, donde los niveles de expresión de la proteína se relacionan directamente con los

periodos de migración durante el desarrollo embrionario de *M. sexta* [Horgan y col., 1994]. Por otro lado, se han descrito receptores de proteína G heterotrimérica (GPCR) participando activamente en la migración de las CNC, tales como Cxcr4 y C3aR, sin embargo, se desconoce la cascada de señalización completa de estas dos vías [Carmona-Fontaine y col., 2011; Theveneau y col., 2010].

### 1.5 Ric-8, un GEF no-canónico para proteínas G heterotriméricas

La proteína citosólica Ric-8 (Resistencia a los Inhibidores de la Colinesterasa 8) es un GEF para G $\alpha$ -GDP conservado evolutivamente y participa en vías de señalización dependiente e independiente de GPCR [Nishimura y col., 2006; Tall y col., 2003]. Ric-8 actúa como intercambiador de nucleótidos de guanina cuando G $\alpha$ -GDP está disociada del heterotrímico, hecho que la diferencia de otros activadores (Fig. 3) [Tall y col., 2003]. En mamíferos se han descrito dos genes parálogos para Ric-8, estos son Ric-8A y Ric-8B. Se ha descrito que Ric-8A presenta actividad GEF para G $\alpha_i$ , G $\alpha_q$  y G $\alpha_{12/13}$ , mientras que Ric-8B tiene mayor afinidad por G $\alpha_s$  y G $\alpha_q$  [Romo y col., 2008; Tall y col., 2003]. En humanos, la transcripción de Ric-8B es regulado por CREB y C/EBP, que se unen a sitios funcionales del promotor [Maureira y col., 2016]. En *Xenopus* se ha identificado solo una proteína Ric-8, con mayor similitud a Ric-8A, por lo que se ha denominado como tal, esta se expresa como ARNm materno en el ovocito, y conforme avanza el desarrollo se expresa en el polo animal, luego el mesodermo y, posteriormente, su expresión es restringida al tubo neural, cerebro y estructuras derivadas de la cresta neural [Maldonado-Agurto y col., 2011]. Se sabe que Ric-8A es importante en la embriogénesis debido a que embriones de ratones knock-out para Ric-8 (homocigotos -/-) no son viables y mueren en etapas tempranas durante el desarrollo [Tõnissoo y col., 2006].





**Figura 3: Ciclo de activación y desactivación de proteínas G heterotriméricas.**

{1} El sistema inactivo se compone del heterotrímero, formado por  $G\alpha$ -GDP unida al dímero  $G\beta\gamma$ , y por un receptor de membrana acoplado a la proteína G (GPCR). Cuando el GPCR une su ligando, sufre un cambio conformacional en la región intracelular induciendo su actividad GEF sobre la subunidad  $G\alpha$ -GDP, activando el sistema con la disociación de  $G\alpha$ -GTP y el dímero  $G\beta\gamma$  {2}.  $G\alpha$ -GTP puede activar sus efectores y amplificar la señal {3}. Mediante la actividad GTPasa intrínseca que posee  $G\alpha$ , esta hidroliza el GTP, produciendo su disociación de sus efectores {4}. Sobre  $G\alpha$ -GDP disociado actúa Ric-8, el cual vuelve a activar  $G\alpha$  con su actividad GEF para que continúe la activación de los efectores {5}. Sin embargo, luego de que  $G\alpha$ -GDP se disocie del efector, este tiende a unirse nuevamente al dímero  $G\beta\gamma$  y formar el heterotrímero inactivo unido al GPCR {6}. [Hinrichs y col., 2012; Leal J. I., Tesis de pregrado, 2015].

## 1.6 Función de Ric-8A

Entre algunas de las funciones de Ric-8, se ha descrito a la proteína como un componente regulador de la polaridad celular, controlando la división celular asimétrica en embriones de *C. elegans* [Afshar y col., 2005], y de neuroblastos de *Drosophila* [Wang y col., 2005]. Además, como molécula citoplasmática, Ric-8 contribuye al proceso de transmisión sináptica en *C. elegans* [Miller y Rand, 2000]. Durante la división celular asimétrica, Ric-8 interactúa con el complejo proteico Gai-GDP-Pins-Mud que es reclutado en la región apical por Par3/aPKC [Bellaiche y Gotta, 2005; Betschinger y Knoblich, 2004; Siller y Doe, 2009, Wang y col., 2005]. Por otro lado, durante la migración de astrocitos, Cdc42 interactúa también con Par6/aPKC en el borde director [Etienne-Manneville y Hall, 2003; Osmani y col., 2010]. Por lo tanto, se puede observar que los mismos complejos proteicos controlan la polaridad celular durante la división celular asimétrica y la migración celular. Ric-8 también tiene función como chaperona, estabilizando el plegamiento de las subunidades G $\alpha$  y permitiendo su correcta localización en la membrana [Gabay y col., 2011; Klattenhoff y col., 2003]. En relación con esta función, se ha descrito que los niveles de Gai2 y G $\alpha$ q son regulados a través de sistema de degradación ubiquitina-proteosoma, la cual se ve disminuida cuando ambas proteínas se encuentran interaccionando con Ric-8A [Chishiki y col., 2013].

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que Ric-8A es esencial para la inducción de la CN, participando en etapas tempranas de la inducción [Rodríguez M, Tesis de Magíster, 2016]. Hemos determinado que Ric-8A, actuando como GEF para la subunidad G $\alpha$ 13, regula la migración de las células de la CNC de *Xenopus* [Fuentealba y col., 2013; Toro-Tapia y col., 2017; Toro-Tapia, Tesis Doctoral, 2016]. En estos reportes hemos descrito que, en embriones donde se ha silenciado Ric-8A, las células de la CN craneal no son capaces de migrar direccionadamente hacia una fuente del péptido Sdf1, que es un potente quimioatrayente para células de la cresta neural [Fuentealba y col.,

2013]. Además, estas células presentan una disminución en el número de adhesiones focales y un comportamiento de migración radial anormal [Fuentealba y col., 2013; Toro-Tapia y col., 2017], sin embargo, el mecanismo por el cual Ric-8A regula la migración aún permanece sin ser dilucidado completamente. En nuestro laboratorio hemos comprobado que el papel de Ric-8A está relacionado con la regulación de Gα13 y Gai2, pues la sobreexpresión de cualquiera de estas subunidades permite el rescate del fenotipo en CN donde se ha silenciado Ric-8A [Toro-Tapia, Tesis Doctoral, 2016; Villaseca S., Tesis de magíster, 2017]. Otros estudios, también realizados en nuestro laboratorio, comprobaron que Ric-8A participa en establecer la polaridad de células de “animal cap” a través de la vía de señalización de Gai, en estadíos tempranos de gástrula en embriones de *Xenopus tropicalis* [Arriagada C., Tesis de Magíster, 2012]. Por estos antecedentes, y los descritos anteriormente donde Ric-8A, junto a la subunidad Gai, controla la polaridad celular durante la división asimétrica en *C. elegans* y en *Drosophila*, propusimos como hipótesis de este estudio que: **“Ric-8A regula la polaridad celular durante la migración de las células de la Cresta Neural en *Xenopus tropicalis*”**.

Para contestar esta hipótesis, en este trabajo hemos analizado la función de Ric-8A en el establecimiento de la polaridad celular durante la migración colectiva de las células de la CNC, mediante la detección de Rho GTPasas usando biosensores FRET [Itoh y col., 2002; Pertz y col., 2006] en células de cultivo, y sondas basadas en GBD (dominio de unión a GTPasa) [Stephenson y Miller, 2017], para examinar si Ric-8A afecta la activación espaciotemporal de Rac1 y RhoA en células de la CNC de *Xenopus*. Además, realizamos la detección de cambios en la localización de proteínas marcadoras de polaridad a través de inmunofluorescencia.

## 2 HIPÓTESIS

Ric-8A regula la polaridad celular durante la migración 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

Analizar la función de Ric-8A sobre la regulación de distintos marcadores de polaridad celular en eventos de migración de las células de la Cresta Neural Craneal de *Xenopus tropicalis*.

### 3.2 Objetivos específicos

- 1) Estudiar el efecto de la pérdida y ganancia de función de Ric-8A sobre la localización de las proteínas marcadoras de polaridad, aPKC y Par3, durante la migración de las células de la Cresta Neural.
- 2) Estudiar el efecto de la pérdida y ganancia de función de Ric-8A en el patrón de activación de las proteínas G pequeñas, RhoA y Rac1, durante la migración de las células de la Cresta Neural.

## 4 MATERIALES

### 4.1 Reactivos y Soluciones

- Acetato de Sodio 3 M, pH 5.2
- Acrilamida 30% (29% p/v acrilamida, 1% p/v bisacrilamida)
- Agarosa (1% p/v)
- Agua DEPC (Agua *nano pure* incubada con 0.1% de dietilpirocarbonato, y autoclavada)
- Agua *nano pure* (agua destilada y desionizada)
- Amortiguador de carga ácidos nucleicos 6x (Thermo Scientific)
- Amortiguador de carga de proteínas 5x (312.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% p/v SDS, 0.01% azul de bromofenol, 50% v/v glicerol, 100 mM DTT)
- Amortiguador de corrida proteínas 1x (25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 0.1% p/v SDS)
- Amortiguador de hibridación (50% formamida, 5x SSC, 1 mg/ml Torula RNA, 100 µg/ml heparina, 1x Solución Denhardt, 0.1% Tween20, 0.1% CHAPS, 10 mM EDTA)
- Amortiguador de *Stripping* de bajo pH (25 mM glicina-HCl, pH 2, 1% (p/v) SDS)
- Amortiguador de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v/v metanol)
- Ampicilina (100 µg/mL)
- APS (12.5% p/v Persulfato de amonio)
- Azul de Coomassie (0.25 g de Coomassie brilliant Blue R-250 en 90 mL metanol: H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) y 10 mL ácido acético glacial)
- Bromuro de etidio (10 mg/mL)
- BSA 100x
- CaCl<sub>2</sub> 2 M

- Cisteína (3% p/v en 1/9x MR pH 7.9)
- DFA (53 mM NaCl, 5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4.5 mM Gluconato de potasio, 32 mM Gluconato de sodio, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, pH 8.3 ajustado con 1 M de Bicina).
- Estándar de ADN GeneRuler 1 Kb (Thermo Scientific), Bandas (pb): 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000.
- Estándar de ADN  $\lambda$ HindIII (New England Biolabs), Bandas (pb): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125.
- Estandar de ARN RiboRuler High Range (Thermo Scientific), Bandas (pb): 200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 y 6000.
- Estándar de Proteínas preteñido (PageRule Prestained Protein Ladder) (Thermo Scientific), Bandas (kDa): 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 170.
- Etanol absoluto 100%
- Etanol 70% (v/v)
- Fenol/cloroformo (50% v/v fenol saturado básico, 48% v/v cloroformo, 2% v/v Alcohol isoamílico)
- Ficoll® PM 400 (GE Healthcare Life Sciences)
- Gentamicina (100 µg/ml)
- Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (Chorulon®, MSD)
- Inhibidores de proteasa (Roche)
- Isopropanol
- Kanamicina (50 µg/mL)
- LiCl (5 M)
- Líquidos quimioluminiscentes (Perkin Elmer)
- MAB ("Maleic Acid Buffer": 100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl, pH 7.5)
- MEMFA (Formaldehído 3.7% p/v, 100 mM MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.4)

- PBS 1x (NaCl 150 mM, 20 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.4)
- PMSF (100 mM)
- Polietilenglicol/NaCl (13% p/v PEG 8000, 1.6 M NaCl)
- Rojo ponceau (0.1% p/v rojo ponceau, 5% v/v ácido acético glacial)
- SDS 20% p/v
- Solución I (50 mM Glucosa, 25 mM, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0)
- Solución II (0.2 N NaOH, 1% p/v SDS)
- Solución III (3 M acetato de sodio, 0.2 M ácido acético glacial)
- Solución de Bouin (70% ácido pícrico saturado, 5% ácido acético glacial, 25% formaldehído)
- Solución de leche descremada al 5% p/v (disuelta en TBS-Tween20)
- Solución Denhardt (1% Ficoll, 1% polivinilpirrolidona (PVP) y un 1% seroalbúmina bovina (BSA))
- Solución MR (Modified Frog Ringers) (0.1 M NaCl, 1.8 mM KCl, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.0 mM HEPES-NaOH pH 7.6)
- Solución TENS (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1 N NaOH, 0.5% p/v SDS, pH 8.0)
- SSC 1x ("Saline Sodium Citrate": 150 mM NaCl, 17 mM Citrato de sodio, pH 7.0)
- TAE 50x (Merck)
- TBS-Tween20 (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.05% v/v Tween20)
- TE (100 mM Tris-HCl (Merck), 10 mM EDTA, pH 8.0)
- TEMED (Sigma)
- TENS (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1 N NaOH, 0.5% SDS)

## 4.2 Enzimas

- Enzimas de restricción: NotI, XhoI, XbaI, KpnI, HpaI y StuI (NEB).
- DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (NEB)
- Fosfatasa antártica (NEB)
- T4 ADN Ligasa (Thermo Scientific)
- RNasa A (Sigma)
- Sp6 ARN polimerasa (NEB)
- Proteinasa K (Fermentas)
- ADNasa I (Ambion)

## 4.3 Plásmidos

- pCSC2+/6MycXtRic-8A
- pCS2+H2B-GFP
- pTriEx-RhoA FLARE.sc Biosensor
- pCS2+RhoA (FRET)
- pRaichu1026x
- pCS2+Rac1 (FRET)
- pSP72/Slug
- pCS2+/FoxD3
- pBS(sk+)/Sox2
- pBluescript-Twist
- pCS2+rGBD-mCherry
- pCS2+pGBD-GFP





#### 4.4 Medios de cultivo

##### Medios de cultivo para bacterias:

- Medio LB (Luria-Bertani): 5 g/L Extracto de levadura, 10 g/L Triptona y 10 g/L NaCl.
- Placas con agar LB: 5 g/L Extracto de levadura, 10 g/L Triptona, 10 g/L NaCl, y 10 g/L Agar adherido en placas Petri de 10 cm.

Los medios fueron suplementados con Ampicilina 100 µg/mL o Kanamicina 50 µg/mL cuando se requirió.

##### Medio de cultivo para líneas celulares:

- Medio DMEM alto en glucosa, líquido (Hyclone): Suplementado con 4 mM de glutamina (Hyclone). El medio fue suplementado adicionalmente con o sin 10% Suero Fetal Bovino.

#### 4.5 Oligonucleótidos

##### 4.5.1 Oligonucleótidos de ADN

Se utilizaron estos partidores para secuenciar los plásmidos que contenían los biosensores FRET:

5'- AAT ACG ACT CAC TAT AG -3' (T7 Forward)

5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG -3' (SP6)

5'- ATT AAC CCT CAC TAA AG -3' (T3)

5'- ATG GTC CTG CTG GAG TTC -3' (EGFP-E)

5'- CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G -3' (EGFP-N)

#### 4.5.2 Oligonucleótidos Morfolino

Oligonucleótido morfolino control (MOCtl):

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

Oligonucleótido morfolino contra XtRic-8A (MORic-8A):

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

#### 4.6 Anticuerpos y Fluoróforos

(I: Inmunofluorescencia; WB: "Western Blot"; HIS: Hibridación *in situ*)

- Rodamina dextrano, Life Technologies
- Anticuerpo anti Digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina, Roche (HIS: 1:3000)
- Anticuerpo anti Ric-8A monoclonal de ratón 1H6, Sigma (I: 1:100)
- Anticuerpo anti Par-3 sc-5598, Santa Cruz (I: 1:25)
- Anticuerpo anti N-Cadherina (MNCD2), Hybridoma (I: 1:10)
- Anticuerpo anti E-Cadherina (5D3), Hybridoma (I: 1:10)
- Anticuerpo anti mouse Alexa fluor 488, Life Technologies (I: 1:200)
- Anticuerpo anti mouse Alexa fluor 546, Life Technologies (I: 1:200)
- Anticuerpo anti rabbit Alexa fluor 488, Life Technologies (I: 1:200)
- Anticuerpo anti rabbit Alexa fluor 546, Life Technologies (I: 1:200)
- Faloidina 546 y 633, Life Technologies (I: 1:200)
- Hoechst, Thermo Fisher Scientific. (I: 1:1000)

## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 Manipulación de animales y técnicas embriológicas

Todos los métodos utilizados para la mantención y utilización del modelo *Xenopus* fueron previamente evaluados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas. La metodología de eutanasia de anfibios utilizada se basó en los métodos descritos en el trabajo de Close y colaboradores (1996).

#### 5.1.1 Obtención de embriones de *Xenopus tropicalis*

La obtención de embriones de *Xenopus tropicalis* se realizó por medio de la técnica de fertilización *in vitro*. La ovulación de las ranas hembras seleccionadas fue inducida previamente mediante la inyección sub-cutánea de hormona Gonadotrofina Coriónica 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 fertilización), todas las ranas fueron inyectadas nuevamente 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, los testículos fueron macerados en medio L15 suplementado con 10% de FBS. Posteriormente, los huevos fueron extraídos y fertilizados con gotas de macerado de testículo e incubados por 20 minutos en solución 1/9x MR. A continuación, el medio de las placas de fertilización se reemplazó por una solución de cisteína al 3% en 1/9x MR pH 7.9 durante 10 minutos, con el objetivo de disolver la capa gelatinosa que protege los embriones, proceso conocido como “desgelatinización”. Finalmente, los embriones fueron lavados e incubados en 1/9x MR a 26°C hasta el estadio requerido para la microinyección. Dos horas post-fertilización, se reemplazó el medio por 1/20x MR con gentamicina a 100

$\mu\text{g/mL}$ , manteniendo la misma temperatura hasta alcanzar los estadios de neurula temprana y neurula tardía (Modificación de la metodología descrita por Sive y col., 2000).

### 5.1.2 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  $\mu\text{g/mL}$  hasta alcanzar los estadios requeridos.

Para el desarrollo de esta tesis se diseñó un oligonucleótido morfolino (MO), el cual es específico contra el ARN mensajero de la proteína Ric-8A de *Xenopus tropicalis* (MOXtRic-8A). El oligonucleótido morfolino fue sintetizado por GeneTools®, y es capaz de hibridar con el ARN mensajero de Ric-8A, impidiendo de esta forma su traducción. Los niveles de silenciamiento de Ric-8A mediados por MOXtRic-8A fueron previamente determinados mediante “Western Blot” (Fuentealba y col., 2013 y Maldonado-Agurto, 2010, tesis de magíster). Por otro lado, con el fin de determinar la toxicidad del morfolino utilizado, se inyectaron también concentraciones equimolares de un MO control (MOCtl) no relacionado. Para los ensayos de pérdida de función de Ric-8A, la cantidad de MOXtRic-8A utilizada fue de 15 ng (descrita previamente en Fuentealba y col., 2013), inyectando un blastómero ventral y uno dorsal del embrión en estadio de ocho células, de manera de silenciar sólo un lado del embrión y mantener el otro lado como control.

Además, para esta tesis se evaluó también la ganancia de función de Ric-8A, mediante la microinyección de ARNm de 6MycXtRic-8A, utilizando una cantidad de 100 pg en cada blastómero, inyectando un blastómero ventral y uno dorsal del embrión en estadio de ocho células. Diferentes ARNm fueron utilizados también durante la microinyección de embriones para los ensayos de polaridad, análisis de toxicidad de biosensores FRET, sondas para detectar GTPasas activas, o como marcadores de linaje. En los ensayos para evaluar toxicidad de biosensores FRET o sondas para detectar la actividad de Rac1 y RhoA, la muestra de interés se inyectó en conjunto con el marcador de linaje Rodamina-Dextrano al 1%, para facilitar la identificación del lado inyectado del embrión mediante fluorescencia. Durante estos ensayos, el protocolo para la microinyección de embriones fue el mismo descrito previamente. Para el uso de oligonucleótidos morfolino se tuvo en cuenta consideraciones propias sobre su manipulación. Momentos previos a la microinyección, los morfolinós fueron incubados a 65°C por varias horas, luego fueron centrifugados (centrífuga Force mini, *Bioproducts*), y cuantificados realizando las respectivas diluciones a inyectar. Este procedimiento fue necesario llevarlo a cabo debido a la baja solubilidad de estas moléculas y la facilidad con la que precipitan (Metodología descrita por Harland *Xenopus tropicalis* Site).

### **5.1.3 Fijación de embriones**

Una vez que los embriones alcanzaron el estadio requerido, fueron fijados en una solución de MEMFA para ensayos de Hibridación *in situ* (MEMFA: Formaldehído 3,7% p/v, 100 mM MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 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).

#### 5.1.4 Hibridación *in situ*

El protocolo es una modificación del descrito en Harland Lab *Xenopus tropicalis* (Sive y col., 2000), y probado previamente en el laboratorio. Consiste en una etapa de hidratación de los embriones previamente fijados a concentraciones crecientes de PTw (1x PBS con 0.1% Tween20), y luego una permeabilización al ser incubados en 5 µg/ml de proteinasa K por 5 minutos para permitir una mejor penetración de la sonda. Se realizaron dos lavados con 100 mM de trietanolamina pH 7-8 por 5 minutos, dos lavados con trietanolamina/anhídrido acético por 5 minutos los cuales permitieron neutralizar las cargas de la sonda permitiendo una unión más específica con el ARNm, seguido de cinco lavados con PTw por 5 minutos, todos ellos a temperatura ambiente y en agitación. Se volvió a fijar los embriones en 3.7% formaldehído/PTw por 20 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se realizaron reiterados lavados con PTw. Se realizó una pre-hibridación con amortiguador de hibridación por al menos 30 minutos a 65°C, para posteriormente reemplazar la solución por una mezcla del amortiguador de hibridación con la sonda contra *snail2*, *sox2*, *foxD3* o *twist* a una concentración final de 1 µg/ml, incubándolo toda la noche a 65°C.

Una vez finalizada la hibridación, se realizaron lavados a 65°C con formamida al 50%, 25% y 12,5% en 2x SSCTw (2x SSC con 0.1% Tween20) por 10 minutos cada uno, terminando los lavados con 2x y 0,2x de SSCTw por 10 y 30 minutos, respectivamente. Se realizaron dos lavados con PTw y MAB previos al bloqueo con “*Blocking Reagent*” (Roche) al 2% en MAB por al menos 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina a una dilución de 1:3000 toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron múltiples lavados con MAB, luego se incubaron los embriones con "buffer" AP (“*Alkaline Phosphatase buffer*”: 100 mM Tris-HCl 9.5 pH, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1%

Tween20) dos veces por 5 minutos y se reveló con NBT/BCIP (*"Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt"*). 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, y luego se fijaron los embriones nuevamente con la solución de Bouin (70% ácido pícrico saturado, 5% ácido acético glacial, 25% formaldehído) toda la noche. Se lavaron los embriones con una solución de etanol al 70% en PTw hasta acabar con la tinción amarilla adquirida, para seguidamente realizar lavados hidratantes a concentraciones decrecientes de etanol diluido en 1x SSC. Después se blanquearon los embriones con solución blanqueadora (0.5x SSC, 5% formamida, 1% peróxido, y agua destilada), incubando bajo luz blanca a temperatura ambiente, hasta que se blanquearon lo suficiente para que la pigmentación natural de los embriones no interfiriera con la señal del reactivo cromogénico. Se mantuvieron los embriones en PBS para realizar la foto documentación, y se almacenaron en etanol 100%. La foto documentación se realizó en un estereoscopio Olympus SZ61 utilizando una cámara Leica DFC450.

### **5.1.5 Explantes de Crestas Neurales Craneales**

Se extrajeron las crestas neurales craneales (CNC) desde embriones en estadio cercano a st17. En primer lugar, se seleccionaron los embriones inyectados verificando el marcador de linaje bajo una lupa de fluorescencia. Para realizar la disección, primero se les removió la membrana vitelínica a los embriones en medio 1/9x MR con el uso de pinzas n°5 (*"Fine science tools"* N° 11252-00). Posteriormente, los embriones fueron inmovilizados en una placa con plastilina, y las células de CNC fueron cuidadosamente disectadas usando una

“navaja” confeccionada con pelo de ceja. Cada explante fue colectado y cortado a tamaños adecuados para los ensayos en una placa con medio DFA. Luego, las CNC cortadas se cultivaron a 26°C en medio DFA sobre un cubreobjetos de vidrio (para inmunofluorescencia), o sobre una placa de vidrio (para time-lapses) cubierta con matriz de fibronectina (50 µg/mL). El tiempo de adhesión de los explantes al sustrato fue de aproximadamente 30 minutos, posterior a eso las células comienzan a dispersarse, y dependiendo del ensayo se les permitió migrar 3-5 horas.

#### **5.1.6 Localización espacio-temporal de la actividad de RhoA y Rac1.**

Para estudios de polaridad celular, se analizó *ex vivo* la actividad de RhoA y Rac1 durante el proceso de migración, para ello, se extrajeron CNC desde embriones inyectados previamente con 100 pg de ARNm para la expresión de la sonda rGBD-mCherry, y 30 pg de ARNm para la expresión de pGBD-GFP. Una vez que los explantes fueron adheridos a la placa de vidrio con fibronectina (como se explicó en la sección 4.1.5) se obtuvieron videos “time-lapse” con imágenes capturadas cada 5-20 segundos (el tiempo dependió de cuantos explantes se capturaran simultáneamente en cada experimento). Para estos ensayos se utilizó el equipo de microscopía confocal espectral LSM780 NLO Zeiss (objetivo 63x). Los resultados fueron analizados con el plugin de pseudo-color de ImageJ 1.49q (NIH, USA).



## **5.2 Técnicas de Biología Molecular**

### **5.2.1 Electroforesis en gel de Agarosa**

Se utilizó electroforesis en gel de agarosa con el fin de visualizar patrones de digestión de ADN y para purificar fragmentos de ADN linealizados. Se prepararon geles de agarosa al 1% en solución TAE 0.5x, con bromuro de etidio en una concentración final de 0.5 µg/mL. A las muestras a analizar se les agregó glicerol a una concentración final de 10% v/v, y azul de bromofenol al 0.25% p/v. Luego de cargadas las muestras se procedió a correr el gel a 100 V constantes por 30 minutos. Se utilizó tanto para poder estimar el tamaño de fragmentos de ADN como para cuantificar sus concentraciones. Para cuantificar concentraciones desde bandas de ADN se utilizó ADN del fago λ digerido con la enzima HindIII (estándar λ/HindIII, New England Biolabs). Los geles fueron visualizados en un transiluminador UV a una longitud de onda de 254 nm.

### **5.2.2 Construcción del plásmido pCS2+RhoA-FRET**

Se generó la construcción del plásmido pCS2+RhoA-FRET, para la expresión del biosensor FRET que detecta la actividad de RhoA. Para esta construcción, se dispuso del plásmido pTriEx-RhoA FLARE.sc Biosensor (Pertz y col., 2006) para obtener el biosensor de RhoA (FRET), el cual fue liberado digiriendo con NcoI en el extremo 5' del fragmento, y luego de una reacción Klenow, con XhoI en su extremo 3'. Posteriormente, fue insertado en el vector pCS2+ linealizado con StuI y XhoI. Este vector mejora la expresión en anfibios y permitió la transcripción *in vitro* del biosensor.

### **5.2.2.1 Digestión preparativa y purificación de ADN plasmidial**

Se utilizó digestión preparativa de ADN plasmidial para obtener el fragmento de ADN de interés y el vector lineal, para su posterior purificación y subclonamiento. Se digirieron 10 µg de plásmido con 40 U de enzima de restricción adecuada, 10 µL del buffer de restricción 10x correspondiente, y 1 µL de BSA 100x en un volumen final de 100 µL de reacción. Se incubó la digestión por 4 horas a 37°C y se inactivó la enzima calentando a 65°C por 20 minutos. Luego se verificaron las digestiones analizando 1 µL de las mezclas de reacción, por electroforesis. Posteriormente, se purificó el fragmento de ADN de interés, desde electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

### **5.2.2.2 Reacción de ligación**

Mediante la ligación se pueden unir covalentemente fragmentos de ADN de interés a un vector. Se usaron ~100 ng de vector digerido y purificado, junto con el fragmento de ADN deseado en una relación molar vector:inserto de 3:1. La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen de 5 µL utilizando 0.1 volúmenes de buffer T4 DNA ligasa y 2.5 U de enzima T4 DNA Ligasa (Thermo Scientific), e incubando por 16 horas a 16°C. Se usó como control una reacción de ligación usando solo el vector, sin agregar el inserto. Luego se transformaron bacterias químicamente competentes con la mezcla de ligación.

### **5.2.2.3 Transformación de bacterias químicamente competentes**

La transformación de bacterias químicamente competentes fue necesaria para realizar construcciones de ADN plasmidial, y también para la preparación a gran escala de los diferentes plásmidos utilizados. Para ello, bacterias

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  previamente preparadas por el método de calcio (descrito en Maniatis y col., Molecular Cloning 1982) para volverlas competentes, fueron transformadas con los plásmidos de interés utilizados. Se incubaron 30 ng de plásmido en 50  $\mu$ L de bacterias durante 30 minutos en hielo. Luego, éstas fueron sometidas a un shock térmico por 2 minutos a 42°C y luego a 4°C por 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 500  $\mu$ L de medio LB sin antibiótico y se incubaron las bacterias a 37°C por 1 hora en agitación. Finalmente, las bacterias fueron recolectadas por centrifugación (4500 rpm por 5 minutos) y sembradas en placas LB/Agar/Ampicilina e incubadas toda la noche a 37°C.

#### **5.2.2.4 Purificación de ADN plasmidial por Mini-lisado**

Se utilizó el método de lisis alcalina modificada de Birnhoim y Doly, 1979. De las colonias transformadas producto de la ligación se seleccionaron colonias al azar, y se incubaron en 4 mL de medio LB/ampicilina por toda la noche a 37°C. Se centrifugó 1.5 mL de cultivo de los clones recombinantes a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada Smart R17). Se resuspendió el pellet en 300  $\mu$ L de solución TENS (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1 N NaOH, 0.5% SDS). Se agitó por inversión suavemente y se incubó en hielo por 10 minutos. Luego, se agregó 150  $\mu$ L de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 para neutralizar la mezcla y se agitó vigorosamente de forma manual. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante donde se encuentra todo el material genético. Luego se precipitó el ADN plasmidial con etanol 100%. Se centrifugó y se le agregó al “pellet” 1 mL de etanol 70% para limpiarlo, y se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el “pellet” que contiene el ADN plasmidial a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspendió el ADN en 30  $\mu$ L de agua *nano pure* conteniendo RNasa A (20  $\mu$ g/mL), y se centrifugó nuevamente a 12000

por 10 minutos a 4°C, se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos para almacenar el ADN a -20°C.

#### **5.2.2.5 Digestión analítica de ADN plasmidial**

Se realizó digestión analítica de ADN plasmidial para corroborar la correcta inserción del fragmento de ADN a su vector correspondiente. Se digirieron 6 µL de ADN plasmidial obtenido por Mini-lisado (400 ng aproximadamente) con 10 U de cada enzima de restricción correspondiente, 1 µL del buffer de restricción 10x correspondiente, y 0.2 µL de BSA 100x para un volumen final de reacción de 10 µL. La digestión se llevó a cabo por 4 horas a 37°C, tras lo cual los productos de digestión fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se comparó los fragmentos liberados con el estándar de tamaño molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder para determinar si la ligación resultó correcta.

#### **5.2.3 Purificación de ADN plasmidial a gran escala por Maxiprep**

Para la purificación de ADN plasmidial a gran escala se utilizó el método de lisis alcalina modificada de Birnhoim y Doly, 1979. Se inoculó un cultivo de la colonia recombinante identificada como positiva por análisis de Mini-lisado en 250 mL de medio LB conteniendo el antibiótico adecuado, y se creció toda la noche a 37°C con agitación. Se centrifugó el cultivo a 5000 rpm por 15 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El “pellet” se trató con 5 mL de solución I, 10 mL de solución II, y 5 mL de solución III. Se recuperó el sobrenadante centrifugando a 10000 rpm por 15 min a 4°C; se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol y se centrifugó a 10000 rpm por 15 min a 4°C. Se lavó el pellet con etanol 70%, y se resuspendió en 3 mL de TE. Se precipitaron los ARNs de gran tamaño con 3 mL de LiCl 5M, se centrifugó y se recuperó el ADN del sobrenadante por precipitación

con 1 volumen de isopropanol. Se volvió a centrifugar a 10000 rpm por 15 min a 4°C, se lavó el precipitado con etanol 70%, y se resuspendió en 500 µL de amortiguador TE conteniendo 20 µg/mL de RNasa A. Se precipitó con polietilenglicol/NaCl, el sedimento se resuspendió en 400 µL de TE, y luego se extrajo con 1 volumen de fenol/cloroformo, dos veces. A partir de la fase acuosa se recuperó el ADN plasmidial precipitando con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M, y 2 volúmenes de etanol 100%. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C, y finalmente se resuspendió el “pellet” en 200 µL de agua *nano pure*. El ADN plasmidial resultante se cuantificó mediante electroforesis, comparando el plásmido linealizado con el estándar λ/HindIII (New England Biolabs) mediante el software ImageJ.

#### **5.2.4 Secuenciación**

Para comprobar la secuencia de los plásmidos construidos o provenientes de otros grupos de investigación, se enviaron a un servicio de secuenciación externo, perteneciente al Departamento de Ecología, en la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los resultados fueron recibidos por correos electrónicos y visualizados con el software Chromas Lite. Las secuencias obtenidas se alinearon por ClustalW2 con las secuencias esperadas obtenidas de bases de datos.

#### **5.2.5 Síntesis de sonda y ARN mensajero *in vitro***

Tanto las sondas para realizar hibridación *in situ* como los ARN mensajeros para realizar sobreexpresión de genes fueron sintetizados por transcripción *in vitro* en el laboratorio. Para la síntesis de ambos, sondas y mensajeros, primero se linealizó el ADN plasmidial que contiene el gen de interés con una enzima de restricción que se encuentre cerca del extremo 5' en el caso

de la sonda, y 3' en el caso del ARNm, los cuales generarán un ARN antisentido y sentido, respectivamente. Luego se purificó por gel de agarosa el fragmento linealizado empleando el kit de extracción *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL)*. Se cuantificó por gel, analizando la banda generada a través de densitometría comparando con marcador de peso molecular (*Riboruler low range*) empleando Image J 1.49q (NIH, USA), y luego se utilizó 1.5 µg de ADN purificado como templado para comenzar la transcripción *in vitro*. La transcripción de la sonda se llevó a cabo en presencia de dig-UTP (nucleótidos de uridina marcados con digoxigenina) junto al resto de la mezcla de nucleótidos y la ARN polimerasa, Sp6 según las especificaciones correspondientes. Por otro lado, para la generación de ARN mensajero se empleó el kit de transcripción *in vitro mMESSAGE mMACHINE SP6*, según recomendaciones de la empresa (Life Technologies). Ambas reacciones se realizaron en agua libre de nucleasas. Con el uso de ADNasas, se removió el ADN inicial, y posteriormente se purificaron los mensajeros a través de precipitación con LiCl, agregando 30 µl a la reacción final, para luego centrifugarla por 15 minutos a 10000 rpm a 4°C, o alternativamente purificándolos mediante kit de extracción de ARN (*Nucleospin RNAII, MACHEREY-NAGEL*).

## **5.3 Técnicas de Biología Celular**

### **5.3.1 Cultivo celular**

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en viales criogénicos dentro de un tanque de nitrógeno líquido. Las células fueron criopreservadas en medio de cultivo completo con 10% DMSO, y enfriadas lentamente antes de almacenar (1 día a -80°C, y luego en nitrógeno líquido). Todas las células fueron cultivadas en placas de cultivo celular de 10 cm con medio de cultivo HyClone DMEM (GE

Lifesciences), suplementado con 10% FBS y 4 mM de glutamina. Las células se sacaron de criogenia de forma rápida a 37°C, fueron centrifugadas para eliminar el medio con DMSO y cultivadas en medio completo. Todos los medios fueron almacenados a 4°C, pero fueron calentados a 37°C para su uso con las células. Todos los procedimientos se realizaron dentro de una cámara de bioseguridad clase II tipo A2 (LabGard ES UN-425, NuAire).

Los cultivos celulares en crecimiento se mantuvieron a 37°C en un ambiente estéril humificado y a presión controlado al 5%. Cuando la placa de cultivo alcanzó un 90% de confluencia, las células fueron lavadas con 10 mL de PBS 1x estéril, luego despegadas de la placa con 1 mL de tripsina 0.005%, y la tripsina fue inactivada con 1 mL de DMEM 10% FBS, para finalmente inocular un volumen de las células en una placa nueva de 10 cm con medio de cultivo.

### **5.3.2 Transfección de cultivos celulares con Lipofectamina**

Para los ensayos de sobreexpresión de proteínas en células eucariontes se emplearon líneas de cultivos celulares HeLa y HEK 293T. Para realizar la transfección, las células fueron crecidas sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina en placas de 24 pocillos con 500 µL de medio DMEM 10% FBS hasta alcanzar un 60% de confluencia. Por cada pocillo se realizó una mezcla 400 ng de ADN plasmidial con 50 µL de DMEM sin suero. Asimismo, se realizó otra mezcla de 2 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con 50 µL de DMEM sin suero y se incubó por 5 minutos. A continuación, se juntó el contenido de ambas mezclas, se agitó suavemente y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para que se formara el complejo Lipofectamina-ADN. Mientras, se removió el medio de cultivo desde los pocillos de la placa, y fue reemplazado por 400 µL de DMEM sin suero. Al cabo de la incubación, se adicionó la mezcla de transfección al pocillo. Se incubó la placa durante 6 hrs en la estufa de cultivo,



tras lo cual se reemplazó el medio de cultivo por DMEM 10% FBS. Finalmente, las células fueron incubadas a 37°C por 24 hrs con 5% de CO<sub>2</sub>.

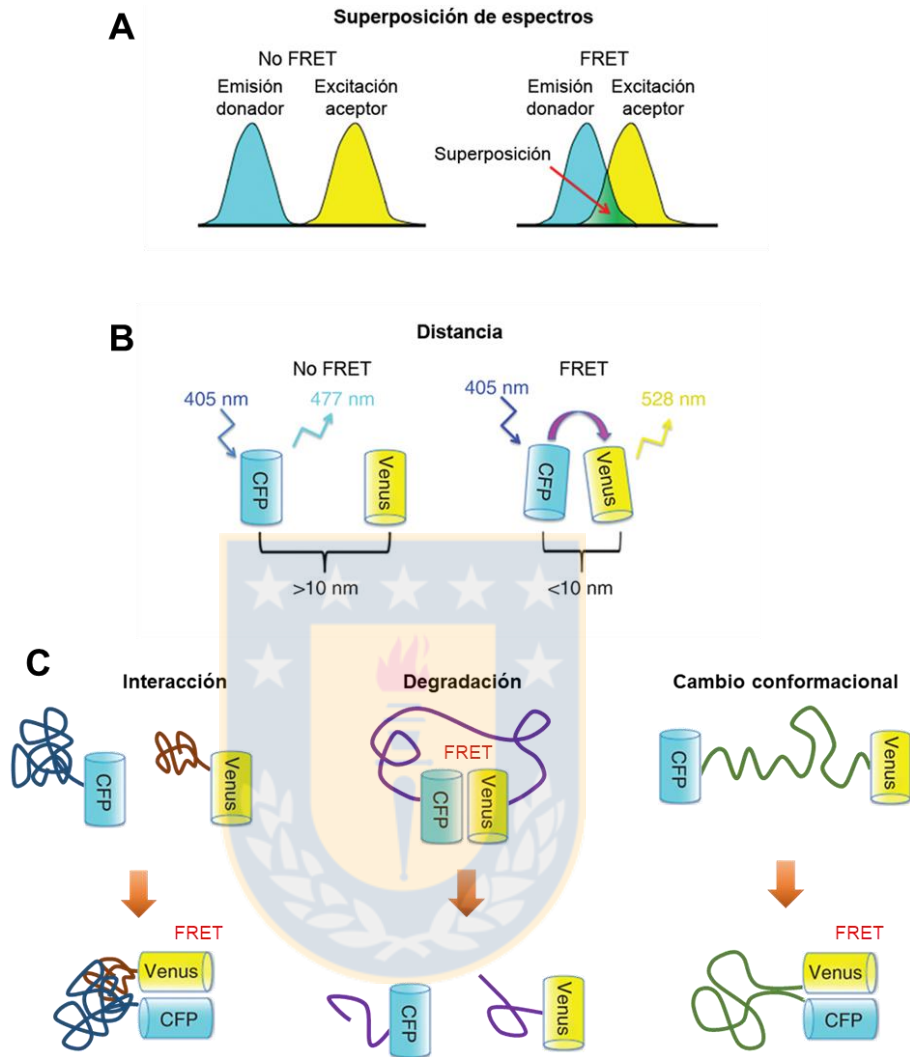
### **5.3.3 Inmunocitoquímica**

Para la inmunodetección por microscopía de fluorescencia se fijaron las células de cultivo o los explantes de crestas neurales en 3.7% formaldehído/PBS por 30 minutos a temperatura ambiente (18°C). Luego se lavaron las muestras en PBS para posteriormente permeabilizarlas por medio de dos lavados en hielo con una solución de 0.2% Triton-x100/PBS previamente enfriada. Se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS para luego bloquear con 2% suero/PBS a temperatura ambiente por 30 minutos. Se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. El anticuerpo primario fue removido mediante lavados cortos con PBS para luego incubar con el anticuerpo secundario, Hoescht (tinción nuclear) y Faloidina (tinción del citoesqueleto de actina) por 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo secundario fue removido mediante 5 lavados de 5 minutos con PBS y las muestras fueron montadas sobre un portaobjetos con una solución de Dako para su posterior análisis bajo un microscopio espectral confocal LSM780 NLO Zeiss (objetivo 63x).

### **5.3.4 Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET)**

Para realizar la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) (Fig. 4), células de cultivo (HEK 293T o HeLa) fueron transfectadas con ADN plasmidial codificante con biosensores FRET para medir la actividad de RhoA (Pertz y col., 2006) y Rac1 (Itoh y col., 2002). Las células fueron fijadas 3,7% formaldehído/PBS, y se midió la eficiencia FRET cuantificando la emisión de la proteína fluorescente amarilla (YFP) sobre la intensidad de la proteína fluorescente cian (CFP) donante.





**Figura 4: Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).**

Esquema representativo de la técnica FRET, que consiste en la detección de la cercanía de dos (a veces tres) fluoróforos, en base a la transferencia de energía entre ellos. **(A)** Un requisito para realizar FRET, es que entre los fluoróforos exista una superposición en el espectro de emisión del donador, con el espectro de excitación del aceptor. **(B)** Para que ocurra la transferencia de energía (FRET), debe haber una cercanía menor a 10 nm entre los fluoróforos, de lo contrario, la emisión del fluoróforo donador no excitará al aceptor. **(C)** Esta técnica es utilizada en biología celular y molecular, generalmente fusionando los fluoróforos del par FRET a otras proteínas. Se suele aplicar para el estudio de interacción, degradación y cambios conformacionales de proteínas. [Modificado de Mitchell y col., 2008].

Para la estandarización de la técnica FRET en células de cultivo, se utilizaron activadores de las vías de Rac1 y RhoA como GSK3 $\beta$ , Tiam1 y G $\alpha$ 13, los cuales fueron transfectados en conjunto de los biosensores para evaluar cambios de en la actividad de las GTPasas. Se utilizó un microscopio confocal espectral Zeiss modelo LSM780 con un objetivo de inmersión en aceite de 63x NA1.4. Para la excitación del par FRET, CFP e YFP, se utilizaron las líneas de láser de diodo 405 nm y láser de argón multilínea 514 nm, respectivamente. La adquisición de la imagen se realizó excitando las muestras con el láser de 405 nm y separando los canales de emisión con un espejo dicróico, seguido de filtros de paso de banda permitiendo el monitoreo simultáneo de las emisiones de CFP (450-510 nm), e YFP (520-560 nm). El protocolo basado en el trabajo de Timmerman y col., 2015 con modificaciones. El análisis de la eficiencia FRET, medido por la razón YFP/CFP, se realizó posterior a la captura de las imágenes, utilizando el software Fiji (Schindelin y col., 2012), un paquete de procesamiento de imágenes de código abierto basado en ImageJ. A las imágenes en bruto de los canales cian y amarillo se les removió fondo con el proceso 'Subtract Background'. Luego se alinearon los canales con el plugin 'Registration, StackReg'. Se suavizó las imágenes para disminuir el ruido usando el proceso 'Smooth'. Los canales cian y amarillo procesados se separaron en imágenes diferentes usando 'Stack, Stack to images', y se convirtieron a formato de 32-bit. Se aplicó un umbral únicamente a la imagen del canal de YFP, convirtiendo los píxeles del fondo en dato no numérico "NaN (Not a Number)" usando el ajuste 'Threshold', de esta manera se evita la formación de artefactos derivados del ruido del fondo cuando se aplica la relación. Finalmente se calculó la razón YFP:CFP dividiendo los dos canales con el proceso 'Calculator Plus', y se aplicó un pseudocolor personalizado modificando el 'LUT'.

### 5.3.5 Reducción de autofluorescencia

La autofluorescencia puede ser de dos tipos, de origen natural o producto de la fijación. En el microscopio confocal observamos las células vivas (sin fijar), y fijadas con PBS/formaldehído por 15 y 30 min, para encontrar diferencias o descartar que la autofluorescencia sea producto de la fijación. Existen varios compuestos que suelen producir autofluorescencia y métodos para reducirla, nos enfocamos en métodos descritos que reducen la autofluorescencia producto de la excitación por UV azul [Billinton y Knigth, 2001; Yang y col., 2017].

Tratamiento con Ácido Pícrico: Se fijaron las células en PBS con 2% de formaldehído, y 0.2% ácido pícrico por 20 min. Luego, las muestras se sometieron a una serie de lavados de 5 min cada uno, en forma de gradiente desde etanol hasta DMSO (etanol al 100%, 75% y 25% en DMSO, y DMSO al 100%). Posteriormente, se realizaron una serie de lavados de 5 min cada uno, en forma de gradiente desde DMSO hasta PBS (DMSO al 100%, 75% y 25% en PBS, y PBS al 100%).

Tratamiento con Sudan Black: Se preparó una mezcla de 0.3% sudan black (p/v) en etanol 70%, y se incubó por 2 horas en oscuridad. Posteriormente, se aplicó la mezcla sobre las muestras previamente fijadas con PBS/formaldehído y se mantuvo por 10 min. Luego se realizaron 8 lavados con PBS.

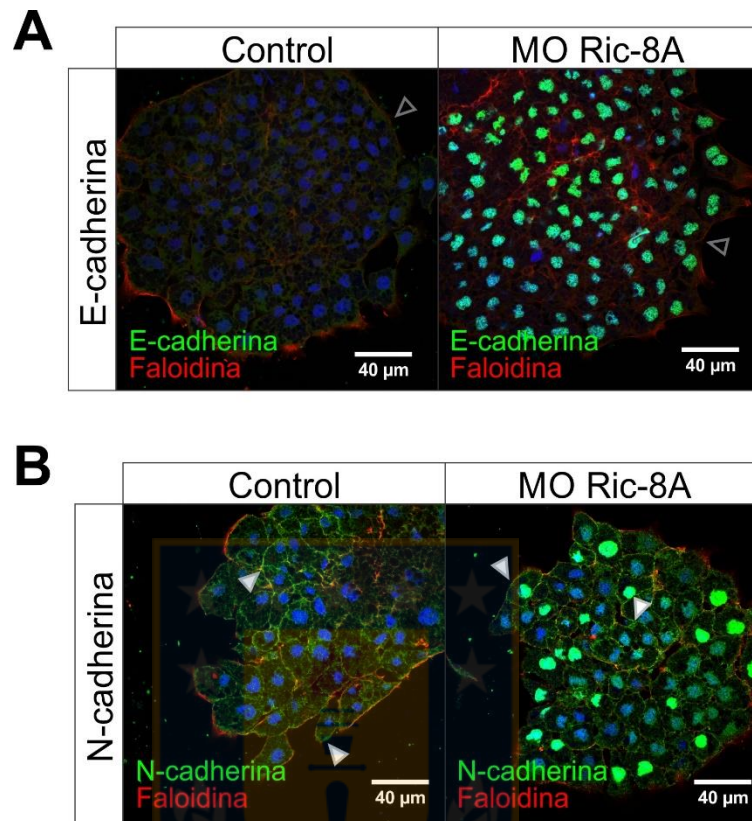
Tratamiento con Ultravioleta: Las muestras se irradiaron con UV (100 W, 334 - 365 nm) por 2 horas en hielo.

## 6 RESULTADOS

**Objetivo 1:** “Estudiar el efecto de la pérdida y ganancia de función de Ric-8A sobre la localización de las proteínas marcadoras de polaridad, aPKC y Par3, durante la migración de las células de la Cresta Neural.”

### 6.1 Ric-8A no es requerida para la TEM

Luego de especificarse y antes de comenzar a migrar extensivamente a distintos puntos del embrión, la CN realiza una transición epitelio-mesenquimal (TEM), para de esta forma, adquirir motilidad. Durante este proceso de cambios, se ha descrito el cambio de E-cadherinas a N-cadherinas, fundamental para disminuir la adherencia célula-célula y permitir la repolarización celular luego de cada evento de CIL [Theveneau y Mayor, 2012a]. Como ya se tenía antecedentes de que Ric-8A cumple un rol fundamental durante la migración de este tipo celular, puesto que su silenciamiento inhibe la migración [Fuentealba y col. 2013], adicionalmente al estudio de su función en establecimientos de la polaridad durante la migración, evaluamos si la función de Ric-8A en la migración celular está relacionada con la TEM o el recambio de cadherinas. Para esto, se realizó inmunocitoquímica de E- y N-cadherina en condiciones de pérdida de función de Ric-8A. Observamos que tanto en la condición control como en la de silenciamiento de Ric-8A, se detectó únicamente N-cadherina en estadios migratorios, lo que indica que las células en ambas condiciones sufrieron el cambio de E-cadherinas por N-cadherinas (Fig. 5). Este resultado sugiere que Ric-8A no regula el recambio de cadherinas o la TEM. Por lo tanto, Ric-8A estaría regulando la migración celular mediante algún otro proceso, por esto nos enfocamos en analizar si su función sobre la migración sería mediante el control de la polaridad celular durante la migración de las CNs.



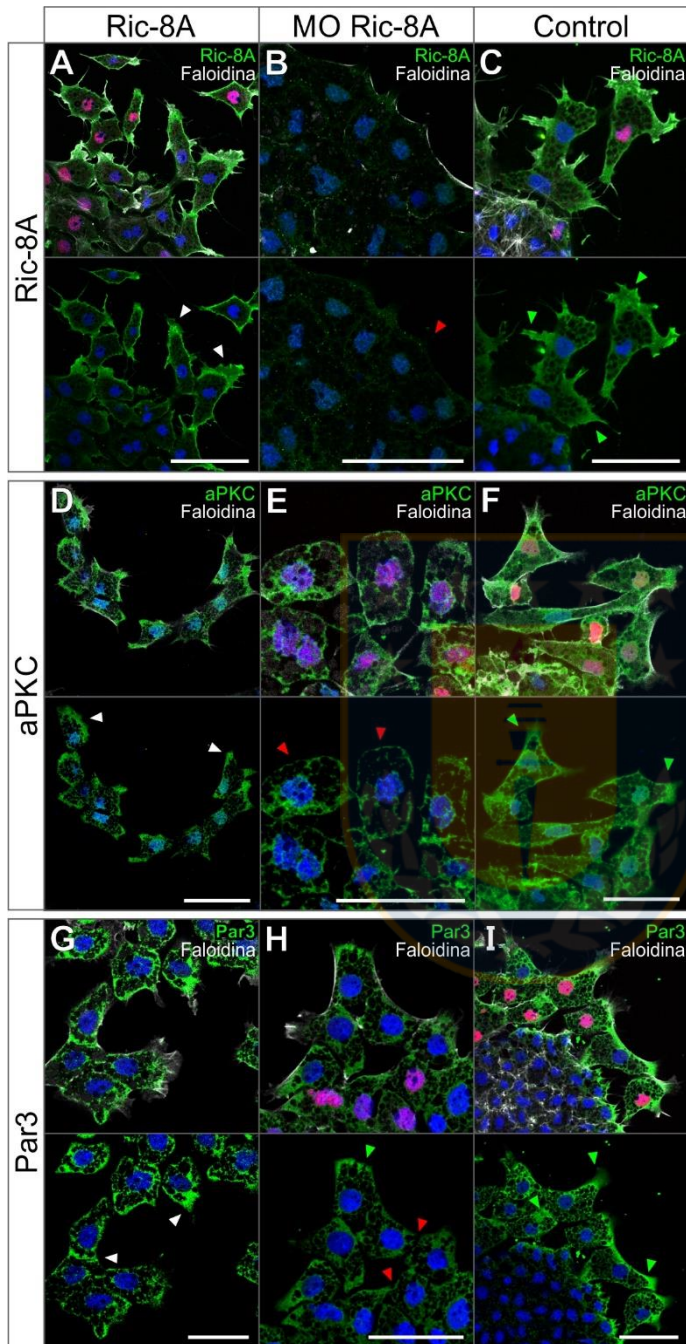
**Figura 5: Ric-8A no regula el cambio de cadherinas durante la TEM.**

Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica sobre explantes de CNC extraídos de embriones en estadio 17, los que fueron previamente inyectados con morfolino para la inhibición de la expresión de Ric-8A. Las fotografías fueron obtenidas mediante microscopía confocal durante estadios migratorios. **(A)** Inmunocitoquímica para la detección de E-cadherina (verde) sobre explantes controles y morfantes para Ric-8A. **(B)** Inmunocitoquímica para la detección de N-cadherina (verde) sobre explantes controles y morfantes para Ric-8A. Se observa faloidina en rojo y los núcleos celulares en azul. Además, en las células morfantes para Ric-8A (MO Ric-8A), se observa un marcador nuclear verde utilizado como trazador de linaje durante la microinyección del morfolino contra Ric-8A. Las flechas blancas y flechas negras señalan la presencia o ausencia de cadherinas, respectivamente.

## 6.2 Ric-8A regula la polaridad celular

Para evaluar el rol de Ric-8A en la polaridad celular, analizamos la localización de proteínas utilizadas como marcadores de polaridad celular en ensayos de pérdida y ganancia de función de Ric-8A. Está descrito que el complejo Par6/Par3/aPKC controla la polaridad celular, posicionando el MTOC y el aparato de Golgi hacia el borde director y cerca del núcleo durante la migración [Etienne-Manneville y Hall, 2003; Ridley y col., 2003]. Por esto, para este estudio extrajimos explantes de CN desde embriones previamente inyectados con ARNm o Morfolino de Ric-8A, y luego fueron sembrados sobre una matriz de fibronectina y analizados por inmunocitoquímica para detectar las proteínas Ric-8A, aPKC y Par3 (Fig. 6). Los resultados muestran que hay disminución y aumento en los niveles Ric-8A en las condiciones de inhibición y de sobreexpresión, respectivamente. Sin embargo, observamos que el cambio en los niveles de Ric-8A no produce un efecto en la localización de la misma, pues tanto en la condición control como la de sobreexpresión de Ric-8A, su localización se encuentra en la zona libre células, concentrándose hacia las protrusiones en el borde director (Fig. 6 A-C). Por otro lado, la proteína quinasa C atípica (aPKC) se observa también en la zona libre de células hacia las protrusiones en las células control (Fig. 6D) y en las células con sobreexpresión de Ric-8A (Fig. 6F), pero pierde su localización al inhibir Ric-8A (Fig. 6E). En el caso del marcador Par3, en condición control, presenta un patrón de expresión similar, hacia la zona libre de células en las protrusiones, pero también se observa en la zona de unión célula-célula, siendo esta última, disminuida en la condición de silenciamiento de Ric-8A. Por el contrario, la localización de Par3 en la zona de las protrusiones, se mantiene en todas las condiciones (Fig. 6 G-I). Estos resultados sugieren que Ric-8A se encuentra regulando la polaridad celular durante la migración de la CN.





**Figura 6: Los niveles de Ric-8A regulan la localización de marcadores de polaridad.**

Immunofluorescencias de explantes de CNC desde embriones inyectados con morfolino contra Ric-8A (MO Ric-8A) o con ARNm de Ric-8A. En cada caso, las proteínas de interés se muestran en verde, en los paneles superiores de cada condición se observa la superposición con el citoesqueleto de actina en blanco y el trazador de linaje nuclear en rojo. Ric-8A se localiza en el borde director en células control (**A**), en células morfantes para Ric-8A (**B**), y células con sobreexpresión de Ric-8A (**C**). Localización del marcador de polaridad aPKC (PKC $\xi$ ) en condiciones control (**D**) y de pérdida (**E**) y ganancia de función de Ric-8A (**F**). Par3 en células control localiza en la unión celular (**G**) y en el borde director. (**H**) En condiciones de pérdida de función de Ric-8A, Par3 disminuye su localización en la unión célula-célula, y también es menos evidente en el borde director. (**I**) Par3 conserva su localización al sobreexpresar Ric-8A. Las

barras muestran escala de 40  $\mu$ m. Las flechas blancas señalan la localización normal, las flechas rojas la pérdida de localización y las flechas verdes señala que se conserva la localización normal.

**Objetivo 2:** “Estudiar el efecto de la pérdida y ganancia de función de Ric-8A en el patrón de activación de las proteínas G pequeñas, RhoA y Rac1, durante la migración de las células de la Cresta Neural”.

### **6.3 Análisis espaciotemporal de la actividad de Rac1 y RhoA por FRET**

Como las células de la cresta neural requieren una activación polarizada de las proteínas G pequeñas para migrar, uno de nuestros objetivos fue estandarizar un método para estudiar la activación espaciotemporal de las proteínas GTPasa pequeñas de la familia Rho GTPasas; Rac1 y RhoA, que como se mencionó anteriormente, se encargan de la remodelación del citoesqueleto de actina regulando la formación de protrusiones y contracción celular, respectivamente.

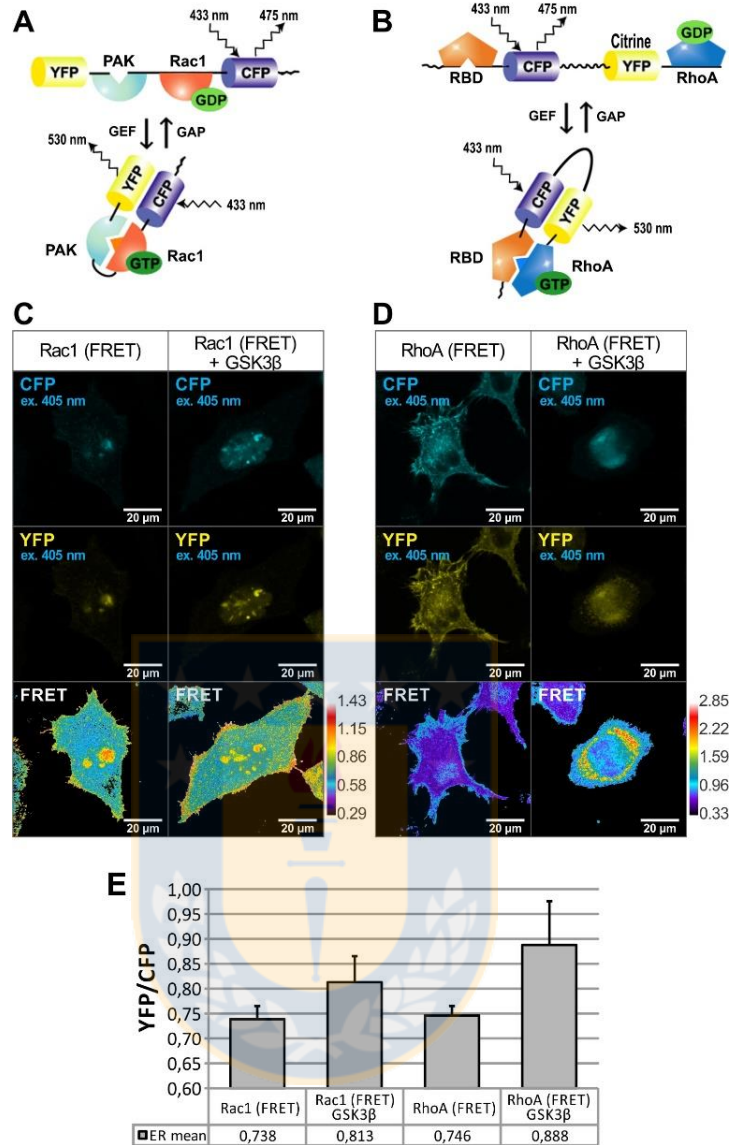
Para la detección de Rac1 y RhoA activados utilizamos biosensores FRET, que consisten en proteínas de fusión conformadas por el dominio de unión a nucleótidos de las proteínas G pequeñas (Rac1 o RhoA), el dominio de unión a GTPasa de un efector específico (PAK o Rhotekin), y las proteínas fluorescentes, el donador CFP y el aceptor YFP (Fig. 7A y 7B). Estos biosensores se activan cuando intercambian el GDP por GTP en el dominio de la proteína G pequeña, produciendo un cambio conformacional que acerca los fluoróforos y produce el efecto FRET. Ambos biosensores fueron sintetizados por otros grupos de investigación [Itoh y col., 2002; Pertz y col., 2006], y se encontraban en vectores que no facilitaban su transcripción *in vitro*, lo que es necesario para el trabajo en biología del desarrollo donde se suele microinyectar ARNm en embriones para sobreexpresar un gen. Por esto, utilizamos el biosensor Rac1 (FRET) insertado en el vector pCS2+, y trasparamos el biosensor de “pTriEx-RhoA FLARE.sc Biosensor” al vector pCS2+ RhoA (FRET). Por lo tanto, para validar el método, primero transfectamos los biosensores en células de cultivo como modelo



preliminar a las células de la cresta neural, y estandarizar en ellas los parámetros de medición, esto debido a la versatilidad de las líneas celulares (HeLa y HEK 293T), y evitar el sacrificio innecesario de animales.

### **6.3.1 Estandarización del método FRET en células HeLa**

Validamos el método FRET en la línea celular HeLa, para lo cual se transfectó con lipofectamina a los biosensores Rac1 y RhoA (FRET) de forma individual, y cotransfectados junto con GSK3 $\beta$ . Las células posteriormente fueron fijadas y analizamos sus eficiencias FRET mediante la relación YFP/CFP. Observamos que el método es funcional en células de cultivo HeLa, y aunque estas células no están polarizadas, se puede ver claramente que la proteína Rac1 se encuentra activa en la zona de las protrusiones. Como control se utilizó la sobreexpresión de Glucógeno Sintasa Quinasa 3 (GSK3 $\beta$ ) (Fig. 7), un activador indirecto tanto de la proteína Rac1, mediante la activación de FAK [Domoto y col., 2016], como de la proteína RhoA, mediante la inhibición de p190RhoGAP [Sun y col., 2009]. Al sobreexpresar GSK3 $\beta$  se pudo observar un incremento de la actividad de ambas GTPasas (Fig. 7E), y por lo tanto corroborar que el sistema es capaz de sensor la activación de sus vías.

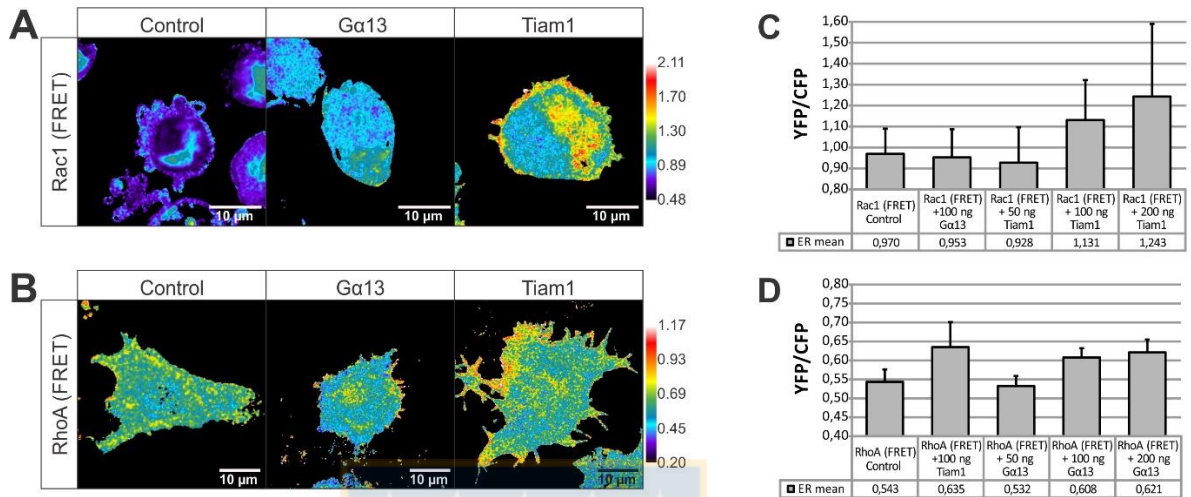


**Figura 7: GSK3β incrementa la actividad de Rac1 y RhoA en células HeLa.**

(A) Esquema de la estructura del biosensor usado para medir la actividad de Rac1 (pRaichu1026x de Itoh y col., 2002). (B) Esquema de la estructura del biosensor usado para medir la actividad de RhoA (pTriEx-RhoA FLARE.sc de Pertz y col., 2006). (C,D) Imágenes representativas de CFP, YFP y FRET en células HeLa con expresión de los biosensores Rac1 o RhoA (FRET), y con/sin sobreexpresión de GSK3β. La actividad de las GTPasas se muestra en FRET, calculado a partir de la relación de intensidades de fluorescencia entre el aceptor YFP (excitado por la fluorescencia del donador) y el donador CFP (excitado a 405 nm). La escala de la intensidad FRET se representa a la derecha. (E) Promedio de la relación de emisión (YFP/CFP) de las células completas expresando Rac1 y RhoA (FRET) con o sin sobreexpresión de GSK3β. n = 9 por cada condición, obtenidos de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico no significativo.

### 6.3.2 Sensibilidad del método FRET frente a activadores

Las proteínas G pequeñas son activadas por proteínas GEF, y aunque estos GEFs son numerosos, su especificidad con las distintas Rho GTPasas ayuda a mantener las distintas vías separadas y de esta forma activar las proteínas G en localizaciones y momentos determinados [Lawson y Ridley, 2018]. Para evaluar la sensibilidad de los biosensores en la activación de sus vías específicas, y de esta forma continuar con la estandarización de nuestro método, analizamos la activación de las proteínas G pequeñas en células con sobreexpresión de activadores de alta especificidad. Para esto, transfectamos a través del método con lipofectamina los biosensores Rac1 y RhoA (FRET) individualmente y cotransfectados junto con Tiam1 y G $\alpha$ 13 en células HEK 293T. Tiam1 es identificado como un GEF específico para Rac1 [Lambert y col., 2002; Mertens y col., 2003], mientras que G $\alpha$ 13 es la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica que activa a LARG y p115-RhoGEF, ambos GEFs específicos para RhoA [Wirth y col., 2008; Sabbatini y col., 2010]. Observamos que la actividad de Rac1 incrementa al sobreexpresar Tiam1, no así al sobreexpresar G $\alpha$ 13, mientras que la actividad de RhoA incrementa en ambas condiciones, al sobreexpresar G $\alpha$ 13, y al sobreexpresar Tiam1. Lo anterior es debido a que, aunque hace décadas se describe a Tiam1 como un GEF específico para Rac1, este también tiene actividad GEF, aunque en menor medida, sobre Cdc42 y RhoA [Boissier y Huynh-Do, 2014; Shepherd y col., 2010]. Por lo tanto, este método FRET es funcional en las líneas celulares HeLa y HEK 293T, y los biosensores para Rac1 y RhoA detectan la activación específica de sus vías (Fig. 8).

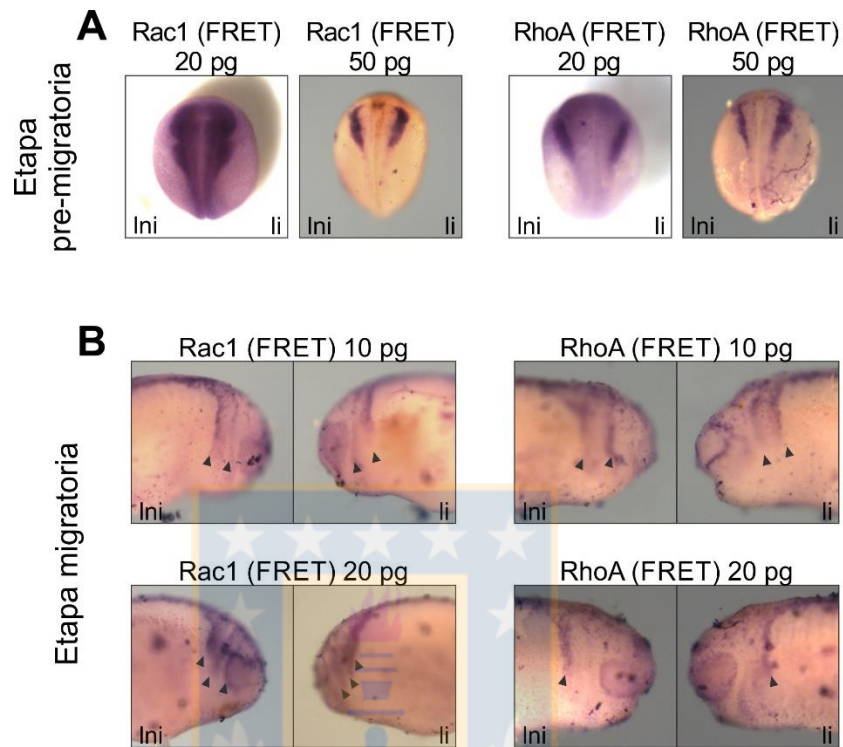


**Figura 8: Activación específica de Rac1 y RhoA en células HEK 293T.**

(A) Imágenes representativas de células HEK 293T expresando el biosensor Rac1 (FRET) con sobreexpresión de Tiam1 o la subunidad Gα13. (B) Imágenes representativas de células HEK 293T expresando el biosensor RhoA (FRET) con sobreexpresión de Tiam1 o la subunidad Gα13. La actividad se representa como FRET, calculado desde la relación de intensidad de fluorescencia YFP/CFP. La escala de intensidad de FRET está representada a la derecha. (C) Gráfico del cambio en la relación de emisión (YFP/CFP) de las células expresando Rac1 (FRET) y transfectadas con 50 pg de Gα13 o 50 ng, 100 ng o 200 ng de Tiam1 (n= 6 a 19 por condición). (D) Gráfico del cambio en la relación de emisión (YFP/CFP) de las células expresando RhoA (FRET) y transfectadas con 50 pg de Tiam1 o 50 ng, 100 ng o 200 ng de Gα13. n= 7 a 10 por condición, desde 3 experimentos independientes. Análisis estadístico no significativo.

### 6.3.3 La expresión de los biosensores FRET no afecta la inducción y migración de la CN en *Xenopus*

Con el método FRET funcional, procedimos a trabajar con los biosensores en nuestro modelo de interés, la cresta neural (CN) de *Xenopus tropicalis*. Inicialmente, evaluamos si es que la expresión de estos biosensores tiene algún efecto en la inducción o en la migración de la CN. Para evaluar esto, microinyectamos los biosensores como ADN plasmidial en estadio de 2 y de 8 células, para evaluar el efecto sobre la inducción y la migración de la CN, respectivamente. Las cantidades de biosensores inyectadas fueron de 20, 50 y 100 pg para los embriones inyectados en estadio de 2 células, mientras que para los inyectados en estadio de 8 células fue de 10, 20 y 50 pg. La expresión de los biosensores en las cantidades más altas (100 pg en 2 células, y 50 pg en 8 células) resultó con toxicidad sobre la viabilidad del embrión, muriendo antes de alcanzar estadio 16, por lo que estas dos condiciones se descartaron y se continuó con las restantes (20 y 50 pg en 2 células, o 10 y 20 pg en 8 células). Posteriormente, realizamos hibridación *in situ* en embrión completo contra *snail2*, factor de transcripción usado como marcador específico de CN. El resultado nos muestra que la expresión de los biosensores en estas concentraciones no afecta ni a la inducción ni a la migración de la CN, ya que como se puede observar, *snail2* se expresa de manera normal en el lado inyectado de los embriones en estadio 16 y 23-24, respectivamente (100% n=26-52 por condición) (Fig. 9).



**Figura 9: Sobreexpresión de biosensores de Rac1 y RhoA no afecta la inducción y migración de CN de *Xenopus tropicalis*.**

Ensayos de hibridación *in situ* en embriones de *Xenopus tropicalis* en etapas pre-migratoria y migratoria. Las marcas muestran el patrón de expresión de *snail2*, un marcador específico de cresta neural. **(A)** Embriones microinyectados con Rac1 y RhoA (FRET) fijados en estadio 16, muestran que no hay efecto en la inducción de la cresta neural, la cual es visualizada tanto en el lado inyectado (li) como lado no inyectado (Ini). **(B)** Embriones microinyectados con Rac1 y RhoA (FRET) fijados en estadio 23-24, muestran que no hay efecto en la migración de la cresta neural, la cual es visualizada tanto en el lado inyectado (li) como lado no inyectado (Ini). Las flechas negras señalan las rutas migratorias de la CN. Los embriones de las imágenes son representativos de 4 experimentos independientes, analizando en total 26-52 embriones por condición.



#### 6.3.4 Autofluorescencia de las células de CN impiden realizar FRET en este modelo celular

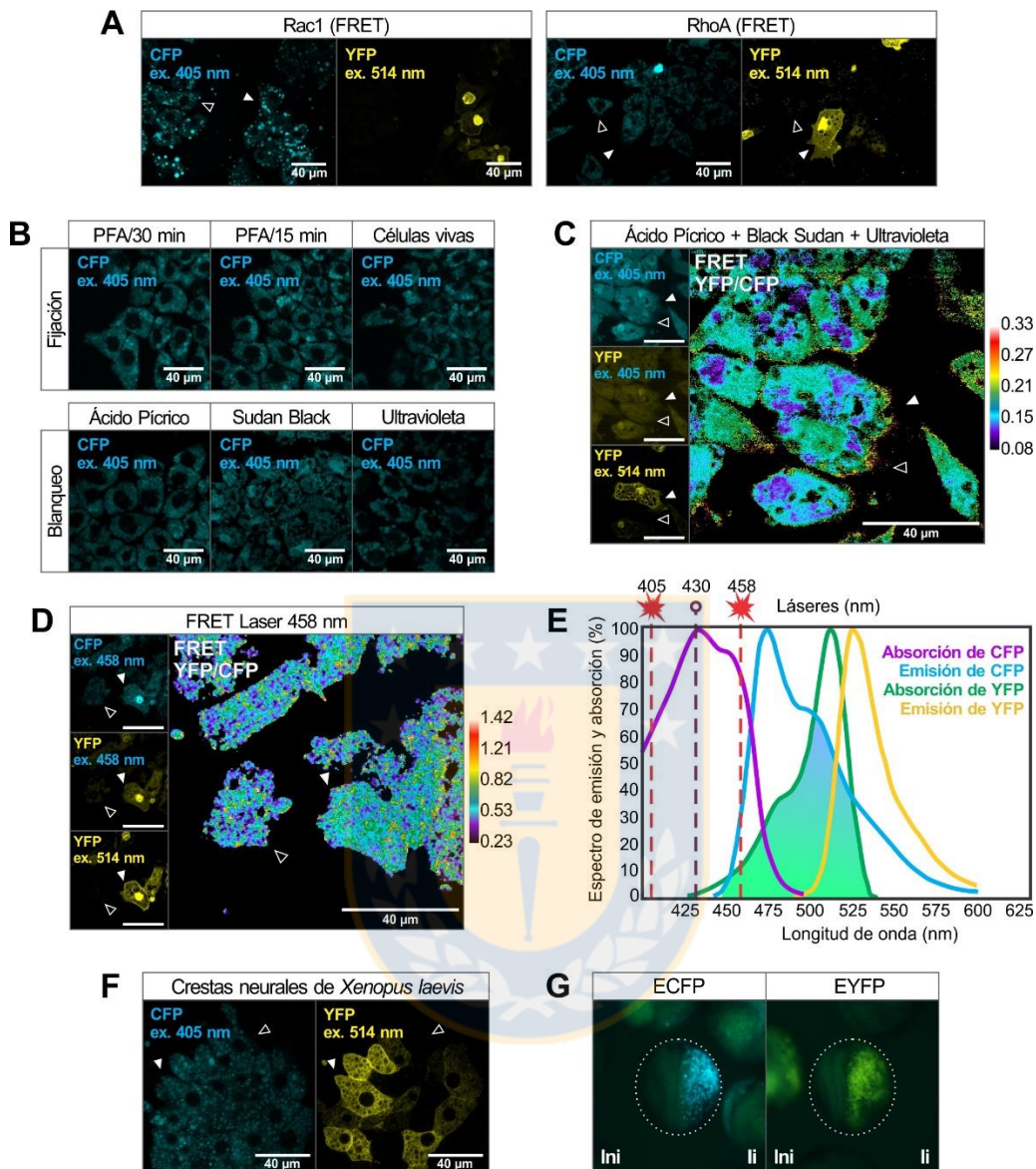
Anteriormente se comprobó que nuestro modelo de estudio no sufre efectos adversos por la sobreexpresión de los biosensores, sin embargo, al analizar las crestas neurales en un microscopio confocal espectral (LSM780 NLO Zeiss), encontramos que este tipo celular posee una alta autofluorescencia en el canal de CFP. Debido a que la eficiencia FRET la medimos mediante la relación de intensidades YFP/CFP, cualquier autofluorescencia que intervenga en estos dos canales impide realizar la medición correctamente. En las células de la cresta neural, la autofluorescencia es tan alta que a simple vista no se puede distinguir las células que poseen el biosensor usando el canal CFP (excitado a 405 nm), y solo se pueden identificar excitando YFP (con 514 nm) (Fig. 10A). Buscamos maneras de reducir esta fluorescencia basal alterando los métodos de fijación, usualmente utilizamos fijaciones con PFA por 30 min, se probó reducirlo a 15 minutos, y también ver células no fijadas (células vivas) (Fig. 10B). Encontramos que la autofluorescencia no es producto del método de fijación, ya que se observa que las células vivas y las fijadas poseen una autofluorescencia similar. Por esto, se trató las células fijadas con métodos de blanqueo o *quenching* de compuestos autofluorescentes que se excitan en el espectro UV azul. Se intentó con los tratamientos de Ácido Pírico, Sudan Black y Ultravioleta (UV) (Fig. 10B). Además, se intentaron estos métodos de blanqueo simultáneamente y tampoco sirvió para remover la autofluorescencia. Por lo tanto, al tratar de realizar FRET en CN utilizando estos biosensores, se obtiene un patrón de falsa señal positiva en todas las células, posean o no el biosensor (Fig. 10C).

La autofluorescencia anteriormente descrita se obtiene al excitar las células mediante láser con longitud de onda de 405 nm. Sin embargo, excitando CFP a 458 nm, la autofluorescencia es menor, incluso se puede distinguir a las

células que expresan el biosensor observando el canal de CFP (Fig. 10D). Sin embargo, no es recomendado excitar a 458 nm ya que también excita levemente a YFP (Fig. 10E). Nosotros trabajamos con el láser 405 nm, que es muy utilizado en estudios publicados con el par FRET CFP-YFP, pero el láser óptimo es el de 430 nm, el cual no está disponible en la Universidad. Ya sea por la autofluorescencia o por la leve excitación sobre YFP, tampoco es posible utilizar este método FRET sobre las CN excitando con un láser a 458 nm, obteniéndose un patrón de intensidad FRET con un ruido homogéneo en las células con y sin biosensor (Fig. 10D).

Si bien las células de CN de *Xenopus tropicalis* tienen una alta autofluorescencia producto de la gran cantidad de vacuolas de yema (yolk), que imposibilita utilizar el método FRET particularmente con estos biosensores, en *Xenopus laevis* podría ser distinto, pues existen estudios donde estos mismos biosensores sirvieron para analizar células de CN en este modelo animal [Matthews y col., 2008; Scarpa y col., 2015]. Repetimos la obtención de explantes de células de CN, pero esta vez desde embriones de *Xenopus laevis*, y las analizamos vivas (sin fijar) por microscopía confocal. También se encontró autofluorescencia que impide distinguir la señal CFP en este modelo, y por lo tanto, imposibilita la realización del método FRET (Fig. 10F). Debido a estos resultados, se descartó el uso del método FRET con estos biosensores, estandarizado en líneas de cultivo celulares, para la detección de la actividad de Rac1 y RhoA, en células de la CN. Sin embargo, estos resultados son de utilidad para otros estudios que se realizarán en nuestra línea de investigación en el laboratorio, pues no descartamos su uso en otros modelos celulares, ni incluso en otros tejidos de *Xenopus*, pues se pudo observar que al inyectar los fluoróforos ECFP e EYFP de manera individual, la señal de ECFP puede distinguirse en embrión completo por sobre la autofluorescencia (Fig. 10G).





**Figura 10: Autofluorescencia en células de cresta neural de *Xenopus*.**

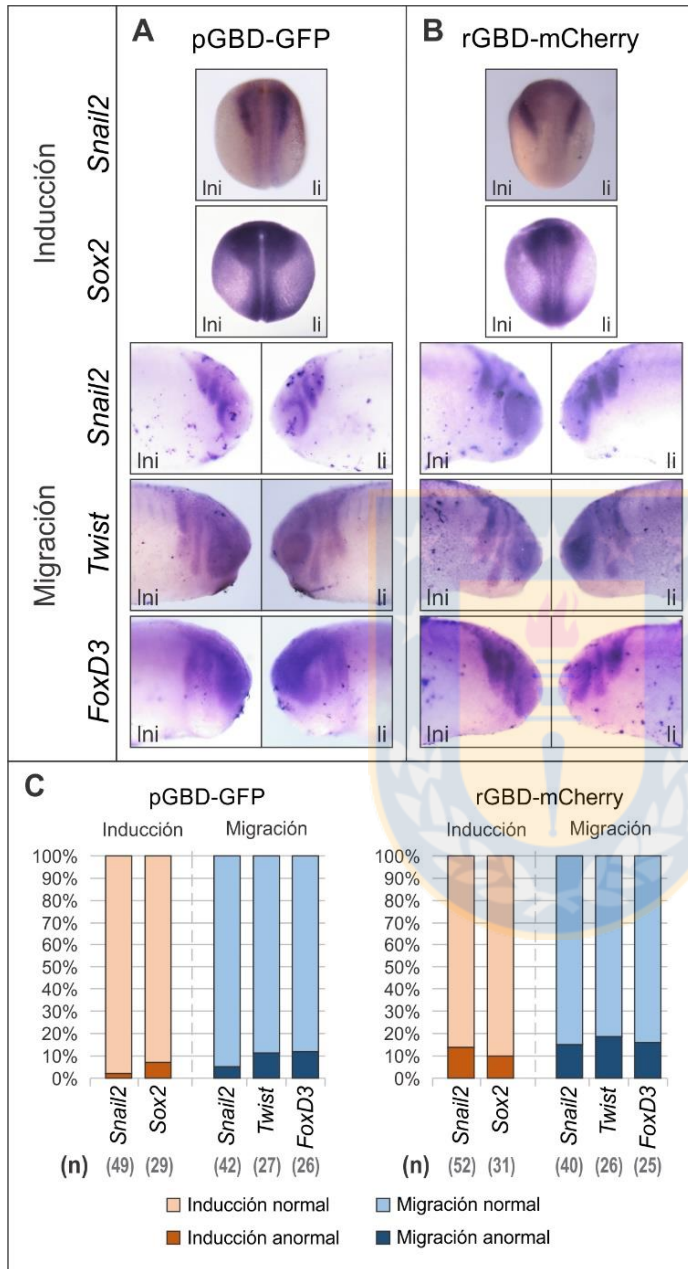
Imágenes representativas capturadas por microscopía confocal (**A**, **B**, **C** **D** y **F**). Las cabezas de flecha blancas y huecas señalan a células con o sin los biosensores, respectivamente. (**A**) Canales CFP (excitado a 405 nm) e YFP (ex. a 514 nm) de células de CN expresando Rac1 y RhoA (FRET) donde se aprecia alta fluorescencia. (**B**) Células de CN en experimentos donde se intentó, sin resultado, reducir la autofluorescencia del canal CFP cambiando el método de fijación o realizando un blanqueo posterior. (**C**) Método FRET interferido por la autofluorescencia de CFP incluso después de aplicar los tres métodos de blanqueo juntos. (**D**) Método FRET excitando CFP a 458 nm. El canal CFP tiene menor autofluorescencia, pero al realizar FRET hay interferencia. (**E**) Espectro de emisión y absorción de CFP e YFP. Se señalan los láseres de 405 nm, 458 nm (utilizados en la tesis) y de 430 nm (no disponible). (**F**) Canales CFP e YFP de CN de *Xenopus laevis*. (**G**) Embriones inyectados con ECFP y EYFP observados en una lupa de epifluorescencia. El biosensor Rac1 (FRET) se usó para representar las condiciones en **C**, **D** y **F**.

#### **6.4 Detección de las proteínas G pequeñas Rac1 y RhoA activas con sondas a base de proteínas de fusión**

Como se mencionó anteriormente, la activación de las proteínas G pequeñas Rac1 y RhoA son un foco de estudio importante durante la migración celular, debido a que las actividades de estas regulan la remodelación del citoesqueleto de actina para realizar funciones de adhesión y formación de protrusiones, procesos críticos en la migración celular. Estas Rho GTPasas se activan en lugares específicos dentro de la célula migratoria, Rac1 está activa en la zona anterior de la célula promoviendo la formación de protrusiones, y RhoA está activa en la zona posterior de la célula controlando la contracción celular [Theveneau y Mayor, 2010; Shoval y Kalcheim, 2012]. Por este motivo, la actividad de las proteínas G pequeñas es de interés para estudiar la polaridad celular. Anteriormente descartamos el uso de un método FRET para el estudio de la actividad de las proteínas G pequeñas en CNC, así que analizamos la actividad de estas mediante sondas fluorescentes basadas en GBDs (dominios de unión a GTPasas). Las sondas pGBD-GFP y rGBD-mCherry detectan respectivamente a las proteínas Rac1 y RhoA activas [Stephenson and Miller, 2017]. Estas sondas consisten en proteínas de fusión entre proteínas fluorescentes y los dominios GBD de efectores específicos, de tal manera que la localización de la señal de fluorescencia indica la acumulación de esta proteína en su forma activada en esa región de la célula.

#### 6.4.1 Efecto de las sondas sobre la inducción y migración de CN de *Xenopus*

En primera instancia, analizamos si la sobreexpresión de estas sondas afecta al modelo de estudio, ya sea en la inducción o en la migración de la CN. Para esto, se microinyectaron embriones en estadio de 8 células con ARNm de pGBD-GFP (30 pg) o rGBD-mCherry (100 pg). Se utilizaron las sondas a estas concentraciones, ya que al analizar la inyección de distintas cantidades de ARNm (rango de 20 a 150 pg), y obtener los respectivos explantes de CNC, las señales óptimas al analizarlas bajo microscopía confocal correspondieron a 30 pg y 100 pg de ARNm de pGBD-GFP y rGBD-mCherry, respectivamente (resultados no mostrados). Realizamos hibridación *in situ* de los embriones inyectados para detectar *snail2*, *twist* y *foxD3*, marcadores específicos de cresta neural, y *sox2*, marcador de neuroectodermo (placa neural), utilizado como un marcador del tejido adyacente. Los resultados muestran que la inyección de las sondas (ARNm de pGBD-GFP y rGBD-mCherry), no afectan a la inducción ni a la migración de la CN, así como tampoco al tejido adyacente, observándose que los marcadores *snail2*, *twist*, *foxD3* y *sox2* se expresan normalmente en los embriones en estadio 16 y estadio 23-24, tanto en el lado inyectado como en el lado no inyectado (Fig. 11).



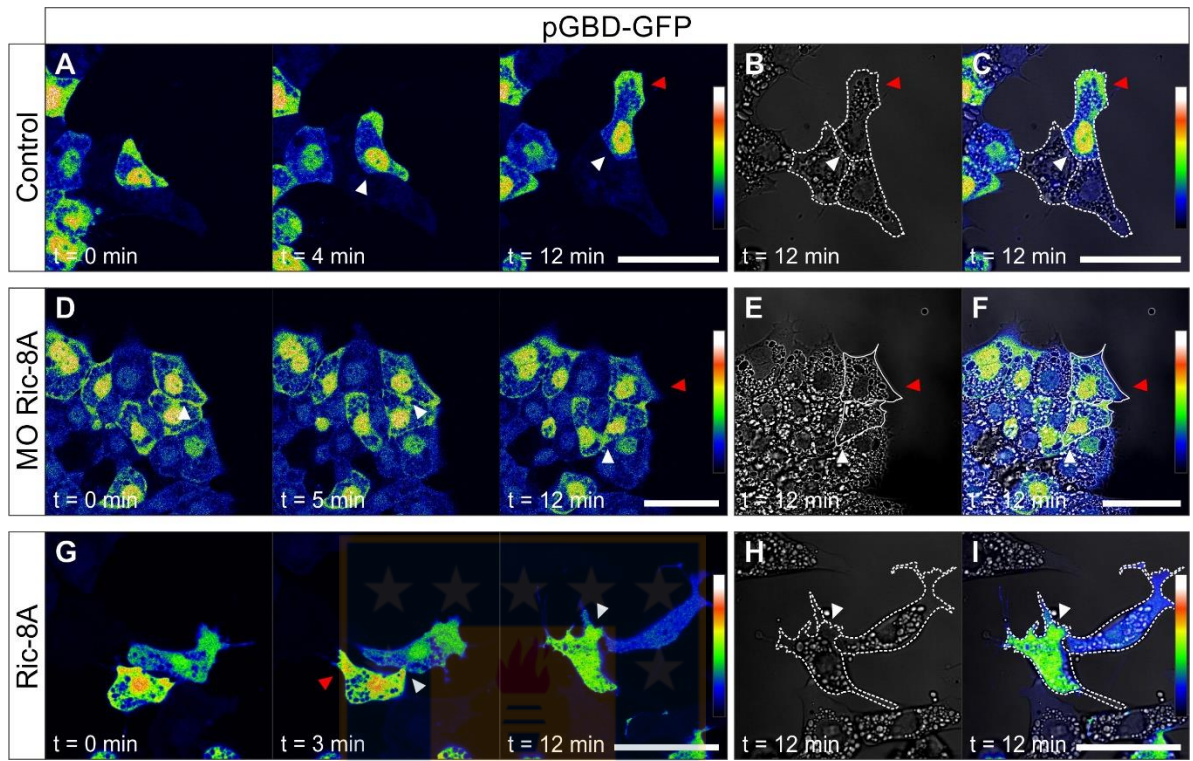
**Figura 11: Sobreexpresión de las sondas pGBD-GFP y rGBD-mCherry no afectan la inducción ni la migración de la CN.**

Hibridación *in situ* de embriones de *Xenopus tropicalis* inyectados con ARNm para sobreexpresar las sondas pGBD-GFP (detecta Rac1 activo) y rGBD-mCherry (detecta RhoA activo). La expresión de las sondas para Rac1 (**A**) y para RhoA (**B**) no afectaron la inducción de la CN, ya que en los embriones fijados en estadio 16 no se observan diferencias en los patrones de expresión de *snail2* y *sox2* entre el lado no inyectado (Ini) y el lado inyectado (li). Los embriones fijados en estadio 23-24 muestran que la expresión de las sondas para Rac1 (**A**) y para RhoA (**B**) no afecta la migración de la CN, ya que no se aprecian diferencias en los patrones de expresión de *snail2*, *twist* y *foxD3* entre el lado no inyectado (Ini) y el lado inyectado (li). (**C**) Cuantificación de los fenotipos observados representado en un gráfico de porcentajes del total de embriones por condición.

#### **6.4.2 Ric-8A controla la localización de Rac1 y RhoA activadas durante la migración de CN en *Xenopus***

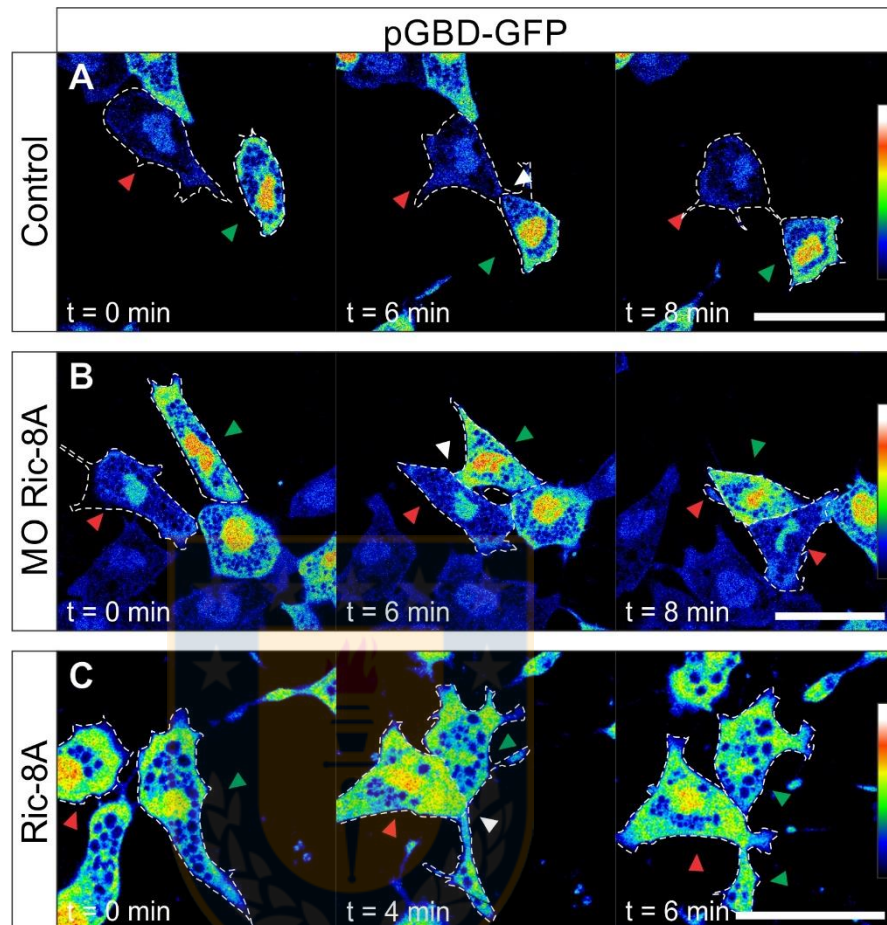
Se analizó el comportamiento de la actividad de Rac1 y RhoA en células de CN migratorias en condiciones de pérdida y ganancia de función de Ric-8A. Para esto, inyectamos el ARNm de las sondas pGBD-GFP y rGBD-mCherry en embriones en estadio de 8 células. Además, junto a las sondas se co-inyectó morfolino o ARNm para Ric-8A, para silenciar o sobreexpresar Ric-8A, respectivamente. Posteriormente se realizó explantes de CNC en estadio 17 y se analizaron las células migratorias en microscopio confocal realizando *timelapse*. En células de CN control, Rac1 activada se localiza en las protrusiones en el borde director, en dirección a la migración, y es inhibida en la zona de contacto célula-célula, como ya se había descrito previamente [Carmona-Fontaine y col., 2011] (Fig. 12 A-C). Este mismo fenotipo se observa en los ensayos de CIL, que permiten observar el comportamiento individual de las células al colisionar durante la migración (Fig. 13A). Por otra parte, las células morfantas de Ric-8A no son capaces de migrar y separarse de los explantes. De hecho, sus protrusiones son más pequeñas e inestables comparadas con la condición control, lo cual es consistente con nuestros trabajos previos [Fuentelba y col., 2013]. Además, en comparación con el control, los morfantas para Ric-8A presentan incremento en la actividad de Rac1 en la zona de unión célula-célula y no así en el borde director (Fig. 12 D-F). Este comportamiento celular se observa también en ensayos de CIL, donde en morfantas para Ric-8A observamos que cuando colisionan dos células, incrementa la actividad de Rac1 en la zona de contacto célula-célula y se superponen migrando una por encima de la otra (Fig. 13B). Además, en la condición de ganancia de función de Ric-8A, la actividad de Rac1 se conserva en el borde director como en el control, pero no es inhibida en el contacto célula-célula, por lo que su comportamiento durante CIL es similar a las células morfantas de Ric-8A (Fig. 12 G-I y Fig. 13C).





**Figura 12: Cambios en los niveles de expresión de Ric-8A afectan la localización de Rac1 activa.**

Imágenes representativas de *timelapses* de células de CN migratorias expresando la sonda pGBD-GFP, para la detección de la actividad de Rac1, en condiciones de pérdida o ganancia de función de Ric-8A. Las imágenes se tomaron en tiempos diferentes que están señalados en cada panel. **(A)** Células control muestran la localización Rac1 activada en la zona de protrusiones hacia el borde director y no en el contacto célula-célula (tiempo = 0, 4 y 12 min). La misma célula en **A** con tiempo = 12 min se muestra en luz transmitida **(B)** y como una superposición entre la actividad de Rac1 y luz transmitida **(C)**. **(D)** Células de CN con pérdida de función de Ric-8A muestra que Rac1 activada se localiza en el contacto célula-célula (tiempo = 0, 5 y 12 min). La misma célula en **D** con tiempo = 12 min se muestra en luz transmitida **(E)** y como una superposición entre la actividad de Rac1 y luz transmitida **(F)**. **(G)** Células de CN con ganancia de función de Ric-8A muestra que Rac1 activada se localiza en la zona de protrusiones y en el contacto célula-célula (tiempo = 0, 3 y 12 min). La misma célula en **G** con tiempo = 12 min se muestra en luz transmitida **(H)**, y como una superposición entre la actividad de Rac1 y luz transmitida **(I)**. Las barras de escala son de 40 μm. Las flechas blancas y rojas muestran cambios en la actividad de Rac1 en las protrusiones y en el contacto célula-célula, respectivamente. **(A-I)** n = 3.



**Figura 13: La pérdida y ganancia de función de Ric-8A afecta la invasión celular mediada por Rac1.**

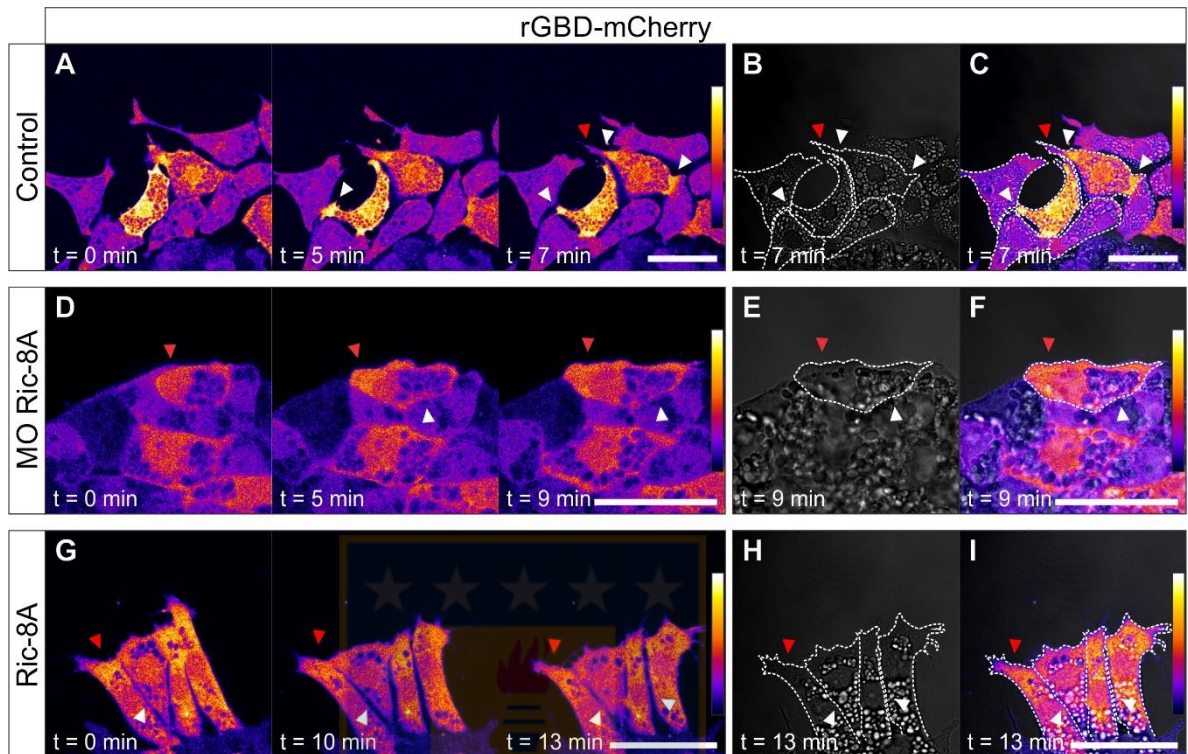
Imágenes representativas de *timelapses* de células de CN migratorias expresando la sonda pGBD-GFP, para la detección de la actividad de Rac1 en condiciones de pérdida o ganancia de función de Ric-8A. Las imágenes se tomaron en tiempos diferentes que están señalados en cada panel. **(A)** Imágenes de dos células control que al colisionar cambian su dirección de migración. La imagen tomada en  $t = 6$  min muestra la inactivación de Rac1 cuando se produce el contacto entre las células, y un incremento de actividad en el sentido opuesto. **(B)** Células con pérdida de función de Ric-8A mantienen Rac1 activo en la zona de contacto celular y se superponen, pasando una por encima de la otra. **(C)** Células con ganancia de función de Ric-8A también se superponen entre sí cuando colisionan. Las barras de escala son de  $40 \mu\text{m}$ . En cada panel, las flechas verdes y rojas marcan las dos células que colisionan, y las flechas blancas señalan la zona de colisión. **(A-C)**  $n = 3$ .

Por otro lado, la actividad de RhoA en células CN control se localiza en la zona de contacto célula-célula, y se encuentra inactiva en la zona del borde director (Fig. 14 A-C). Por el contrario, en células con pérdida de función de Ric-8A, se observa que RhoA activa se concentra principalmente en el borde director, hacia las protrusiones, y también se observa su actividad en la zona de contacto célula-célula, aunque disminuida (Fig. 14 D-F). Cuando hay sobreexpresión de Ric-8A, la actividad de RhoA se observa principalmente en el borde director libre de células, y no se observa activo en el contacto célula-célula (Fig. 14 G-I).

Estos resultados sugieren que los niveles de Ric-8A son cruciales para el establecimiento de la localización de las proteínas GTPasas activadas, y con ello, de la polaridad celular durante la migración de células de CN en *Xenopus*.







**Figura 14: Cambios en los niveles de expresión de Ric-8A afectan la localización de RhoA activa.**

Imágenes representativas de *timelapses* de células de CN migratorias expresando la sonda pGBD-mCherry, para la detección de RhoA activada en condiciones de pérdida o ganancia de función de Ric-8A. Las imágenes se tomaron en tiempos diferentes que están señalados en cada panel. **(A)** Células control muestran la localización RhoA activada en la zona contacto célula-célula (tiempo = 0, 5 y 7 min). La misma célula en **A** con tiempo = 7 min se muestra en luz transmitida **(B)**, y como una superposición entre la actividad de RhoA y luz transmitida **(C)**. **(D)** Células de CN con pérdida de función de Ric-8A muestra que RhoA activada se localiza en hacia las protrusiones en el borde director (tiempo = 0, 5 y 9 min). La misma célula en **D** con tiempo = 9 min se muestra en luz transmitida **(E)** y como una superposición entre la actividad de RhoA y luz transmitida **(F)**. **(G)** Células de CN con ganancia de función de Ric-8A muestra que RhoA activada se localiza en la zona de protrusiones, y en menor medida, en el contacto célula-célula (tiempo = 0, 10 y 13 min). La misma célula en **G** con tiempo = 13 min se muestra en luz transmitida **(H)** y como una superposición entre la actividad de RhoA y luz transmitida **(I)**. Las barras de escala son de 40  $\mu\text{m}$ . Las flechas blancas y rojas muestran cambios en localización de RhoA activada en las protrusiones y en el contacto célula-célula, respectivamente. **(A-I)** n = 3.

## 7 DISCUSIÓN

La migración celular es un proceso dependiente de múltiples vías de señalización, dentro de las que se destacan las mediadas por proteínas G heterotriméricas. Ric-8A es un GEF no-canónico para distintas proteínas G heterotriméricas, como las proteínas  $G\alpha_{12/13}$  y  $G\alpha_i$ , que han sido las más vinculadas con la migración celular, donde se las ha descrito en distintos tipos celulares controlando la remodelación del citoesqueleto de actina mediante la regulación de proteínas RhoGTPasas [Cotton y Claing, 2009; Kelly y col., 2007; Tall y col., 2003; Wiege K. y col., 2012]. La proteína citosólica Ric-8A es altamente conservada, y actúa tanto como GEF y como chaperona para subunidades  $\alpha$  de proteínas G heterotriméricas, y es requerida para que estas  $G\alpha$  transloquen a la membrana celular [Gabay y col., 2011; Klattenhoff y col., 2003]. Se ha descrito que Ric-8A regula procesos como la división celular asimétrica en *C. elegans* y *Drosophila* [Afshar y col., 2005; Wang y col., 2005], y la transmisión sináptica en *C. elegans* [Miller y col., 2000]. En nuestro grupo de investigación, identificamos una nueva función para Ric-8A durante el desarrollo embrionario de *Xenopus*, donde se comprobó que esta proteína es un regulador de la migración de las células de CNC controlando la formación de adhesiones celulares y la quimiotaxia, un rol clave que se hace evidente cuando se silencia la expresión de Ric-8A, ocasionando una inhibición significativa de la migración celular [Fuentealba y col., 2013; Toro-Tapia, Tesis Doctoral, 2016]. Este rol regulador de Ric-8A sobre la migración celular es consistente con estudios donde se ha observado que, luego del silenciamiento de Ric-8A, se produce una pérdida en la capacidad migratoria tanto en fibroblastos de embriones de ratón [Wang y col., 2011], como en linfocitos B [Boullaran y col., 2015]. Aún se desconoce el mecanismo a través del cual Ric-8A regula la migración de CNC, sin embargo, en nuestro laboratorio hemos comprobado que su control sobre la migración está relacionado con la regulación de  $G\alpha_{13}$  y  $G\alpha_i2$ , pues la sobreexpresión de

cualquiera de estas subunidades permite el rescate del fenotipo morfante de Ric-8A (condición de silenciamiento de Ric-8A) [Toro-Tapia, Tesis Doctoral, 2016; Villaseca S., Tesis de magíster, 2017]. En el presente trabajo de tesis, demostramos que Ric-8A controla la polaridad celular durante la migración de CNC, lo que fue observado al realizar ensayos de pérdida y ganancia de su función que produjeron cambios en la localización y la actividad de distintas proteínas que regulan la polarización celular. Sobre la base de estos hallazgos, proponemos un modelo que representa el control de Ric-8A sobre la polaridad celular (Fig. 15).

Las células de CNC migran de forma colectiva coordinando tres mecanismos que requieren polaridad celular: CIL, co-atracción y quimiotaxia [Theveneau y Mayor, 2012b]. Como previamente habíamos descrito que el silenciamiento de Ric-8A produce la inhibición de la migración de la CNC, donde observamos que explantes de CNC perdían la capacidad de dispersarse y migrar radialmente [Fuentealba y col., 2013], existía la posibilidad de que Ric-8A fuese requerido también para la transición epitelio-mesenquimal (TEM), y eso explicaría de paso el fenotipo no migratorio de las células. En nuestro laboratorio hemos observado que las CN en estadio no migratorio presentaban E-cadherinas y ausencia de N-cadherinas [Toro-Tapia, Tesis Doctoral, 2016], por lo que descartamos la posibilidad de que Ric-8A regulara la TEM al observar que, en estadio migratorio, las células de la CNC morfantes para Ric-8A tienen ausencia de E-cadherina y expresan N-cadherina, lo que corresponde al fenotipo mesenquimal normal de estas células durante el proceso de migración [Theveneau y Mayor, 2012a; Scarpa y col., 2015]. Con el fin de migrar, las células de la CNC están altamente polarizadas hacia la dirección de la migración. En este contexto, la señalización de PCP (Polaridad celular planar) es un regulador clave de la polaridad celular de células de CNC, controlando la reorganización del citoesqueleto y la morfología celular [Vladar y col., 2009]. Como las proteínas que regulan la polaridad celular durante la migración y la división celular

asimétrica son las mismas, nos centramos en analizar la polaridad celular mediada por Ric-8A. Varios estudios han descrito que la posición del huso mitótico durante la división celular asimétrica es regulada por vías de señalización no-canónicas de proteínas G heterotriméricas, controlada por el GEF Ric-8A y por proteínas GDI (GPR1/2 en *C. elegans* y Pins en *Drosophila*) [Hinrichs y col., 2012; Miller y Rand, 2000; Wang y col., 2005]. Además, las proteínas de la familia Par y aPKC regulan la polarización celular durante la migración, posicionando el MTOC y el aparato de Golgi para orientar la dirección del crecimiento de los microtúbulos hacia el borde director [Etienne-Manneville y Hall, 2003; Lawson y Ridley, 2018; Ridley y col., 2003]. En *C. elegans*, Par3, Par6 y aPKC están localizados en la región anterior del cigoto durante la división celular asimétrica, mientras que Par1 y Par2, junto con Ric-8, Gα-GDP y GPR1/GPR2 están en la región posterior [Wilkie y Kinch, 2005]. También en mamíferos, se ha visto a Ric-8A y Gαi hacia la corteza celular, regulando la orientación del huso mitótico en la división celular a través de LGN, Numa y dineína [Woodard y col., 2010]. Con experimentos de pérdida y ganancia de función de Ric-8A, buscamos cambios en la localización de las proteínas Par3 y aPKC, las cuales fueron utilizadas como marcadores de polaridad, y observamos que al silenciar Ric-8A, estas cambian su localización sugiriendo con ello pérdida en la polaridad celular. Estos resultados sugieren que Ric-8A es requerido para la polarización celular, y son consistentes con otros estudios donde se observó que linfocitos B knockout para Ric-8A, eran incapaces de migrar hacia un factor quimioatrayente presentando una localización anormal de aPKC, indicando defectos en la polaridad celular [Boullaran y col., 2015]. Por lo tanto, aunque durante este trabajo de tesis no se realizaron estudios bioquímicos de interacción de proteínas, no descartamos la posibilidad de que, para controlar la polaridad durante la migración, Ric-8A se encuentre formando parte de complejos proteicos junto con Par3 y/o aPKC, lo que se propone demostrar a futuro.

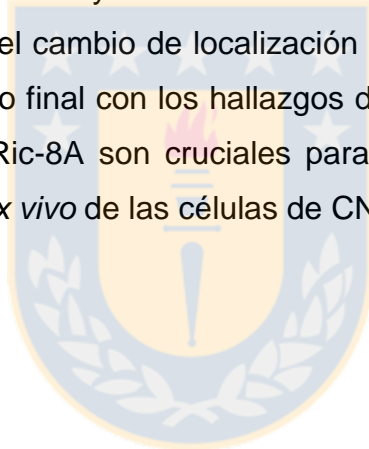
Otra forma de estudiar la probable función de Ric-8A sobre el establecimiento de la polaridad celular fue a través de la evaluación de la actividad de las proteínas pertenecientes a la familia Rho GTPasas, a través de la utilización de biosensores FRET, que son capaces de detectar la actividad espacio-temporal de las proteínas Rac1 y RhoA, pero nos encontramos con dificultades para utilizarlos en células de CNC. Los biosensores FRET pueden utilizarse para estudios en líneas celulares HeLa y HEK 293T, las cuales no poseen autofluorescencia, o es baja a un nivel despreciable. Sin embargo, en células de CNC la autofluorescencia en el canal cian es tan alta que no permite distinguir la fluorescencia emitida por el fluoróforo CFP, y por lo tanto, produce una interferencia que nos impidió realizar el método FRET. Durante esta tesis intentamos distintos métodos descritos para disminuir la autofluorescencia y realizar FRET con estos biosensores, pero sin tener resultado. Un método que no pudimos probar, y que podría ser una alternativa a futuro, es excitar las muestras con un láser de 430 nm, el cual está disponible en el mercado de microscopía fluorescente, pero que no ha sido adquirido para microscopios de la Universidad de Concepción. Cabe mencionar, que estos mismos biosensores han sido utilizados en estudios de *Xenopus laevis* por otro grupo de investigación excitando con el mismo láser que nosotros utilizamos [Matthews y col., 2008; Scarpa y col., 2015], por esta razón probamos en este modelo y también tuvimos problemas con una autofluorescencia similar a la observada en *Xenopus tropicalis*. Una de las diferencias entre nuestro método y el descrito por estos investigadores es que nosotros evaluamos seFRET (*Sensitized Emission*), lo cual nos permitiría analizar la actividad de las Rho GTPasas en células vivas mediante *timelapse*, mientras que el otro grupo de investigación utiliza apFRET (*Acceptor Photobleaching*), que requiere células fijadas y controles de los fluoróforos separados, que no poseíamos. apFRET sufre menor interferencia por autofluorescencia, pero del modelo, una autofluorescencia alta como la observada es un obstáculo para realizar cualquier medición FRET [Bryce y col., 2016]. Una



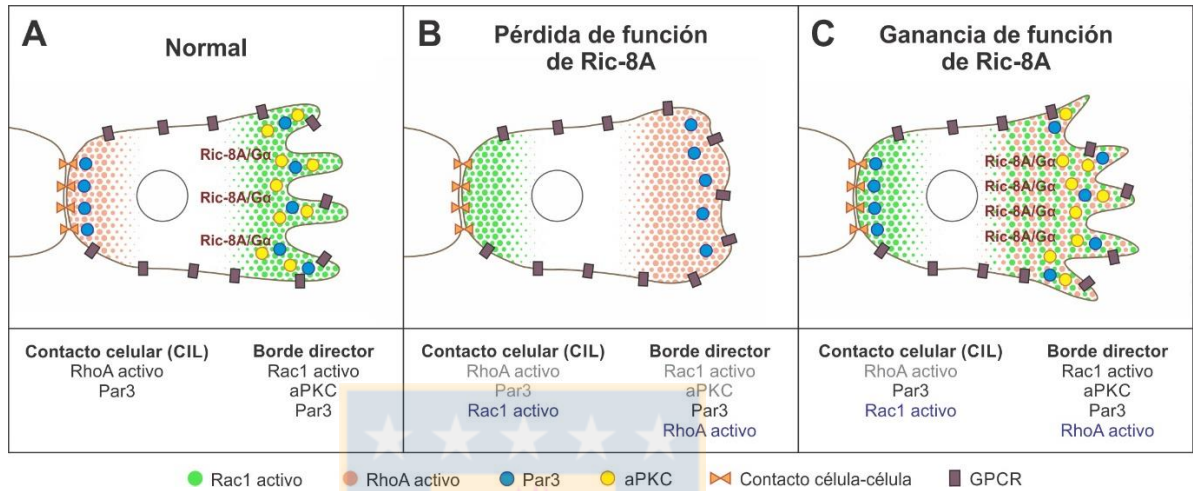
solución para realizar FRET en CNC con los equipos que actualmente tenemos en nuestra Universidad, sería modificar el par de fluoróforos CFP-YFP por otro par FRET más lejano a la autofluorescencia, como GFP-RFP. Sin embargo, durante este trabajo de tesis logramos estandarizar el método FRET utilizando estos biosensores para realizar otros estudios utilizando cultivos celulares, los que podrán ser de utilidad tanto para nosotros como para otros grupos de investigación en nuestra Universidad. Por lo tanto, para poder continuar nuestro estudio utilizamos otras sondas que nos permitieron detectar en CNC la actividad de Rac1 y RhoA.

Nuestros resultados muestran que Ric-8A es requerido para establecer la polaridad celular *ex vivo*, ya que cambios en los niveles de este producen cambios en la localización de Rac1 y RhoA activadas en las células de CNC durante la migración. Por lo anterior, sumado al cambio en la localización de Par3 y aPKC, concluimos que Ric-8A tiene un rol crítico durante la polarización celular en la migración de CNC. Se observó también que, bajo condiciones de ganancia y pérdida de función de Ric-8A, las células migratorias pierden la función CIL, perdiendo la capacidad de repelerse y pasando unas sobre otras. Cabe señalar que normalmente Rac1 es inhibida cuando dos células entran en contacto, pero cuando la vía de Ric-8A se desregula, Rac1 se activa en la zona de contacto célula-célula, y por lo tanto, las células que colisionan generan protrusiones sin cambiar de dirección. Esto se relaciona con que en *Xenopus*, Par3 actúa como inhibidor de Trio, un GEF para Rac1, promoviendo la catástrofe de microtúbulos en la zona de contacto celular [Moore y col., 2013], y como Ric-8A es necesaria para mantener su localización, Rac1 no es inhibida en esta zona y la célula deja de censar CIL. No obstante, las proteínas Rac1 y RhoA son reguladas por diversas proteínas GEF, GAP y GDI, dándoles a estas Rho GTPasas la capacidad de activarse en momentos específicos y de manera localizada dentro de la célula [Lawson y Ridley, 2018]. Por lo que es probable que Ric-8A, a través de sus funciones como GEF y chaperona de las subunidades  $G\alpha$ , este regulando

a más de un regulador de estas Rho GTPasas y su identificación puede ser foco de estudio a futuro. Además, como las GTPasas pequeñas se regulan entre ellas, cualquier desregulación en una de ellas puede resultar en una regulación anormal en las otras. Por lo tanto, sugerimos que Ric-8A, controlando río arriba a una o varias proteínas G heterotriméricas, regula la localización de aPKC y Par3, y las actividades de Rac1 y RhoA. Por otra parte, las sondas con las que se detectó la actividad de Rac1 y RhoA no permiten realizar una cuantificación de la actividad de las proteínas (lo que con los biosensores FRET habría sido posible), sino que solo cambios de localización, pero sería interesante analizar si Ric-8A produce activación y/o inhibición de Rac1 o RhoA en las células migratorias, además del cambio de localización de su actividad. En conclusión, proponemos un modelo final con los hallazgos de esta tesis, donde se muestra como los niveles de Ric-8A son cruciales para regular la polarización celular durante la migración *ex vivo* de las células de CNC (Fig. 15).







**Figura 15: Ric-8A controla la polaridad celular durante la migración de CNC.**

A partir de los resultados de esta tesis, se propone el siguiente modelo. Ric-8A, a través de sus funciones de GEF y chaperona sobre las subunidades G $\alpha$ , transloca las proteínas aPKC y Par3 a la corteza celular controlando río abajo la localización de las GTPasas activas. **(A)** Células normales mantienen a Rac1 activo y aPKC en el borde director, y mantienen a RhoA activo y Par3 en el contacto célula-célula. **(B)** Células con pérdida de función de Ric-8A presentan pérdida de localización de Par3 y aPKC, y un cambio en la localización de Rac1 activada en el contacto célula-célula y de RhoA activada en el borde director. **(C)** Células con ganancia de función de Ric-8A presentan localización normal de Par3 y aPKC, pero cambios en la localización de Rac1 y RhoA activadas. En el borde director permanecen activos tanto Rac1 como RhoA, y en el contacto célula-célula Rac1 cambia respecto al control y pasa a estar activo, y RhoA cambia a inactivo.

## 8 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se puede concluir que:

1. El silenciamiento de Ric-8A no afecta la Transición Epitelio-Mesenquimal.
2. aPKC y Par3 pierden su localización polarizada en explantes morfantes para Ric-8A.
3. Rac1 se mantiene activado en el contacto célula-célula cuando se silencia y cuando se sobreexpresa Ric-8A.
4. RhoA activo disminuye su localización en el contacto célula-célula cuando se silencia y cuando se sobreexpresa Ric-8A.
5. Por lo tanto, los niveles de Ric-8A son cruciales para el establecimiento de la polaridad celular durante la migración de la CNC.

## 9 REFERENCIAS

- Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Siderovski, D.P., Gönczy, P., 2005. Cortical localization of the Galpha protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division. *Development* 132, 4449–4459.
- Alfandari, D., Cousin, H., Marsden, M. 2010. Mechanism of *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Cell Adh Migr* 4: 553-560.
- Arriagada C. 2012. Análisis de la localización subcelular de XtRic-8A y de su participación en la polarización celular en embriones de *X. tropicalis*. Tesis de Magíster en Bioquímica y Bioinformática, Universidad de Concepción.
- Aybar, M., Nieto, M., 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.
- Barriga, E.H., Maxwell, P.H., Reyes, A.E., Mayor, R. 2013. The hypoxia factor Hif-1a controls neural crest chemotaxis and epithelial to mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 201, 759–776.
- 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.
- Bellaiche, Y., Gotta, M. 2005. Heterotrimeric G proteins and regulation of size asymmetry during cell division. *Curr. Op. Cell Biol.* 17, 658–663.
- Betschinger, J., Knoblich, J. A. 2004. Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Current Biology* : CB, 14(16), R674–85.
- Billinton N, Knight AW. 2001. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal Biochem.* 2001 Apr 15;291(2):175-97.
- Birnbaumer L. 2007. Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: From 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *BiochimBiophysActa* 1768:772–793.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* Nov 24;7(6):1513-23.
- Boissier, P., and Huynh-Do, U. 2014. The guanine nucleotide exchange factor Tiam1: a Janus-faced molecule in cellular signaling. *Cell. Signal.* 26, 483–491.

- Boullaran, C., Hwang, I.-Y., Kamenyeva, O., Park, C., Harrison, K., Huang, Z., Kehrl, J.H., 2015. B lymphocyte-specific loss of Ric-8A results in a G $\alpha$  protein deficit and severe humoral immunodeficiency. *J. Immunol.* 195, 2090–2102.
- Bryce T. Bajar, Emily S. Wang, Shu Zhang, Michael Z. Lin, Jun Chu. 2016. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors (Basel) Sep*; 16(9): 1488.
- Bronner-Fraser, M., Sauka-Spengler, T. 2008. Evolution of the neural crest view from a gene regulatory perspective. *Genesis.* 46, 673-682.
- Burstyn-Cohen, T. y Kalcheim, C. 2002. Association between the cell and neural crest delamination through specific regulation of G1/S transition. *Dev. Cell.* 3:383395.
- Carmona-Fontaine, C., Matthews, H.K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G.A., Parsons, M., Stern, C.D., 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.M., Parsons, M., Lambris, J.D., Mayor, R. 2011. Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration. *Dev. Cell.* 21, 1026-1037.
- Chang, W.K., Carmona-Fontaine, C., Xavier, J.B. 2013. Tumor–stromal interactions generate emergent persistence in collective cancer cell migration. *Interface Focus*, 3, 20130017–20130017.
- Chishiki, K., Kamakura, S., Yuzawa, S., Hayase, J., Sumimoto, H. 2013. Ubiquitination of the heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunits Gai2 and Gaq is prevented by the guanine nucleotide exchange factor Ric-8A. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 435(3), 414–419.
- Clay M., Halloran M. 2011. Regulation of cell adhesions and motility during initiation of neural crest migration. *Current Opinion in Neurobiology.* 21(1):17–22.
- 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., Claing, A. 2009. G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cell Sign.* 21, 1045–1053.
- De Pascalis, C., and S. Etienne-Manneville. 2017. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Mol. Biol. Cell.* 28:1833–1846. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-03-0134>
- Domoto, Takahiro & Pyko, Ilya & Furuta, Takuya & Miyashita, Katsuyoshi & Uehara, Masahiro & Shimasaki, Takeo & Nakada, Mitsutoshi & Minamoto, Toshinari. 2016.

- Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is a pivotal mediator of cancer invasion and resistance to therapy. *Cancer Science*. 107. 10.1111/cas.13028.
- Donnelly SK, Bravo-Cordero JJ, Hodgson L. Rho GTPase isoforms in cell motility: Don't FRET, we have FRET. *Cell Adhes Migr*. 2014;8:526–534. doi: 10.4161/cam.29712.
- Etienne-Manneville, S. 2013. Microtubules in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 471-499.
- Etienne-Manneville, S., Hall, A. 2003. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr. Op. Cell Biol.* 15, 67–72.
- Friedl, P., and R. Mayor. 2017. Tuning Collective Cell Migration by Cell-Cell Junction Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9:a029199. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029199>
- Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, L., Beyer, A., Henriquez, J.P., Caprile, T., Mayor, R., Marcellini, S., Hinrichs, M.V., Olate, J., Torrejón, M. 2013. Ric8A, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, is critical for cranial neural crest cell migration. *Dev. Biol.* 378, 74-82.
- Gabay, M., Pinter, M. E., Wright, F. A., Chan, P., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., et al. 2011. Ric8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein  $\alpha$  subunit membrane association. *Science Signaling*, 4(200), ra79–ra79.
- Gallik, K.L., Treffy, R.W., Nacke, L.M., Ahsan, K., Rocha, M., Green-Saxena, A., Saxena, A., 2017. Neural crest and cancer: Divergent travelers on similar paths. *Mechanisms of Development* 148, 89–99.
- Gammill, L. S., Gonzalez, C., & Bronner-Fraser, M. 2007. Neuropilin 2/semaphorin 3F signaling is essential for cranial neural crest migration and trigeminal ganglion condensation. *Developmental Neurobiology*, 67(1), 47–56.
- Gilbert, S. F. 2013. *Developmental Biology*. 10th edition. Sinauer Associates. Publishers. Massachusetts.
- Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. 2007. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26:3122–3142.
- Groysman, M., Shoval, I., & Kalcheim, C. 2008. A negative modulatory role for rho and rho-associated kinase signaling in delamination of neural crest cells. *Neural Development*, 3(1), 27.
- Hall, B. K. 2008. The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *Journal of Biosciences*, 33(5), 781–793.

- Hinrichs, M.V., Torrejón, M., Montecino, M., Olate, J., 2012. Ric-8: different cellular roles for a heterotrimeric G-protein GEF. *J. Cell. Biochem.* 113, 2797–2805.
- Horgan A., Lagrange M., Copenhaver P. 1994. Developmental expression of G proteins in a migratory population of embryonic neurons. *Development.* 120:729-742.
- Itoh, R. E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N. and Matsuda, M. 2002. Activation of Rac and Cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Molecular and Cell Biology.* 22 :6582-6591.
- Kashef, J., Köhler, A., Kuriyama, S., Alfandari, D., Mayor, R., & Wedlich, D. 2009. Cadherin-11 regulates protrusive activity in *Xenopus* cranial neural crest cells upstream of Trio and the small GTPases. *Genes & Development*, 23(12), 1393–1398.
- Kelleher, F. C., Fennelly, D., Rafferty, M. 2006. Common critical pathways in embryogenesis and cancer. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 45, 375–388.
- Kelly, P., Casey, P. J., & Meigs, T. E. 2007. Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric g proteins: growth, migration, and metastasis. *Biochemistry*, 46(23), 6677–6687.
- Klattenhoff, C., Montecino, M., Soto, X., Guzmán, L., Romo, X., García, M.A., Mellstrom, B., Naranjo, J.R., Hinrichs, M.V., Olate, J., 2003. Human brain synembryon interacts with Gs alpha and Gq alpha and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *J. Cell. Physiol.* 195, 151–157.
- Kuriyama S., Mayor R. 2008. Molecular analysis of neural crest migration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 1349–1362.
- LaBonne, C., 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.
- Lambert, J. M., Lambert, Q. T., Reuther, G. W., Malliri, A., Siderovski, D. P., Sondek, J., Collard, J. G., Der, C. J. 2002. Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nature Cell Biol.* 4: 621-625
- Lawson, C.D., Ridley, A.J. 2018. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J. Cell Bio.* 217, 447-457.
- Le Clainche, C., Carlier, M.-F. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* 88, 489-513.
- Le Douarin N.M., C. Kalcheim. 1999. *The Neural Crest.* Cambridge University Press.



- Leal, J. I. 2015. Co-expresión y purificación de las proteínas G $\alpha$ 13 y Ric-8A como complejo proteico. Tesis de pregrado de Bioingeniería, Universidad de Concepción.
- Lin, F., Sepich, D. S., Chen, S., Topczewski, J., Yin, C., Solnica-Krezel, L., & Hamm, H. 2005. Essential roles of G $\alpha$ 12/13 signaling in distinct cell behaviors driving zebrafish convergence and extension gastrulation movements. *The Journal of Cell Biology*, 169(5), 777–787.
- Liu JP & Jessell TM. 1998. A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development*. Dec;125(24):5055-67.
- Maldonado-Agurto, R., Toro, G., Fuentealba, J., Arriagada, C., Campos, T., Albistur, M., Henriquez, J.P., Olate, J., Hinrichs, M.V., Torrejón, M. 2011. Cloning and Spatiotemporal expression of RIC-8 in *Xenopus* embryogenesis. *Gen. Exp. Patt.* 11, 401– 408.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Matthews H.K., Marchant L., Carmona-Fontaine C., Kuriyama S., Larraín J., Holt M.R., Parsons M., Mayor R. 2008. Directional migration of neural crest cells *in vivo* is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development*. May;135(10):1771-80.
- Maureira A, Sánchez R, Valenzuela N, Torrejón M, Hinrichs MV, Olate J, Gutiérrez JL. 2016. The CREB Transcription Factor Controls Transcriptional Activity of the Human RIC8B Gene. *J Cell Biochem*. 117(8):1797-805. doi:10.1002/jcb.25479
- Mayor R., Carmona-Fontaine C. 2010. Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol*. 20, 319–328. 10.1016/j.tcb.2010.03.005
- Mayor, R., Etienne-Manneville, S. 2016. The front and rear of collective cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 17, 97–109.
- Mayor, R., Morgan, R., Sargent, M. G. 1995. Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121: 767–777.
- Mayor, R., Theveneau, E. 2013. The neural crest. *Development* (Cambridge, England), 140, 2247–2251.
- Milet, C., & Monsoro-Burq, A. H. 2012. Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Developmental Biology*, 366(1), 22–33.
- Miller, K. G., Emerson, M. D., McManus, J. R., & Rand, J. B. 2000. RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)alpha signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron*, 27(2), 289–299.



- Miller, K.G. Rand, J.B. 2000. A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *C. elegans*. *Genetics*. 156, 1649-1660.
- Mitchell FL, Marks GE, Bichenkova EV, Douglas KT, Bryce RA. 2008. Molecular probes: insights into design and analysis from computational and physical chemistry. *Biochem Soc Trans*. Feb;36(Pt 1):46-50.
- Moore, R., Theveneau, E., Pozzi, S., Alexandre, P., Richardson, J., Merks, A., Parsons M., Kashef J., Linker C., Mayor R. 2013. Par3 controls neural crest migration by promoting microtubule catastrophe during contact inhibition of locomotion. *Development*. 140, 4763–4775.
- Nagai Y., Nishimura A., Tago K., Mizuno N., Itoh H. Ric-8b stabilizes the alpha subunit of stimulatory g protein by inhibiting its ubiquitination. *J. Biol. Chem*. 2010;285:11114–11120. doi: 10.1074/jbc.M109.063313.
- Nandadasa, S., Tao, Q., Menon, N. R., Heasman, J., & Wylie, C. 2009. N- and E-cadherins in *Xenopus* are specifically required in the neural and non-Neural ectoderm, respectively, for F-actin assembly and morphogenetic movements. *Development (Cambridge, England)*, 136(8), 1327–1338.
- Nieuwkoop, PD., Faber, J. 1994. Normal table of *Xenopus laevis*. North Holland, Amsterdam.
- 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.
- Offermanns S. 2003. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol*. Oct;83(2):101-30.
- Oka, Y., Saraiva, L., Kwan, Y., Korsching, S. 2009. The fifth class of G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(5):1484-9.
- Oldham, W. M., & Hamm, H. E. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(1), 60–71. <http://doi.org/10.1038/nrm2299>
- Osmani, N., Peglion, F., Chavrier, P., Etienne-Manneville, S. 2010. Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J. Cell Biol*. 191, 1261- 1269.
- Parri, M., Chiarugi, P. 2010. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun. Sign. CCS*, 8, 23.
- Paterson, E.K., and S.A. Courtneidge. 2017. Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *FEBS J*. <https://doi.org/10.1111/febs.14123>

- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L. and Hahn, K. M. 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*. 440: 1069-1072.
- Pierce, K., Premont R., Lefkowitz R. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Sep;3(9):639-50.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Horwitz, A.R. 2003. Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science*, 302, 1704–1709.
- Rodríguez M. 2016. Estudio funcional de Ric-8A durante la inducción de las Crestas Neurales en *Xenopus tropicalis*. Tesis de Magíster en Bioquímica y Bioinformática, Universidad de Concepción.
- Rodríguez, O.C., Schaefer, A.W., Mandato, C.A., Forscher, P., Bement, W.M. Waterman-Storer, C.M. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol*. 5, 599-609.
- Romo X, Pastén P, Martínez S, Soto X, Lara P, Ramírez A, Torrejón M, Montecino M, Hinrichs MV, Olate J. 2008. Ric-8 is a GEF for Gas and participates in maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Physiol*. 214:673–680.
- Sabbatini M., Bi Yan, Ji Baoan, Ernst Stephen, Williams J. 2010. CCK activates RhoA and Rac1 differentially through Gα13 and Gαq in mouse pancreatic acini. *J Physiol Cell Physiol*. Mar; 298(3): C592–C601.
- Sato M, Blumer JB, Simon V, Lanier SM. 2006. Accessory proteins for G proteins: Partners in signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 46:151–187.
- Sauka-Spengler, T. y Bronner-Fraser, M. 2008. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9, 557-568.
- Scarpa, E., Szabo, A., Bibonne, A., Theveneau, E., Parsons, M., Mayor, R., 2015. Cadherin switch during EMT in neural crest cells leads to contact inhibition of locomotion via repolarization of forces. *Dev. Cell* 34:421–434.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E. et al. 2012, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* 9(7): 676-682, PMID 22743772.
- Shepherd TR, Klaus SM, Liu X, Ramaswamy S, DeMali KA, Fuentes EJ. 2010. The Tiam1 PDZ domain couples to Syndecan1 and promotes cell-matrix adhesion. *Mol Biol*. May 21;398(5):730-46.
- Shoval I., Kalcheim C. 2012. Antagonistic activities of Rho and Rac GTPases underlie the transition from neural crest delamination to migration. *Developmental Dynamics*. 241:1155–1168.

- Siller, K., Doe, C. 2009. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nature Cell Biology*, 11(4), 365–374.
- Sive y col. Harland Lab. 2000. Early Development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual CSHL Press. [https://tropicalis.berkeley.edu/gene\\_expression/in-situ/insitu.html](https://tropicalis.berkeley.edu/gene_expression/in-situ/insitu.html)
- Spiering D., Hodgson L. 2011. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhesion & Migration*. 5(2):170-180.
- Stephenson, R.E., Miller, A.L. 2017. Tools for live imaging of active Rho GTPases in *Xenopus*. *Genesis*, 55. DOI 10.1002/dvg.22998.
- Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuryama S. and Mayor R. 2009. Differential requirements of BMP and Wnt signaling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development*. Vol. 136: 771-779.
- Steventon, B., Mayor, R., 2012. Early neural crest induction requires and initial inhibition of Wnt signals. *Dev. Biol.* 367, 55-65.
- Strobl-Mazzulla P.H., Bronner M.E. 2012. Epithelial to mesenchymal transition: new and old insights from the classical neural crest model. *Semin. Cancer Biol.*, 22, pp. 411-416, 10.1016/j.semcancer.2012.04.008
- Sun Tong, Marbelys Rodriguez, Leung Kim. 2009. Glycogen synthase kinase 3 in the world of cell migration. *Dev Growth Differ.* Dec;51(9):735-42.
- Szabó A., Melchionda M., Nastasi G., Woods M.L., Campo S., Perris R., Mayor R. 2016. *In vivo* confinement promotes collective migration of neural crest cells. *J Cell Biol.* 213(5):543-55.
- Szabó, A., & Mayor, R. 2015. Cell traction in collective cell migration and morphogenesis: The chase and run mechanism. *Cell Adhesion & Migration*, 9(5), 380–383.
- Tall GG, Krumin AM, Gilman AG. 2003. Mammalian Ric-8A (Synembryn) is a heterotrimeric Gα protein guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 278:8356–8362.
- Theveneau E., Mayor R. 2010. Integrating chemotaxis and contact-inhibition during collective cell migration. *Small GTPases at work. Landes Bioscience, Small GTPases.* 2010; 1:2, 1-5.
- Theveneau E., Mayor R. 2011. Collective cell migration of the cephalic neural crest: The art of integrating information. *Genesis* 49:164–176.
- Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., Mayor, R. 2010. Collective chemotaxis requires contact dependent cell polarity. *Developmental Cell.* 19, 39 – 53.

- Theveneau, E., Mayor, R. 2012a. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev. Biol.* 366, 34–54.
- Theveneau, E., Mayor, R. 2012b. Neural crest migration: Interplay between chemorepellents, chemoattractants, contact inhibition, epithelial— Mesenchymal transition, and collective cell migration. *Wiley Interdisciplinary Rev. Dev. Biol.* 1, 435–445.
- Theveneau, E., Steventon, B., Scarpa, E., Garcia, S., Trepát, X., Streit, A., Mayor, R., 2013. Chase-and-run between adjacent cell populations promotes directional collective migration. *Nat. Cell Biol.* 15:763–772.
- Timmerman I, Heemskerk N, Kroon J, Schaefer A, van Rijssel J, Hoogenboezem M, van Unen J, Goedhart J, Gadella TW Jr, Yin T, Wu Y, Huveneers S, van Buul JD. 2015. A local VE-cadherin and Trio-based signaling complex stabilizes endothelial junctions through Rac1. *J Cell Sci* 2015 128: 3041-3054
- Tõnissoo T, Koks S, Meier R, Raud S, Plaas M, Vasar E, Karis A. 2006. Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behav Brain Res* 167:42–48.
- Toro-Tapia G. 2016. Estudio de la función de Ric-8A y Gα13 durante la migración de las células de la cresta neural craneal en *Xenopus*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas Área Biología Celular y Molecular, Universidad de Concepción.
- Toro-Tapia, G., Villaseca, S., Leal, J.I., Beyer, A., Fuentealba, J., Torrejón, M. 2017. *Xenopus* as a model organism to study heterotrimeric G-protein pathway during collective cell migration of neural crest. *Genesis* DOI 10.1002/dvg.23008.
- Trainor, P.A. 2010. Craniofacial Birth Defects: The Role of Neural Crest Cells in the Etiology and Pathogenesis of Treacher Collins Syndrome and the Potential for Prevention. *Am. J. Med. Genet.* 0(12): 2984–2994. doi:10.1002/ajmg.a.33454.
- Vedula, S.R.K., Rivasio, A., Lim, C.T., Ladoux, B. 2013. Collective cell migration: A mechanistic perspective. *Physiology.* 28, 370–379.
- Villaseca S. 2017. Estudio de la función de las proteínas Gai2 y Ric-8A en la morfología y polarización celular durante la migración de células de la Cresta Neural Craneal en *Xenopus*. Tesis de Magíster en Bioquímica y Bioinformática, Universidad de Concepción.
- Vladar, E.K., Antic, D., Axelrod, J.D., 2009. Planar cell polarity signaling: the developing cell's compass. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002964.

- 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. *Nat. Cell Biol.* 7, 1091-1098.
- Wiege, K., Le, D. D., Syed, S. N., Ali, S. R., Novakovic, A., Beer-Hammer, S., et al. 2012. Defective macrophage migration in Gai2- but not Gai3-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(2), 980–987.
- Wilkie, T.M., Kinch, L., 2005. New roles for Galpha and RGS proteins: communication continues despite pulling sisters apart. *Curr. Biol.* 15, R843–R854.
- Wirth, A., Benyo, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Orsy, P., Horvath, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E., Lemmer, B., Schutz, G., Gutkind, J. S., Offermanns, S. 2008. G-12-G-13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nature Med.* 14: 64-68, 2008.
- Woods, M. L., Carmona-Fontaine, C., Barnes, C. P., Couzin, I. D., Mayor, R., & Page, K. M. 2014. Directional collective cell migration emerges as a property of cell interactions. *PLoS One*, 9(9), e104969.
- Woodard, G.E., Huang, N.-N., Cho, H., Miki, T., Tall, G.G., Kehrl, J.H., 2010. Ric-8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3519–3530
- Yang J, Yang F, Campos LS, William Mansfield, Helen Skelton, Yvette Hooks, Pentao Liu. 2017. Quenching autofluorescence in tissue immunofluorescence. *Wellcome Open Res* 2017, 2:79