



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

**Participación y rol de conexas en la liberación de ATP en el  
proceso de neurulación en *Xenopus laevis***



Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

**LINA MARIANA TOVAR  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2020**

Profesor Guía: Patricio Alejandro Castro Maldonado  
Departamento de fisiología,  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Profesor tutor

---

Dr. Patricio Castro M.  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



---

Dra. Marcela Torrejón Q.  
Profesor Evaluador Interno  
Universidad de Concepción

---

Dr. Agustín Martínez  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad de Valparaíso

Director de Programa

---

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

## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo quiero agradecer a las personas e instituciones que hicieron posible su desarrollo:

A la Universidad de Concepción, a la Facultad de Ciencias Biológicas, al Programa de Magister de Bioquímica y Bioinformática, al Departamento de Fisiología y a los profesores que hicieron posible la realización de este trabajo.

Debo agradecer de manera sincera y especial al Doctor Patricio Castro Maldonado por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Muchas gracias por su confianza, tiempo, apoyo, enseñanza brindada en el laboratorio, por las correcciones en las presentaciones y escritos, que me llevaron a finalizar de forma exitosa este trabajo de tesis.

Agradezco al Dr. Carlos Felipe Burgos por su ayuda y guía en la realización de los estudios *in silico*, que resultaron fundamentales para el adecuado desarrollo del presente trabajo. Asimismo, quisiera agradecer a la Dra. Antonia Recabal y a la Srta. Yenifer Argel por las recomendaciones experimentales, por los consejos académicos y personales, por los momentos de amistad y por la enseñanza entregada.

Quiero expresar también mi agradecimiento a la Dra. Marcela Torrejón, Dr. Agustín Martínez y Dra. Amparo Uribe, miembros de la comisión de tesis, por su disposición, amabilidad, y apoyo durante el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias por su colaboración y buenos consejos.

Agradezco a mis amigos y compañeros del laboratorio, de quienes aprendí y con quienes compartí muchas experiencias: Ingrid, Nicolas, Camilo, Alicia y especialmente a Camila Benavides y Claudio Retamal por los consejos académicos, espacios de risas y por los momentos de amistad compartidos. Debo agradecer también a todo el personal del

Departamento de Fisiología, quienes facilitaron el trabajo día a día, especialmente a la Sra. Susana Rojas y Jocelin González.

A mis compañeros y amigos de Magister: Belén, Matías, Héctor y Brian, gracias por toda la ayuda, por sus aportes académicos, por el aguante y por su solidaridad. Gracias Chicos.

Al apoyo fundamental de mi “Pololo” y colega Sergio López. Por los momentos vividos, por su apoyo, colaboración y por estar dispuesto como pocos a ayudarme y motivarme, por compartir su vida, sueños, conocimiento y experiencia. Muchas Gracias López.

Y, por supuesto, quiero agradecer enormemente a mi familia, a mis hermanos Johanna y Daniel y a mis padres Visitación y Gregorio por su apoyo incondicional, consejos, por ser el soporte y motor de mi vida, sin duda me enseñaron el valor del esfuerzo. Quería agradecer además a mi familia chilena Del Campo-Bustos, quienes con cariño me acompañaron en mi etapa por Chile. Agradezco por los momentos vividos, por la experiencia de festejar las fiestas patrias y por aceptarme en su hogar. Muchas Gracias.

Finalmente, debo agradecer a las fuentes de financiamiento del presente trabajo, al proyecto FONDECYT 11160562 a cargo del Dr. Patricio Castro Maldonado, y a la Dirección de postgrados de la Universidad de Concepción por otorgarme las becas de arancel y estipendio durante el desarrollo de esta tesis.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	XI
SUMMARY .....	XIII
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Neurulación.....	1
2. Defectos del tubo neural .....	4
3. Neurotransmisores durante el desarrollo temprano del Sistema Nervioso.....	7
4. Conexinas Cxs.....	11
5. Regulación de hemicanales .....	17
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
Hipótesis.....	21
Objetivo general .....	21
Objetivos Específicos.....	21
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas.....	22
1.1. Declaración ética y animales de experimentación .....	22
1.2. Obtención de embriones de <i>Xenopus laevis</i> .....	22
2. Técnicas de Biología Molecular: RT-PCR convencional y RT-qPCR en tiempo real	
24	
2.1 Extracción de ARN total.....	24
2.2 Transcripción reversa (RT) del ARN total .....	24
2.3 Amplificación del ADNc por PCR .....	25
2.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	25
2.5 RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) .....	26
3. Técnicas para el estudio de la funcionalidad de los hemicanales.....	28
3.1 Tratamiento farmacológico .....	28

3.2	Captación de lucifer yellow y detección de fluorescencia <i>in vivo</i> .....	28
3.3	Cuantificación de ATP extracelular e intracelular .....	29
4.	<b>Técnicas <i>In silico</i>: Análisis bioinformático interacción hemicanal Cx46- Carbenoxolona/Enoxolona</b> .....	31
4.1	Selección de moléculas .....	31
4.2	Preparación de la proteína GJ $\alpha$ 3 (Cx46) .....	31
4.3	Identificación sitio de interacción proteína-ligando.....	32
4.4	Docking Molecular .....	32
5.	Análisis estadístico.....	34
IV.	<b>RESULTADOS</b> .....	35
1.	Perfil de expresión de Cxs en estadios tempranos de desarrollo en <i>Xenopus laevis in vitro</i> 35	
2.	Bloqueo farmacológico de Cxs en neurulación induce DTN .....	41
3.	Permeabilidad a Lucifer Yellow de HCs-Cxs, regulada por potenciales redox y FGFs (FGF2) durante el proceso de neurulación en <i>Xenopus laevis in vivo</i> .....	47
4.	Potenciales redox y FGFs promueven la liberación de ATP mediante la apertura de HCs-Cxs durante el proceso de neurulación en <i>Xenopus laevis in vitro</i> .....	51
5.	Análisis <i>in silico</i> : Estudio y análisis de posibles sitios de interacción en hemicanales de conexina 46.....	55
6.	Análisis <i>in silico</i> : Simulaciones de Docking Molecular, interacciones de hemicanales conexina 46 con Carbenoxolona/Enoxolona .....	61
V.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	75
1.	Perfil de expresión y función de conexinas durante el proceso de neurulación en <i>Xenopus laevis</i> .....	75
2.	FGF2 y potenciales redox regulan la apertura de HCs-Cxs durante el proceso de neurulación en <i>Xenopus laevis</i> .....	80
3.	Predicciones <i>in silico</i> : Sitios e interacciones de unión de bloqueadores ampliamente usados para modular la actividad de Cxs .....	84
VI.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de formación del tubo neural. ....	3
Figura 2. Representación esquemática formación del tubo neural humano y DTN. ....	5
Figura 3. Representación estructural de conexinas, hemicanales y formación de gap junctions (GJ). ....	14
Figura 4. Desarrollo embrionario de <i>Xenopus laevis</i> . ....	23
Figura 5. Preparación hemicanal Cx46. ....	34
Figura 6. Patrón de expresión relativa de conexinas subgrupo $\alpha$ en diferentes estadios de desarrollo de <i>Xenopus laevis</i> . ....	38
Figura 7. Patrón de expresión relativa de conexinas subgrupo $\beta$ en diferentes estadios de desarrollo de <i>Xenopus laevis</i> . ....	40
Figura 8. Bloqueo farmacológico de Cxs con CBX induce DTN. ....	44
Figura 9. Bloqueo farmacológico de Cxs con ENX induce DTN. ....	46
Figura 10. Análisis representativo de HCs-Cxs presentes en células de la placa neural para determinar la captación de LY. ....	49
Figura 11. Análisis cuantitativo: captación de lucifer Yellow en células de la placa neural. ....	50
Figura 12. Liberación de ATP a través de HCs-Cxs en el proceso de neurulación en <i>Xenopus laevis</i> . ....	54
Figura 13. Representación esquematizada de hemicanales de conexina 46. ....	57
Figura 14. Cavidades identificadas en el hemicanal de la conexina 46. Hemicanal visualizado en un giro de 90° (eje x). ....	58
Figura 15. Cavidades con mayor puntuación de drogabilidad. ....	61
Figura 16. Conformaciones de docking molecular y resultados de energía de unión de CBX y ENX en los HCs-Cx46. ....	62
Figura 17. Conformaciones con mejor puntuación de acoplamiento molecular y aminoácidos involucrados de HC-Cx46 con carbenoxolona y enoxolona. ....	65
Figura 18. Acoplamiento molecular de CBX y ENX en la estructura de HCs-Cx46 (Sitio 1). ....	69
Figura 19. Acoplamiento molecular de CBX y ENX en la estructura de HCs-Cx46 (Sitio 2). ....	71
Figura 20. Acoplamiento molecular de CBX y ENX en la estructura de HCs-Cx46 (Sitio 3). ....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Nomenclatura de conexinas y sus símbolos genéticos. ....</b>	<b>13</b>
<b>Tabla 2. Lista de partidores usados para RT-PCR convencional y qRT-PCR cuantitativo (producto final de amplificación).....</b>	<b>27</b>



## ABREVIATURAS

°C	: Grados Celsius
2D	: Dos dimensiones
3D	: Tres dimensiones
Å	: Angstrom
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ADNc	: Ácido desoxirribonucleico complementario
Ala	: Alanina
AMP	: Adenosina monofosfato
AMPA	: $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AMPc	: Adenosina monofosfato (cíclico)
Arg	: Arginina
ARN	: Ácido Ribonucleico
ARNm	: ARN mensajero
Asn	: Asparagina
Asp	: Aspartato
ATP	: Adenosina trifosfato
BMP	: “Bone Morphogenetic Protein”, Proteína morfogenética del hueso
Ca <sup>2+</sup>	: Ion calcio divalente
CaCl <sub>2</sub>	: Cloruro de calcio
CBX	: Carbenoxolona
CCN	: Células de la cresta neural
CO	: Monóxido de carbono
CO <sub>2</sub>	: Dióxido de carbono
CS	: Estadios de Carnegie
CT	: Dominio C-terminal
Cxs	: Conexinas
Da	: Dalton
DNTPs	: Nucleósidos trifosfato
DTN	: "Neural tube defects", Defectos del tubo neural
DTT	: Ditiotreitól
EDTA	: Ácido Etileno Diámino Tetra-acético
ENX	: Enoxolona
Est	: Estadio embrionario
FBS	: “Fetal Bovine Serum”, Suero Fetal Bovino
FGFs	: “Fibroblast Growth Factors”, Factores de crecimiento de Fibroblastos
GABA	: Ácido gamma-aminobutírico
Gap19	: Péptido mimético de Cx43, bloqueador de hemicanales Cx 43
Gap26	: Péptido mimético de Cx43, bloqueador de gap junction Cx 43
Gap27	: Péptido mimético de Cx43, bloqueador de gap junction Cx 43
GJ	: "Gap junction", unión comunicante
Gln	: Glutamina
Glu	: Glutamato



Gly	: Glicina
GSH	: Glutación
H <sub>2</sub> O	: Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Peróxido de hidrogeno
HCG	: "Human chorionic Gonadotropin", Hormona Gonadotropina Coriónica humana
HCS-Cxs	: Hemicanales de conexinas
HEPES	: Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico
His	: Histidina
Hpf	: Horas post fertilización
IC <sub>50</sub>	: Concentración efectiva media.
Ile	: Isoleucina
IP <sub>3</sub>	: Inositol trifosfato
IP <sub>3</sub> R	: Receptor de inositol trifosfato
K <sup>+</sup>	: Ion potasio monovalente
KA	: Receptor de Kainato
Kcal	: Kilocalorías
Kcal/mol	: Kilocalorías por mol
KCl	: Cloruro de potasio
KDa	: Kilo dalton
KJ	: Kilojulios
LE	: "Extracellular loops", bucles extracelulares
Leu	: Leucina
LI	: "Intracellular loop", bucle intracelular
LY	: Lucifer yellow
Lys	: Lisina
M	: Molar
mg	: Miligramos
Mg <sup>2+</sup>	: Ion magnesio divalente
MgCl <sub>2</sub>	: Cloruro de magnesio
mGluR	: "Metabotropic glutamate receptor", receptor metabotrópico de glutamato
MgSO <sub>4</sub>	: Sulfato de magnesio
min	: Minutos
mL	: Mililitros
mM	: Milimolar
mm	: Milímetros
MM-GBSA	: "Molecular Mechanics Generalized- Born Surface Area", método rápido basado en campos de fuerza que calcula la energía libre de enlace aproximada
MMR	: Marc's modified Ringer's
Na <sup>+</sup>	: Ion sodio monovalente
NaCl	: Cloruro de sodio
NAD <sup>+</sup>	: Nicotinamida adenina dinucleótido
NC	: "Neural crest", cresta neural
ng	: Nanogramos
NGF	: "Nerve growth factor", factor de crecimiento nervioso



nm	: Nanómetros
nM	: Nano molar
NMDA	: Ácido N-metil-D-aspártico
NO	: Monóxido de nitrógeno
NT	: Dominio N-terminal
NTs	: Neurotransmisores
O <sub>2</sub>	: Oxígeno molecular
P2X	: Receptores purinérgicos ionotrópicos
P2Y	: Receptores purinérgicos metabotrópicos
Pb	: Pares de bases
PDB	: Protein Databank
pH	: Concentración de protones
Phe	: Fenilalanina
PIP <sub>2</sub>	: Fosfatidilinositol bifosfato
PKC	: Proteína quinasa C
PNs	: Precusores neuronales
PPi	: Pirofosfato inorgánico
Pxs	: Panexinas
RMSD	: "Root Mean Square Deviation", Desviación de la raíz cuadrada media
RT-PCR	: Retrotranscripción y PCR
RT-qPCR	: Retrotranscripción y PCR cuantitativa
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
Ser	: Serina
SNAP25	: "Synaptosomal associated protein 25kDa",
SNARE	: "soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor"
SNC	: Sistema nervioso central
TAE	: Tampón tris acetato EDTA
Thr	: Treonina
T <sub>m</sub>	: Temperatura de denaturación
TMs	: Dominios transmembrana
Trp	: Triptófano
Tyr	: Tirosina
UTP	: Uridina trifosfato
VAMP1	: "Vesicle associated membrane protein 1", proteína de membrana asociada a vesícula
VGLUT1	: "Vesicular glutamate transporter", transportador vesicular de glutamato
VNUT	: "Vesicular nucleotide transporter", transportador vesicular de nucleótidos
Wnt	: "Wingless-Type"
ZSV	: Zona subventricular
ZV	: Zona ventricular
ΔG	: Cambio en la energía libre
μg	: Microgramos
μL	: Microlitros
μM	: Micromolar

## RESUMEN

La neurulación es un proceso crucial en la formación del sistema nervioso central (SNC), y corresponde a uno de los primeros eventos de desarrollo embrionario en vertebrados (3<sup>ra</sup> semana de gestación en humanos y 14,5 a 21,5 horas en *Xenopus laevis*). Este proceso comienza con el plegamiento y fusión de la placa neural que dará lugar a la formación de tubo neural y posterior desarrollo del cerebro y medula espinal, involucrando procesos como la migración y proliferación celular. Alteraciones en este proceso generan defectos del tubo neural (DTN), los que pueden ser causados por factores ambientales y genéticos.

Las conexinas (Cxs) son una familia de 21 proteínas transmembrana que forman hemicanales (HCs) y uniones comunicantes (gap junction) en vertebrados. Varios estudios han demostrado la participación de hemicanales en la comunicación celular permitiendo la liberación de ATP, glutamato y NAD<sup>+</sup>, moléculas que regulan la migración celular y estabilizan la transmisión sináptica. Por otro lado, se ha demostrado que cambios en el estado de fosforilación y/o cambios en el potencial redox intracelular activan la apertura de hemicanales en diferentes tipos celulares. Algunas Cxs (Cx46, Cx43, Cx32 y Cx26) han sido asociadas a procesos de proliferación, migración y diferenciación en diferentes etapas de desarrollo, sugiriendo una participación dinámica de estas proteínas durante el desarrollo del SNC. La hipótesis de esta tesis pretende elucidar si los hemicanales formados por conexinas (ej., GJ $\alpha$ 3/GJ $\beta$ 1) participan en la liberación de ATP desde células de la placa neural durante el proceso de neurulación en *Xenopus laevis*.

Los datos obtenidos en esta tesis permiten demostrar: (i) la presencia relevante de Cx46, Cx32, en estadios de neurulación y que su bloqueo farmacológico con CBX y ENX ocasiona defectos en el cierre del tubo neural (DTN). (ii) Las Cxs son funcionales como

hemicanales y participan en la liberación de ATP, y su apertura es regulada transitoriamente por FGF2 y/o potenciales redox intracelulares (DTT), desencadenado potencialmente la activación de la señalización purinérgica. Por último, a través de estudios *in silico* se determinó dos posibles sitios (sitio N y sitio E) de interacción entre Cx46/CBX y Cx46/ENX, los cuales se localizan en los dominios N-terminal y EL2 sitios altamente conservados entre las distintas isoformas de Cxs. Con este trabajo de tesis se genera una aproximación del rol de los hemicanales de Cxs y los mecanismos moleculares involucrados en su apertura durante el proceso de neurulación, y que en este caso involucran la regulación de la vía de señalización de FGF2, potenciales redox intracelulares y eventualmente la señalización purinérgica. Proponemos que, los hemicanales de Cxs regulan la liberación de ATP y eventualmente otras moléculas como glutamato en el proceso de neurulación y que su bloqueo farmacológico participa en la generación DTN, que serían ocasionados por alteraciones en la señalización purinérgica y/o glutamatérgica.



## SUMMARY

Neurulation is a crucial process in the formation of the central nervous system (CNS), and corresponds to one of the first events of embryonic development in vertebrates (3rd week of gestation in humans and 14.5 to 21.5 hours in *Xenopus laevis*). This process begins with the folding and fusion of the neural plate that will lead to the formation of the neural tube and subsequent development of the brain and spinal cord, involving processes such as cell migration and proliferation. Alterations in this process generate neural tube defects (NTDs), which can be caused by environmental and genetic factors.

Connexins (Cxs) are a family of 21 transmembrane proteins that form hemichannels (HCs) and gap junctions in vertebrates. Several studies have demonstrated the participation of Cxs as HCs in cellular communication, allowing the release of ATP, glutamate, and NAD<sup>+</sup>, molecules that regulate cell migration and stabilize synaptic transmission. Furthermore, it has been demonstrated that changes in the phosphorylation state and/or changes in the intracellular redox potential induce hemichannel opening in different cell. Some Cxs (Cx46, Cx43, Cx 32 and Cx26) have been associated with processes of proliferation, migration, and differentiation at different developmental stages, suggesting a dynamic participation of these proteins during the development of the CNS. The hypothesis of this thesis aims to elucidate whether the hemichannels formed by connexins (e.g., GJ $\alpha$ 3/GJ $\beta$ 1) participate in the release of ATP from cells of the neural plate during the neurulation process in *Xenopus laevis*.

The data obtained in this thesis allow to demonstrate: (i) the relevant presence of Cx46, Cx32, in neurulation stages and that its pharmacological blockade with CBX and ENX causes NTDs. (ii) Cxs are functional as HCs and participate in the release of ATP, and their opening is transiently regulated by FGF2 and/or intracellular redox potential (DTT),

triggering potentially the activation of the purinergic signaling. Finally, through in silico studies, two possible sites (N site and E site) of interaction between Cx46/CBX and Cx46/ENX were determined, which are in the N-terminal and EL2 domains, highly conserved sites between the different isoforms of Cxs.

This thesis work generates an approximation of the role of Cx as hemichannels and the molecular mechanisms involved in their opening during the neurulation process, and that in this case involves the regulation of the FGF2 signaling pathway, intracellular redox potential and eventually purinergic signaling. We propose that HCs-Cxs regulates the release of ATP and eventually the release of other neurotransmitters such as glutamate in the neurulation process, and its pharmacological blockade participates in the generation of NTDs, what would be caused by alterations in purinergic and/or glutamatergic signaling.



# I. INTRODUCCIÓN

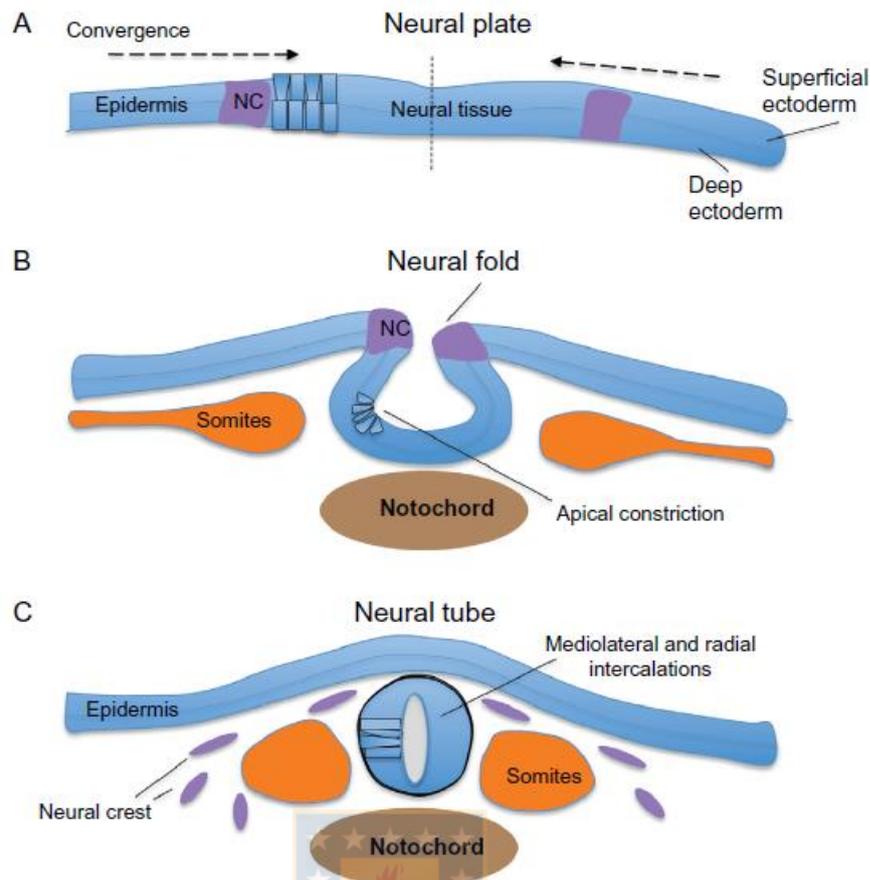
## 1. Neurulación

La formación del sistema nervioso central (SNC) comienza muy temprano en el desarrollo embrionario, a través del proceso denominado neurulación. En vertebrados, este proceso morfogénético es complejo y requiere la coordinación de diversos eventos celulares y moleculares, los cuales derivan en la formación del tubo neural (Wilde, Petersen, & Niswander, 2014). Por lo anterior, la generación de esta estructura (Karfunkel, 1974; G. Schoenwolf, 1982; G. C. Schoenwolf & Smith, 1990) corresponde a uno de los primeros eventos asociados al desarrollo normal del SNC (Gilbert & Singer, 2000). Este proceso es altamente conservado entre vertebrados como anfibios y humanos, llevándose a cabo entre las 14,5-21,5 horas post fertilización (hpf, estadios 12,5-20) en *Xenopus laevis* ([www.xenbase.org](http://www.xenbase.org)) (Karimi et al., 2018) y entre los días 20-28 en humanos (Estadios de Carnegie, CS 9-13, (O'Rahilly & Müller, 2007)). La formación del tubo neural involucra la participación del ectodermo neural y de algunos tejidos circundantes como el ectodermo no neural, el mesodermo y la notocorda, varios de los cuales se formaron en etapas previas, como la gastrulación (Nikolopoulou, Galea, Rolo, Greene, & Copp, 2017). Dentro de las señalizaciones que participan en el proceso de formación del tubo neural, destacan las vías activadas por Wnt y la señalización mediada por BMP (de sus siglas en inglés Bone Morphogenetic Proteins). Estas y otras moléculas regulan eventos celulares esenciales para el cierre del tubo, como la polaridad celular planar, extensión convergente, constricción apical y la formación, aposición y fusión de los pliegues neurales (Reichert, Randall, & Hill, 2013). Existen dos mecanismos para convertir la placa neural plana, en un tubo neural:

A. En la neurulación primaria, el ectodermo original se divide en tres conjuntos de células: (1) El tubo neural posicionado internamente, que dará comienzo al desarrollo del cerebro y parte superior de la médula espinal. (2) La epidermis posicionada externamente (ectodermo no-neural) y (3) las células de la cresta neural, las cuales se forman en la región que conecta el tubo neural y la epidermis. Estas células dan origen a las neuronas periféricas, las glías, las células pigmentarias de la piel, entre otras (Gilbert & Singer, 2000; Sokol, 2016). Finalmente, las células que rodean a la placa neural promueven la proliferación de estas últimas, su invaginación y su separación de la superficie por fusión de los pliegues neurales, para formar un tubo hueco (Eibach, Moes, Hou, Zovickian, & Pang, 2017). De esta forma se dará origen a dos capas epiteliales: el ectodermo superficial y el tubo neural (Colas & Schoenwolf, 2001; Copp, Greene, & Murdoch, 2003).



B. La neurulación secundaria, se genera en la parte posterior del embrión y desarrolla la parte complementaria de la médula espinal. En este mecanismo el tubo neural se produce a partir de la unión de células mesenquimáticas para formar un cordón sólido que posteriormente se ahueca. Esta canalización del epitelio crea el tubo neural secundario, cuyo lumen es continuo con el tubo neural primario (Eibach et al., 2017). De esta manera, el tubo neural completo se forma por la unión de estos dos tubos formados separadamente (Figura 1). Si el cierre no se completa, el neuroepitelio (placa neural) permanece expuesto al medio externo y estará sujeto a degeneración y/o a muerte de los precursores neuronales (Defectos del tubo neural) (Greene & Copp, 2014).

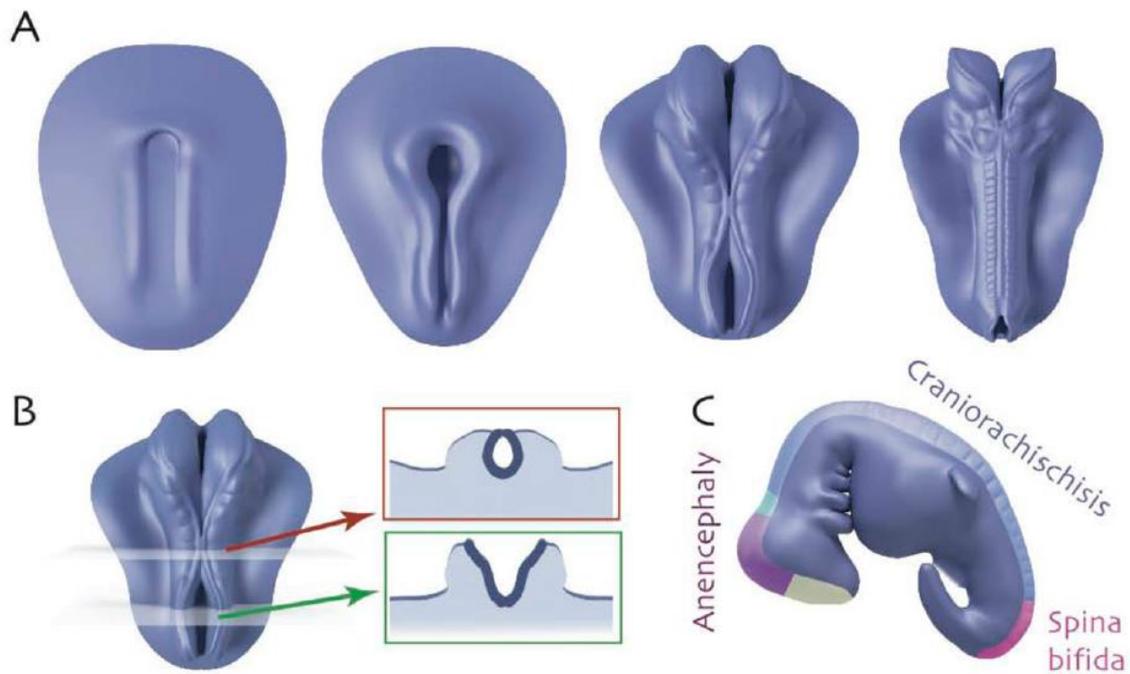


**Figura 1. Esquema de formación del tubo neural.**

Etapas principales del cierre del tubo neural. A. La placa neural consta de dos capas: capa superficial y capa profunda. La placa se encuentra entre la epidermis (ectodermo no-neural). La línea punteada muestra el eje central del plegamiento. Las flechas indican el sentido de la migración latero-medial. B. La constricción apical conduce al plegamiento de la placa neural. NC: Cresta neural (por sus siglas en inglés neural crest) población de células pluripotentes y migratorias. C. Los pliegues neurales se fusionan en el tubo neural y el tubo neural se alarga debido a las intercalaciones celulares radiales y medio laterales. Extraído de (Sokol, 2016).

## 2. Defectos del tubo neural

Los defectos del tubo neural (DTN) son una de las malformaciones de nacimiento más comunes a nivel mundial, presentando una prevalencia de 1 por 1000 embarazos establecidos y corresponde al segundo grupo más común de defectos de nacimiento, después de los defectos congénitos cardíacos (Seidahmed et al., 2014). El cierre alterado del tubo neural conlleva a una degeneración *in útero* del tejido nervioso expuesto. En relación con la localización y severidad de la apertura, estos defectos podrían causar letalidad perinatal o deficiencia neurológica severa en individuos que sobrevivan. La anencefalia y la espina bífida corresponden a las malformaciones más habituales (Copp & Greene, 2010; Stottmann, Berrong, Matta, Choi, & Klingensmith, 2006). Los defectos que aparecen en zonas craneales se conocen como anencefalias, condición caracterizada por la ausencia de bóveda craneal y defectos severos en los hemisferios cerebrales. Concordante con lo anterior, los defectos que se exhiben en la porción caudal del tubo neural se denominan mielomeningoceles (espina bífida) (Wallingford, Niswander, Shaw, & Finnell, 2013) (Figura 2).



**Figura 2. Representación esquemática formación del tubo neural humano y DTN.**

A. Imágenes sucesivas que muestran el cierre del tubo neural en un embrión humano. Inicialmente, el SNC es una lámina plana; los pliegues neurales se elevan para cerrar el tubo neural. B. Las secciones transversales ilustran regiones cerradas (enmarcada roja) y abiertas (enmarcada verde) del tubo neural. C. Defectos del tubo neural. Extraído de (Wallingford et al., 2013).

Las causas identificadas de DTN son múltiples, siendo estas, tanto genéticas como ambientales (Blom, 2009; Cabrera, Hill, Etheredge, & Finnell, 2004; Detrait et al., 2005; Lee & Gleeson, 2020). Posiblemente, cada factor por separado no es suficiente para alterar el proceso de neurulación, sin embargo, en conjunto pueden producir un efecto sinérgico que lleva a la aparición de un fenotipo alterado (Avagliano et al., 2019). En los factores ambientales descritos, podemos mencionar, la diabetes mellitus, la obesidad materna, el uso de drogas antiepilépticas en el embarazo, la hipertermia y el déficit nutricional de folato (Avagliano et al., 2019; Blom, 2009). Además, genéticamente se ha postulado que al menos unos 300 genes participan en el proceso de formación del tubo

neural (Nikolopoulou et al., 2017). De ellos, solo un pequeño número ha sido estudiado y relacionado directamente con la aparición de DTN en humanos (Avagliano et al., 2019).

Asociado a lo anterior, se hace relevante estudiar los mecanismos moleculares y celulares, a través, de los cuales la placa neural se pliega y fusiona para dar comienzo a la formación del tubo neural. Estos mecanismos podrían cumplir un rol importante en el desarrollo de ciertas patogénesis embrionarias de DTN, pero también, al desarrollo e implementación de métodos de prevención de DTN. Sin embargo y pese a la importancia clínica de estas afecciones, la predisposición genética, las causas moleculares y celulares que subyacen a estos defectos siguen siendo poco comprendidas (Wallingford et al., 2013).



### 3. Neurotransmisores durante el desarrollo temprano del Sistema Nervioso

El proceso de formación del tubo neural implica diversos procesos celulares, como cambios en la forma de células de la placa neural, migración y proliferación celular (Wallingford et al., 2013). Además, intervienen señalizaciones moleculares, como las reguladas por Wnt, BMP, FGFs (de sus siglas en inglés fibroblast growth factors) entre otras (Böttcher & Niehrs, 2005; Hébert, 2011; Reichert et al., 2013; Thisse & Thisse, 2005). Estos mecanismos moleculares y celulares regulan procesos esenciales para el cierre del tubo neural, como la extensión convergente y formación, aposición y fusión de los pliegues neurales (Hébert, 2011; Nikolopoulou et al., 2017; Yamaguchi & Miura, 2013).

Adicionalmente, se ha descrito que los neurotransmisores (NTs) participan en eventos tempranos durante el desarrollo neural, como en la proliferación celular de precursores neurales (Represa & Ben-Ari, 2005), la diferenciación y migración celular (Borodinsky et al., 2003; Jansson & Åkerman, 2014; Spitzer, 2006; Zimmermann, 2006) y la proliferación y migración orientada de precursores neuronales de la placa neural (Sequera, Goyal, Castro, Levin, & Borodinsky, 2018). Lo anterior, demuestra que los NTs serían actores relevantes en este proceso, sin embargo, su participación específica en el proceso de neurulación no ha sido analizada en detalle.

El glutamato y el ATP son NTs que modulan la transmisión sináptica. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC y participa activamente en funciones conductuales como la memoria y el aprendizaje (Jansson & Åkerman, 2014; Mattson, 2008). La señalización de glutamato activa receptores ionotrópicos (canales iónicos dependientes de ligando) como el receptor AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico), el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) y el receptor KA (kainato); y

receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (mGluR<sub>1</sub>-mGluR<sub>8</sub>) (de sus siglas en inglés, metabotropic glutamate receptor) (Jansson & Åkerman, 2014; Lujan, Shigemoto, & Lopez-Bendito, 2005). Durante procesos de neurodesarrollo, se ha demostrado que el glutamato participa en la proliferación de neuroblastos corticales, neuroblastos estriatales en el telencéfalo (Luk & Sadikot, 2004) y de células de la zona subventricular (Song et al., 2017). En el hipocampo embrionario y postnatal de ratas, la liberación no vesicular de glutamato regula la migración celular de neuronas inmaduras (Manent et al., 2005), lo que sugiere una liberación de glutamato independiente del complejo SNARE (por sus siglas en inglés soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor). Se ha observado la generación de corrientes iónicas en las neuronas en maduración, incluidas las neuronas sin sinapsis funcionales, de este modo se puede evidenciar una comunicación paracrina, similar a Wnt, FGFs y BMP, en una etapa temprana de desarrollo (Manent et al., 2005). Adicionalmente se han descrito transmisión por volumen (Kula, Chen, & Kukley, 2019) y sinapsis en cáncer (Barria, 2019). En el proceso de neurulación, se han identificado transcritos (ARNm) involucrados en la neurotransmisión vesicular de glutamato, como el transportador vesicular de glutamato (VGluT1, por sus siglas en inglés vesicular glutamate transporter), la proteína de membrana asociada a vesícula (VAMP1 de sus siglas en inglés vesicle associated membrane protein 1) y la proteína SNAP25 asociada a sinaptosoma (SNAP25 por sus siglas en inglés synaptosomal associated protein 25kDa) (Root, Velázquez-Ulloa, Monsalve, Minakova, & Spitzer, 2008; Sequerra et al., 2018).

Por su parte, el ATP es un neurotransmisor y un neuromodulador (Abbracchio, Burnstock, Verkhratsky, & Zimmermann, 2009; Boison, 2008; Zimmermann, 2006) que actúa mediando diversas respuestas fisiológicas y patológicas en el SNC adulto como, efectos tróficos sobre las neuronas y las células gliales, incluidas la proliferación celular,

la diferenciación celular y el crecimiento axonal. Adicionalmente el ATP se ha asociado a la síntesis y liberación de factores tróficos como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2 de sus siglas en inglés fibroblast growth factor), el factor de crecimiento nervioso (NGF del inglés nerve growth factor) y la neurotrofina 3 (Cheung, Chan, & Burnstock, 2005; Liu, Hashimoto-Torii, Torii, Haydar, & Rakic, 2008; Zimmermann, 2006). Se ha sugerido que la comunicación celular a través de nucleótidos involucra interacciones moleculares y mecanismos de señalización celular. La cascada de señalización purinérgica activa la fosfolipasa C, la cual hidroliza el fosfatidilinositol bifosfato (PIP2 del inglés phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), generando como sustrato el segundo mensajero inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>, de sus siglas en inglés inositol 1,4,5-triphosphate), activando la liberación Ca<sup>2+</sup> de los depósitos citoplásmicos sensibles a IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R), incrementando la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. El incremento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> modula la propagación intercelular de ondas de calcio, las cuales desempeñan un rol importante en el desarrollo embrionario y formación del tubo neural (Webb & Miller, 2003).

El ATP puede ser almacenado y co-liberado con NTs como GABA (ácido gamma butírico), glutamato y noradrenalina (Cheung et al., 2005). La señalización de este neurotransmisor actúa a través de receptores ionotrópicos P2X activados por ligando (P2X<sub>1-7</sub>) y receptores acoplados a proteínas G, P2Y (P2Y<sub>1,2,4,6,8,11,12,13,14</sub>) (Abbracchio et al., 2009; Zimmermann, 2006). Se ha demostrado la presencia de estos NTs en estadios tempranos de desarrollo (Burnstock & Dale, 2015; Lujan et al., 2005; Root et al., 2008; Zimmermann, 2006). Con relación a la señalización de ATP (purinérgica), se ha descrito la participación de los receptores P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>8</sub> y la eNTPDasa-2 enzima encargada de hidrolizar nucleósidos tri y difosfato; los cuales modulan la señalización de ATP en el proceso de neurulación, la neurogénesis

embrionaria temprana y desarrollo cerebral en ratas (Bogdanov, Dale, King, Whittock, & Burnstock, 1997; Burnstock & Dale, 2015; Cheung et al., 2005; Massé & Dale, 2012).

Existe evidencia que sugiere un mecanismo de señalización mediado por glutamato y ATP previo a la formación de la comunicación sináptica (sinaptogénesis) (Bogdanov et al., 1997; Burnstock & Dale, 2015; Cheung et al., 2005; Sequerra et al., 2018). El mecanismo clásico de liberación de estos NTs es a través de vesículas sinápticas, las cuales concentran estas moléculas, por transportadores específicos VGLuT (SLC17A6-8) y VNUT (SLC17A9, transportador vesicular de nucleótidos), para luego fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido al espacio sináptico (Larsson et al., 2012; Sawada et al., 2008; Südhof, 2004). Sin embargo, se ha descrito otro mecanismo alternativo de liberación en el cual participa una familia de proteínas llamadas conexinas (Belousov, 2012; Mayorquin, Rodriguez, Sutachan, & Albarracín, 2018; Orellana et al., 2011; Stout, Costantin, Naus, & Charles, 2002; Weissman, Riquelme, Ivic, Flint, & Kriegstein, 2004; Ye, Wyeth, Baltan-Tekkok, & Ransom, 2003).

Debido a que, se desconoce si el mecanismo de liberación vesicular está o no presente durante la neurulación, es importante dilucidar si el mecanismo mediado por conexinas participaría en la señalización de estos neurotransmisores.

#### 4. Conexinas Cxs

En vertebrados, las células establecen interacciones funcionales y estructurales que son esenciales para el funcionamiento de tejidos y órganos. Las conexinas (Cxs) y panexinas (Pxs) son proteínas presentes en las uniones intercelulares y se ensamblan en forma de hexámeros para formar un hemicanal, también conocido como conexón o panexón; este hemicanal se organiza en dominios que atraviesan la membrana celular (dominios transmembrana TMs) (Barbe, Monyer, & Bruzzone, 2006; Evans, De Vuyst, & Leybaert, 2006; Goodenough & Paul, 2003; Kumar & Gilula, 1996; Penuela, Gehi, & Laird, 2013; Willecke et al., 2002). Los hemicanales de conexinas, (inexinas en invertebrados), no así de panexinas, unen el citoplasma de dos células contiguas, formando canales intercelulares cuya función es permitir la transferencia directa de metabolitos e iones de bajo peso molecular (<1 kDa), incluidos  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , segundos mensajeros como adenosín monofosfato cíclico (AMPC), inositol trifosfato (IP3), ATP y Glu. Estas moléculas, pueden moverse bidireccionalmente a través de estos canales, pero el paso de proteínas y ácidos nucleicos es limitado (Axelsen, Calloe, Holstein-Rathlou, & Nielsen, 2013; Goodenough & Paul, 2009; Kumar & Gilula, 1996; Oyamada, Oyamada, & Takamatsu, 2005). Las conexinas participan en procesos de propagación y amplificación de cascadas de señalización que tienen como resultado el crecimiento y desarrollo celular, entre otras funciones (Aasen, Johnstone, Vidal-Brime, Lynn, & Koval, 2018; Axelsen et al., 2013).

Las Cxs están formadas por nueve dominios, cuatro dominios transmembrana: TM1, TM2, TM3 y TM4; un dominio N-terminal (NT); un dominio C-terminal (CT); dos dominios extracelulares hidrofílicos (loops LE1 y LE2) y un loop intracelular LI (Figura 3). Los cuatro dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana y los LE1 y LE2 contienen residuos o sustituciones conservadas entre las diferentes Cxs, mientras, los

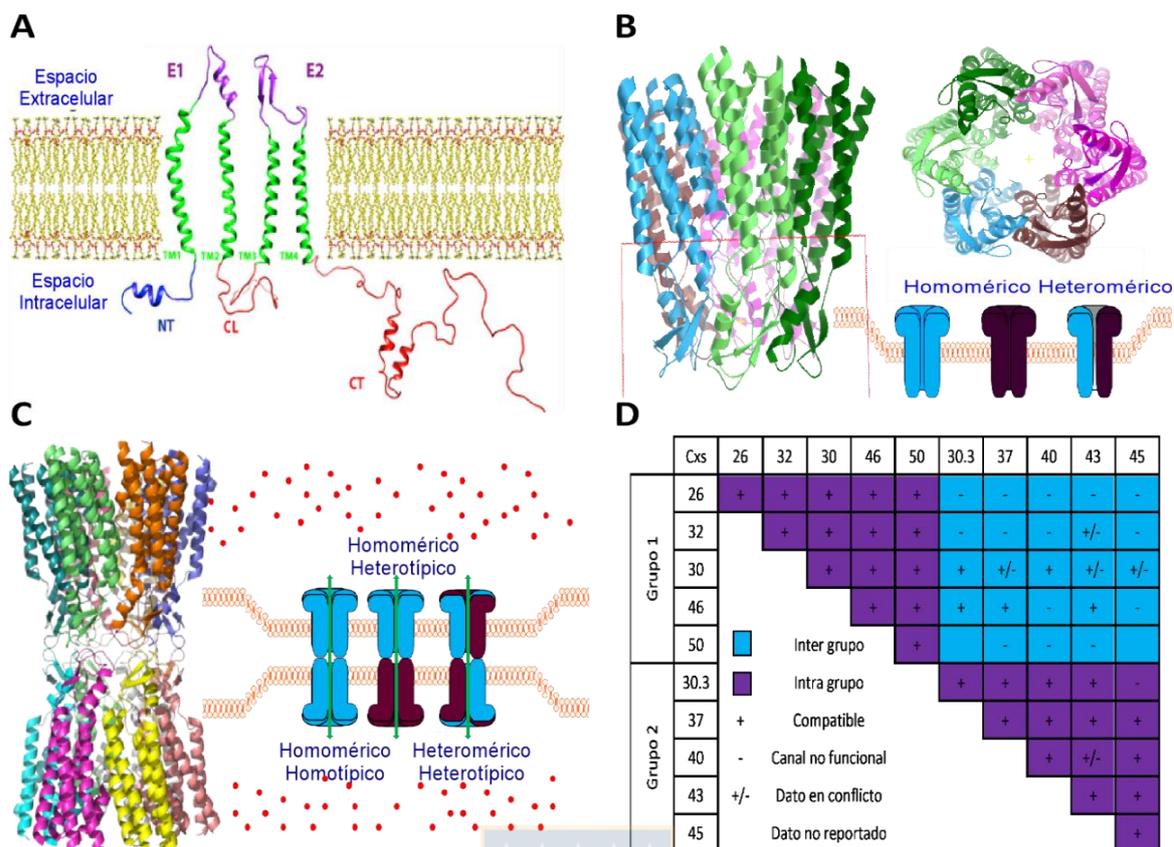
dominios citoplasmáticos (LI y CT) presentan menor homología entre las diferentes Cxs. Por su parte, el CT es el dominio más variable tanto en longitud como en su composición de aminoácidos (Bai, 2016; Beyer, Lipkind, Kyle, & Berthoud, 2012; Bosone, Andreu, & Echevarria, 2016; Laird, 2006). Un análisis detallado de la composición aminoacídica de las conexinas muestra una similitud del ~50%, mientras que su distribución en los tejidos de un organismo es específica, siendo la conexina-43 (Cx43) la más ampliamente distribuida en al menos 35 tejidos, que abarcan tipos celulares que incluyen cardiomiocitos, queratinocitos, astrocitos, oligodendrocitos, tanicitos, células endoteliales, células madre embrionarias y células de músculo liso (Goodenough & Paul, 2009; Huettner et al., 2006; Laird, 2006; Recabal et al., 2018; Ye et al., 2003).

Los hemicanales están constituidos por seis Cxs, distribuidas de forma hexagonal con un poro central. La familia de las Cxs en humanos está formada por 21 integrantes (Tabla 1), por lo que los hemicanales pueden estar formados por una misma Cx, denominado hemicanal homomérico, o por diferentes tipos, heteromérico. Adicionalmente, este puede unirse con otro hemicanal de la célula contigua idéntico a él, formando un canal homotípico, o a un hemicanal con una composición diferente a la suya, formando un canal heterotípico (Bai, 2016; Bai, Yue, & Aoyama, 2018; Barbe et al., 2006; Goodenough & Paul, 2009; Koval, Molina, & Burt, 2014; Kumar & Gilula, 1996) (Figura 3). Las Cxs se pueden denominar según su peso molecular (de 23 a 62 kDa) o de acuerdo con su similitud de secuencia y la longitud de los dominios citoplasmáticos dividiéndose en cinco subgrupos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Tabla 1).

**Tabla 1. Nomenclatura de conexinas y sus símbolos genéticos.**

Grupo	<i>Homo sapiens</i>		<i>Xenopus laevis</i>	
	Nombre Proteína	Símbolo Gen	Nombre Proteína	Símbolo Gen
$\alpha$	Cx43	GJ $\alpha$ 1	Cx43	GJ $\alpha$ 1
	Cx46	GJ $\alpha$ 3	Cx46	GJ $\alpha$ 3
	Cx37	GJ $\alpha$ 4	Cx37/Cx41	GJ $\alpha$ 4
	Cx40	GJ $\alpha$ 5	Cx40	GJ $\alpha$ 5
	Cx50	GJ $\alpha$ 8	Cx50	GJ $\alpha$ 8
	Cx59/ Cx58	GJ $\alpha$ 9	Cx59	GJ $\alpha$ 9
	Cx62	GJ $\alpha$ 10	Cx62	GJ $\alpha$ 10
$\beta$	Cx32	GJ $\beta$ 1	Cx32/Cx30	GJ $\beta$ 1
	Cx26	GJ $\beta$ 2	Cx26/Cx29	GJ $\beta$ 2
	Cx31	GJ $\beta$ 3	Cx31	GJ $\beta$ 3
	Cx30.3	GJ $\beta$ 4		GJ $\beta$ 4
	Cx31.1	GJ $\beta$ 5	Cx31.1	GJ $\beta$ 5
	Cx30	GJ $\beta$ 6		
	Cx25	GJ $\beta$ 7	Cx25/Cx28.6	GJ $\beta$ 7
$\gamma$	Cx45	GJ $\gamma$ 1/GJ $\alpha$ 7	Cx45/Cx43.4	GJ $\gamma$ 1/GJ $\alpha$ 7
	Cx47/Cx46.6	GJ $\gamma$ 2/GJ $\alpha$ 12	Cx46.6	GJ $\gamma$ 2
	Cx30.2	GJ $\gamma$ 3		
$\delta$	Cx36	GJ $\delta$ 2	Cx36	GJ $\delta$ 2
	Cx31.9/ Cx30.2	GJ $\delta$ 3/ GJ $\alpha$ 11		GJ $\delta$ 3
	Cx40.1	GJ $\delta$ 4	Cx40.1	GJ $\delta$ 4
$\epsilon$	Cx23	GJ $\epsilon$ 1	Cx23	GJ $\epsilon$ 1/GJ $\gamma$ 3

Tabla modificada de la versión de (Bai, 2016; Bai et al., 2018). La nomenclatura oficial de los nombres de los genes está disponible en: <http://www.genenames.org/> / <http://www.xenbase.org/>



**Figura 3. Representación estructural de conexas, hemicanales y formación de gap junctions (GJ).**

A. Representación estructural de dominios de una Cx en la membrana plasmática celular. La Cx presenta cuatro dominios hidrofóbicos transmembrana (TM) (verde), dos dominios extracelulares LE (morado) y tres dominios citosólicos: un N-terminal conservado (NT) (azul), un bucle citoplasmático variable (LI) y un C-terminal CT (rojo). Extraído de (Bosone et al., 2016). B. Tipos de hemicanal Cxs. Homomérico (misma Cx) y heteromérico (diferentes Cxs). Modelo hemicanal lateral y frontal Cx46 (ID 6MHQ). C. Tipos de canales de unión gap. Homomérico-homotípico (hemicanales y canales conformados de la misma Cx). Canal homomérico-heterotópico (hemicanal conformado por la misma Cx, canal conformado por dos tipos de Cxs). Canal heteromérico-heterotípico (hemicanales conformados por diferentes Cxs). Gap junction Cx46 (ID 6MHQ). D. Compatibilidad funcional para formar GJ de las 10 Cxs más estudiadas. Las Cxs se dividieron en dos grupos. Grupo 1: incluye Cx26, Cx32, Cx30, Cx46 y Cx50, y el grupo 2 contiene Cx30.3, Cx37, Cx40, Cx43 y Cx45. Con pocas excepciones, las conexiones del mismo grupo (intragrupo) (morado) son compatibles para formar un canal funcional (+). Sin embargo, GJ heterotípicos (Inter grupo) (azul) son generalmente

incapaz de formar canales GJ funcionales (-). Por ejemplo, la Cx46 puede formar GJ heterotípicos con todas las Cxs del grupo 1, Cx26, Cx30, Cx32 y Cx50, pero no puede formar GJ heterotípicos con la Cx40 y Cx45 del grupo 2. Extraído de (Bai & Wang, 2014; Bai et al., 2018).

La composición de cada Cx en el hemicanal le confiere características específicas como permeabilidad selectiva a diferentes moléculas. En la revisión de (Harris, 2007), se evidencia la permeabilidad de la Cx26, Cx30, Cx32 y Cx43 a ATP, IP3, Glu, AMPc, NAD<sup>+</sup> y glucosa. En 2008 (Kanaporis et al., 2008), demostraron que la permeabilidad de los hemicanales de Cx43 a AMPc es 3.2 veces mayor que en los compuestos por Cx26 y 5.2 veces mayor que los canales compuestos por Cx40. Luego, estos resultados se compararon con datos análogos para el flujo de LY (lucifer yellow), molécula fluorescente que normalmente no ingresa a la célula por su naturaleza hidrofílica, pero ingresa por hemicanales debido a su bajo peso molecular (442.3 Da) (Hanani, 2012). Esta molécula, muestra la misma tendencia cualitativa, pero permeabilidades por canal más bajas que las de AMPc. La permeabilidad de los hemicanales (estado abierto) depende posiblemente de las interacciones entre los aminoácidos internos o cercanos al poro y de las moléculas que atraviesan el poro, así como del tamaño relativo de dichas moléculas y el diámetro del poro  $Cx43 > Cx32 > Cx26 = Cx26/Cx32 > Cx37 > Cx46 > Cx40$  (Harris, 2007; Kanaporis et al., 2008).

Cada tipo celular expresa Cxs específicas que pueden variar acorde a la etapa del desarrollo:

- i. Cx43 y Cx46 forman uniones comunicantes (gap junction) en la migración temprana de células de la cresta neural (CCN) (Bannerman et al., 2000).
- ii. Cx26 y Cx43 se expresan durante la neurogénesis temprana, estas aumentan y luego disminuyen a medida que la neurogénesis se completa, mientras que, Cx32 y Cx43 se expresan durante todo el desarrollo del cerebro y edad adulta (Nadarajah, Jones, Evans, & Parnavelas, 1997).
- iii. En el desarrollo embrionario Cx26, Cx43 y Cx45 se expresan en la zona ventricular (ZV) de los ventrículos laterales, en esta zona se encuentran los precursores neurales (PNs) y glías radiales (Bittman & LoTurco, 1999; Weissman et al., 2004). En la neurogénesis tardía, Cx45 modula la proliferación de PNs en la zona subventricular posnatal (ZSV) (Khodosevich et al., 2012).
- iv. Cx26, Cx31.1, Cx32, Cx36, Cx37, Cx43, Cx45, Cx47, presentan diferentes patrones de expresión en el desarrollo cerebral, principalmente en cambios relacionados a patrones espaciotemporales de la neurogénesis y gliogénesis embrionaria y posnatal temprana. En la zona subgranular del hipocampo se encontraron PNs que expresaban Cx26, Cx30, Cx37, Cx40, Cx43 y Cx45, las cuales presentan una cambiante expresión dinámica en el transcurso del compromiso neuronal (Swayne & Bennett, 2016).

## 5. Regulación de hemicanales

Las conexinas pueden generar hemicanales, los cuales permanecen en la membrana citoplasmática sin formar unión intercelular (Goodenough & Paul, 2003). Se ha demostrado que a través de estos hemicanales pueden liberarse moléculas como ATP, Glu, glutatión, prostaglandina E2 y NAD<sup>+</sup>, que actúan como mensajeros autocrinos/paracrinos (Evans et al., 2006; Goodenough & Paul, 2003; Harris, 2007; Orellana et al., 2011; Stout et al., 2002; Sáez et al., 2010; Ye et al., 2003). El Glu y el ATP juegan un papel importante para el correcto funcionamiento celular el cual requiere condiciones específicas como pH, temperatura y fuerza iónica. Lo anterior implica que cualquier alteración de estas condiciones puede generar consecuencias en la fisiología para las células.

Debido a su baja selectividad y gran diámetro de poro, en células en reposo, los hemicanales presentan baja probabilidad de apertura, pero ésta aumenta a través de desfosforilaciones, baja concentración de Ca<sup>2+</sup> externo (Stout et al., 2002), estímulos mecánicos, potenciales de membrana positivos y disminución del potencial redox de la célula (Pogoda, Kameritsch, Retamal, & Vega, 2016; Mauricio Antonio Retamal, 2014; Sáez, Retamal, Basilio, Bukauskas, & Bennett, 2005). También responden a UTP extracelular (Cotrina et al., 1998), estímulos patológicos, como la inhibición metabólica e isquemia/reperfusión que aumenta la permeabilidad de la membrana celular a través de los hemicanales (John, Cesario, & Weiss, 2003). Luego, incrementos en la concentración Ca<sup>2+</sup> citosólico (De Vuyst et al., 2007; Stout et al., 2002), permitiendo la liberación de ATP, Glu y Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular. También, en estado abierto los hemicanales captan moléculas como bromuro de etidio, DAPI, yoduro de propidio, calceína y lucifer yellow (LY), moléculas de alta fluorescencia y bajo peso molecular (<1 kDa), adecuadas para

detectar hemicanales funcionales. (Eckert, 2006; Ek-Vitorin & Burt, 2013; Elfgang et al., 1995; Stout et al., 2002; Sáez et al., 2005; Ye et al., 2003).

El paso de estos trazadores fluorescentes puede suceder a través de uniones comunicantes y/o hemicanales. La captación de estas moléculas desde el espacio extracelular puede ser modulada por bloqueadores farmacológicos (Willebrords, Maes, Yanguas, & Vinken, 2017). Existen algunas drogas que poseen la capacidad de bloquear la funcionalidad de las conexinas como carbenoxolona (CBX), enoxolona (ENX), octanol, heptanol y ácido flumenámico (Willebrords et al., 2017). Sin embargo, no existen drogas específicas que posean la capacidad de bloquear o modular diferencialmente a las conexinas descritas. Para superar este inconveniente se han utilizado péptidos pequeños (7-10 aminoácidos) (Willebrords et al., 2017), los cuales han sido diseñados a partir de la secuencia aminoacídica primaria de estas. Los péptidos más utilizados corresponden a Gap 26, Gap27 y Gap19 que han sido diseñados a partir de los loops LE1, LE2 y LI de Cx43, que han mostrado ser capaces de bloquear la actividad de Cx43 como hemicanal (Gap19) y como gap junctions (Gap26 y Gap27) (Willebrords et al., 2017). Si bien es cierto que se ha mostrado la eficiente acción inhibitoria de drogas y péptidos, se desconoce cómo estos estarían modulando la acción de las conexinas. Por lo cual, en este trabajo mediante herramientas bioinformáticas (docking molecular) se estudió el mecanismo de interacción entre CBX/ENX y las Cxs de nuestro interés.

La apertura de los hemicanales puede ser regulada por potenciales redox (Evans et al., 2006; Pogoda et al., 2016; Mauricio Antonio Retamal, 2014; Mauricio A Retamal, Schalper, Shoji, Bennett, & Sáez, 2007; Sáez et al., 2010) y factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs de sus siglas en inglés fibroblast growth factors) (De Vuyst et al., 2007; Garré et al., 2010; Recabal et al., 2020; Schalper et al., 2008; Schalper et al., 2012;

Sáez et al., 2010). Los cambios en el potencial redox es uno de los mecanismos de control más amplio de los canales iónicos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Varios canales iónicos están regulados por una o más moléculas oxidantes o reductoras, incluyendo Cxs. Entre estas moléculas se encuentran: NO, CO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DTT (de sus siglas en inglés dithiothreitol) y glutatión (GSH) (Pogoda et al., 2016; Mauricio Antonio Retamal, 2014; Mauricio A Retamal et al., 2007). El DTT y GSH, reducen la generación de radicales libres, actúan como eliminadores de radicales libres o reducen las cisteínas oxidadas. Estos agentes reductores juegan un rol en la apertura de los hemicanales mediante la reducción del potencial redox intracelular, que puede actuar sobre los residuos de cisteína del C-terminal de las Cxs (Mauricio Antonio Retamal, 2014; Mauricio A Retamal et al., 2007).

Los FGFs son una familia de 22 polipéptidos, que se expresan en la mayoría de los tejidos (Böttcher & Niehrs, 2005). Los FGFs participan en eventos tempranos como la morfogénesis, proliferación y diferenciación (Böttcher & Niehrs, 2005; Dorey & Amaya, 2010; Thisse & Thisse, 2005). La interacción de estos factores con receptores específicos (FGFR1-4), activan señales citoplasmáticas mediante cambios en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr/Tyr (Böttcher & Niehrs, 2005; Dorey & Amaya, 2010; Thisse & Thisse, 2005). FGF1 modulan la apertura de hemicanales en células Hela y astrocitos espinales (Garré et al., 2010; Schalper et al., 2008; Sáez et al., 2010) y FGF2 en células de glioma (De Vuyst et al., 2007) y tanicitos (Recabal et al., 2020). La apertura de los hemicanales por el estímulo de estos factores, puede asociarse a cambios en el estado de fosforilación de los sitios sensibles (Ser/Thr/Tyr) de los dominios NT y CT de las Cxs (Pogoda et al., 2016; Schalper et al., 2012; Sáez et al., 2010), dominios que interactúan con la región formadora del poro a modo de “bola y cadena”. El estímulo de

los hemicanales por FGF1 y FGF2, incrementa la liberación de ATP al espacio extracelular, activando la señalización purinérgica (descrito en la sección 3).

Finalmente, en vertebrados se ha descrito la participación de conexinas en prácticamente todos los tipos celulares, excepto en los glóbulos rojos (Oyamada et al., 2005). Sin embargo y en relación con nuestro interés, se desconoce cuáles son las conexinas presentes en las células de la placa neural, y cuál es su rol en el mecanismo de liberación de ATP en neurulación y en la formación del tubo neural. ¿Estarán las Cxs presentes en el proceso de neurulación? ¿Forman hemicanales funcionales que participan en el mecanismo de liberación de ATP al medio extracelular en la formación del tubo neural? ¿Estos hemicanales pueden ser regulados por potenciales redox intracelulares y la vía de señalización inducida por FGFs en el proceso de neurulación en *Xenopus laevis*?

De acuerdo con lo mencionado anteriormente se propone la siguiente hipótesis:



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

Los hemicanales formados por conexinas (ej., GJ $\alpha$ 3/GJ $\beta$ 1) participan en la liberación de ATP desde células de la placa neural durante el proceso de neurulación en *Xenopus laevis*.

### Objetivo general

Evaluar la participación de hemicanales formados por conexinas (ej., GJ $\alpha$ 3/GJ $\beta$ 1) en la liberación de ATP durante el proceso de neurulación en *Xenopus laevis*.

### Objetivos Específicos

1. Identificar la presencia y localización de las conexinas mayormente expresadas en estadios tempranos de desarrollo de *Xenopus laevis*.
2. Evaluar la función de hemicanales formados por conexinas en el proceso de neurulación, mediante el bloqueo farmacológico y liberación de ATP.
3. Determinar el sitio probable de unión de inhibidores farmacológicos (carbenoxolona y enoxolona) en el hemicanal de Cx46 (GJ $\alpha$ 3), mediante estudios bioinformáticos.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas

##### 1.1. Declaración ética y animales de experimentación

Los métodos implementados para el cuidado y manipulación del modelo *Xenopus* fueron previamente aprobados y revisados por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Biológicas y por el comité de Ética, Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Concepción (Fondecyt 11160562). Los animales fueron tratados de acuerdo con los protocolos éticos establecidos por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH). El protocolo de eutanasia de anfibios se basó en los métodos descritos por (Close et al., 1997).

Los embriones fueron mantenidos en solución Marc's modified Ringer's (MMR al 10%, pH 7.4), conteniendo NaCl 1 M, KCl 20 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, HEPES 50 mM.

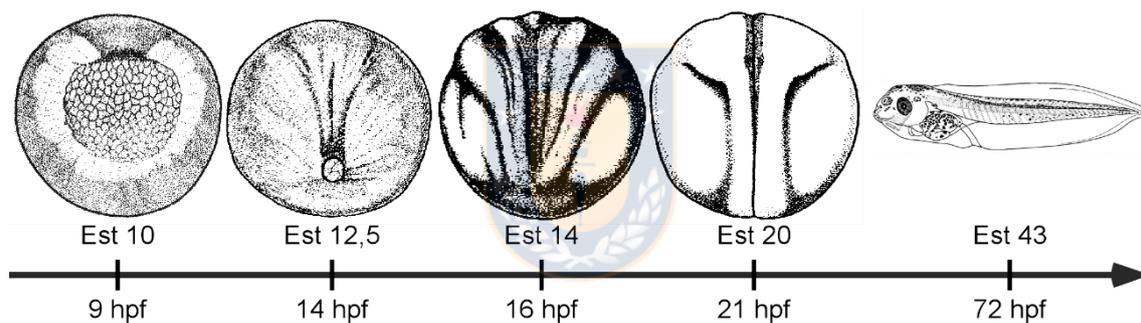


##### 1.2 Obtención de embriones de *Xenopus laevis*

La recolección de ovocitos de *Xenopus laevis* se realizó por medio de la técnica de fertilización *in vitro*. La ovulación de la rana hembra seleccionada fue inducida previamente mediante la inyección subcutánea de hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG). Con 48 hrs de anterioridad a la fertilización (pre-prime), la hembra fue inyectada con 50 unidades de hCG. 24 hrs después la hembra fue inyectada nuevamente con 250-300 unidades de hCG (prime). El macho fue previamente anestesiado en benzocaína y luego sacrificado, para extraer sus testículos, mediante una incisión abdominal. Los testículos fueron almacenados en medio MMR 1X suplementado con FBS. 12 hrs después de la segunda inyección de hCG se recolectaron los ovocitos en solución MMR 1X, posteriormente se fertilizaron con extracto de testículos de *X. laevis*

y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en solución MMR al 10%. Después, el medio de fertilización se reemplazó por una solución de cisteína al 2% en MMR 10%, pH 7.8-7.9 durante 10 minutos, con el objetivo de disolver la capa gelatinosa que protege los embriones, proceso conocido como “desgelatinización”. Posteriormente, los embriones fueron lavados e incubados en MMR al 10% a temperatura ambiente, para luego evaluar la formación del tubo neural entre 10.5 y 21.5 horas post-fertilización (hpf) (Figura 4), observando en el transcurso de este periodo, la expresión de diferentes Cxs. Los controles utilizados para evaluar la expresión de transcritos fueron:

- i. Control positivo (Cerebro Adulto *Xenopus laevis*)
- ii. Control negativo embriones en estadio de gástrula (estadio 10)



**Figura 4. Desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*.**

Etapas seleccionadas para el análisis del cierre del tubo neural y efectos morfológicos (Est 40-45). En estadio de gástrula se especifican las capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) y el embrión adquiere una orientación axial (Est 10). Estadio de neurulación temprana (Est 12.5) la zona media del embrión determina la posición futura de la placa neural. La elevación inicial de pliegues neurales, más pronunciada en la región anterior es observable durante estadio de neurulación intermedia (Est 14). En estadio de neurulación tardía (Est 20) los pliegues neurales se tocan entre si permitiendo el cierre del tubo neural. Modificado de (Karimi et al., 2018; Nieuwkoop & Faber, 1994).

## **2. Técnicas de Biología Molecular: RT-PCR convencional y RT-qPCR en tiempo real**

### **2.1 Extracción de ARN total**

Para la extracción ARN total de los estadios embrionarios de *Xenopus laevis*: Estadio 10 (gástrula), estadio 12,5 (temprano), estadio 14 (intermedio), estadio 19-20 (tardío) y cerebro adulto, se utilizó el kit E.Z.N.A.® HP Total RNA, homogenizando las muestras en 700  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis GTC, este volumen se implementó según instrucciones del fabricante por cantidad de tejido (30 mg). Las muestras se sometieron a centrifugaciones y lavados con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % v/v. Finalmente, el ARN total se eluyó en 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa y se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm y su pureza de acuerdo con la relación 260/280.

### **2.2 Transcripción reversa (RT) del ARN total**

La síntesis de ADN se realizó utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MuLV Enzyme Mix (ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit), agregando 1  $\mu\text{g}$  de cada muestra de ARN total. Para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , se incubó el ARN con 0,5  $\mu\text{g}$  de oligo-dT, denaturó a 70°C por 5 minutos y se llevó a hielo por 2 minutos. Posteriormente se agregó el tampón de transcripción M-MuLV Reaction Mix (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 10 mM), 400 U de la enzima transcriptasa reversa M-MuLV Enzyme Mix y se incubó por 1 h a 42°C y finalmente a 70°C por 5 min. Los controles negativos para la amplificación de cada muestra fueron realizados con el mismo protocolo de transcripción, pero sin añadir oligo-dT, ni enzima M-MuLV Enzyme Mix.

### 2.3 Amplificación del ADNc por PCR

La amplificación de ADNc se realizó en un termociclador Bio Rad (Icycler) implementado el kit de PCR (New England BioLabs). En una mezcla que contenía el tampón ThermoPol or Standard Taq Reaction 1X (Tris-HCl 10 mM, HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, pH 8.3), mezcla de dNTPs (0,2 mM de cada uno) set de partidores específicos (0,2 μM de cada uno) (Tabla 2), Taq ADN polimerasa 0,625 U (New England BioLabs) y 1 μL del producto de transcripción reversa, en un volumen final de 25 μL. El programa de incubación consistió en: un ciclo de 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 57°C por 30 s y 72°C por 30-40 s, y una extensión final de 72°C por 5 min. La síntesis de todos los ADNc fue testada utilizando partidores específicos para Sub-1. Se utilizó Sub-1 como gen de referencia por sus niveles de expresión (estables) en diferentes etapas tempranas de desarrollo en *Xenopus laevis* (Mughal, Leemans, Spirhanzlova, Demeneix, & Fini, 2018). Los partidores utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando NCBI, la especificidad de los partidores fue corroborada utilizando el programa informático de alineamiento de secuencias (BLAST), teniendo en cuenta su T<sub>m</sub>, el porcentaje de GC y la formación de dímeros.

### 2.4 Electroforesis en geles de agarosa

Se utilizó electroforesis en gel de agarosa con el fin de separar los fragmentos de ADN. Se prepararon geles de agarosa al 1% en solución TAE 0.5X (Tris-Ácido Acético EDTA; Tris-HCl 40 mM, ácido acético 30 mM y EDTA 1 mM; pH 7,6), con bromuro de etidio en una concentración final de 0.5 μg/mL. Las muestras fueron mezcladas con la solución tampón gel loading dye blue 1X (Ficoll 2,5%, EDTA 11 Mm, Tris-HCl 3.3 mM, SDS 0.017% y azul de bromofenol 0.015%) y cargadas en el gel. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb DNA ladder (GeneRuler, Thermo Scientific). La corrida electroforética se realizó a 100 V por 40 min en tampón TAE en una cámara de

electroforesis y la visualización de los fragmentos se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

## **2.5 RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)**

La reacción de RT-qPCR en tiempo real fue realizada con el kit Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) en un volumen final de 20  $\mu$ L, conteniendo 2  $\mu$ L de ADNc y 500 nM de cada set de partidores (Tabla 2). El gradiente de temperatura usada fue 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos, en un termociclador Mx3000P (Agilent Technologies, Inc.). La cuantificación de expresión relativa, se calculó comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) en relación con el gen de referencia Sub-1 (Mughal et al., 2018).



**Tabla 2. Lista de partidores usados para RT-PCR convencional y qRT-PCR cuantitativo (producto final de amplificación).**

Nombre	Partidor sense 5'-3'	Partidor antisense 5'-3'	Producto (pb)
<b>GJa1 (Cx43)</b>	CCT GGG GCG ATG AAC AAT CA	ACC CAG AAA CGC ACA TGA GA	106
<b>GJa2 (Cx38)</b>	CTGCCAGATGCTGTGAAACAT	GTCCACACAGACTCACCTGC	156
<b>GJa3 (Cx46)</b>	TGCCACTGGCTGAGATGTGAC	ACCTTTTCGGCAGCTGATCC	162
<b>GJa4 (Cx37)</b>	ATTGCTGGGGGAATACTAAGATCA	TCAGACTGCTCATCTCCCCA	183
<b>GJa7 (Cx45)</b>	GGC TGA CGG TGC TCA TA	AGG GGT GCA AAT GCA TCG TA	142
<b>GJa9 (Cx59)</b>	ACCTCCACAGTAAGCCACAC	TGGGATGGTACCCACATGGA	151
<b>GJa10 (Cx62)</b>	CTCCATTGAGGGGGTCCCTA	TATTAGGGCAAGGGGACCGT	150
<b>GJβ1 (Cx32)</b>	CAGGAGAGCAGCTAACACATCT	CCGCCACAAGCACCATGATA	143
<b>GJβ2 (Cx26)</b>	TCAGCGCACAGAGACCAATA	AAATCGGACTGTTCGTCCCC	181
<b>GJβ3 (Cx31)</b>	TCCGTCCCAAGGTTGTCATT	AACTTTCTCTGCTGCGACCA	154
<b>GJβ4 (Cx31)</b>	GTATCCCATGTCCGCCTCTG	AATACTGAGTCCACTGCGGC	224
<b>GJβ7 (Cx25)</b>	GCTGCTTTTGAACATTTTCATTGTCG	GCTTCGGCTGCAACAACATA	154
<b>GJγ1 (Cx45)</b>	TGC CTG TAC ATG AGC TGG AC	GTT GGC CTC AGG GCT ACT AC	131
<b>GJγ2 (Cx46.6)</b>	GCTCAGGAACAAAACCTGCCC	CTCCTTGCTTTTCGTGAGCG	211
<b>GJγ3 (Cx30.2)</b>	TTGGGCCCTACAGCTAGTGA	AAGACTTCCCGCATCACACA	229
<b>GJδ3</b>	GGACAACCTGGTCTAACCGGG	ATGAGCTGGGAACCCACTTG	158
<b>GJδ4 (Cx40.1)</b>	TGCACGGGGCAGTATTTTCT	TCTCTCTTTAGGCGCTCGGA	224
<b>Sub-1</b>	AGC AGG AGA AAT GAA GCC AGG	CCG ACA TCT GCT CCT TCA GT	80

### **3. Técnicas para el estudio de la funcionalidad de los hemicanales**

A continuación, se explican las diferentes técnicas que se utilizaron para el estudio de la funcionalidad de los hemicanales.

#### **3.1 Tratamiento farmacológico**

Se incubaron 10 embriones (estadio 12,5) en MMR 10% en una placa de 12 pocillos con diferentes concentraciones de carbenoxolona (CBX) (3, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200 y 300  $\mu$ M) y enoxolona (ENX) (3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 200 y 300  $\mu$ M). Después de 12 horas de incubación los embriones (estadio 19-20) fueron lavados tres veces con MMR 10% y mantenidos en esa solución hasta el estadio de tadpole (estadio 40-45). El análisis y toma de imágenes se realizó en un estereomicroscopio NIKON modelo SMZ25, acoplado a una cámara campo claro amscope, objetivo 1x (embriones estadio 20) y objetivo 0,63x (embriones tadpole) en los cuales se determinó los efectos e implicaciones morfológicas en el proceso de neurulación. Para cuantificar el IC<sub>50</sub> de carbenoxolona (CBX) y enoxolona (ENX), se utilizó el programa ImageJ, en el cual se analizó también, el porcentaje de fenotipo alterado (cierre incorrecto del tubo neural) y alteraciones en la zona anteroposterior. Los IC<sub>50</sub> fueron utilizados en los posteriores ensayos como captación de LY y cuantificación de ATP.

#### **3.2 Captación de lucifer yellow y detección de fluorescencia *in vivo***

El lucifer yellow (LY) no es capaz de permeabilizar la membrana de las células excepto a través de los hemicanales funcionales o gap junctions dado sus propiedades fisicoquímicas y peso molecular (442,3 Da). Para estudiar la funcionalidad de los hemicanales se evaluó la capacidad de captación de LY en embriones (estadio 12,5), tanto en condiciones fisiológicas (FGF2) (Schalper et al., 2008), como redox (DTT) (Mauricio A Retamal et al., 2007). Para ello, 5 embriones se incubaron con LY 0,2 % en MMR 10%

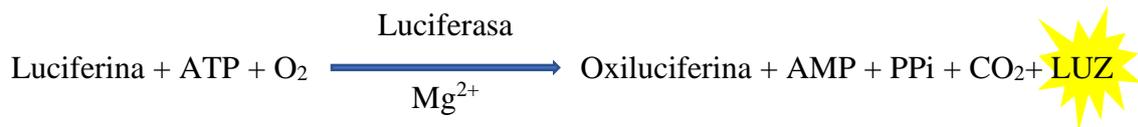
en placas de 24 pocillos y se trataron por 7 horas en diferentes condiciones (volumen final 500  $\mu$ L):

- i. Condición control: LY 0,2 % + MMR 10%
- ii. Condición 1: LY 0,2 % + MMR 10% + CBX 30  $\mu$ M
- iii. Condición 2: LY 0,2 % + MMR 10% + ENX 50  $\mu$ M
- iv. Condición 3: LY 0,2 % + MMR 10% + DTT 1 mM
- v. Condición 4: LY 0,2 % + MMR 10% + DTT 1 mM + CBX 30  $\mu$ M
- vi. Condición 5: LY 0,2 % + MMR 10% + DTT 1 mM + ENX 50  $\mu$ M
- vii. Condición 6: LY 0,2 % + MMR 10% + FGF2 20 ng/mL
- viii. Condición 7: LY 0,2 % + MMR 10% + FGF2 20 ng/mL + CBX 30  $\mu$ M
- ix. Condición 8: LY 0,2 % + MMR 10% + FGF2 20 ng/mL + ENX 50  $\mu$ M

Para la detección de fluorescencia, los embriones fueron lavados dos veces con MMR 10%, pH 7,4, para favorecer el cierre de los hemicanales. El análisis y toma de imágenes se realizó en un estereo microscopio NIKON modelo SMZ25, acoplado a una cámara Fluo Flir, objetivo 1x, con magnificación 8X (embriones estadio 20). La positividad de LY fue cuantificada con el programa ImageJ, en el cual se contaron las células positivas para LY por área.

### **3.3 Cuantificación de ATP extracelular e intracelular**

Para la medición de ATP se utilizó el sistema enzimático “Luciferina/Luciferasa” kit determinación de ATP (A22066 Thermo Fisher Scientific). La luciferasa cataliza la reacción de luciferina en presencia de ATP y O<sub>2</sub>, en esta reacción se emite bioluminiscencia la cual es proporcional a la cantidad de ATP.



Los embriones fueron incubados en placas de 48 pocillos (volumen final de 200  $\mu\text{L}$ ), bajo las siguientes condiciones:

- i. Condición control: MMR 10%
- ii. Control positivo: MMR10% + gramicidina A 100  $\mu\text{M}$
- iii. Condición 1: MMR 10% + CBX 30  $\mu\text{M}$
- iv. Condición 2: MMR 10% + ENX 50  $\mu\text{M}$
- v. Condición 3: MMR 10% + DTT 1 mM
- vi. Condición 4: MMR 10% + DTT 1 mM + CBX 30  $\mu\text{M}$
- vii. Condición 5: MMR 10% + DTT 1 mM + ENX 50  $\mu\text{M}$
- viii. Condición 6: MMR 10% + FGF2 20 ng/mL
- ix. Condición 7: MMR 10% + FGF2 20 ng/mL + CBX 30  $\mu\text{M}$
- x. Condición 8: MMR 10% + FGF2 20 ng/mL + ENX 50  $\mu\text{M}$

Después de 7 horas, se calculó la concentración de ATP extracelular contenido en 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y la concentración de ATP intracelular (lisado mecánico de 3 embriones).

La Gramicidina A, es una molécula de cadena lineal de aminoácidos, que forma poros en la membrana, permitiendo la fuga de ATP al medio extracelular, razón por la cual se utilizó como control positivo del procedimiento. La cantidad de ATP en cada muestra fue calculada a partir de una curva estándar, cuyo intervalo de concentraciones incluye 0,1, 0,5, 1 y 10  $\mu\text{M}$ . La absorbancia fue medida a 560 nm durante 2 minutos a 28°C.

## **4. Técnicas *In silico*: Análisis bioinformático interacción hemicanal Cx46- Carbenoxolona/Enoxolona**

### **4.1 Selección de moléculas**

La estructura de GJ $\alpha$ 3 (Cx46) fue extraída del Protein Data Bank PDB (código 6MHQ), resolución de 3.4 Å (Myers et al., 2018). Las estructuras de CBX (CID: 636403) (PM: 570.8 g/mol) y ENX (CID: 10114) (PM: 470.7 g/mol) se obtuvieron de la base de datos Pubchem y fueron preparadas usando el programa LigPrep (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016), se asignaron cargas, estados de protonación y enlaces rotables en el programa AutoDock Vina versión 1.5.0 (Trott & Olson, 2010), antes de realizar las simulaciones de docking molecular. Para ejecutar Vina los formatos (proteína-ligando) fueron transformados y guardados como “pdbqt” conservando los átomos de hidrógenos polares para disminuir el gasto computacional en el docking molecular.

### **4.2 Preparación de la proteína GJ $\alpha$ 3 (Cx46)**

La estructura de GJ $\alpha$ 3 (Cx46), fue modificada en PyMOL versión 1.7 (DeLano, 2002), para modelar la conformación de hemicanal (HC-Cx46). Las moléculas de H<sub>2</sub>O de la estructura cristalizada fueron eliminadas para disminuir el tamaño y evitar que moléculas extra enmascaren la unión ligando-proteína, se agregaron cadenas laterales e hidrógenos faltantes y se crearon puentes disulfuro a pH  $7 \pm 0,2$  a través del programa Maestro Protein Preparation Wizard (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016). Igualmente, se delimitó cada cadena de la proteína agregando “TER” en el archivo txt y se predijo los valores de pKa de los grupos ionizables a pH fisiológico a través el programa PROPKA versión 3.1 (Olsson, Søndergaard, Rostkowski, & Jensen, 2011; Søndergaard, Olsson, Rostkowski, & Jensen, 2011). Por último, se realizó una minimización de energía de la estructura utilizando el programa Macromodel

(Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016) en un gradiente conjugado de energía Polak-Ribiere hasta una convergencia de 0,05 kJ/mol, usando para este proceso el campo de fuerza OPLS\_2005 en solvente acuoso.

### **4.3 Identificación sitio de interacción proteína-ligando**

Para la identificación de sitios de unión de moléculas pequeñas en los HCs-Cx46, se usó el programa Fpocket, el cual se fundamenta en la teselación de Voronoi y en las esferas  $\alpha$  para analizar la superficie de la proteína y detectar el “Bolsillo” de interacción (proteína- ligando). Para determinar los “Bolsillos de interacción” se utilizó el PDB 6MHQ modificado (HCs-Cx46) y se ejecutó el programa de acuerdo a los lineamientos de (Le Guilloux, Schmidtke, & Tuffery, 2009; Schmidtke, Le Guilloux, Maupetit, & Tuffery, 2010).

### **4.4 Docking Molecular**

Una vez identificados los “Bolsillos de interacción” en el HC-Cx46, el siguiente paso fue realizar simulaciones de docking molecular. El Docking molecular predice la orientación e interacciones entre proteína-ligando, utilizando dos componentes principales: acoplamiento y puntuación. El acoplamiento *per se* implica el muestreo conformacional y orientativo del ligando dentro de las restricciones del sitio de unión la proteína. La puntuación determina la orientación de los ligandos (Yuriev, Agostino, & Ramsland, 2011).

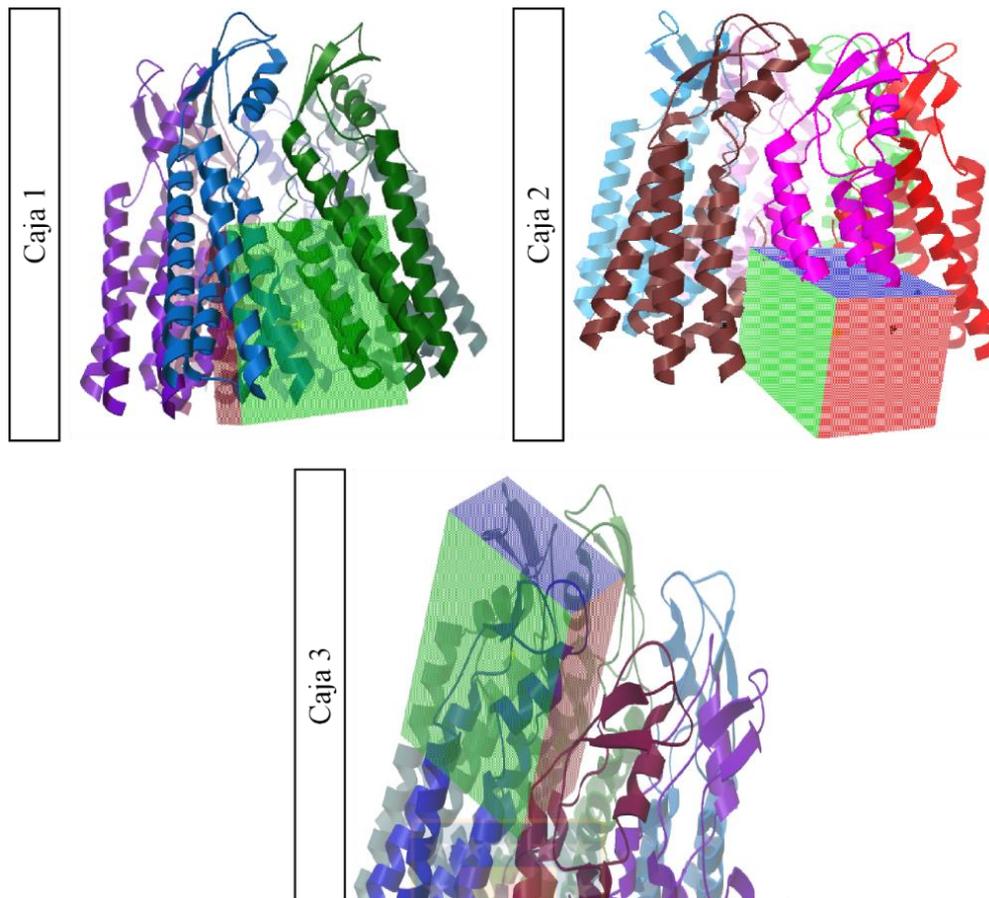
Para analizar la interacción HCs-Cx46-CBX/ENX se ejecutó el programa AutoDock Vina versión 1.5.0 (Trott & Olson, 2010). Los parámetros de interacción se realizaron manteniendo la proteína rígida y los ligandos como moléculas flexibles. Adicional a esto, se generó una caja de cribado o “Grid Box” con dimensiones específicas centrada en el “bolsillo de interacción” utilizando el programa auxiliar AutoGrid 4.

El tamaño y dimensiones (Figura 5) de cada caja de cribado se describen a continuación:

- i. Caja 1: centro x = 107.961; centro y = 123.038; centro z = 56.697 Å; exhaustividad = 512; tamaño x = 28; tamaño y = 24; tamaño z = 28 Å.
- ii. Caja 2: centro x = 131.23; centro y = 105.468; centro z = 55.123 Å; exhaustividad = 512; tamaño x = 30; tamaño y = 20; tamaño z = 22 Å.
- iii. Caja 3: centro x = 96.599; centro y = 87.962; centro z = 94.644; exhaustividad = 512; tamaño x = 24; tamaño y = 22; tamaño z = 26 Å.

Los complejos generados se clasificaron en función de las constantes de afinidad expresadas en kcal/mol. El análisis de la interfaz HCs-Cx46-CBX/ENX y los parámetros energéticos fueron realizados en el programa Maestro (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016). Adicionalmente, el  $\Delta G$  teórico fue calculado a través del cálculo de energía MM-GBSA utilizando el programa Prime (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016). Todas las imágenes fueron creadas y visualizadas en PyMOL versión 1.7 (DeLano, 2002).





**Figura 5. Preparación hemicanal Cx46.**

Se muestran las localizaciones, tamaños y dimensiones de cajas de rejilla docking molecular. Cada caja evidencia el sitio de interacción proteína-ligando (hemicanal Cx46 con CBX y ENX). Caja 1 sitio de interacción: NT (dos monómeros). Caja 2 sitio de interacción: NT, TM2 y TM3 (un monómero). Caja 3 sitio de interacción: LE1 y LE2 (un monómero).

### 5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, cada muestra fue comparada con su respectivo control. Estos análisis se realizaron en el programa GraphPad Prism 6.0 Software. Los resultados se expresaron en promedio  $\pm$  desviación estándar y se determinaron las diferencias significativas mediante ANOVA de una vía (no paramétrico) con test de comparación múltiple de Dunnett y Bonferroni. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## IV. RESULTADOS

De acuerdo con lo anterior se propone que, algunas Cxs se expresan y participan en el proceso formación del tubo neural, formando hemicanales que permiten la liberación ATP. Para conocer si las Cxs están presente o no en este proceso se evaluó la presencia de transcritos en la formación del tubo neural.

**Objetivo 1:** “Identificar la presencia y localización de las conexinas mayormente expresadas en estadios tempranos de desarrollo de *Xenopus laevis*.”

### 1. Perfil de expresión de Cxs en estadios tempranos de desarrollo en *Xenopus*

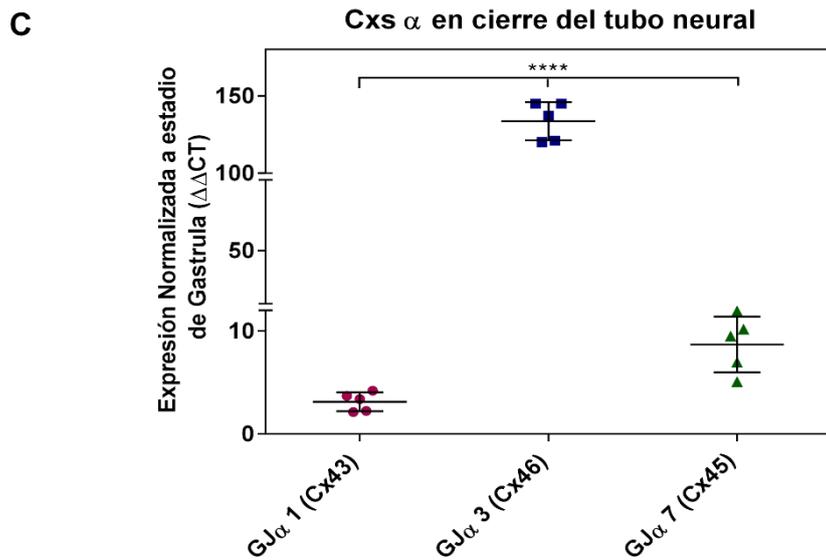
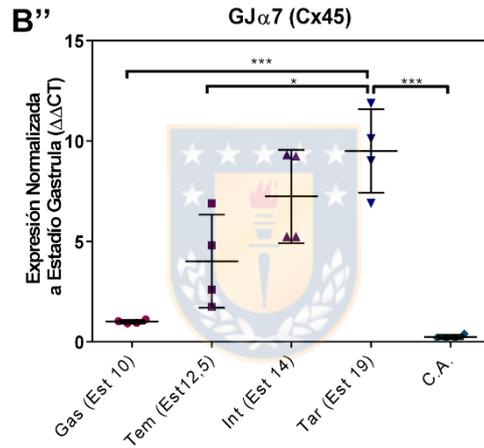
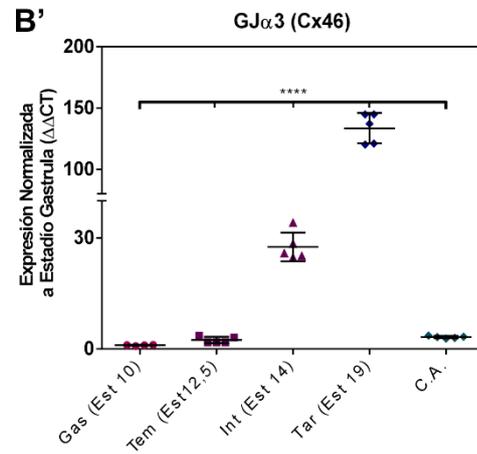
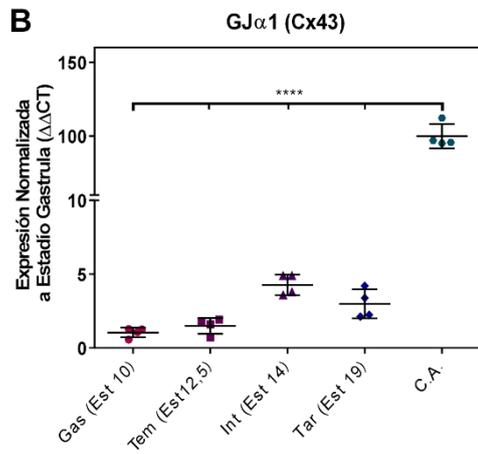
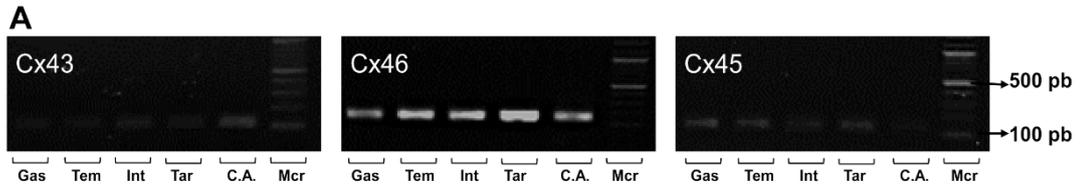
#### *laevis in vitro*

Estadios temprano, intermedio y tardío de *Xenopus laevis* expresan GJ $\alpha$ 1 (Cx43), GJ $\alpha$ 3 (Cx46), GJ $\alpha$ 7/GJ $\gamma$ 1 (Cx45), GJ $\beta$ 1 (Cx32), GJ $\beta$ 2 (Cx26), GJ $\beta$ 3 (Cx31), GJ $\beta$ 7 (Cx25) y GJ $\delta$ 3. En una primera etapa se caracterizó la expresión de conexinas en las condiciones de estadio de gástrula (Est 10), temprano (Est 12,5), intermedio (Est 14), tardío (Est 20) y cerebro adulto, a través de RT-PCR. Los resultados evidencian la expresión de Cx43, Cx45, Cx46, Cx26, Cx32, Cx31 y Cx25 (Figura 6A-7A). Los patrones de migración electroforéticos observados en los diferentes estadios, son similares a los patrones observados en el control positivo de cerebro adulto (CA), demostrando especificidad de los partidores reportados en la Tabla 2.

Los genes GJ $\alpha$ 2 (Cx38), GJ $\alpha$ 4 (Cx37), GJ $\alpha$ 9 (Cx59), GJ $\alpha$ 10 (Cx62), GJ $\beta$ 4, GJ $\gamma$ 2 (Cx46.6), GJ $\gamma$ 3 (Cx30.2) y GJ $\delta$ 4 (Cx40.1), no mostraron patrón de expresión o cambios significativos (aumento o disminución de niveles de mensajero), resultados no mostrados, razón por la cual no fueron considerados para realizar los ensayos de RT-qPCR.

Para la cuantificación por RT-qPCR de GJ $\alpha$ 1 (Cx43), GJ $\alpha$ 3 (Cx46), GJ $\alpha$ 7/GJ $\gamma$ 1 (Cx45), GJ $\beta$ 1 (Cx32), GJ $\beta$ 2 (Cx26), GJ $\beta$ 3 (Cx31), GJ $\beta$ 7 (Cx25) y GJ $\delta$ 3, se determinó el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) en relación al gen de referencia Sub-1 (Mughal et al., 2018). Los resultados fueron expresados aplicando el método  $\Delta$ Ct en el cual la cantidad de ADNc fue expresada como X veces sobre la muestra utilizada como referencia Sub-1 (Mughal et al., 2018) y posteriormente se implementó el método  $\Delta\Delta$ Ct, normalizando los datos al estadio de gástrula (Figura 6B-7B). El Ct es inversamente proporcional al número de copias del templado lo que indica a mayor número de copias de templado, menor Ct medido.

Por medio de RT-PCR convencional se observó la expresión de Cx43, Cx45, Cx46, Cx26, Cx32, Cx31 y Cx25, en todos los estadios de desarrollo de interés y no se observó cambios significativos en el nivel de expresión del mensajero de estas conexinas (Figura 6A-7A). Sin embargo, en el análisis de RT-PCR cuantitativo se evidenció que las Cxs incrementan su expresión en relación con los niveles de expresión reportados en estadio de gástrula (Est 10) (Figura 6B-7B). Así mismo, se puede identificar que la Cx45 (Figura 6B''), Cx32 (Figura 7B), Cx31 (Figura 7B'') y Cx25 (Figura 7B''') mantienen sus niveles de expresión en los diferentes estadios. Las Cx46 (Figura 6B') y Cx26 (Figura 7B') incrementan en 10 (Cx26) y 100 (Cx46) veces su expresión en estadio tardío (Est 20) y la Cx43 100 veces en cerebro adulto (Figura 6B). Una vez demostrada la expresión de Cxs en los diferentes estadios de desarrollo en *Xenopus laevis*, se realizó una comparación de la expresión relativa de estas en el estadio de cierre del tubo neural (Est 19-20) (Figura 6-7C).

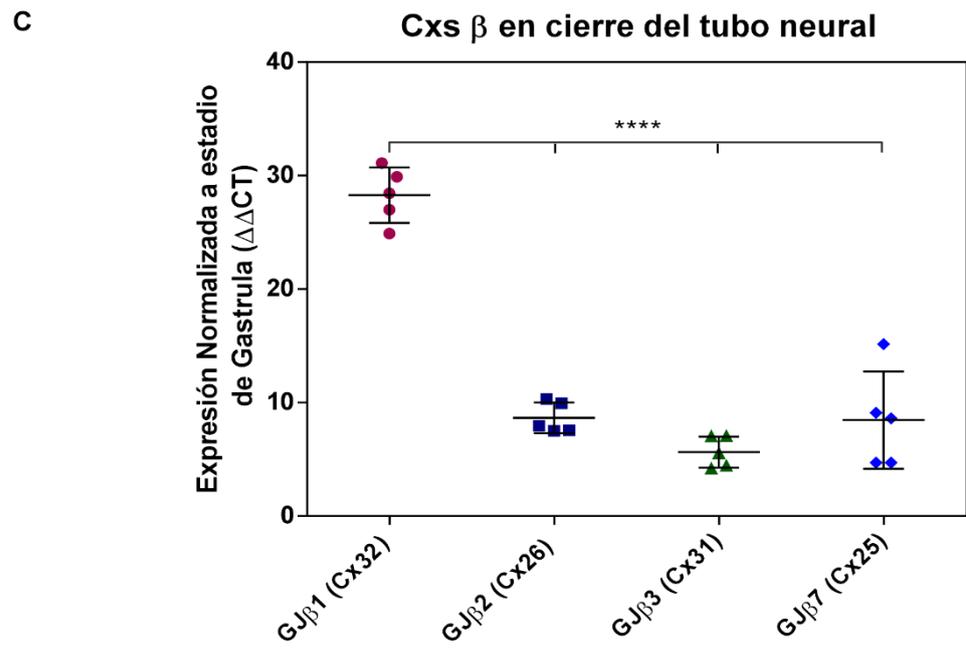
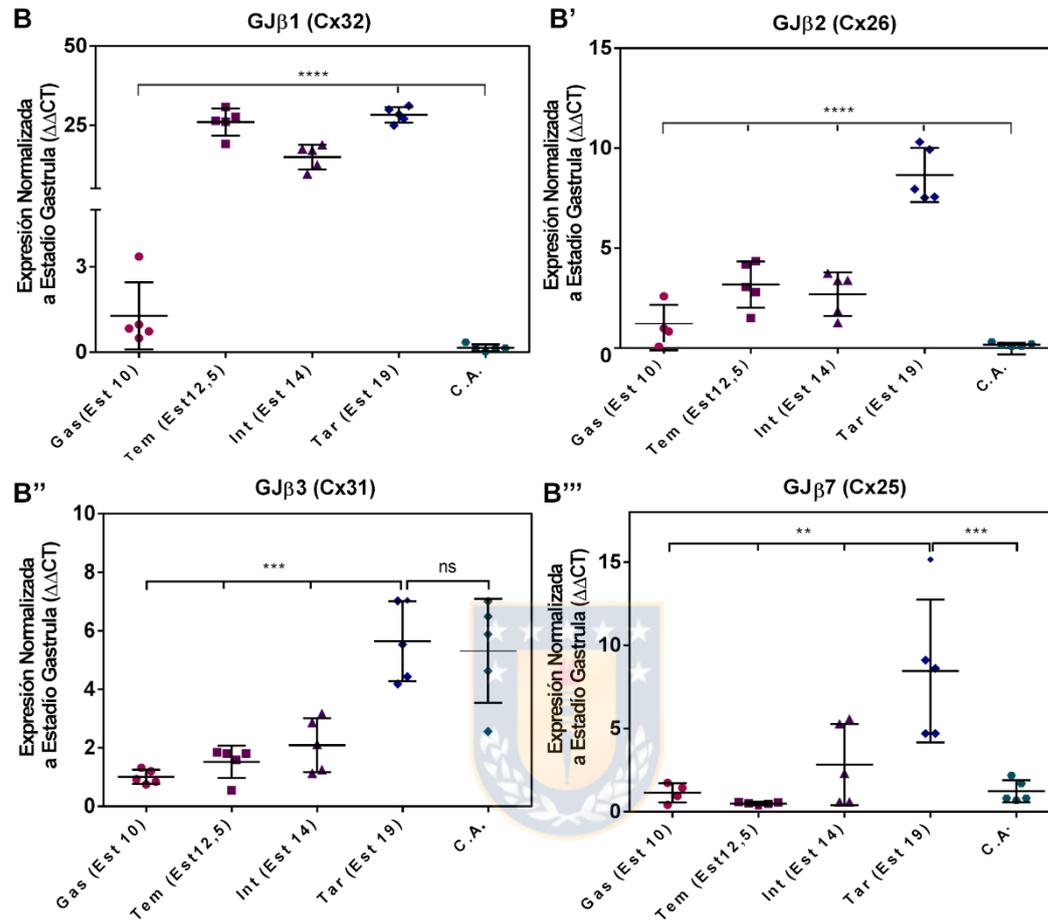
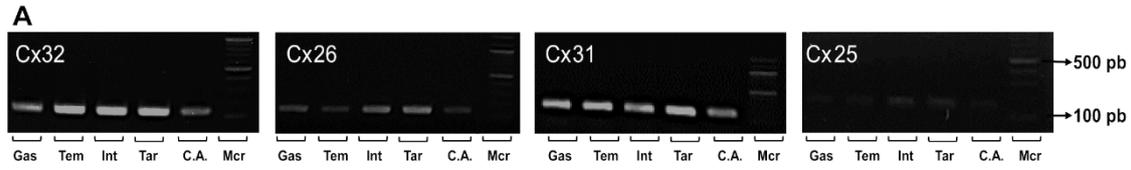


**Figura 6. Patrón de expresión relativa de conexinas subgrupo  $\alpha$  en diferentes estadios de desarrollo de *Xenopus laevis*.**

A. RT-PCR para GJa1 (Cx43), GJa3 (Cx46) y GJa7 (Cx45) en diferentes estadios tempranos de desarrollo de *Xenopus laevis*. Carril 1. Gas (Gástrula estadio 10), Carril 2. Tem (temprano estadio 12,5), Carril 3. Int (Intermedio estadio 14), Carril 4. Tar (Tardío estadio 19-20), Carril 5. CA (Cerebro adulto) y Carril 6. Mcr (Marcador 100 pb) N= 2.

B. RT-qPCR para GJa1 (Cx43), GJa3 (Cx46) y GJa7 (Cx45) en formación del tubo neural de *Xenopus laevis* N= 4. C. Análisis comparativo de expresión de conexinas en el cierre del tubo neural de *Xenopus laevis* N= 4. La expresión transcripcional de las conexinas fue normalizada al gen control sub-1. ANOVA de una vía, corrección de Dunnett, (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ). Las barras de error para los datos representan la desviación estándar.





**Figura 7. Patrón de expresión relativa de conexinas subgrupo  $\beta$  en diferentes estadios de desarrollo de *Xenopus laevis*.**

A. RT-PCR para GJ $\beta$ 1 (Cx32), GJ $\beta$ 2 (Cx26), GJ $\beta$ 3 (Cx31) y GJ $\beta$ 7 (Cx25) en diferentes estadios tempranos de desarrollo de *Xenopus laevis*. Carril 1. Gas (Gástrula estadio 10), Carril 2. Tem (temprano estadio 12,5), Carril 3. Int (Intermedio estadio 14), Carril 4. Tar (Tardío estadio 19-20), Carril 5. CA (Cerebro adulto) y Carril 6. Mcr (Marcador 100 pb). B. RT-qPCR para GJ $\beta$ 1 (Cx30/32), GJ $\beta$ 2 (Cx26), GJ $\beta$ 3 (Cx31) y GJ $\beta$ 7 (Cx25) en formación del tubo neural de *Xenopus laevis* N= 5. C. Análisis comparativo de expresión de conexinas en el cierre del tubo neural de *Xenopus laevis* N= 5. La expresión transcripcional de las conexinas fue normalizada al gen control sub-1. ANOVA de una vía, corrección de Dunnett, (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ; ns= no significativo.). Las barras de error para los datos representan la desviación estándar.

Los resultados obtenidos demostraron la expresión preferencial de Cx46, 100 veces más abundante de las Cxs  $\alpha$  (Figura 6C) y de la Cx32, 30 veces más abundante de las Cxs  $\beta$  (Figura 7C), sugiriendo que tanto la Cx46, como la Cx32 cumple una función específica durante la formación del tubo neural. Se ha demostrado que la Cx46 y la Cx32 están involucradas en procesos de migración temprana (Bannerman et al., 2000), neurogénesis y gliogénesis embrionaria y posnatal temprana (Swayne & Bennett, 2016). Estos resultados proponen que tanto Cx46, como Cx32 estarían formando uniones comunicantes o hemicanales regulando el proceso de formación del tubo neural o algún otro proceso, por esto el enfoque se dirigió a analizar su funcionalidad en el proceso de neurulación (Est 12,5- Est 20) mediante el bloqueo funcional de estas Cxs.

**Objetivo 2:** “Evaluar la función de hemicanales formados por conexinas en el proceso de neurulación, mediante el bloqueo farmacológico y liberación de ATP.”

## **2. Bloqueo farmacológico de Cxs en neurulación induce DTN**

Para determinar su participación en la formación del tubo neural, se utilizó CBX (Figura 8) y ENX (Figura 9), bloqueadores de Cxs (Willebrords et al., 2017), para evaluar los posibles efectos en la etapas tempranas de desarrollo embrionario, específicamente durante los estadios de neurulación (12,5-20) y tadpole (40-45) (Figura 8A-9A). Los ensayos con CBX y ENX se realizaron en embriones en estadio 12,5, los cuales fueron incubados en concentraciones crecientes de CBX y ENX. Los embriones se trataron con estos bloqueadores hasta alcanzar el estadio de neurula tardía (Est 20) (Figura 8A-9A), mostrando cambios morfológicos (malformaciones) a partir de 30  $\mu\text{M}$  (CBX) (Figura 8B) y 50  $\mu\text{M}$  (ENX) (Figura 9B), la exposición a CBX y ENX provocó un retraso importante en la formación del tubo en comparación con los embriones control. Los fenotipos muestran una apertura del tubo neural principalmente en la zona anterior del embrión 30  $\mu\text{M}$  (CBX) (Figura 8B) y 30  $\mu\text{M}$  (ENX) (Figura 9B), pero al aumentar estas concentraciones la alteración se extiende a todo el eje anteroposterior (Figura 8B-9B).

La cuantificación de fenotipo alterado (tubo neural abierto/cerrado) indica que inicialmente un 20,2% (Figura 8C) y 15% (Figura 9C) de embriones control presentan fenotipo abierto, en comparación con un 66,5% de embriones con fenotipo abierto expuestos a 30  $\mu\text{M}$  CBX (Figura 8C) y un 65,5% de embriones con fenotipo abierto expuestos a 50  $\mu\text{M}$  ENX (Figura 9C). En concentraciones superiores a 30  $\mu\text{M}$  (CBX) y 50  $\mu\text{M}$  (ENX) el fenotipo alterado aumenta a un 81,1% (Figura 8C) y 84,4% (Figura 9C), respectivamente. Finalmente, a concentraciones iguales o superiores a 100  $\mu\text{M}$  el 100%

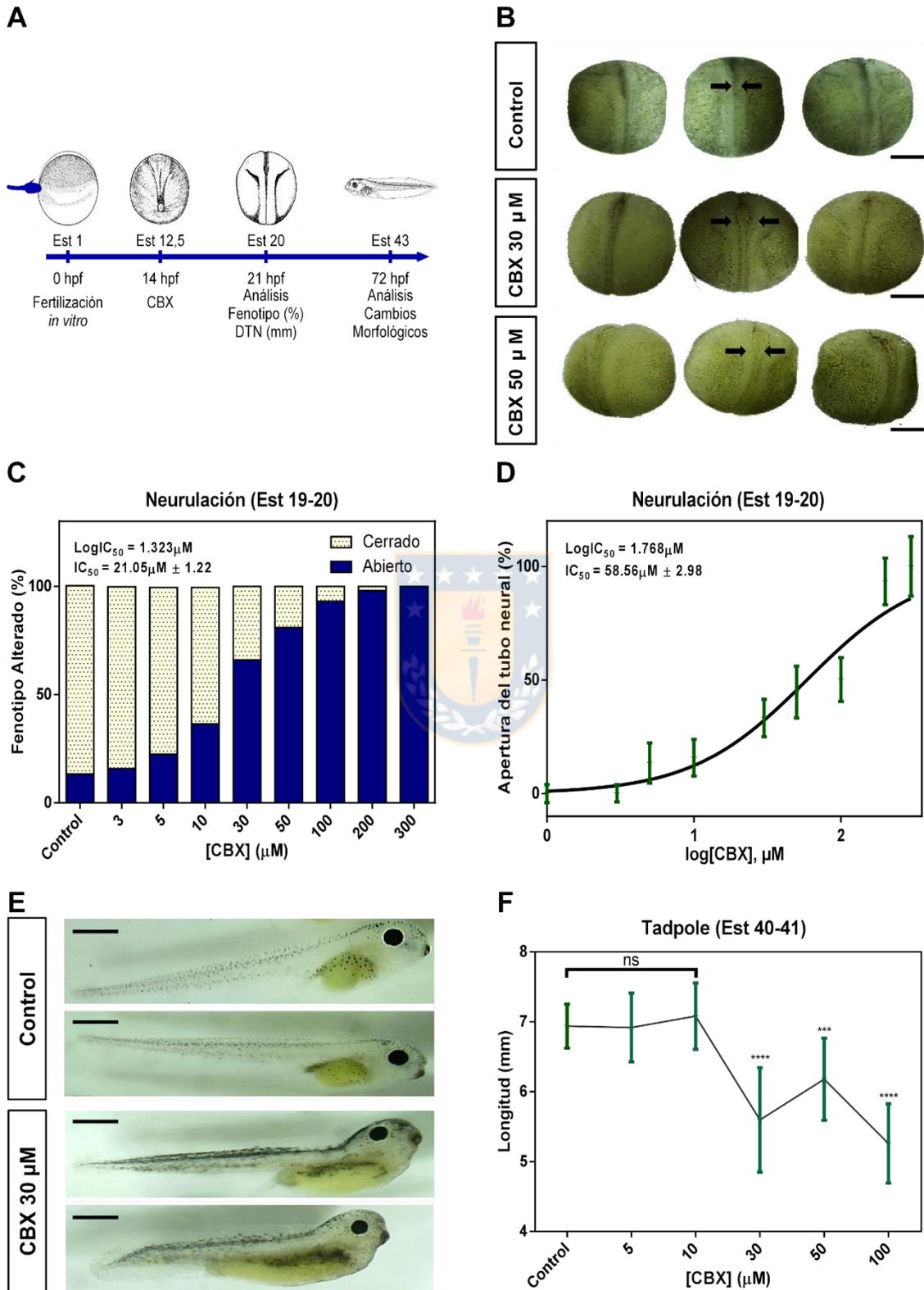
de los embriones presenta un fenotipo alterado (Figura 8C-9C). A través de, la curva concentración-respuesta de fenotipos alterados, se calculó el EC<sub>50</sub> (concentración efectiva media), siendo inicialmente (promedio ± error estándar), reportando un valor de 21,05 μM ± 1,22 (CBX) (Figura 8C) y 47,83 μM ± 2,31 (ENX) (Figura 9C).

Una vez identificado el fenotipo alterado de los embriones se evaluó el nivel de severidad de apertura del tubo neural (mm) en cada condición (Figura 8D-9D). Los datos se expresaron en % normalizado de apertura del tubo neural, tomando el valor de apertura mínimo 0,05 mm ± 0,02 como el 0% y el valor de apertura máximo 0,29 ± 0,05 (CBX) (Figura 8D) y 0,32 ± 0,04 (ENX) (Figura 9D) como el 100%. El análisis cuantitativo arrojó que, bajo condiciones control, los embriones presentan un 2% de severidad de apertura, pero en condiciones de 30 μM (CBX) (Figura 8D) y 50 μM (ENX) (Figura 9D) la apertura del tubo neural aumenta a 33,3% (0,17 mm ± 0,05 y 0,14 ± 0,04), respectivamente. La concentración a la que se obtiene el 50% de severidad de apertura es de 58,56 μM ± 2,98 (CBX) y 66,74 μM ± 4,19 (ENX).

Para evaluar si los embriones presentaban cambios morfológicos relevantes tras la exposición a los bloqueadores de Cxs en neurulación (Est 12,5-20), se midió la longitud (mm) de embriones en estadio tadpole (Est 40-45), embriones control y embriones tratados con CBX/ENX (Figura 8E-9E). Los embriones tratados con 30 μM CBX presentaron fenotipos alterados en su eje anteroposterior curvo (Figura 8E), evidenciando alteraciones en la formación de su médula espinal. A concentraciones superiores 100-300 μM CBX, se generó la inhibición completa del crecimiento y posterior degeneración y muerte. La longitud de los embriones tras la exposición a CBX varió significativamente entre los embriones control (6,93 mm ± 0,14) y los grupos expuestos a 30 μM (5,59 mm ± 0,18) y 100 μM (5,59 mm ± 0,18) (Figura 8F). Estos resultados indica que los embriones

tratados con CBX, desarrollan defectos durante el proceso de formación del tubo neural

(Figura 8E-8F).



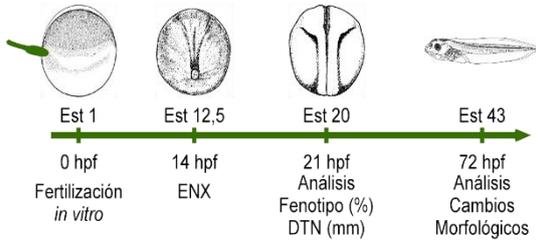
### Figura 8. Bloqueo farmacológico de Cxs con CBX induce DTN.

A. Línea de tiempo describiendo procedimiento realizado para el tratamiento con CBX. B. Fenotipo morfológico de embriones tratados con CBX (estadio 12,5 a estadio 20). Barra de escala 500  $\mu\text{m}$ . C. Cuantificación del porcentaje de fenotipo abierto/cerrado de embriones con concentraciones variables 3  $\mu\text{M}$ -300  $\mu\text{M}$  de CBX,  $\text{IC}_{50} = 21,05 \mu\text{M} \pm 1,22$ . D. Curva concentración-respuesta de apertura del tubo neural (% normalizado) de embriones en estadio 20 tratados con concentraciones crecientes de CBX (3 $\mu\text{M}$ -300 $\mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50} = 58,56 \mu\text{M} \pm 2,98$ . E. Fenotipo morfológico de tadpole (Est 40-45), después del tratamiento de CBX desde estadio 12,5 a estadio 20, Barra de escala 1 mm. F. Análisis cuantitativo del efecto de CBX en el desarrollo de embriones de *Xenopus laevis*. N=6 grupos de embriones fertilizados independientes y 10 réplicas para cada condición. ANOVA de una vía, corrección de Dunnett, (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ; ns= no significativo.). Las barras de error para los datos representan la desviación estándar.

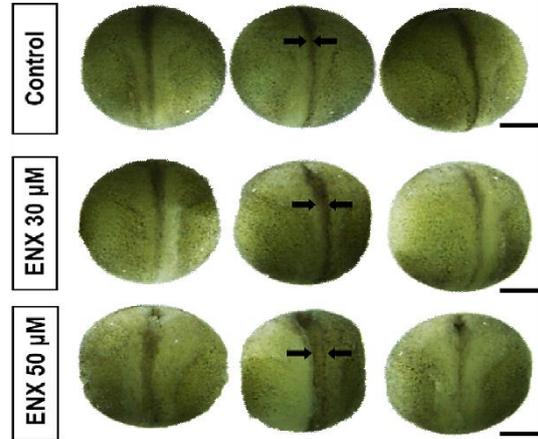
Los embriones expuestos a concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  de ENX, no mostraron fenotipos alterados en el estadio de tadpole (Est 40-45) (Figura 9E), pero concentraciones superiores 100-300  $\mu\text{M}$ , provocaron el deterioro completo de los embriones y posterior muerte (Figura 9F). En las concentraciones 30  $\mu\text{M}$  (7,44 mm  $\pm$  0,43) y 60  $\mu\text{M}$  (7,47 mm  $\pm$  0,57), no se observaron diferencias significativas en la longitud de los embriones (mm) con respecto al grupo control (7,49 mm  $\pm$  0,28), observándose diferencias significativas en concentraciones superiores 70-100  $\mu\text{M}$  (7,06 mm  $\pm$  0,48) y (6,88 mm  $\pm$  0,35), respectivamente. Estos datos permiten establecer que CBX y ENX causan alteraciones en el proceso de neurulación, pero la exposición a CBX genera efectos prolongados en estadios posteriores de desarrollo (Estadio Tadpole). Actualmente, se desconocen los mecanismos moleculares de cómo interaccionan estos bloqueadores para inhibir la funcionalidad de las Cxs. Una posible alternativa para elucidar esta interacción es mediante herramientas *in silico*. Con el fin de conocer las interacciones Cxs-bloqueadores se implementó la técnica de docking molecular que permite predecir el sitio de interacción

de estos bloqueadores en la estructura tridimensional de la Cx 46 (Resultados mostrados en la sección 5).

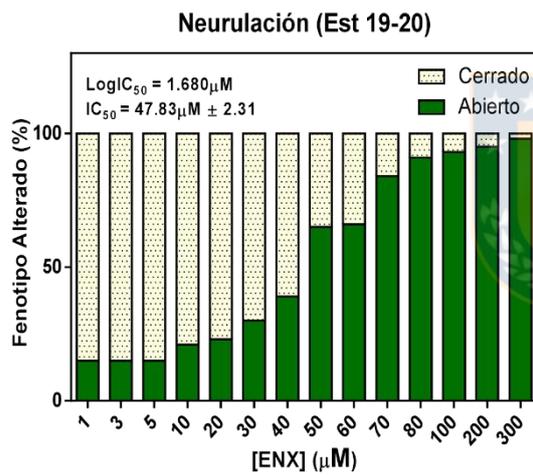
**A**



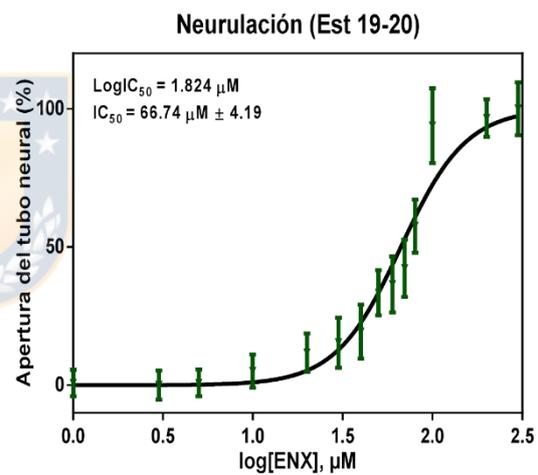
**B**



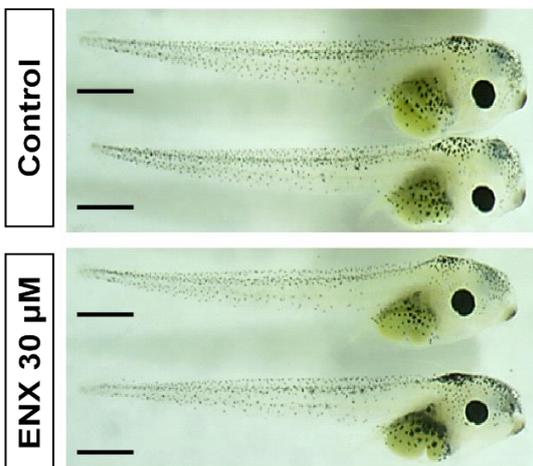
**C**



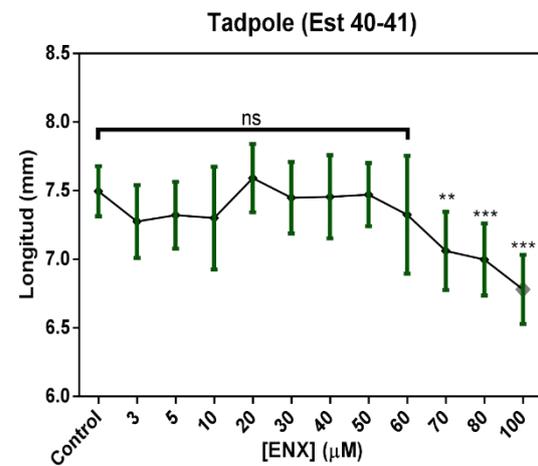
**D**



**E**

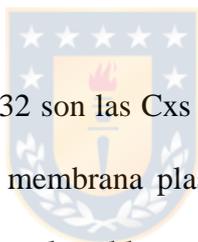


**F**



### Figura 9. Bloqueo farmacológico de Cxs con ENX induce DTN.

A. Línea de tiempo describiendo procedimiento realizado para el tratamiento con ENX. B. Fenotipo morfológico de embriones tratados con ENX (estadio 12,5 a estadio 20). Barra de escala 500  $\mu\text{m}$ . C. Cuantificación del porcentaje de fenotipo abierto/cerrado de embriones con concentraciones variables 3  $\mu\text{M}$ -300  $\mu\text{M}$  de ENX,  $\text{IC}_{50} = 47,83 \mu\text{M} \pm 2,31$ . D. Curva concentración-respuesta de apertura del tubo neural (% normalizado) de embriones en estadio de neurula tardía (Est 20), tratados con concentraciones crecientes de ENX (3 $\mu\text{M}$ -300 $\mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50} = 66,74 \mu\text{M} \pm 2,98$ . E. Fenotipo morfológico de tadpole (Est 40-45), después del tratamiento de ENX desde estadio de neural temprana (Est 12,5) a estadio de neurula tardía (Est 20). Barra de escala 1 mm. F. Análisis cuantitativo del efecto de ENX en el desarrollo de embriones de *Xenopus laevis*. N = 4 grupos de embriones fertilizados independientes y 10 réplicas para cada condición. ANOVA de una vía, corrección de Dunnett, (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ; ns= no significativo.). Las barras de error para los datos representan la desviación estándar.



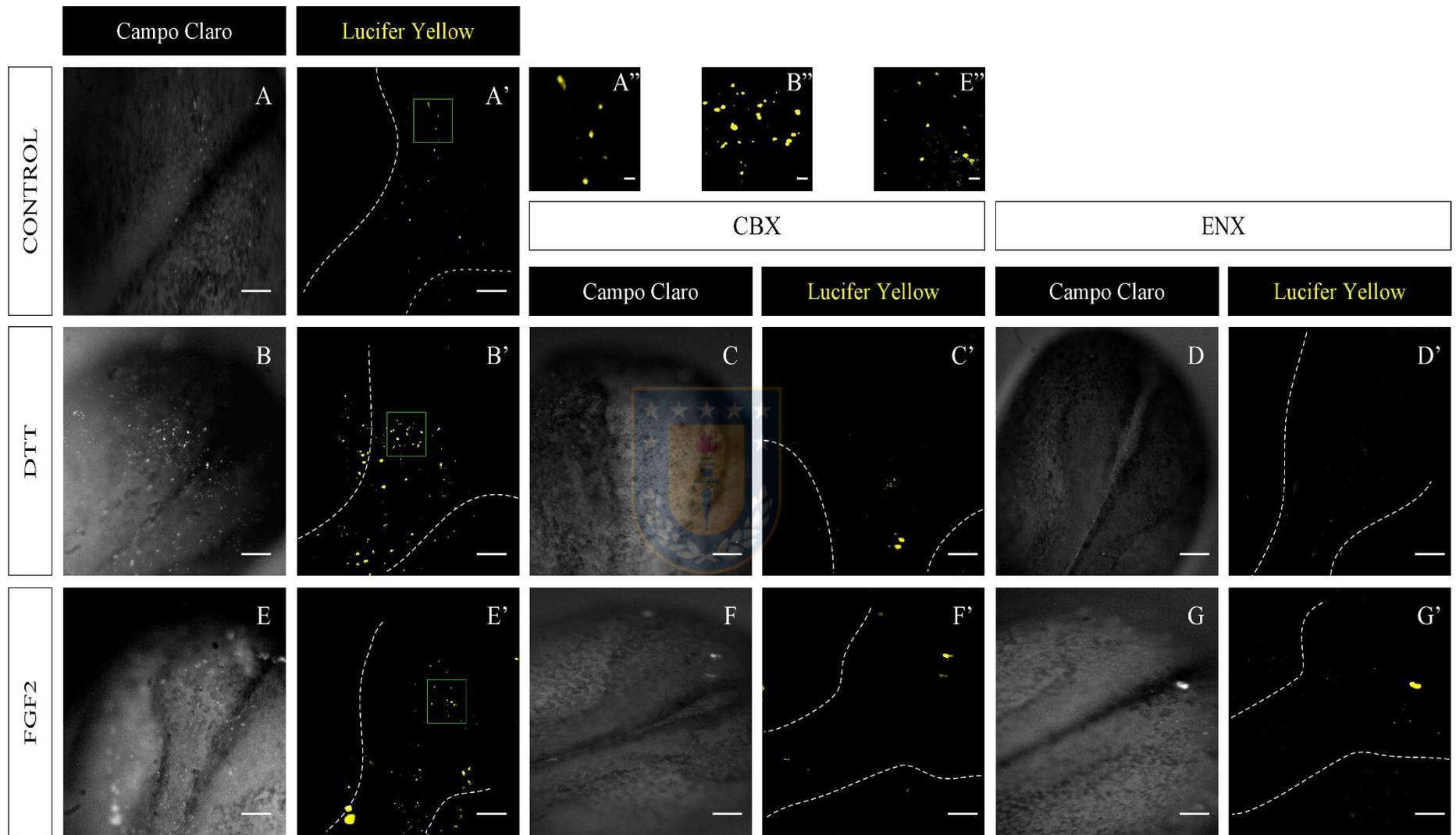
Teniendo en cuenta que Cx46 y Cx32 son las Cxs con mayor expresión génica (Figura 6C-7C), y que se transportan a la membrana plasmática ya oligomerizadas formando hemicanales (Koval et al., 2014) y que al ser bloqueadas se generan DTN (Figura 8-9), el siguiente paso fue estudiar la funcionalidad de estos hemicanales, no apareados.

Para estudiar si la actividad de los HCs-Cxs en neurulación, participan en los cambios fenotípicos del cierre del tubo neural (DTN) (Figura 8-9), se determinó la incorporación del trazador de permeabilidad Lucifer yellow (LY). El LY es un fluoróforo aniónico (carga neta  $2^-$ ), que normalmente no ingresa a la célula por su naturaleza hidrofílica, pero ingresa casi exclusivamente a través de HCs-Cxs debido a su bajo peso molecular (442.3 Da) (Eckert, 2006; Hanani, 2012).

### **3. Permeabilidad a Lucifer Yellow de HCs-Cxs, regulada por potenciales redox y FGFs (FGF2) durante el proceso de neurulación en *Xenopus laevis* *in vivo***

Se sabe que los potenciales redox y los FGFs modulan la apertura de HCs-Cxs, ya sea en presencia o ausencia de cationes divalentes y que esto ocurre a las 3 horas (Mauricio A Retamal et al., 2007) y 7 horas de exposición (Schalper et al., 2008). Por lo tanto, se decidió estudiar el efecto del DTT y FGF2 sobre el estado funcional de los HCs-Cxs, evaluando la permeabilidad de células de la placa neural a LY, en concentraciones fisiológicas de cationes divalentes y en presencia de CBX (30  $\mu$ M) y ENX (50  $\mu$ M). Para medir la captación de LY se registraron los cambios en la fluorescencia de las células de embriones (Est 12,5) expuestos a 1mM de DTT, 20 ng/mL de FGF2, 30  $\mu$ M de CBX y 50  $\mu$ M de ENX por 7 horas, mediante un microscopio de fluorescencia acoplado a un sistema de registro de imágenes, como se indicó en Materiales y Métodos. Para el análisis de las imágenes, se seleccionó el área del eje anteroposterior de los embriones (Est 20), analizando la captación de fluorescencia de cada embrión (Figura 10).

Las imágenes tomadas después de la incubación mostraron fluorescencia en el interior de células de la placa neural en concentraciones fisiológicas de cationes divalentes (condición control) (Figura 10A-A'), confirmando la presencia y funcionalidad de HCs-Cxs, en el proceso de neurulación. Los resultados indicaron que los embriones tratados con DTT y FGF2 incrementaron significativamente la captación de LY (Figura 10B-B' y E-E') comparado con la condición control (Figura 10A-A'), y su efecto fue revertido por CBX y ENX (Figura 10C', D', F' y G').



**Figura 10. Análisis representativo de HCs-Cxs presentes en células de la placa neural para determinar la captación de LY.**

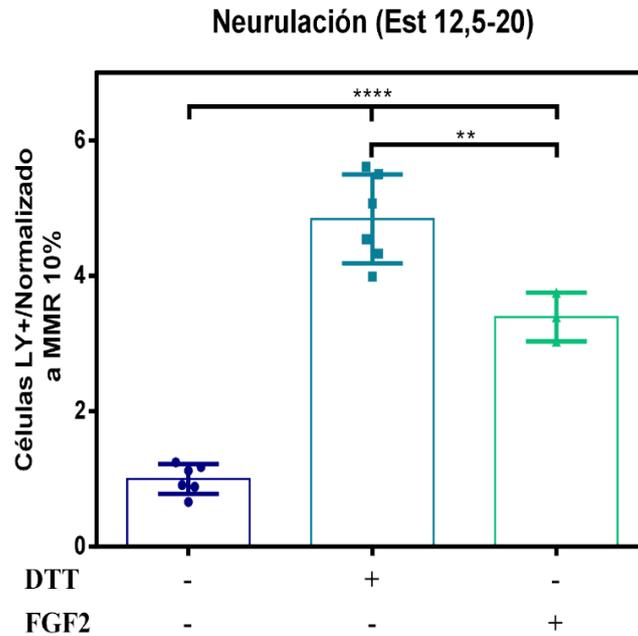
A-G. Imágenes representativas del proceso de cierre del tubo neural en condición control, DTT, DTT/CBX, DTT/ENX, FGF2, FGF2/CBX y FGF2/ ENX. A'-G'. Fluorescencia de células de la placa neural, ilustrando la captación de LY en condición control, DTT, DTT/CBX, DTT/ENX, FGF2, FGF2/CBX y FGF2/ ENX. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ . Las imágenes del panel superior muestran una magnificación de los recuadros en A', B' y E' señalando la captación de LY, respectivamente. Barra de escala (A'', B'' y E''): 20  $\mu\text{m}$ . Barra de escala recuadros magnificados: 20  $\mu\text{m}$ .

El análisis cuantitativo de células LY positivas, revelo diferencias significativas en la absorción del colorante en las distintas condiciones ( $p < 0.05$ ) (Figura 11A).

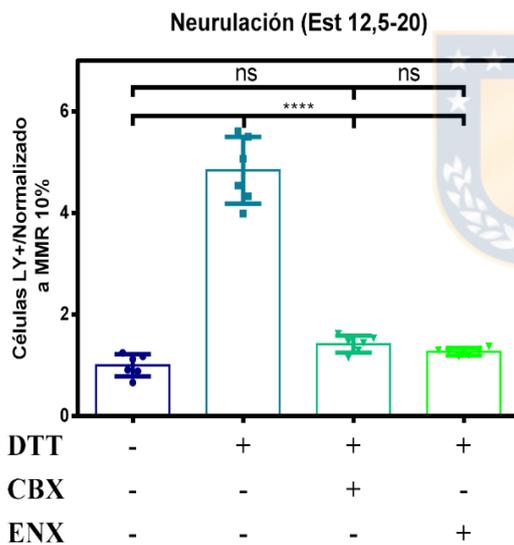
En presencia de una concentración extracelular normal de cationes divalentes, los embriones expuestos a potenciales redox (DTT) y FGFs (FGF2) mostraron un aumento de 3-6 veces sus niveles de captación, comparado con la condición control (Figura 11A). Además, se evidencio diferencias significativas entre los embriones expuestos a DTT y FGF2, donde se observó mayor permeabilidad en condiciones redox (Figura 11A). Para comprobar, que el incremento de permeabilidad de HCs-Cxs está regulado por potenciales redox y la vía de señalización inducida por FGF2, se evaluó el bloqueo farmacológico de estos HCs-Cxs utilizando CBX y ENX; el tratamiento con estos bloqueadores disminuyó la tasa de captación de LY a un nivel cercano al registrado en la condición control, mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 11B-C).

En conjunto, estos resultados indican que las Cxs, forman HCs funcionales, que participan en el aumento de permeabilidad de células de la placa neural y son regulados por potenciales redox y la vía de señalización inducida por FGFs.

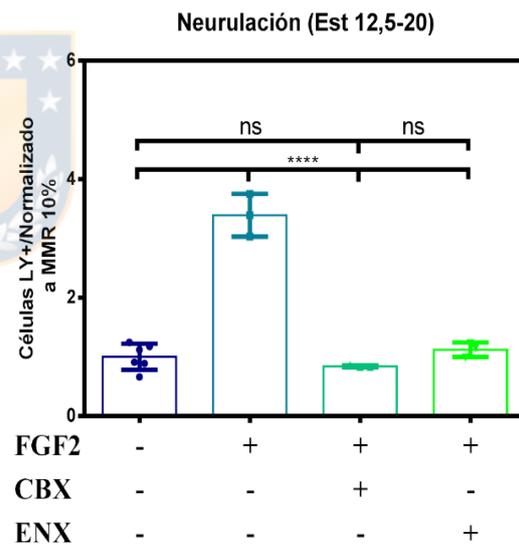
A



B



C



**Figura 11. Análisis cuantitativo: captación de lucifer Yellow en células de la placa neural.**

A. Comparación de células LY positivas en condiciones de potenciales redox y FGF2, cuantificación normalizada a condición control (MMR 10%). B. Cuantificación de células LY tras la exposición a potenciales redox (DTT). C. Cuantificación de células LY tras la exposición a FGF2. N=3 grupos de embriones fertilizados independientes y 5 réplicas para cada condición. ANOVA de una vía, test de comparación de Bonferroni, (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ; ns= no significativo.). Las barras de error para los datos representan la desviación estándar.

En células que expresan HCs-Cxs, el potencial redox intracelular (Evans et al., 2006) y la vía de señalización inducida por FGFs (Garré et al., 2010; Recabal et al., 2020), permiten la liberación de moléculas como ATP, glutamato y NAD<sup>+</sup>. Estos mecanismos de regulación son relevantes en condiciones fisiológicas, por lo tanto, el siguiente objetivo fue evaluar la liberación de ATP tras la apertura de HCs-Cxs, en el proceso de cierre del tubo neural.

#### **4. Potenciales redox y FGFs promueven la liberación de ATP mediante la apertura de HCs-Cxs durante el proceso de neurulación en *Xenopus laevis* *in vitro***

Los mecanismos moleculares implicados en la activación de la señalización purinérgica en estadios tempranos de desarrollo son desconocidos, sin embargo, se ha descrito la participación de receptores P2X, P2Y y de la enzima eNTPDasa-2, en procesos tempranos como neurulación, neurogénesis embrionaria temprana y el desarrollo cerebral en ratas (Bogdanov et al., 1997; Burnstock & Dale, 2015; Cheung et al., 2005; Massé & Dale, 2012). En el proceso de neurulación, se desconoce si el ATP extracelular que potencia esta activación es liberado por un mecanismo clásico (liberación vesicular) o un mecanismo alternativo (HCs-Cxs), lo cual permite sugerir, un mecanismo de liberación mediado por la apertura de HCs-Cxs (Figura 10-11).

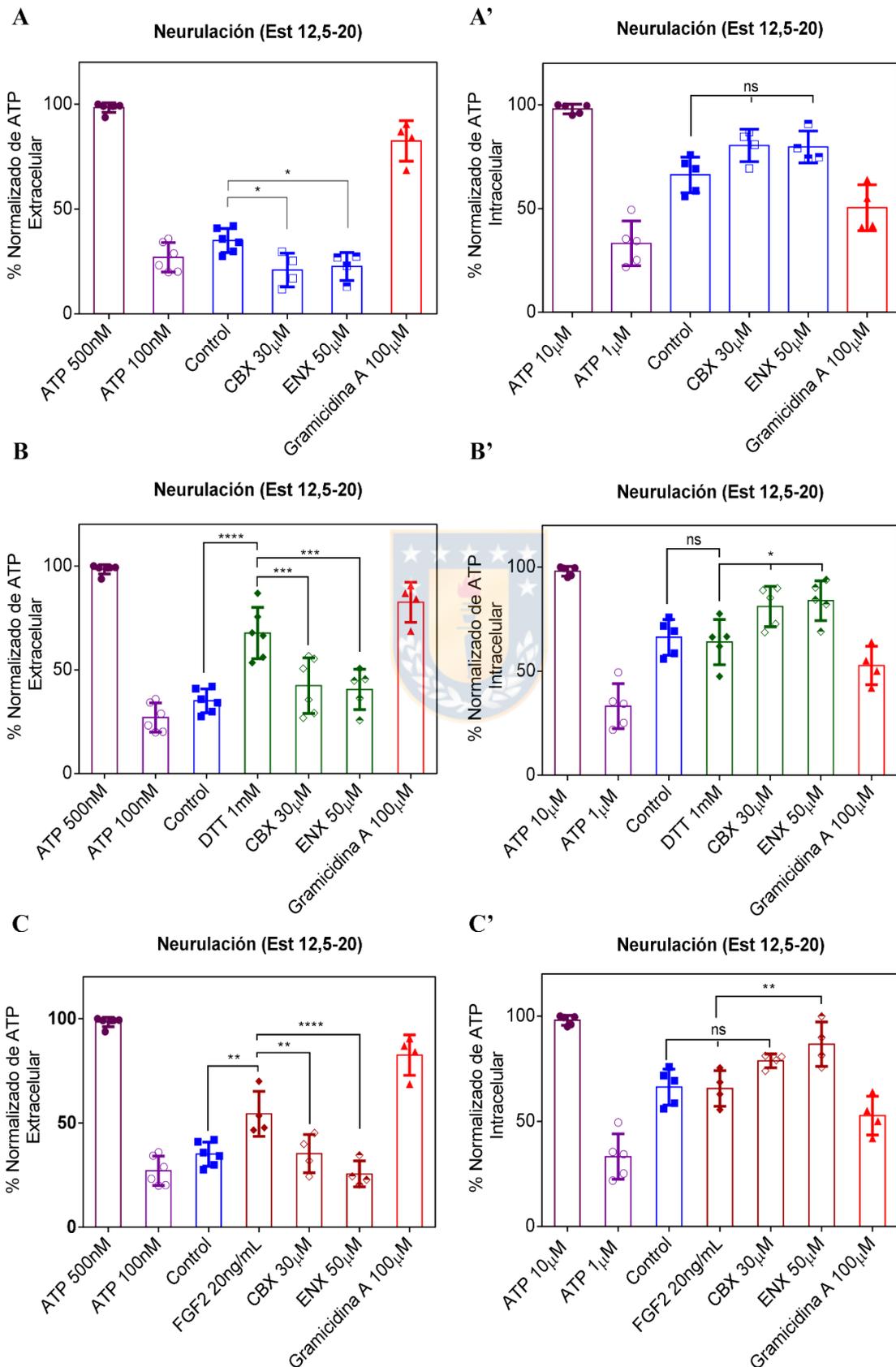
En este objetivo se pretende determinar la vía de liberación de ATP en el proceso de cierre del tubo neural, en estadios de neurula (Est 12,5-20). Para evaluar la participación de HCs-Cxs en la liberación de ATP, se cuantificó la concentración de ATP extracelular en el medio y la concentración intracelular de embriones lisados mecánicamente tratados durante 7 horas con CBX (30  $\mu$ M) y ENX (50  $\mu$ M) a través del ensayo de luciferina

luciferasa (Figura 12A). En condiciones basales, la concentración de ATP liberada al medio y normalizada a la curva de calibración fue equivalente a un 37% de la curva (~180 nM). Esta concentración se redujo a un 20% y un 23% con el tratamiento farmacológico CBX y ENX, respectivamente, mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 12A). En el tratamiento con gramicidina A, se evidenció la fuga de ATP al medio extracelular alcanzando una concentración 82%. Posteriormente, se quiso analizar si el tratamiento farmacológico generaba algún efecto *per se* en la concentración intracelular de ATP, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la concentración de ATP intracelular entre la condición control y las condiciones farmacológicas (Figura 12A').

Para dilucidar si el mecanismo que involucra la apertura de HCs-Cxs y la liberación de ATP al medio extracelular es regulada por potenciales redox intracelulares y factores mitogénicos, se utilizaron las mismas condiciones descritas anteriormente. En presencia de DTT y FGFs, la concentración de ATP liberada al medio y normalizada a la curva de calibración fue de 68% y 56%, respectivamente, comparado con el 37% de la condición control, siendo esto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) (Figura 12B-C). De manera interesante, el incremento de ATP extracelular observado en presencia de DTT y FGFs fue significativamente reducido tras el tratamiento con CBX y ENX, registrando niveles similares a la condición control (Figura 12B-C). Finalmente, se evaluó si el DTT y FGF2, generaban un efecto *per se* en la concentración intracelular de ATP (Figura 12B'-C').

En condiciones normales, la concentración de ATP intracelular y normalizada a la curva de calibración presentó un valor basal de 66%, la cual se disminuyó levemente sin presentar diferencias significativas a 61% (DTT) (Figura 12B') y 64% (FGFs) (Figura 12C'). La presencia de CBX y ENX, causó un incremento significativo sobre la

concentración de ATP intracelular, niveles entre un 75-89% (Figura 12B'-C'), presentado una correlación entre los niveles de ATP extracelular e intracelular.



**Figura 12. Liberación de ATP a través de HCs-Cxs en el proceso de neurulación en *Xenopus laevis*.**

Mediante ensayos de luminiscencia (A-A'), se cuantificó el ATP extracelular e intracelular (nM), normalizado a la curva de calibración, tratados con potenciales redox (B-B'), o factores mitogénicos (C-C'). Los resultados corresponden al menos a cuatro experimentos realizados en forma independiente (N=4), para cada condición. ANOVA de una vía, test de comparación de Bonferroni, (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ; ns= no significativo.). Las barras de error para los datos representan la desviación estándar.

Los resultados descritos demostraron que los HCs-Cxs median la liberación de ATP al espacio extracelular, la cual, es regulada por potenciales redox intracelulares o factores mitogénicos y esta liberación es reducida por bloqueadores farmacológicos, comprobando la participación funcional de HCs-Cxs, en el cierre del tubo neural y que su exposición a bloqueadores farmacológicos inducen un efecto concentración-dependiente generando DTN.

Debido a que la estructura tridimensional de la Cx46 fue determinada recientemente (2018), se desconoce con exactitud cuáles dominios le permiten establecer la unión con sus bloqueadores farmacológicos. Como se postuló en la sección 2, el siguiente paso fue elucidar las interacciones entre los HCs-Cx46 y sus bloqueadores farmacológicos, a través de herramientas *in silico*, que permiten predecir el sitio de interacción de estos bloqueadores en la estructura tridimensional de HCs-Cx46.

**Objetivo 3:** “Determinar el sitio probable de unión de inhibidores farmacológicos (carbenoxolona y enoxolona) en el hemicanal de Cx46 (GJ $\alpha$ 3), mediante estudios bioinformáticos.”

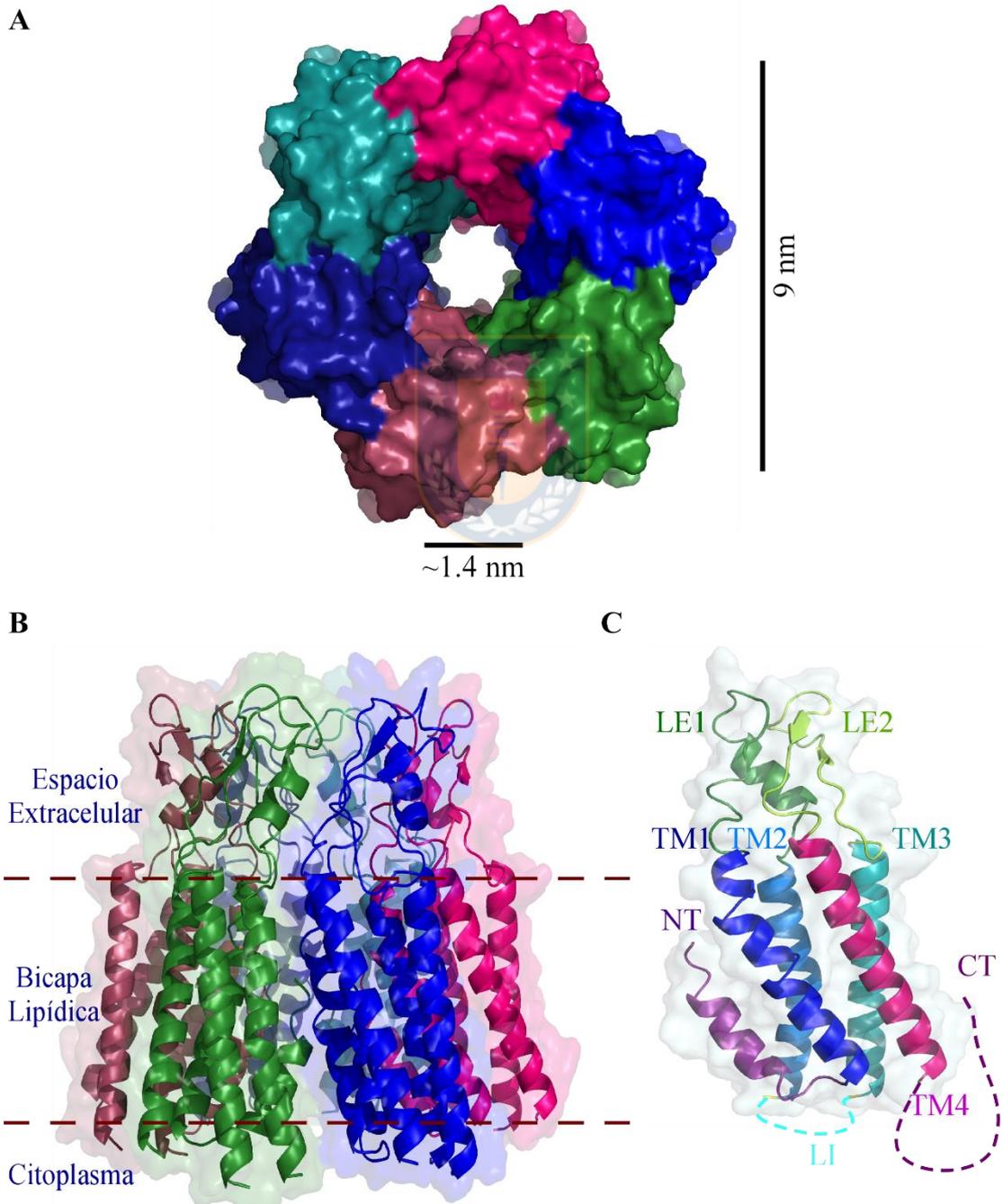
### **5. Análisis *in silico*: Estudio y análisis de posibles sitios de interacción en hemicanales de conexina 46**

El siguiente objetivo consistió en evaluar mediante herramientas *in silico* los posibles sitios de unión de CBX y ENX, en el hemicanal de la Cx46. Para evaluar la interacción de estos bloqueadores farmacológicos con los HCs-Cx46, se utilizó la estructura resuelta de esta conexina en el 2018, por Myers y colaboradores (Figura 13); las estructuras de CBX (CID: 636403) y ENX (CID: 10114) descargadas de la base de datos Pubchem.



En la determinación de la estructura cristalina de la Cx46 (gap junction) a resolución de 3.4 Å mediante criomicroscopía electrónica (CryoEM) (PDB: 6MHQ), se muestra un poro sin obstrucciones de aproximadamente 1.4 nm de diámetro a lo largo del eje del hemicanal (estado abierto) (Figura 13A). Posteriormente, esta estructura fue modificada en PyMOL versión 1.7 (DeLano, 2002), para ejemplificar la conformación de hemicanal (Figura 13B). Las moléculas de H<sub>2</sub>O que se encontraban a una distancia de 5 Å fueron eliminadas para disminuir el tamaño y evitar que moléculas extra enmascaren las simulaciones de docking molecular. Los hidrógenos, puentes disulfuro y cadenas laterales faltantes en la estructura fueron agregados y modelados en Maestro (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016). Igualmente, los valores de pKa de los grupos ionizables a pH fisiológico fueron incorporados mediante el programa PROPKA versión 3.1 usando Maestro Protein Preparation Wizard (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016).

En la figura 13C, se esquematiza un monómero conformado por 4 hélices alfa antiparalelas (TM1-TM4), 2 loops extracelulares (LE1-LE2), 1 loop intracelular (LI), un dominio N-terminal helicoidal (NT) y un dominio C-terminal (CT); el TM1, TM2 y LE1 se localizan en el poro, el TM3, TM4 y LE2 están situados en la membrana lipídica y en el medio extracelular, respectivamente. El NT se pliega en el vestíbulo citoplasmático cubriendo parte del TM1 y TM2 (Myers, Haddad et al. 2018).



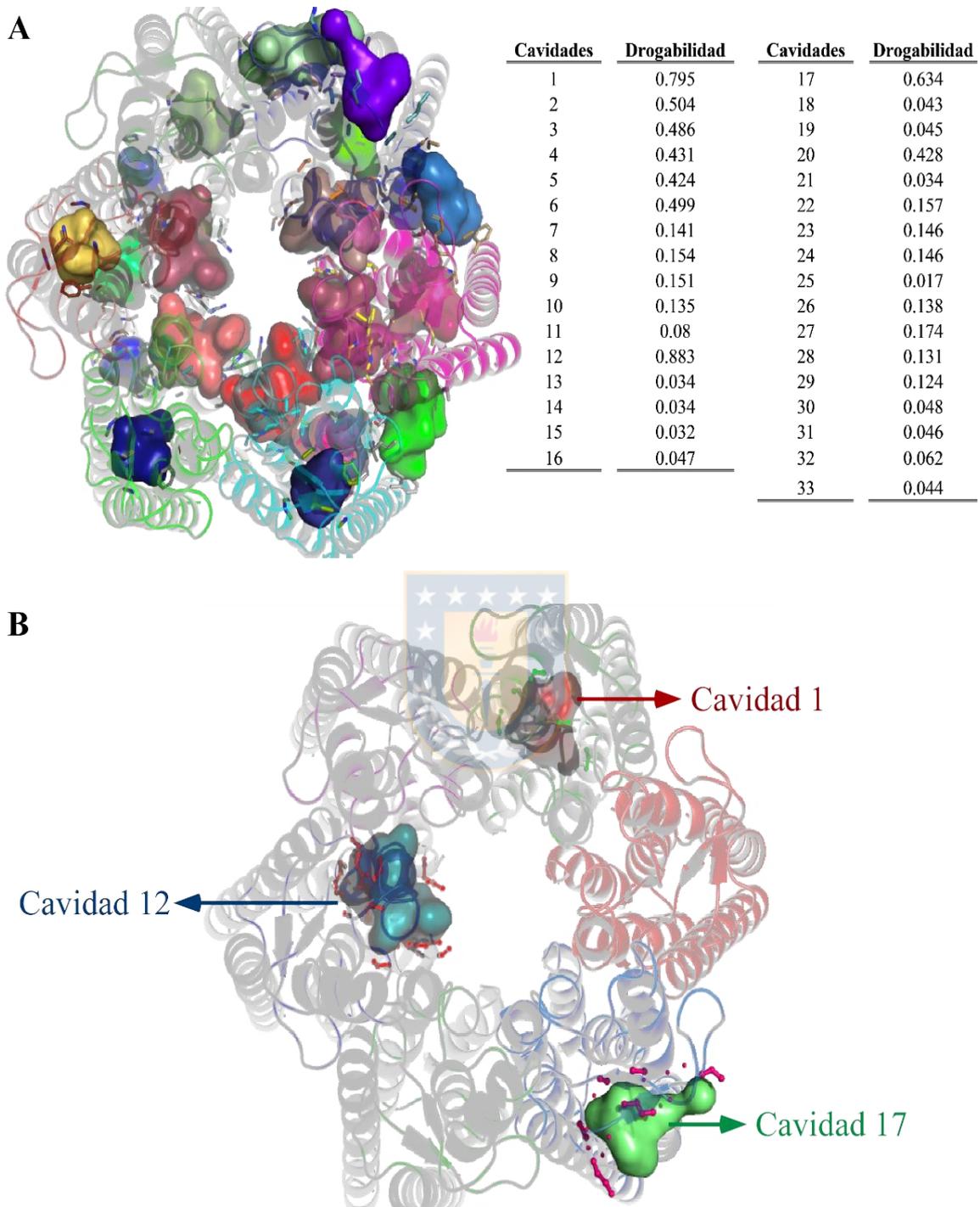
### **Figura 13. Representación esquematizada de hemicanales de conexina 46.**

A. Hemicanal visualizado en un giro de 90° (eje x), poro de ~ 1.4 nm de diámetro. Tamaño del hemicanal 9 nm. B. Representación obtenida en PyMOL, estructura secundaria del hemicanal, compuesto por la disposición hexamérica de protómeros de Cx46. Los LE1/2 generan sitios de acoplamiento, para formar el canal (gap junction), estableciendo un poro de canal continuo de ~ 1.4 nm de diámetro que conecta el citoplasma de las células adyacentes. C. Monómero Cx46, con dominios etiquetados: dominios transmembrana (TM1-TM4), dominios extracelulares (LE1-LE2), dominio N-terminal (NT). El loop intracelular (LI) y el dominio C-terminal (CT) no fueron visualizados por CryoEM (líneas puntuadas).

Un bolsillo es una cavidad presente en la estructura de una proteína, que presenta propiedades como polaridad y volumen que lo hacen apto para que una molécula pequeña pueda unirse y modular su funcionalidad. Una vez ejemplificada la estructura de HCs-Cx46, el siguiente paso fue identificar los posibles bolsillos o cavidades de unión de ligandos empleando dos aproximaciones complementarias. La primera aproximación, fue el estudio de la estructura de HCs-Cx46 empleando Fpocket (Figura 14). Este programa se basa en la geometría (teselación de Voronoi). La teselación de una superficie es una subdivisión en figuras geométricas (polígonos), sin superposición ni espacios vacíos (Le Guilloux et al., 2009; Schmidtke, Le Guilloux, Maupetit, & Tuffery, 2010).

Fpocket clasifica las cavidades de acuerdo con su puntaje de drogabilidad, este puntaje determina la capacidad de los bolsillos de formar enlaces con fármacos y los valores se registran en un intervalo de 0 (no-drogable) a 1 (altamente drogable). En la figura 14A, se muestra la identificación de 33 bolsillos, de los cuales 9 presentaron una puntuación igual o superior a 0.4 y 3 de ellos una puntuación superior a 0.6; cavidad 1 = 0.795, cavidad 12 = 0.883 y cavidad 17 = 0.634 (Figura 14B), por esta razón se decidió trabajar

con los tres bolsillos con mayor puntuación de drogabilidad para realizar las simulaciones de docking molecular.



**Figura 14. Cavidades identificadas en el hemicanal de la conexina 46. Hemicanal visualizado en un giro de 90° (eje x).**

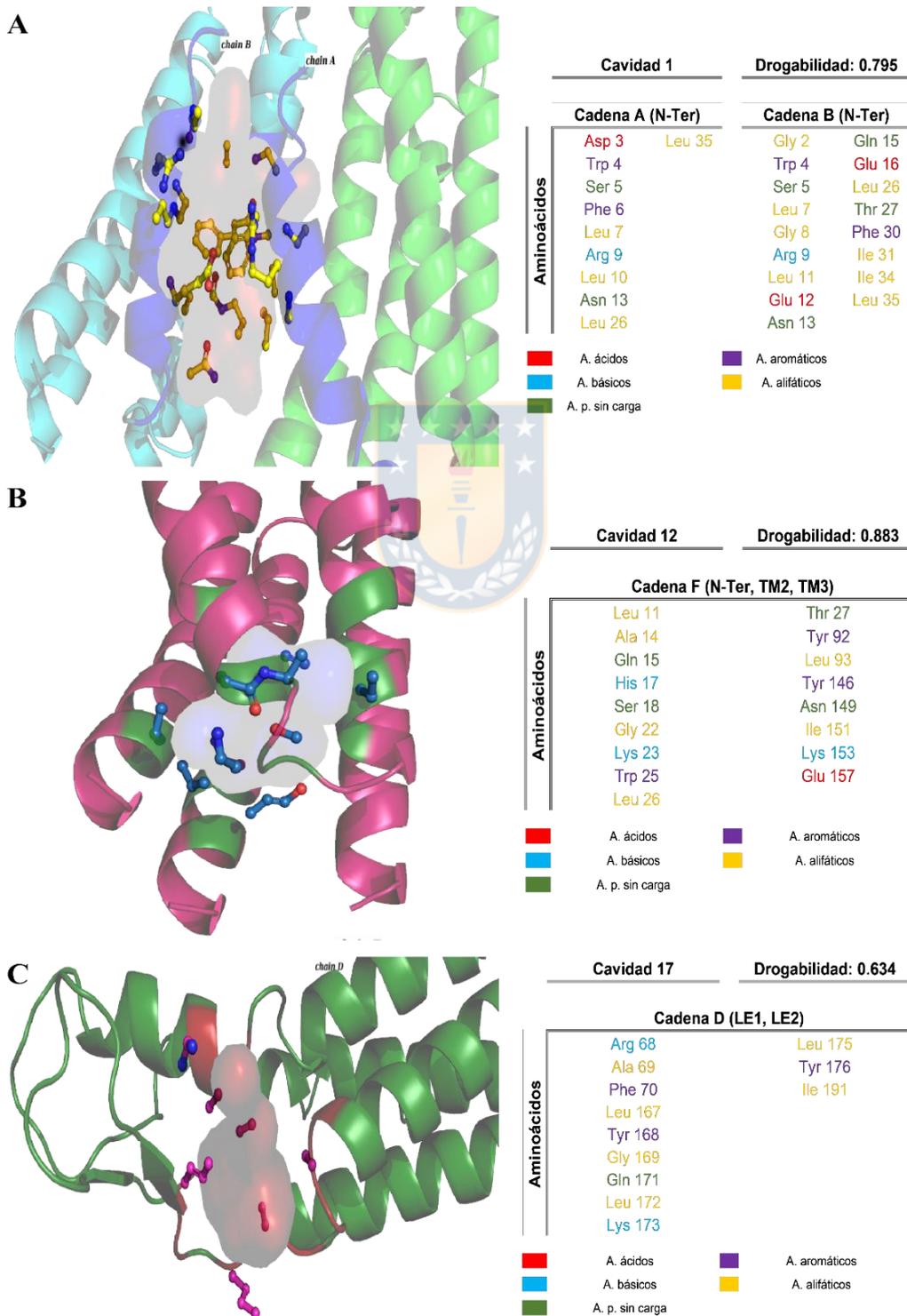
A. Estructura de HC-Cx46 representando las 33 cavidades encontradas a través de Fpocket, tabla de puntuación de drogabilidad intervalo 0-1. B. Estructura DE HC-Cx46

representando las tres mejores cavidades; cavidad 1 = 0.795, cavidad 12 = 0.883 y cavidad 17 = 0.634 cálculo realizado con Fpocket.

En la figura 15, se describe las cavidades con mejor puntuación de drogabilidad detallando residuos aminoácidos, cadenas y dominios de interacción. La cavidad 1 se encuentra formada entre dos cadenas (cadena A-B), en el dominio NT y los residuos aminoácidos que forma la cavidad en la cadena A son Asp3, Trp4, Ser5, Phe6, Leu7, Arg9, Leu10, Asn13, Leu26 y Leu35; en la cadena B Gly2, Trp4, Ser5, Leu7, Gly8, Arg9, Leu11, Glu12, Asn13, Gln15, Glu16, Leu26, Thr27, Phe30, Ile31, Ile34 y Leu35 (Figura 15A). La cavidad 12, aparece como el bolsillo mejor puntuado (drogabilidad = 0.883), de las 33 cavidades. Los residuos que forman esta cavidad son Leu11, Ala14, Gln15, His17, Ser18, Gly22, Lys23, Trp25, Leu26, Thr27, Tyr92, Leu93, Tyr146, Asn149, Ile151, Lys153 y Glu157, estos residuos conforman el dominio NT, TM2 y TM3 (Figura 15B). Los residuos encontrados en la cavidad 1 y 12 forman parte de la región NT. El NT de los HCs-Cx46 se pliegan en el vestíbulo citoplasmático, donde forman un sitio de constricción, y están bien posicionados para funcionar como un filtro de selectividad o dominio de activación que es común en todas las isoformas de conexinas (Beyer et al., 2012; Myers et al., 2018), razón por la cual, estos bolsillos se identificaron como sitios “expuestos” de unión de CBX/ENX.

El bolsillo 17 corresponde a una cavidad formada por los residuos Arg68, Ala69, Phe70, Leu167, Tyr168, Gly169, Gln171, Leu172, Lys173, Leu175, Tyr176 y Ile191. En este caso en particular, estos residuos están localizados en los dominios LE1-LE2 de la cadena C del HC-Cx46 (Figura 15C), los cuales se sitúan en la interfaz de acoplamiento para formar el canal (gap junction) (Bai & Wang, 2014; Bai et al., 2018; Myers et al., 2018).

A partir de esta información, se decidió generar la segunda aproximación, la cual consistió en estudiar los residuos de interacción de cada cavidad con los bloqueadores farmacológicos (CBX/ENX), utilizando los programas AutoDock Vina versión 1.5.0 (Trott & Olson, 2010) y Glide Maestro (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016).



### **Figura 15. Cavidades con mayor puntuación de drogabilidad.**

A-C. Estructura de cadenas de Cx46 representando las tres mejores cavidades encontradas mediante Fpocket. Tabla resumen, detallando puntuación de drogabilidad, residuos aminoácidos, cadenas y dominios. Los residuos están etiquetados de acuerdo con las características de carga de cada aminoácido (rojo, negativo; azul claro, positivo; verde oscuro, polar sin carga; morado, apolar aromático; amarillo, apolar alifático).

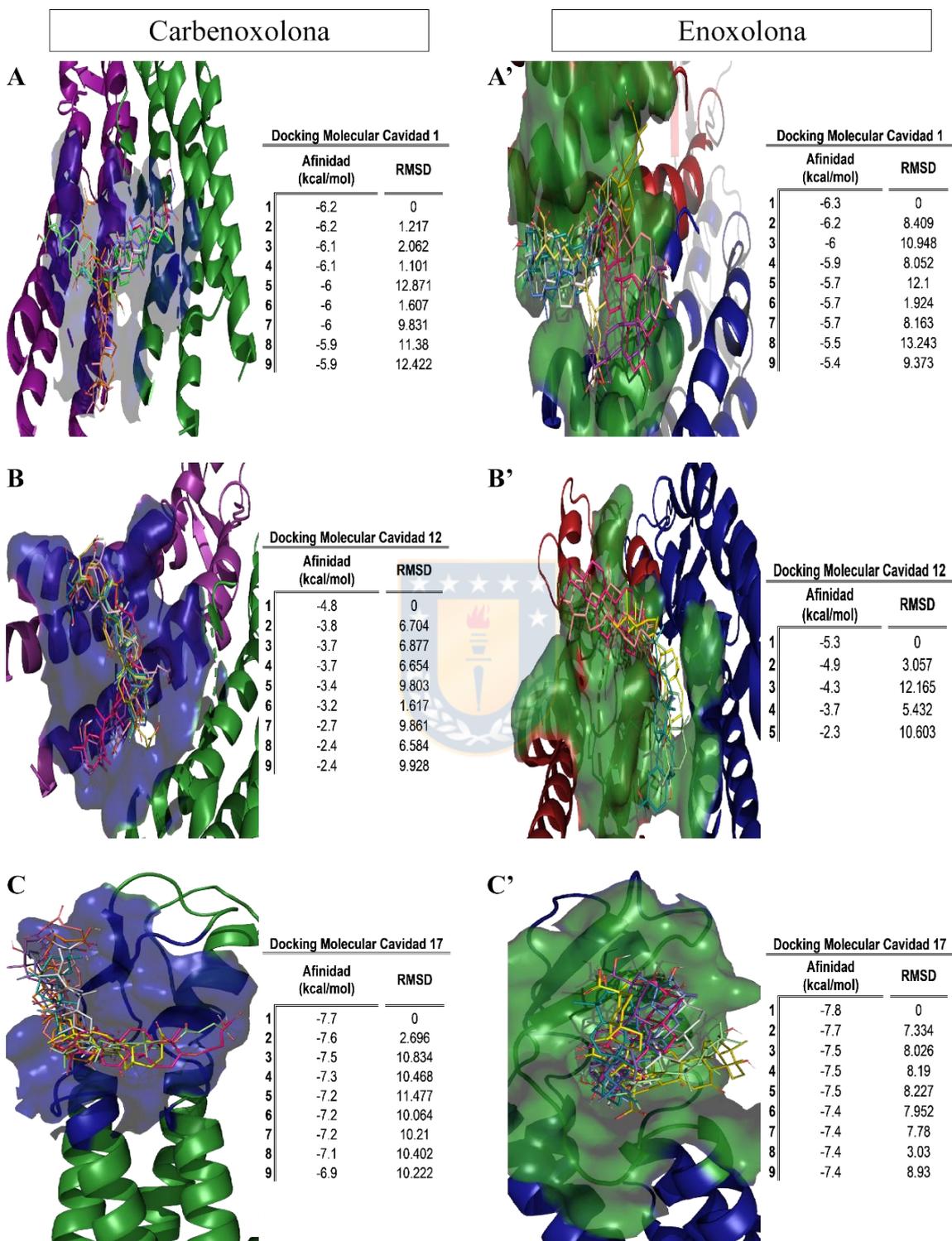
## **6. Análisis *in silico*: Simulaciones de Docking Molecular, interacciones de hemicanales conexina 46 con Carbenoxolona/Enoxolona**

Las simulaciones de docking molecular abarcan dos etapas principales, una de búsqueda y otra de evaluación. La primera etapa se refiere a la exploración del espacio rotacional y traslacional de dimensiones (conocido como grilla o malla) en el receptor (proteína) que es accesible para el ligando, buscando la orientación y conformación que corresponda al mínimo global de energía libre de unión. La siguiente etapa, determina la función de puntuación (scoring) con la que se evalúa la energía de unión de interacción proteína-ligando (Yuriev et al., 2011).

Con el objetivo de identificar el sitio de unión más probable y la conformación más estable con que CBX y ENX, se unen a los HCs-Cx46 en los dominios identificados por Fpocket, se realizaron estudios de acoplamiento molecular (Docking), utilizando los programa AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010) y Glide Maestro (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016), sobre la estructura del HC-Cx46, centrando la búsqueda en las cavidades 1, 12 y 17 descritas anteriormente (Figura 15).

En AutoDock Vina, se obtuvieron nueve conformaciones posibles clasificadas según la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) y su puntuación de energía de unión

(Kcal/mol). En la Figura 16, se muestra una descripción en 3D de las conformaciones moleculares de CBX y ENX.



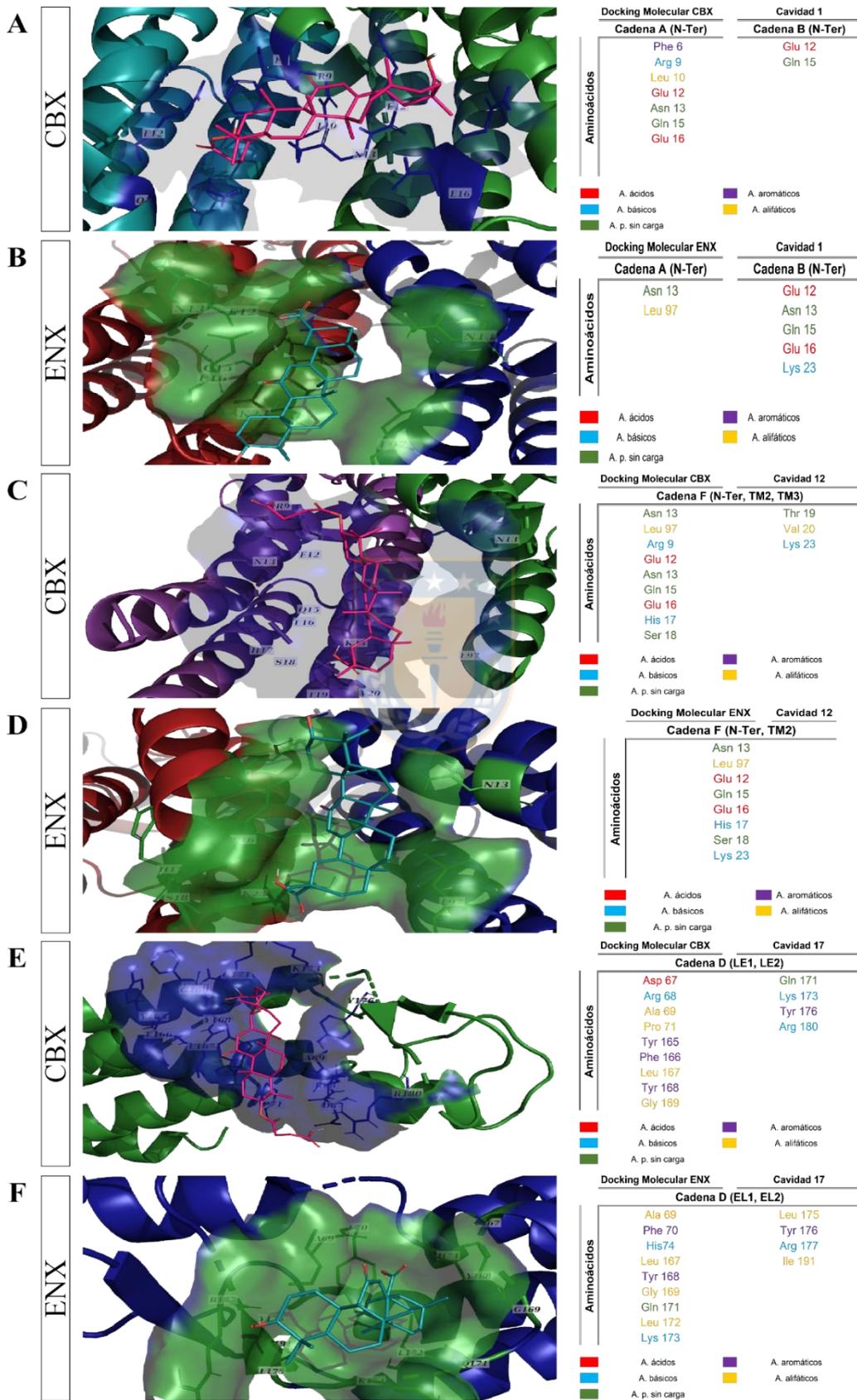
**Figura 16. Conformaciones de docking molecular y resultados de energía de unión de CBX y ENX en los HCs-Cx46.**

A-C. Se muestra el resultado del primer acoplamiento molecular de CBX en el HC-Cx46. El primer panel presenta los nueve resultados de la simulación de acoplamiento molecular sobrepuestos, mostrando la convergencia de los resultados mediante la formación de un solo clúster de conformaciones en el sitio de unión. Tabla resumen, detallando puntuación de acoplamiento y RMSD de CBX. A'-C'. Acoplamiento molecular de ENX en el HC-Cx 46, mostrando las nueve conformaciones superpuestas, formando un clúster en el sitio de unión. Tabla resumen, detallando puntuación de acoplamiento y RMSD de ENX.

Los resultados entre los HCs-Cx46 y los bloqueadores farmacológicos, se agruparon en orientaciones y conformaciones diferentes, mostrando las tres cavidades a valorar. En la figura 16 A-A', se observa las orientaciones adquiridas por CBX (Figura 16A) y por ENX (Figura 16A'), donde se evidencia la interacción de éstas, con los dominios NT de dos de las cadenas del HC-Cx46, cada grupo presentó un intervalo de energía de unión entre -5.9 - -6.2 Kcal/mol (CBX) y -5.4 - -6.3 Kcal/mol (ENX).

Por otra parte, el grupo de conformaciones encontradas en la cavidad 12 (Figura 16B-B'), presentaron energías de unión de -2.4 - -4.8 Kcal/mol para CBX y -2.3 - -5.3 Kcal/mol para ENX, la energía de unión al ser negativa indica un acoplamiento energéticamente favorable entre el ligando y la proteína. Cabe mencionar que, un valor de energía libre de unión más negativo es indicativo de una unión más favorable entre el ligando y la proteína (Yuriev et al., 2011), lo que sugiere que la cavidad 1, es energéticamente más favorable para interactuar con CBX y ENX que la cavidad 12. Asimismo, en el grupo de conformaciones de la cavidad 17 (Figura 16C-C'), se observa un valor de energía libre de unión entre -6.9 - -7.7 Kcal/mol (CBX) y -7.4 - -7.8 Kcal/mol (ENX), indicativo de una unión favorable entre éstos bloqueadores farmacológicos y los dominios extracelulares (LE1-LE2) del HC-Cx46. Una vez obtenidos los rangos de energía de unión de cada cavidad con CBX y ENX, se seleccionó la conformación y orientación con mejor puntuación de acoplamiento (RMSD = 0) y menor energía de unión de cada cavidad para

determinar los residuos aminoacídicos involucrados en la interacción entre el HC-Cx46 con CBX y ENX.



**Figura 17. Conformaciones con mejor puntuación de acoplamiento molecular y aminoácidos involucrados de HC-Cx46 con carbenoxolona y enoxolona.**

A-F. Determinación del sitio de interacción de CBX y ENX en HCs-Cx46, sitios determinados por medio del programa AutoDock Vina; tablas resumen de los residuos aminoacídicos involucrados en la interacción HC-Cx46/CBX (A, C, E) y HC-Cx46/ENX (B, D, F). Interacciones con mejor puntuación de energía de unión (-6,2 Kcal/mol (cavidad 1); -4.8 Kcal/mol (cavidad 12); -7.7 Kcal/mol (cavidad 17) CBX) (-6.3 Kcal/mol (cavidad 1); -5.3 Kcal/mol (cavidad 12); -7.8 Kcal/mol (cavidad 17) ENX). En azul (CBX) y verde (ENX), se observan las regiones identificadas como adecuadas para el acoplamiento de los bloqueadores farmacológicos en los HCs-Cx46.

En la figura 17, se observan los complejos (HC-Cx46/CBX y HC-Cx46/ENX) que presentaron la energía y orientación más estable. Una vez obtenidos los complejos, se procede a evaluar los residuos que se encuentran interactuando con éstos bloqueadores farmacológicos. El complejo HC-Cx46/CBX de la cavidad 1 (Figura 17A), mantiene interacciones con Phe6, Arg9, Leu10, Glu12, Asn13, Gln15 y Glu16 de la cadena A; con Glu12 y Gln15 de la cadena B, con una energía de unión de -6.2 Kcal/mol. Por otro lado, el complejo HC-Cx46/ENX (Figura 17B), presentó interacciones con Asn13 y Leu97 de la cadena A y con Glu12, Asn13, Gln15, Glu16 y Lys23 de la cadena B, con una energía de unión de -6.3 Kcal/mol.

Con relación al acoplamiento en la cavidad 12 entre HC-Cx46/CBX (Figura 17C), se determinó la presencia de interacciones con Asn13, Leu97, Arg9, Glu12, Gln15, Glu16, His17, Ser18, Thr19, Val20 y Lys23, con una energía de unión de -4.8 Kcal/mol. Para el complejo HC-Cx46/ENX (Figura 17D), se encontraron interacciones con los residuos aminoacídicos Asn13, Leu97, Glu12, Gln15, Glu16, His17, Ser18 y Lys23, con una energía de unión de -5.3 Kcal/mol. En relación con estos resultados, se puede deducir que, las cavidades 1 y 12, se sitúan en la región NT y presentan similitudes en el

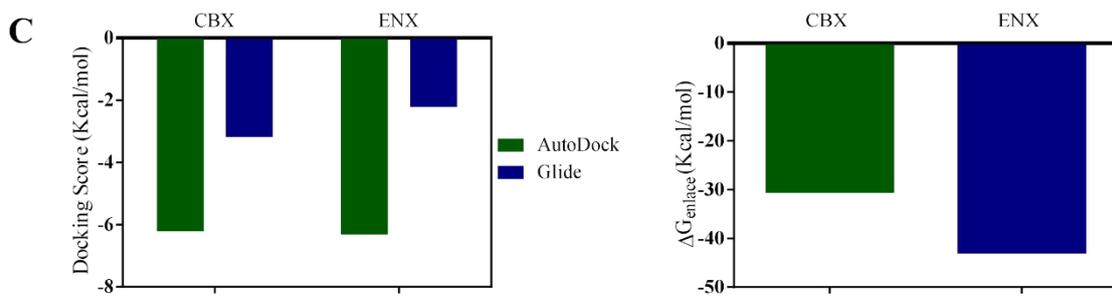
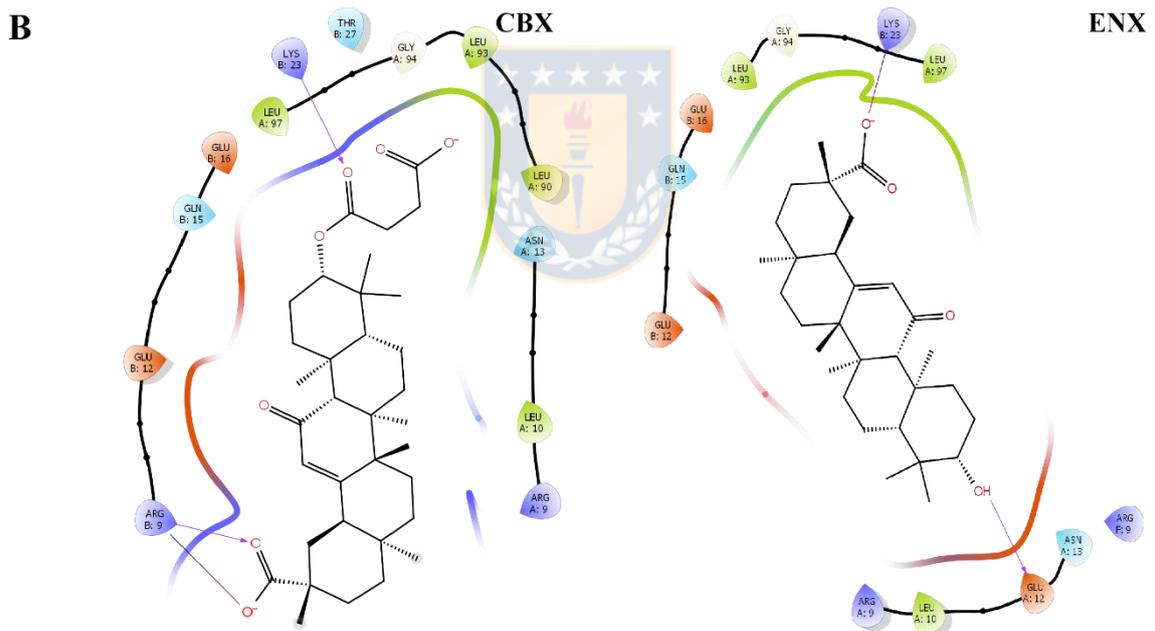
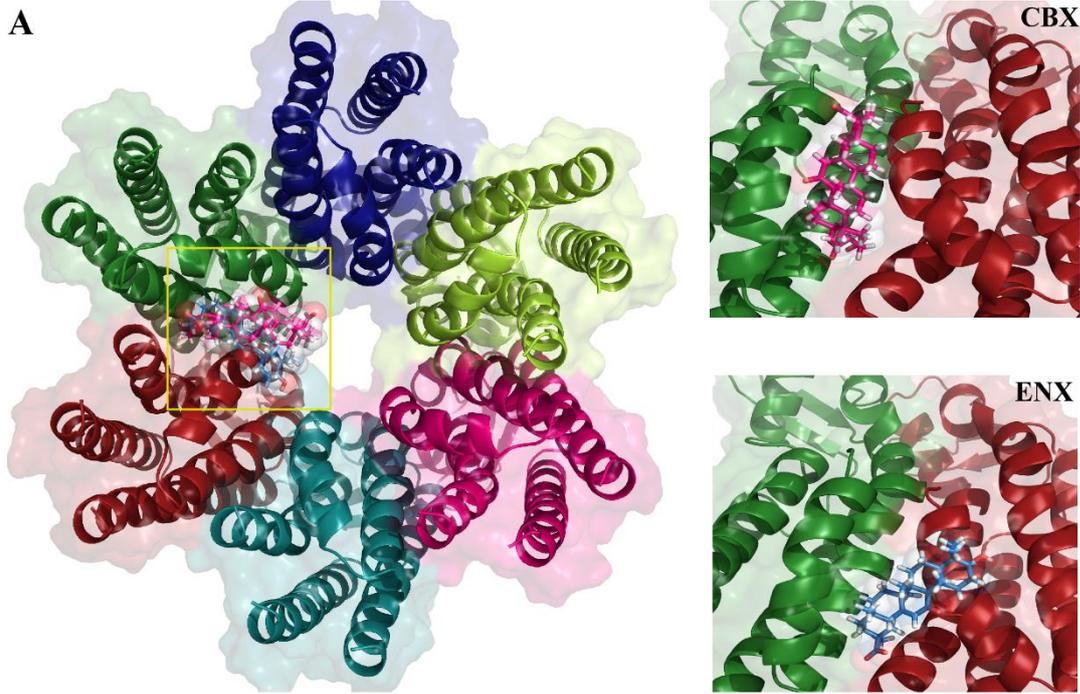
acoplamiento molecular. En la interfaz HC-Cx46/CBX se presenta similitud en la interacción con Arg9, Leu10, Glu12, Asn13, Gln15 y Glu16. En tanto, en la interfaz HC-Cx46/ENX, se encontró similitud en la interacción con Glu12, Asn13, Gln15, Glu16, Lys23 y Leu97. Finalmente, en la cavidad 17 el complejo HC-Cx46/CBX (Figura 17E), presentó interacciones en los residuos Asp67, Arg68, Ala69, Pro71, Tyr165, Phe166, Leu167, Tyr168, Gly169, Gln171, Lys173, Tyr176 y Arg180, con una energía de unión de -7.7 Kcal/mol y el complejo HC-Cx46/ENX (Figura 17F), mantiene interacciones con Ala69, Phe70, His74, Leu167, Tyr168, Gly169, Gln171, Leu173, Lys173, Leu175, Tyr176, Arg177 e Ile191.

Para evaluar la exactitud del protocolo de acoplamiento molecular de las conformaciones resueltas por AutoDock Vina, se realizó una evaluación de los complejos en el programa Maestro (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016). Para ello, el modelo del HC-Cx46 se optimizó geoméricamente por gradiente con el campo de fuerza OPLS\_2005 por medio del programa Macromodel (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016) a fin de calcular su calidad absoluta estimada después de la minimización energética (Figura 18, 19 y 20). Posteriormente, se realizaron acoplamientos dirigidos a las cavidades con Glide (Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2016) utilizando una cuadrícula “grilla” centrada en los aminoácidos que forman los bolsillos definidos en Fpocket y una configuración de precisión extra (XP). Una vez obtenidos los complejos óptimos, se procede a validar los residuos aminoacídicos que se encuentran interactuando y los tipos de enlace que forman. Para ello se utilizó el programa ligand interaction diagram (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016), que realiza la evaluación 2D del complejo.

La metodología de docking utilizada ha mantenido la estructura del HC-Cx46 rígida y las estructuras de CBX y ENX flexibles para el cálculo. La flexibilidad y el movimiento del

HC-Cx46, y los posibles cambios conformacionales que se puedan producir por la unión de los bloqueadores farmacológicos en las cavidades no pueden ser descritos en detalle a través de docking molecular, por lo que para discriminar cuál es el modo de unión más estable y cuál es la cavidad encargada de modular dicha interacción, se calculó un  $\Delta G$  de enlace teórico a través del cálculo de energía MM-GBSA utilizando Prime (Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2016) (Figura 18, 19 y 20).

El análisis de acoplamiento con Glide en el sitio 1 (Figura 18A) reveló que CBX y ENX se unen de manera preferente a residuos aminoacídicos polares que conforman los dominios NT de dos de las cadenas que forman el hemicanal, con ligeras diferencias en la orientación espacial predicha por AutoDock Vina (Figura 17A-B), alcanzando una puntuación de acoplamiento de -3.16 y -2.2 Kcal/mol, respectivamente. La interfaz HC-Cx46/CBX mostró la formación de dos puentes de H con los aminoácidos Arg9 (+) y Lys23 (+) y una interacción de puente salino con Arg9 (+) (Figura 18B, primer panel), dichas interacciones contribuyen a la estabilización del complejo, alcanzando un  $\Delta G$  de enlace igual a -30.61 Kcal/mol (Figura 18C). Por otro lado, la interacción HC-Cx46/ENX en el sitio 1, mostró la presencia de un puente de H con Glu12 (-) y un puente salino con Lys23 (+) (Figura 18B, segundo panel), interacciones que estabilizan el complejo, puntuando un  $\Delta G$  de -43.05.61 kcal/mol (Figura 18C), las puntuaciones de acoplamiento (Docking Score), muestran diferencias en el cálculo predicho por AutoDock Vina y el generado por Glide (Figura 18C), pero la energía de unión sigue siendo negativa, lo cual indica un acoplamiento energéticamente favorable entre CBX/ENX y los HCs-Cx46.

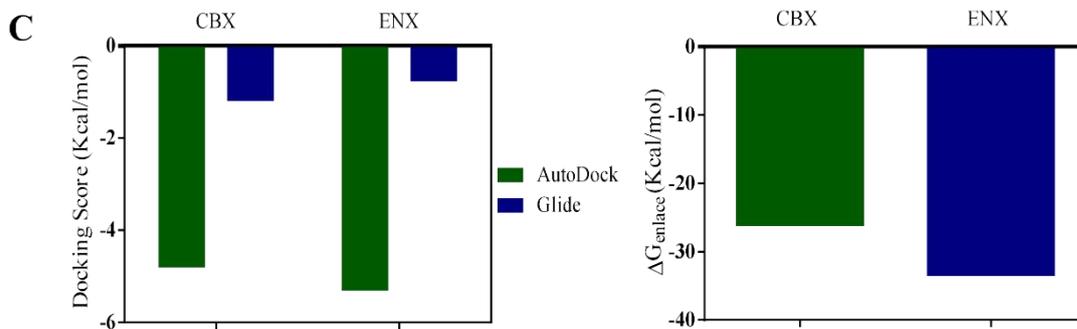
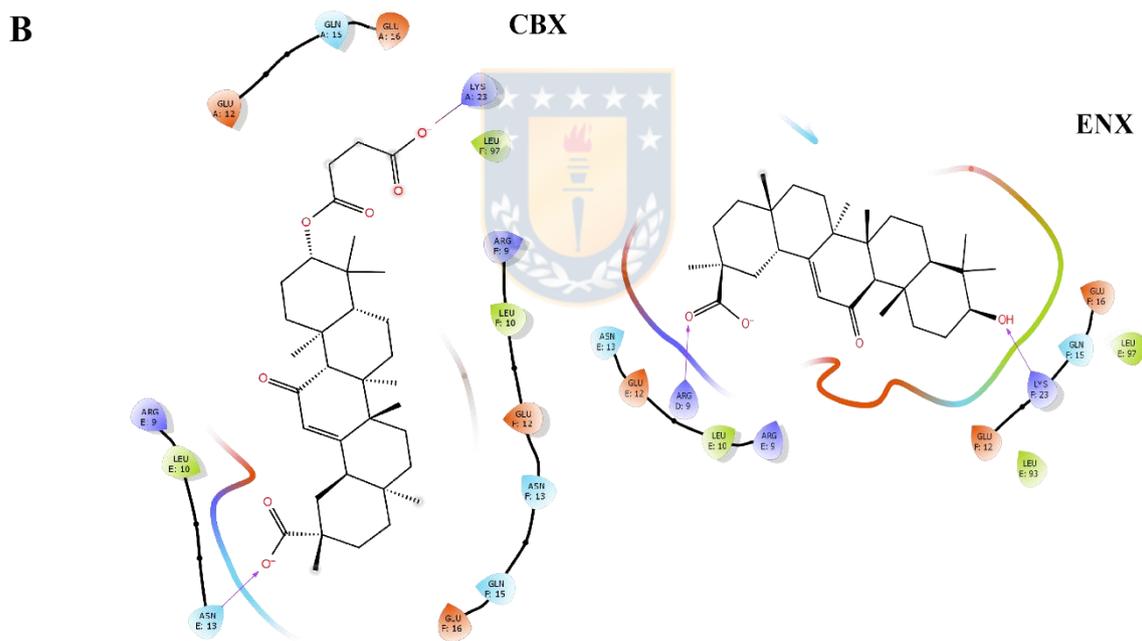
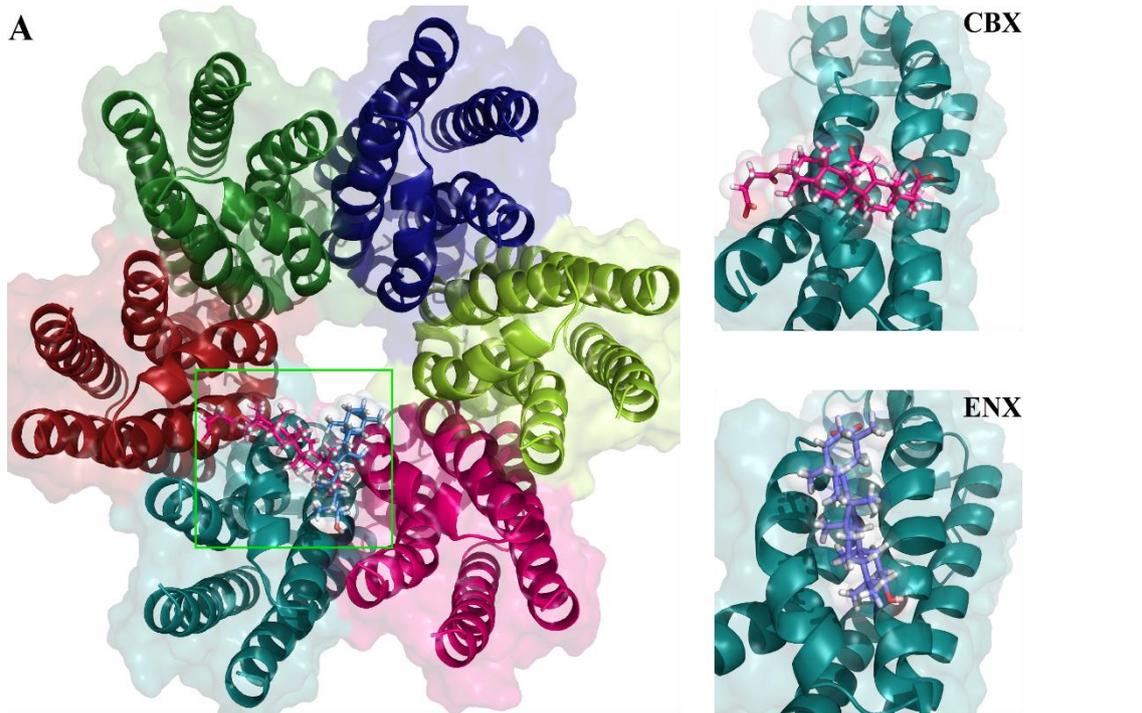


**Figura 18. Acoplamiento molecular de CBX y ENX en la estructura de HCs-Cx46 (Sitio 1).**

A. Interacción representativa entre HCs-Cx46, CBX (magenta) y ENX (azul celeste). Todas las cadenas son idénticas, cada monómero está representado con un color diferente para facilitar la identificación de las regiones entre subunidades. Comparación de acoplamiento de CBX/ENX en los dominios NT de HCs-Cx46 predicho por Glide. B. Diagrama 2D de las interacciones identificadas para HCs-Cx46. Se muestra de forma esquemática los residuos del sitio de unión a CBX y ENX que interactúan con el NT del HC-Cx46, coloreados según sus propiedades fisicoquímicas. Las flechas indican la direccionalidad del enlace de hidrógeno (puente de hidrógeno) y la línea degradada (puente salino). C. Gráficos de las puntuaciones de acoplamiento y  $\Delta G$  de enlace teórico entre la interacción de CBX/ENX con HCs-Cx46.

De acuerdo con los resultados anteriores CBX y ENX son capaces de alojarse en un entorno electrostático y los aminoácidos que interactúan con estos bloqueadores farmacológicos siguen presentes en la cavidad 1 descrita por Fpocket (Figura 18B). Además, es importante destacar que CBX forma más interacciones con el HC-Cx46 en comparación con ENX.

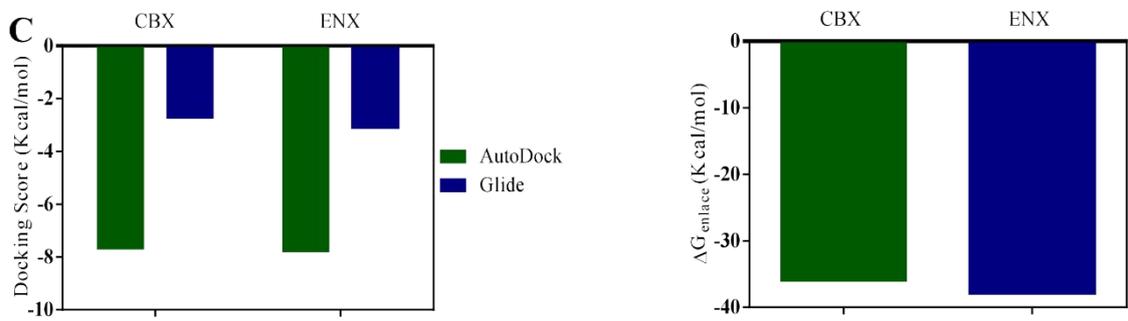
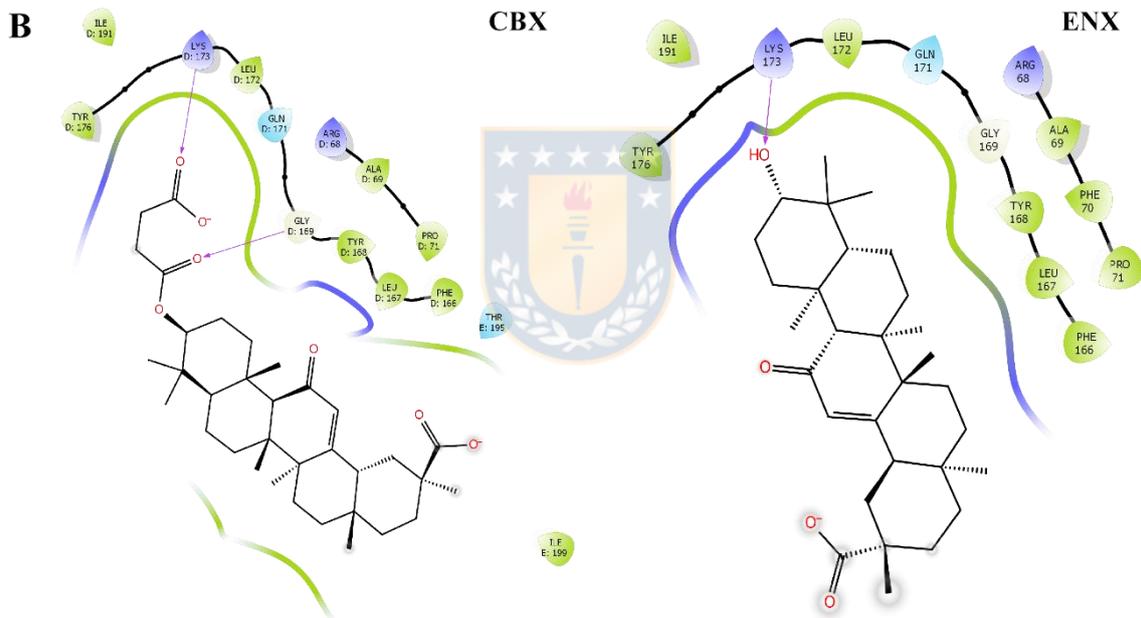
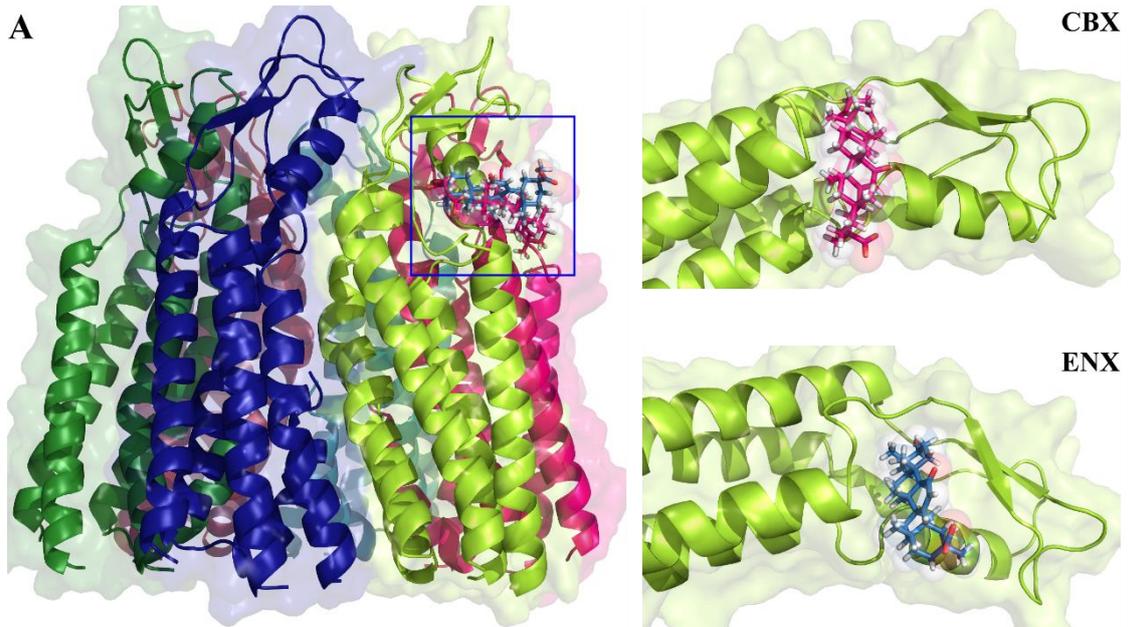
En cuanto al sitio 2 (Figura 19A) CBX y ENX adoptan una conformación diferente a la definida con AutoDock Vina (Figura 17C-D) alcanzando una puntuación de acoplamiento de -1.19 y -0.76 Kcal/mol, respectivamente. El acoplamiento entre HC-Cx46 y CBX mostró la presencia de interacciones con Asn13 (polar, sin carga) formando un puente de H y con Lys23 (+) formando un puente salino (Figura 19B, primer panel), estas interacciones estabilizan el complejo, alcanzando una puntuación de  $\Delta G$  igual a -26.2 Kcal/mol (Figura 19C). En la interfaz HC-Cx46/ENX, también se encontró interacciones de puente de H con Arg9 (+) y Lys23 (+) (Figura 19B), interacciones que contribuyen a la estabilización del complejo, generando un  $\Delta G$  de -33.5 Kcal/mol (Figura 19C).



**Figura 19. Acoplamiento molecular de CBX y ENX en la estructura de HCs-Cx46 (Sitio 2).**

A. Interacción representativa entre HCs-Cx46, CBX (magenta) y ENX (azul celeste). Todas las cadenas son idénticas, cada monómero está representado con un color diferente para facilitar la identificación de las regiones entre subunidades. Comparación de acoplamiento de CBX/ENX en el NT de HCs-Cx46 predicho por Glide. B. Diagrama 2D de las interacciones identificadas para HCs-Cx46. Se muestra de forma esquemática los residuos del sitio de unión a CBX y ENX que interactúan con el NT del HC-Cx46, coloreados según sus propiedades fisicoquímicas. Las flechas indican la direccionalidad del enlace de hidrógeno (puente de hidrógeno) y la línea degradada (puente salino). C. Gráficos de las puntuaciones de acoplamiento y enlace  $\Delta G$  teórico de la interacción de CBX y ENX con HCs-Cx46.

El sitio 2, está clasificado como la mejor cavidad (drogabilidad=0.883). Por medio de Glide se logró comprobar que, el sitio 1 y 2 forman una única cavidad, aun cuando el programa Fpocket resolviera el sitio 2 (cavidad 12) como una cavidad diferente al sitio 1 (cavidad 1). En resumen, el sitio se encuentra formado por Arg9, Leu10, Glu12, Asn13, Gln15, Glu16, Ly23, Leu90, Leu93 y Leu97 de los dominios NT y TM2 del HC-Cx46 (Figura 18-19). Es importante mencionar que, la región NT presenta aminoácidos conservados en las diferentes isoformas de las Cxs (Bai, 2016; Beyer et al., 2012; Myers et al., 2018), lo que posiblemente explicaría que estos bloqueadores, modulen la actividad de éstas en su conformación gap junction y hemicanal.



**Figura 20. Acoplamiento molecular de CBX y ENX en la estructura de HCs-Cx46 (Sitio 3).**

A. Interacción representativa entre HCs-Cx46, CBX (magenta) y ENX (azul celeste). Todas las cadenas son idénticas, cada monómero esta con un color diferente para facilitar la identificación de las regiones entre subunidades. Comparación de acoplamiento de CBX/ENX en los dominios LE1-LE2 de HCs-Cx46 predicho por Glide. B. Diagrama 2D de las interacciones identificadas para HCs-Cx46. Se muestra de forma esquemática los residuos del sitio de unión a CBX y ENX que interactúan con los LE1/LE2 del HC-Cx46, coloreados según sus propiedades fisicoquímicas. Las flechas indican la direccionalidad del enlace de hidrógeno (puente de hidrógeno) y la línea degradada (puente salino). C. Gráficos de las puntuaciones de acoplamiento y enlace  $\Delta G$  teórico de la interacción de CBX y ENX con HCs-Cx46.

En el caso de acoplamiento con Glide para el sitio 3 (Figura 20A), se encontró que CBX y ENX se unen a residuos aminoacídicos que conforman el dominio LE2, y adquieren una orientación similar a la predicha por AutoDock Vina (Figura 17E-F), alcanzando una puntuación de acoplamiento de -2.75 (CBX) y -3.11 (ENX) Kcal/mol. Las moléculas de CBX y ENX se mantienen en una cavidad compuesta principalmente por aminoácidos hidrofóbicos y polares ubicados en el LE2. La interacción HC-Cx46/CBX mostró la formación de dos puentes de H con los aminoácidos Gly169 y Lys173 (+) (Figura 20B, primer panel), dichas interacciones estabilizan el complejo, alcanzando un  $\Delta G$  de enlace igual a -36.09 Kcal/mol (Figura 20C). Por último, la interacción HC-Cx46/ENX, mostró la presencia de un puente de H con el residuo aminoacídico Lys173 (+) (Figura 20B, segundo panel), interacción que estabilizó el complejo, puntuando un  $\Delta G$  de -38 Kcal/mol (Figura 20C), las puntuaciones de acoplamiento (Docking Score), muestran diferencias en el cálculo predicho por AutoDock Vina (Figura 20C, primer panel), mostrando una energía de unión más favorable para ENX. Los loops extracelulares de las conexinas han sido descritos como dominios altamente conservados que forman parte del mecanismo de

acoplamiento para la formación de gap junction funcionales, en particular el LE2 es crucial para la especificidad de acoplamiento cuando se forma el canal (gap junction) (Bai et al., 2018; Koval et al., 2014), el cual se podría ver afectado por las interacciones formadas con CBX y ENX. Sin embargo, estos análisis no son suficientes para discriminar cuál de los dos sitios modula el acoplamiento de CBX y ENX o si estos actúan sinérgicamente. Para determinar si las interacciones identificadas se mantienen en el tiempo es necesario realizar estudios de dinámica molecular y de esta forma dilucidar la modulación y estabilidad de los complejos en el tiempo establecidos en el docking molecular entre los HCs-Cx46 y CBX/ENX en los sitios 1 y 2.

Por lo tanto, de este estudio se pueden extraer los posibles complejos y la posibilidad que la presencia de CBX y ENX modifiquen la conformación de las Cxs en su estado de hemicanal y gap junction.



Finalmente, los estudios *in silico* coinciden con los datos funcionales obtenidos en los ensayos farmacológicos y funcionales, demostrando que CBX y ENX modulan la función de las Conexinas en su conformación de HCs, los cuales participan en la liberación de ATP al espacio extracelular y esta liberación es regulada por potenciales redox intracelulares y factores mitogénicos (FGF2), en el proceso de neurulación y su exposición a CBX y ENX induce DTN.

## V. DISCUSIÓN

### 1. Perfil de expresión y función de conexinas durante el proceso de neurulación en *Xenopus laevis*

En vertebrados, la neurulación es el primer proceso crítico para la formación del SNC (Copp et al., 2003; Wilde et al., 2014). Este proceso requiere la coordinación de una serie de respuestas celulares de proliferación, diferenciación y migración que, a su vez, son finamente reguladas a través de distintas vías de señalización, expresión de receptores y neurotransmisores morfogenéticos (Böttcher & Niehrs, 2005; Luk & Sadikot, 2004; Massé & Dale, 2012; Nikolopoulou et al., 2017; Thisse & Thisse, 2005; Wilde et al., 2014). El proceso de neurulación es ampliamente conocido y se han descrito ampliamente los eventos consecutivos necesarios para la formación del tubo neural (Gilbert & Singer, 2000; Lee & Gleeson, 2020; Wilde et al., 2014). Sin embargo, la comprensión detallada de como ocurre la neurulación, el cierre del tubo neural y las posibles fallas durante estos procesos permanecen incompletas y aun generan interrogantes. Si el cierre del tubo neural no se completa, el neuroepitelio permanece expuesto ocasionando los denominados defectos del tubo neural (DTN) (Avagliano et al., 2019; Copp & Greene, 2010; Lee & Gleeson, 2020). Los DTN generan patologías complejas que incluyen defectos de tubo abierto como anencefalia y mielomeningoceles; y defectos de tubo cerrado como encefalocele y espina bífida oculta (Avagliano et al., 2019; Wallingford et al., 2013). Los DTN pueden originarse por causas ambientales y genéticas (Avagliano et al., 2019; Detrait et al., 2005; Nikolopoulou et al., 2017). Se ha descrito que al menos 300 genes (Nikolopoulou et al., 2017) participan en la formación del tubo neural, a pesar de ello, no se ha estudiado en detalle su relación con los mecanismos que rigen la neurulación y su participación directa con la aparición de DTN.

Las conexinas son una familia de proteínas presentes en las uniones intercelulares y participan en la formación de uniones en hendidura o gap junctions, que se especializan en unir el citoplasma de dos células contiguas, en las cuales participan proteínas de las 2 células adyacentes. Estas proteínas permiten la transferencia directa de metabolitos e iones de bajo peso molecular (<1 kDa), incluidos los segundos mensajeros como AMP cíclico, inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y Ca<sup>2+</sup> (Goodenough & Paul, 2009; Harris, 2007; Oyamada et al., 2005) y regulan importantes eventos fisiológicos y fisiopatológicos en tipos celulares como: neuronas, astrocitos, tanicitos, precursores neurales (PNs), células madre embrionarias, células de la cresta neural, etc. (Bannerman et al., 2000; Bittman & LoTurco, 1999; Huettner et al., 2006; Kanaporis et al., 2008; Kumar & Gilula, 1996; Laird, 2006; Mayorquin et al., 2018; Recabal et al., 2018; Swayne & Bennett, 2016; Weissman et al., 2004; Ye et al., 2003). Las Cxs no solo participan en uniones comunicantes (gap junction), también son capaces de formar hemicanales que permanecen en la membrana plasmática sin formar unión intercelular (Goodenough & Paul, 2003) permitiendo la liberación de moléculas como ATP, Glu, prostaglandina E<sub>2</sub>, glutatión y NAD<sup>+</sup>, que actúan como mensajeros autocrino/paracrino (Cotrina et al., 1998; Evans et al., 2006; Harris, 2007; Orellana et al., 2011; Stout et al., 2002; Sáez et al., 2010; Vinken et al., 2011; Ye et al., 2003).

Diversos estudios han demostrado que las Cxs se expresan de forma dinámica durante el desarrollo del SNC en vertebrados (Bannerman et al., 2000; Bittman & LoTurco, 1999; Khodosevich et al., 2012; Nadarajah et al., 1997; Swayne & Bennett, 2016; Weissman et al., 2004). No obstante, hasta el momento no existen estudios que demuestren la presencia y permitan entender el rol de las Cxs durante el proceso de neurulación en vertebrados. Este estudio proporciona una aproximación para entender el rol de las Cxs durante el cierre del tubo neural, demostrando por primera vez la presencia de GJ $\alpha$ 1 (Cx43), GJ $\alpha$ 3

(Cx46), GJ $\alpha$ 7/GJ $\gamma$ 1 (Cx45), GJ $\beta$ 1 (Cx32), GJ $\beta$ 2 (Cx26), GJ $\beta$ 3 (Cx31), GJ $\beta$ 7 (Cx25) en los distintos estadios de neurulación de *Xenopus laevis* con diferencias significativas en su expresión. Los niveles de expresión génica mostraron que según su clasificación por similitud de secuencia y longitud de dominios citoplasmáticos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ), la Cx46 (GJ $\alpha$ 3) fue la conexina más expresada (100 veces más) de las Cxs  $\alpha$  en el proceso de cierre del tubo neural (Figura 6). A su vez, la Cx32 (GJ $\beta$ 1) fue la conexina más expresada (30 veces más) de las Cxs  $\beta$  (Figura 7). Estudios anteriores han demostrado el cambio de subunidades de conexina a lo largo del desarrollo como resultado de los cambios necesarios para la maduración de los tejidos, es decir, la transición de una célula madre a un estado diferenciado (Huettner et al., 2006). Dicho esto, se ha demostrado que células madre embrionarias (CME) expresan alrededor de 18 Cxs, entre ellas, Cx46, Cx43, Cx32 y Cx26 (Huettner et al., 2006), antecedentes que concuerdan con el patrón de expresión génica observado en nuestros resultados. Además, Bannerman et al, demostraron que la Cx46 y la Cx43 forman canales comunicantes en la migración temprana de células de la cresta neural (CCN), evidencia que sugiere un rol crucial de las Cxs en la transmisión de señales durante la embriogénesis (Bannerman et al., 2000).

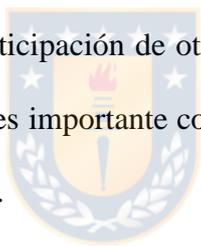
El perfil de expresión de Cx46 vs Cx43 (Figura 6C) en neurulación es un hallazgo interesante. Concordante con esto, se ha postulado una relación recíproca entre Cx46 y Cx43 en la diferenciación de células madre cancerígenas de glioblastoma, en la cual, Cx46 se expresa mayoritariamente en células madre cancerígenas de glioblastoma (indiferenciadas) y Cx43 en células madre no cancerígenas, lo que sugiere que la especificidad de expresión de las Cxs en procesos como la diferenciación son cruciales (Hitomi et al., 2015). Nuestros resultados en *Xenopus laevis* son consistentes con estos estudios sobre el patrón de expresión de Cxs, en los cuales se encontró que Cx46 se expresa mayoritariamente en el proceso de neurulación (células que inician su proceso de

diferenciación) y Cx43 en cerebro adulto (células diferenciadas) de *Xenopus laevis*. Para contribuir a estos resultados, y avalar o descartar la presencia de Cxs durante el cierre del tubo neural, es necesario evaluar los niveles proteicos y localización de estas proteínas durante el proceso de neurulación. Estudios futuros podrían considerar especificar la expresión y localización de estas proteínas con el fin de dilucidar cuales Cxs (Cx46, Cx43, Cx45, Cx32, entre otras) son cruciales para la formación de hemicanales y/o gap junction durante el cierre del tubo neural.

Por otro lado, no se ha reportado evidencia respecto a la participación de Cxs en el cierre del tubo neural ni como alteraciones en su funcionamiento determina la aparición de DTN. En este trabajo se demostró *in vivo*, que las Cxs juegan un rol crucial no sólo durante el proceso de neurulación, sino que también en el desarrollo del eje anteroposterior de embriones de *Xenopus laevis*. La exposición a CBX y ENX bloqueadores farmacológicos de Cxs, inducen un efecto concentración-dependiente, afectando considerablemente el cierre del tubo neural, cambiando la morfología de embriones en estadios posteriores de desarrollo (estadio 45), ocasionando DTN. Los tratamientos llevados a cabo muestran cambios morfológicos (malformaciones) en estadios de neurulación. Principalmente se evidenció un retraso importante en la formación del tubo neural a concentraciones intermedias de 30  $\mu\text{M}$  (CBX) (Figura 8B-D) y 50  $\mu\text{M}$  (ENX) (Figura 9B-D). El tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  (CBX/ENX) (Figura 8C-9C), resultó tóxico y letal en la mayoría de los casos. Además, el desarrollo más posterior de los embriones presentó fenotipos defectuosos, con su eje anteroposterior curvo, evidenciando una posible alteración en la formación de su médula espinal (30  $\mu\text{M}$  CBX) (Figura 8E) o simplemente, la inhibición completa del crecimiento (100  $\mu\text{M}$  CBX/ENX) y posterior degeneración y muerte. Aunque hasta ahora no se ha dilucidado por completo el mecanismo de acción de CBX y ENX, en este estudio se reunió una considerable

evidencia acerca de la interacción de estos bloqueadores con las Cxs. Este punto se analizará más adelante.

Estos resultados sugieren que, probablemente más de una Cx es requerida para la formación del tubo neural, y por esta razón la inhibición farmacológica de Cxs interfiere con el proceso de neurulación. No obstante, se necesitan más análisis para concluir sobre la participación de las Cxs en su conformación de hemicanal y/o gap junction. Si bien estos resultados deben interpretarse en el contexto que estos bloqueadores inhiben diferentes Cxs (Willebrords et al., 2017). Es interesante destacar, el patrón de expresión de ARNm de Cx46, la cual posiblemente conforme la mayoría de hemicanales y/o uniones comunicantes en el proceso de neurulación, sin embargo, es necesario realizar más experimentos que permitan diferenciar entre las distintas isoformas de Cxs. Por lo tanto, no es posible descartar la participación de otras Cxs (como Cx32, Cx26, Cx45 y Cx43) en este proceso. Finalmente es importante considerar que actualmente no existen bloqueadores específicos para Cx46.



Nuestros resultados concuerdan con lo descrito por otros investigadores, quienes han demostrado que la exposición a bloqueadores farmacológicos de Cxs generan alteraciones en eventos como la proliferación, migración y diferenciación en varios tipos celulares, especialmente en células de la cresta neural (Bannerman et al., 2000), neuroblastos (Marins et al., 2009), precursores neurales (Khodosevich et al., 2012) y células madre embrionarias (Huettnner et al., 2006).

## **2. FGF2 y potenciales redox regulan la apertura de HCs-Cxs durante el proceso de neurulación en *Xenopus laevis***

Los HCs-Cxs permiten la comunicación entre el citoplasma celular y el espacio extracelular participando en la señalización autocrina y paracrina (Evans et al., 2006; Sáez et al., 2010). Se ha descrito que los HCs-Cxs participan en la liberación de moléculas involucradas en la señalización celular como ATP y Glu (Cotrina et al., 1998; Orellana et al., 2011; Stout et al., 2002; Ye et al., 2003). En esta tesis se demuestra que estímulos de diferente naturaleza regulan mecanismos que participan en la apertura de HCs-Cxs en el proceso de neurulación, lo que confirma la hipótesis que los HCs-Cxs participan en la liberación de neurotransmisores como ATP durante este proceso. La apertura de los HCs-Cxs puede ser activada por (i) FGFs (De Vuyst et al., 2007; Garré et al., 2010; Recabal et al., 2020; Schalper et al., 2008) y/o (ii) cambios en el potencial redox intracelular, que depende de las cisteínas localizadas en el dominio CT de las Cxs (Evans et al., 2006; Pogoda et al., 2016; Mauricio A Retamal et al., 2007; Sáez et al., 2010). La participación de HCs-Cxs en eventos de neurodesarrollo (Nadarajah et al., 1997; Swayne & Bennett, 2016; Weissman et al., 2004) sugiere la existencia de mecanismos que modulen la funcionalidad de HCs en etapas más tempranas como la neurulación. El bloqueo farmacológico de Cxs afectó la permeabilidad y liberación de ATP al espacio extracelular inducida por potenciales redox y FGF2 *in vivo* e *in vitro*, sugiriendo la participación de estos dos mecanismos en la regulación de apertura de HCs-Cxs durante el cierre del tubo neural.

La formación del SNC implica una variedad de eventos que son controlados por moléculas de señalización. Entre estas, la familia de factores de crecimiento de fibroblastos. Los FGFs participan en eventos como la morfogénesis, migración, proliferación, inducción y diferenciación (Böttcher & Niehrs, 2005; Dorey & Amaya,

2010; Thisse & Thisse, 2005), respuestas celulares cruciales para el desarrollo, que podrían estar relacionadas con la señalización mediada por moléculas y neurotransmisores liberados por HCs-Cxs. FGF2 provocó una apertura transitoria de HCs-Cxs, participando en la liberación de ATP. La incorporación del compuesto fluorescente LY por HCs-Cxs durante el proceso de neurulación, demostró que FGF2 participa en el mecanismo de apertura de HCs-Cxs, la que fue inhibida por bloqueadores farmacológicos (CBX/ENX) (Figura 10-11). El aumento de la permeabilidad de la membrana celular a través de HCs-Cxs provocado por FGF2 puede deberse a un aumento de HCs en la superficie celular (De Vuyst et al., 2007; Schalper et al., 2008; Schalper et al., 2012) atribuible a los cambios en el estado de fosforilación en residuos Ser/Thr/Tyr (Pogoda et al., 2016). Sin embargo, no se puede discriminar la posible participación de las panexinas, proteínas que también forman hemicanales que permite el flujo de moléculas como LY y ATP (Barbe et al., 2006; Garré et al., 2010; Orellana et al., 2011; Penuela et al., 2013). La apertura de HCs-Cxs inducida por FGF2 en embriones en proceso de neurulación provocó un aumento de ~3.5 veces más de captación de LY vs embriones control. Esta captación fue sensible al tratamiento con CBX y ENX (Figura 11C). Consistente con esto, FGF2 llevo a la liberación de 2 veces más ATP en comparación con embriones control. La liberación de ATP fue estadísticamente significativa, pero una vez sometidos los embriones a los tratamientos farmacológicos con CBX y ENX, la concentración de ATP extracelular se redujo a concentraciones similares al control (Figura 12C), sugiriendo que además de HCs-Cxs, otros mecanismos de liberación pueden estar involucrados. Con respecto al último punto, se ha demostrado la participación de los receptores P2X<sub>3,4</sub> y P2Y<sub>1,4,8,11</sub> durante el proceso de neurulación (Bogdanov et al., 1997; Burnstock & Dale, 2015; Cheung et al., 2005; Massé & Dale, 2012), los cuales estimularían la apertura de hemicanales conformados por Pxs (Px1) y

Cxs (Baroja-Mazo, Barberà-Cremades, & Pelegrín, 2013). No obstante, otros mecanismos como liberación a través de panexinas o vesículas no fueron analizados en este trabajo, necesitándose experimentos adicionales que permitan dilucidar su contribución en este proceso.

Por otro lado, el estímulo del agente reductor DTT sobre HCs-Cxs induce una disminución en el potencial redox intracelular aumentando el estado funcional de los HCs-Cxs (Pogoda et al., 2016; Mauricio Antonio Retamal, 2014; Mauricio A Retamal et al., 2007), corroborando la participación de HCs-Cxs en la liberación de ATP durante el proceso de neurulación. Esta afirmación se debe a que (i) el DTT aumentó 5 veces la captación de LY en embriones de *Xenopus laevis* durante el proceso de neurulación, (ii) el aumento de permeabilidad a LY fue inhibido por bloqueadores farmacológicos de Cxs (Figura 11B), (iii) el DTT aumento al doble la liberación de ATP al espacio extracelular y fue inhibido por CBX y ENX (Figura 12B). Como se mencionó anteriormente, las Cxs (Pogoda et al., 2016; Mauricio Antonio Retamal, 2014) presentan cisteínas localizadas en el dominio CT, pero también presenta cisteínas en sus dominios LE1/LE2, estos residuos pueden reducirse u oxidarse, en condiciones redox (Pogoda et al., 2016; Mauricio Antonio Retamal, 2014). Algunas de las Cxs que presentan estos residuos en su dominio CT son Cx43, Cx46, Cx32 (Mauricio Antonio Retamal, 2014), las cuales pueden ser sensibles a cambios en el potencial redox en el proceso de neurulación. De acuerdo con esto, la apertura de HCs-Cxs participaría funcionalmente en la liberación de ATP y en el proceso de cierre del tubo neural, y su bloqueo farmacológico induce DTN. En conclusión, con lo anterior, postulamos dos mecanismos de diferente naturaleza que modulan la apertura de HCs-Cxs durante la neurulación. (i) potenciales redox que inducen cambios en las interacciones de puentes disulfuro, s-nitrosilación, entre otras (Mauricio Antonio Retamal, 2014), causando cambios conformacionales, afectando el estado

abierto/cerrado de HCs-Cxs, (ii) FGF2 induce la apertura controlada de HCs-Cxs, permitiendo la liberación de ATP al espacio extracelular, cambios atribuibles al estado de fosforilación/defosforilación de los sitios sensibles (Ser/Thr/Tyr) de las regiones NT y CT de las Cxs (Pogoda et al., 2016; Schalper et al., 2012; Sáez et al., 2010). Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual FGF2 y el potencial redox intracelular regula la apertura de HCs-Cxs durante el proceso de neurulación requiere futuras investigaciones.

En este trabajo no se estudió la posibilidad que las Cxs formen uniones comunicantes entre células de la placa neural, pero este acoplamiento u otros posibles acoplamientos con otros tipos de células durante el proceso de neurulación requiere futuros estudios.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren un mecanismo de liberación de ATP mediado por HCs-Cxs durante el proceso de neurulación, y su liberación al espacio extracelular posiblemente permitiría la activación de receptores P2X<sub>3-4</sub>, P2Y<sub>1,8</sub> (Bogdanov et al., 1997; Burnstock & Dale, 2015; Cheung et al., 2005; Massé & Dale, 2012), desencadenando diferentes cascadas de señalización (Abbracchio et al., 2009; Zimmermann, 2006). Una posibilidad es la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, el cual modula la propagación intercelular de ondas de calcio, regulando así procesos de proliferación, migración y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario y la formación del tubo neural (Suzuki et al., 2017; Webb & Miller, 2003). La alteración de esta señalización por la inhibición del mecanismo de liberación de ATP por HCs-Cxs puede conducir a DTN. El ATP puede no ser el único neurotransmisor involucrado en la movilización de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durante la formación del tubo neural en *Xenopus laevis*. La inhibición del receptor NMDA (Sequera et al., 2018) y de glutaminasa 1 (GLS1), enzima que cataliza la conversión de glutamina en glutamato, durante el proceso de neurulación (Benavides-Rivas et al., 2020), da como resultado alteraciones en la proliferación celular de células de la placa neural y la migración celular lo que resulta en defectos del tubo

neural (DTN). Esto sugiere que la señalización glutamatérgica (Glu) y purinérgica (ATP) participarían en la movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  regulando procesos como polaridad celular planar, movimientos morfogenéticos, extensión convergente, constricción apical, formación de pliegues neurales y proliferación de células de la placa neural (Benavides-Rivas et al., 2020; Burnstock & Dale, 2015; Massé & Dale, 2012; Sequerra et al., 2018; Suzuki et al., 2017; Webb & Miller, 2003). Sería interesante evaluar la participación de HCs-Cxs en la señalización glutamatérgica durante el proceso de neurulación.

### **3. Predicciones *in silico*: Sitios e interacciones de unión de bloqueadores ampliamente usados para modular la actividad de Cxs**

La identificación y caracterización de sitios funcionales, incluidos los sitios de unión a ligando o sitios catalíticos de una estructura proteica son clave para determinar su regulación (Le Guilloux et al., 2009) y guiar el diseño de moléculas pequeñas que podrían interactuar con la proteína y modular su función (Schmidtke, Le Guilloux, Maupetit, & Tuffery, 2010). En el caso de no encontrarse esta información, se han diseñado diferentes aproximaciones *in silico* para determinar dichos sitios. Existen programas diseñados para identificar y analizar cavidades en la superficie de las proteínas. Estos programas se basan en componentes energéticos y geométricos (Le Guilloux et al., 2009; Schmidtke, Le Guilloux, Maupetit, & Tuffery, 2010). Los componentes basados en geometría buscan e identifican posibles cavidades blanco de moléculas pequeñas. En este trabajo, se implementó algoritmos de tipo geométrico para determinar los posibles sitios que permiten establecer un modo teórico de unión de bloqueadores ampliamente utilizados para modular la función de las Cxs. Estas cavidades se determinaron con Fpocket, programa que permite la detección de “bolsillos”, basado en el método de teselación de Voronoi y de esferas  $\alpha$  (Le Guilloux et al., 2009; Schmidtke, Le Guilloux,

Maupetit, & Tuffery, 2010) para analizar la superficie de la Cx46. A la fecha no existen estudios *in silico* que permitan identificar y caracterizar el sitio de interacción de bloqueadores como CBX y ENX, drogas ampliamente utilizadas para modular la función de las Cxs en diferentes tipos y procesos celulares (Willebrords et al., 2017). Para nuestro conocimiento, este trabajo de tesis contribuye una primera aproximación en la cual, se logró identificar dos sitios candidatos ubicados en los dominios NT y LE2 de la Cx46 y, posteriormente, se confirmó su capacidad para unir moléculas como CBX y ENX, a través de estudios de docking molecular.

El docking molecular trata de predecir la orientación y conformación de una molécula pequeña (ligando) en el sitio funcional de una proteína de interés (Yuriev et al., 2011). Para este propósito, se implementan programas computacionales de docking molecular, como AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010), Glide (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016), entre otros. Los programas de docking molecular se pueden dividir en dos pasos principales: (i) búsqueda de las “posiciones de acoplamiento” y (ii) refinamiento y puntuación de las posiciones generadas (Yuriev et al., 2011). En general, el docking molecular se clasifica en función a su energía libre de unión. Los estudios de docking molecular de este trabajo se realizaron con los programas AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010) y Glide (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016).

El sitio ubicado en el dominio NT presentó residuos aminoacídicos con diferentes características fisicoquímicas. En esta región se encuentran residuos de tipo polar sin carga como Asn13 y Gln15; se puede observar la presencia de Glu12 y Glu16, que corresponden a residuos con carga negativa; Arg9 y Lys23 residuos con carga positiva, además, residuos hidrofóbicos como Phe6 y Leu10 (Figura 17-19). Esta región es altamente conservada entre las distintas isoformas de las Cxs (Bai, 2016; Myers et al., 2018) y participa en la región formadora del poro, sitio determinante para la modulación

de apertura/cierre de estos canales (Beyer et al., 2012; Pogoda et al., 2016). Si bien la fisiología asociada a las modificaciones en esta región se encuentra caracterizada (Bai, 2016; Beyer et al., 2012), no se conoce el rol que cumple cada uno de los residuos al momento de interactuar con moléculas pequeñas como los agentes farmacológicos (CBX/ENX). Los resultados de docking molecular, sugieren que CBX se une con mayor favorabilidad a este sitio (-6.2 Kcal/mol AutoDock Vina y -3.16 Kcal/mol Glide), estableciendo dos puentes de H con Arg9 y Lys23 y un puente salino con Arg9, puntuando un  $\Delta G$  teórico de -30.61 Kcal/mol; comparado con las dos interacciones de ENX, la cual estableció un puente de H con Glu12 y un puente salino con Lys23 alcanzando un  $\Delta G$  de enlace igual a -43.05 Kcal/mol (Figura 18-19). Los puentes de H son las interacciones parcialmente electrostáticas, direccionales, que presentan una fuerza de enlace entre 10 y 40 KJ/mol y son interacciones de corto alcance. El NT finaliza con un aminoácido cargado positivamente (lisina o arginina) en la posición 22 (Cxs  $\beta$ ) o 23 (Cxs  $\alpha$ ) (Beyer et al., 2012). Este aminoácido cargado positivamente (Lys23/Arg23 Cxs  $\alpha$ ) (Lys22/Arg22 Cxs  $\beta$ ) puede tener un papel importante en la biosíntesis de las Cxs (Beyer et al., 2012) y su interacción con CBX y ENX afectaría interacciones críticas para la formación de HCs, así como interacciones involucradas en mantener el estado abierto/cerrado de estos canales.

El sitio posicionado en el LE2 se encuentra cerca de residuos cruciales que influyen en la formación y especificidad de uniones comunicantes para la Cx46. Estos residuos se encuentran entre los aminoácidos 179-195; para la Cx26 y Cx30 se encuentran entre 167-183; para Cx32 entre 166-182; para Cx43 entre 185-201 y Cx45 entre 207 al 223 (Bai & Wang, 2014; Bai et al., 2018; Koval et al., 2014). Se ha demostrado que Cx46 es heterotípicamente compatible con Cx26, Cx30, Cx32, Cx50 y Cx43 (Bai & Wang, 2014; Bai et al., 2018; Koval et al., 2014). Concordante con esto, en este sitio se encuentran

residuos de tipo polar sin carga como Gln171; Lys173 aminoácido con carga positiva y residuos hidrofóbicos como Phe166, Leu167, Tyr168 y Leu172 (Figura 17 y 20). Interesantemente, CBX también establece mayores interacciones que ENX en este sitio, estableciendo dos puentes de H con Lys173 y Gly169 con una energía de unión de -7.7 Kcal/mol (AutoDock Vina) y -2.75 Kcal/mol (Glide) alcanzando un  $\Delta G$  teórico igual a -36.09 Kcal/mol; comparado con la interacción de ENX con Lys173, la cual se estableció por un puente de H con una energía de unión de -7.8 Kcal/mol (AutoDock Vina) y -3.11 Kcal/mol (Glide), puntuando un  $\Delta G$  teórico de -37.98 Kcal/mol (Figura 21). Concordantemente, los resultados obtenidos en los estudios *in silico*, son consecuentes con los ensayos farmacológicos donde se evidenció que CBX genera mayores defectos fenotípicos alterando el desarrollo más tardío de los embriones, evidenciando una posible alteración en la formación de su médula espinal (30  $\mu$ M CBX) o simplemente, la muerte (100  $\mu$ M CBX) (Figura 8). De manera complementaria, se puede sugerir que el sitio ubicado en el NT, como el posicionado en el LE2 son claves para la modulación de las Cxs. No obstante, es necesario realizar estudios de dinámica molecular para establecer si las interacciones descritas entre HCs-Cx46 y CBX/ENX perduran en el tiempo. La dinámica molecular es una herramienta computacional que permite simular los movimientos de un sistema molecular. Las simulaciones de dinámica molecular muestran el espacio conformacional y generan una trayectoria de los movimientos moleculares en función del tiempo, realizando cálculos de energía libre que son extrapolables a sistemas biológicos de interés (Durrant & McCammon, 2011).

Finalmente, la interacción entre Cx46/CBX y Cx46/ENX observada en los sitios N (dominio N-Terminal) y E (LE2 “loop extracelular”) a través de estudios *in silico* apoyan los resultados de presencia y funcionalidad de las Cxs, regulando la liberación de ATP durante el proceso de neurulación en *Xenopus Laevis*.

En conjunto todos estos resultados nos permiten demostrar que HCs-Cxs participan en la liberación de ATP y eventualmente de otros neurotransmisores como glutamato al espacio extracelular, y su mecanismo de apertura es modulado por vías de señalización como: (i) FGF2 y/o (ii) potenciales redox intracelulares, durante procesos tempranos de desarrollo como el cierre del tubo neural, y su bloqueo farmacológico induce la generación de DTN, que serían ocasionados por alteraciones en la señalización purinérgica y/o glutamatérgica.



## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aasen, T., Johnstone, S., Vidal-Brime, L., Lynn, K. S., & Koval, M. (2018). Connexins: synthesis, post-translational modifications, and trafficking in health and disease. *International journal of molecular sciences*, *19*(5), 1296.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences*, *32*(1), 19-29.
- Avagliano, L., Massa, V., George, T. M., Qureshy, S., Bulfamante, G. P., & Finnell, R. H. (2019). Overview on neural tube defects: From development to physical characteristics. *Birth defects research*, *111*(19), 1455-1467.
- Axelsen, L. N., Calloe, K., Holstein-Rathlou, N.-H., & Nielsen, M. S. (2013). Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification. *Frontiers in pharmacology*, *4*, 130.
- Bai, D. (2016). *Structural analysis of key gap junction domains—Lessons from genome data and disease-linked mutants*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.
- Bai, D., & Wang, A. H. (2014). Extracellular domains play different roles in gap junction formation and docking compatibility. *Biochemical Journal*, *458*(1), 1-10.
- Bai, D., Yue, B., & Aoyama, H. (2018). Crucial motifs and residues in the extracellular loops influence the formation and specificity of connexin docking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1860*(1), 9-21.
- Bannerman, P., Nichols, W., Puhalla, S., Oliver, T., Berman, M., & Pleasure, D. (2000). Early migratory rat neural crest cells express functional gap junctions: evidence that neural crest cell survival requires gap junction function. *Journal of neuroscience research*, *61*(6), 605-615.
- Barbe, M. T., Monyer, H., & Bruzzone, R. (2006). Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology*, *21*(2), 103-114.
- Baroja-Mazo, A., Barberà-Cremades, M., & Pelegrín, P. (2013). The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1828*(1), 79-93.
- Barria, A. (2019). Dangerous liaisons as tumour cells form synapses with neurons. In: Nature Publishing Group.

- Belousov, A. B. (2012). Novel model for the mechanisms of glutamate-dependent excitotoxicity: role of neuronal gap junctions. *Brain research*, *1487*, 123-130.
- Benavides-Rivas, C., Tovar, L. M., Zúñiga, N., Pinto-Borguero, I., Retamal, C., Yévenes, G. E., . . . Coddou, C. (2020). Altered Glutaminase 1 Activity During Neurulation and Its Potential Implications in Neural Tube Defects. *Frontiers in pharmacology*, *11*, 900.
- Beyer, E. C., Lipkind, G. M., Kyle, J. W., & Berthoud, V. M. (2012). Structural organization of intercellular channels II. Amino terminal domain of the connexins: sequence, functional roles, and structure. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba)-Biomembranes*, *1818*(8), 1823-1830.
- Bittman, K., & LoTurco, J. (1999). Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. *Cerebral Cortex*, *9*(2), 188-195.
- Blom, H. J. (2009). Folic acid, methylation and neural tube closure in humans. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, *85*(4), 295-302.
- Bogdanov, Y. D., Dale, L., King, B. F., Whittock, N., & Burnstock, G. (1997). Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of *Xenopus* embryos. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(19), 12583-12590.
- Boison, D. (2008). Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. *Current opinion in pharmacology*, *8*(1), 2-7.
- Borodinsky, L. N., O'Leary, D., Neale, J. H., Vicini, S., Coso, O. A., & Fiszman, M. L. (2003). GABA-induced neurite outgrowth of cerebellar granule cells is mediated by GABAA receptor activation, calcium influx and CaMKII and erk1/2 pathways. *Journal of neurochemistry*, *84*(6), 1411-1420.
- Bosone, C., Andreu, A., & Echevarria, D. (2016). GAP junctional communication in brain secondary organizers. *Development, growth & differentiation*, *58*(5), 446-455.
- Böttcher, R. T., & Niehrs, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine reviews*, *26*(1), 63-77.
- Burnstock, G., & Dale, N. (2015). Purinergic signalling during development and ageing. *Purinergic signalling*, *11*(3), 277-305.
- Cabrera, R. M., Hill, D. S., Etheredge, A. J., & Finnell, R. H. (2004). Investigations into the etiology of neural tube defects. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, *72*(4), 330-344.

- Cheung, K., Chan, W., & Burnstock, G. (2005). Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience*, *133*(4), 937-945.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.-M., Bromage, N., Bunyan, J., . . . Hackbarth, H. (1997). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory animals*, *31*(1), 1-32.
- Colas, J. F., & Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, *221*(2), 117-145.
- Copp, A. J., & Greene, N. D. (2010). Genetics and development of neural tube defects. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, *220*(2), 217-230.
- Copp, A. J., Greene, N. D., & Murdoch, J. N. (2003). The genetic basis of mammalian neurulation. *Nature Reviews Genetics*, *4*(10), 784-793.
- Cotrina, M. L., Lin, J. H.-C., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., . . . Nedergaard, M. (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(26), 15735-15740.
- De Vuyst, E., Decrock, E., De Bock, M., Yamasaki, H., Naus, C. C., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2007). Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Molecular biology of the cell*, *18*(1), 34-46.
- DeLano, W. L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on protein crystallography*, *40*(1), 82-92.
- Detrait, E. R., George, T. M., Etchevers, H. C., Gilbert, J. R., Vekemans, M., & Speer, M. C. (2005). Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicology and teratology*, *27*(3), 515-524.
- Dorey, K., & Amaya, E. (2010). FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development*, *137*(22), 3731-3742.
- Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC biology*, *9*(1), 1-9.
- Eckert, R. (2006). Gap-junctional single-channel permeability for fluorescent tracers in mammalian cell cultures. *Biophysical journal*, *91*(2), 565-579.
- Eibach, S., Moes, G., Hou, Y. J., Zovickian, J., & Pang, D. (2017). Unjoined primary and secondary neural tubes: junctional neural tube defect, a new form of spinal

- dysraphism caused by disturbance of junctional neurulation. *Child's Nervous System*, 33(10), 1633-1647. doi:10.1007/s00381-016-3288-7
- Ek-Vitorin, J. F., & Burt, J. M. (2013). Structural basis for the selective permeability of channels made of communicating junction proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(1), 51-68.
- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Fraté, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R. A., . . . Willecke, K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *The Journal of cell biology*, 129(3), 805-817.
- Evans, W. H., De Vuyst, E., & Leybaert, L. (2006). The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochemical Journal*, 397(1), 1-14.
- Garré, J. M., Retamal, M. A., Cassina, P., Barbeito, L., Bukauskas, F. F., Sáez, J. C., . . . Abudara, V. (2010). FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(52), 22659-22664.
- Gilbert, S. F., & Singer, S. (2000). Formation of the neural tube. *Developmental Biology*.
- Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(4), 285-295.
- Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(1), a002576.
- Greene, N. D., & Copp, A. J. (2014). Neural tube defects. *Annual review of neuroscience*, 37, 221-242.
- Hanani, M. (2012). Lucifer yellow—an angel rather than the devil. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(1), 22-31.
- Harris, A. L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Progress in biophysics and molecular biology*, 94(1-2), 120-143.
- Hitomi, M., Deleyrolle, L. P., Mulkearns-Hubert, E. E., Jarrar, A., Li, M., Sinyuk, M., . . . Hubert, C. G. (2015). Differential connexin function enhances self-renewal in glioblastoma. *Cell reports*, 11(7), 1031-1042.
- Huettner, J. E., Lu, A., Qu, Y., Wu, Y., Kim, M., & McDonald III, J. W. (2006). Gap junctions and connexon hemichannels in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24(7), 1654-1667.

- Hébert, J. M. (2011). FGFs: neurodevelopment's Jack-of-all-trades—how do they do it? *Frontiers in neuroscience*, 5, 133.
- Jansson, L. C., & Åkerman, K. E. (2014). The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. *Journal of neural transmission*, 121(8), 819-836.
- John, S., Cesario, D., & Weiss, J. (2003). Gap junctional hemichannels in the heart. *Acta physiologica scandinavica*, 179(1), 23-31.
- Kanaporis, G., Mese, G., Valiuniene, L., White, T. W., Brink, P. R., & Valiunas, V. (2008). Gap junction channels exhibit connexin-specific permeability to cyclic nucleotides. *The Journal of general physiology*, 131(4), 293-305.
- Karfunkel, P. (1974). The mechanisms of neural tube formation. In *International review of cytology* (Vol. 38, pp. 245-271): Elsevier.
- Karimi, K., Fortriede, J. D., Lotay, V. S., Burns, K. A., Wang, D. Z., Fisher, M. E., . . . Ponferrada, V. G. (2018). Xenbase: a genomic, epigenomic and transcriptomic model organism database. *Nucleic acids research*, 46(D1), D861-D868.
- Khodosevich, K., Zuccotti, A., Kreuzberg, M. M., Le Magueresse, C., Frank, M., Willecke, K., & Monyer, H. (2012). Connexin45 modulates the proliferation of transit-amplifying precursor cells in the mouse subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(49), 20107-20112.
- Koval, M., Molina, S. A., & Burt, J. M. (2014). Mix and match: investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues. *FEBS letters*, 588(8), 1193-1204.
- Kula, B., Chen, T. J., & Kukley, M. (2019). Glutamatergic signaling between neurons and oligodendrocyte lineage cells: Is it synaptic or non-synaptic? *Glia*, 67(11), 2071-2091.
- Kumar, N. M., & Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*, 84(3), 381-388.
- Laird, D. W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochemical Journal*, 394(3), 527-543.
- Larsson, M., Sawada, K., Morland, C., Hiasa, M., Ormel, L., Moriyama, Y., & Gundersen, V. (2012). Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cerebral Cortex*, 22(5), 1203-1214.
- Le Guilloux, V., Schmidtke, P., & Tuffery, P. (2009). Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection. *BMC bioinformatics*, 10(1), 168.

- Lee, S., & Gleeson, J. G. (2020). Closing in on Mechanisms of Open Neural Tube Defects. *Trends in Neurosciences*.
- Liu, X., Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Haydar, T. F., & Rakic, P. (2008). The role of ATP signaling in the migration of intermediate neuronal progenitors to the neocortical subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(33), 11802-11807.
- Lujan, R., Shigemoto, R., & Lopez-Bendito, G. (2005). Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*, *130*(3), 567-580.
- Luk, K. C., & Sadikot, A. F. (2004). Glutamate and regulation of proliferation in the developing mammalian telencephalon. *Developmental neuroscience*, *26*(2-4), 218-228.
- Manent, J.-B., Demarque, M., Jorquera, I., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., & Represa, A. (2005). A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *Journal of Neuroscience*, *25*(19), 4755-4765.
- Marins, M., Xavier, A. L., Viana, N. B., Fortes, F. S., Fróes, M. M., & Menezes, J. R. (2009). Gap junctions are involved in cell migration in the early postnatal subventricular zone. *Developmental neurobiology*, *69*(11), 715-730.
- Massé, K., & Dale, N. (2012). Purines as potential morphogens during embryonic development. *Purinergic signalling*, *8*(3), 503-521.
- Mattson, M. P. (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1144*, 97.
- Mayorquin, L. C., Rodriguez, A. V., Sutachan, J.-J., & Albarracín, S. L. (2018). Connexin-mediated functional and metabolic coupling between astrocytes and neurons. *Frontiers in molecular neuroscience*, *11*, 118.
- Mughal, B. B., Leemans, M., Spirhanzlova, P., Demeneix, B., & Fini, J.-B. (2018). Reference gene identification and validation for quantitative real-time PCR studies in developing *Xenopus laevis*. *Scientific reports*, *8*(1), 1-9.
- Myers, J. B., Haddad, B. G., O'Neill, S. E., Chorev, D. S., Yoshioka, C. C., Robinson, C. V., . . . Reichow, S. L. (2018). Structure of native lens connexin 46/50 intercellular channels by cryo-EM. *Nature*, *564*(7736), 372-377.
- Nadarajah, B., Jones, A., Evans, W. H., & Parnavelas, J. (1997). Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. *Journal of Neuroscience*, *17*(9), 3096-3111.

- Nieuwkoop, P. D., & Faber, J. (1994). *Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis*: Garland Pub.
- Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N. D., & Copp, A. J. (2017). Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development*, *144*(4), 552-566.
- O'Rahilly, R., & Müller, F. (2007). *Neurulation in the normal human embryo*. Paper presented at the Ciba Foundation Symposium 181-Neural Tube Defects: Neural Tube Defects: Ciba Foundation Symposium 181.
- Olsson, M. H., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical p K a predictions. *Journal of chemical theory and computation*, *7*(2), 525-537.
- Orellana, J. A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J. X., Bennett, M. V., Naus, C. C., . . . Sáez, J. C. (2011). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *Journal of neurochemistry*, *118*(5), 826-840.
- Oyamada, M., Oyamada, Y., & Takamatsu, T. (2005). Regulation of connexin expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1719*(1-2), 6-23.
- Penuela, S., Gehi, R., & Laird, D. W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1828*(1), 15-22.
- Pogoda, K., Kameritsch, P., Retamal, M. A., & Vega, J. L. (2016). Regulation of gap junction channels and hemichannels by phosphorylation and redox changes: a revision. *BMC cell biology*, *17*(1), 11.
- Recabal, A., Elizondo-Vega, R., Philippot, C., Salgado, M., López, S., Palma, A., . . . Caprile, T. (2018). Connexin-43 gap junctions are responsible for the hypothalamic tanycyte-coupled network. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 406.
- Recabal, A., Fernández, P., López, S., Barahona, M. J., Ordenes, P., Alejandra, P., . . . Caprile, T. The FGF2-induced tanycyte proliferation involves a connexin 43 hemichannel/purinergic-dependent pathway. *Journal of Neurochemistry*.
- Recabal, A., Fernández, P., López, S., Barahona, M. J., Ordenes, P., Alejandra, P., . . . Caprile, T. (2020). The FGF2-induced tanycyte proliferation involves a connexin 43 hemichannel/purinergic-dependent pathway. *Journal of Neurochemistry*.

- Reichert, S., Randall, R. A., & Hill, C. S. (2013). A BMP regulatory network controls ectodermal cell fate decisions at the neural plate border. *Development*, *140*(21), 4435-4444.
- Represa, A., & Ben-Ari, Y. (2005). Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends in neurosciences*, *28*(6), 278-283.
- Retamal, M. A. (2014). Connexin and Pannexin hemichannels are regulated by redox potential. *Frontiers in physiology*, *5*, 80.
- Retamal, M. A., Schalper, K. A., Shoji, K. F., Bennett, M. V., & Sáez, J. C. (2007). Opening of connexin 43 hemichannels is increased by lowering intracellular redox potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(20), 8322-8327.
- Root, C. M., Velázquez-Ulloa, N. A., Monsalve, G. C., Minakova, E., & Spitzer, N. C. (2008). Embryonically expressed GABA and glutamate drive electrical activity regulating neurotransmitter specification. *Journal of Neuroscience*, *28*(18), 4777-4784.
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., . . . Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(15), 5683-5686.
- Schalper, K. A., Palacios-Prado, N., Retamal, M. A., Shoji, K. F., Martínez, A. D., & Sáez, J. C. (2008). Connexin hemichannel composition determines the FGF-1–induced membrane permeability and free  $[Ca^{2+}]_i$  responses. *Molecular biology of the cell*, *19*(8), 3501-3513.
- Schalper, K. A., Riquelme, M. A., Brañes, M. C., Martínez, A. D., Vega, J. L., Berthoud, V. M., . . . Sáez, J. C. (2012). Modulation of gap junction channels and hemichannels by growth factors. *Molecular BioSystems*, *8*(3), 685-698.
- Schmidtke, P., Le Guilloux, V., Maupetit, J., & Tuffery, P. (2010). Fpocket: online tools for protein ensemble pocket detection and tracking. *Nucleic acids research*, *38*(suppl\_2), W582-W589.
- Schmidtke, P., Le Guilloux, V., Maupetit, J., & Tuffery, P. (2010). Fpocket: online tools for protein ensemble pocket detection and tracking. *Nucleic acids research*, *38*(suppl\_2), W582-W589.
- Schoenwolf, G. (1982). On the morphogenesis of the early rudiments of the developing central nervous system. *Scanning electron microscopy*(Pt 1), 289-308.
- Schoenwolf, G. C., & Smith, J. L. (1990). Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development*, *109*(2), 243-270.

- Seidahmed, M. Z., Abdelbasit, O. B., Shaheed, M. M., Alhussein, K. A., Miqdad, A. M., Khalil, M. I., . . . Salih, M. A. (2014). Epidemiology of neural tube defects. *Saudi medical journal*, 35(Suppl 1), S29.
- Sequerra, E. B., Goyal, R., Castro, P. A., Levin, J. B., & Borodinsky, L. N. (2018). NMDA receptor signaling is important for neural tube formation and for preventing antiepileptic drug-induced neural tube defects. *Journal of Neuroscience*, 38(20), 4762-4773.
- Sokol, S. Y. (2016). Mechanotransduction during vertebrate neurulation. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 117, pp. 359-376): Elsevier.
- Song, M., Yu, S. P., Mohamad, O., Cao, W., Wei, Z. Z., Gu, X., . . . Wei, L. (2017). Optogenetic stimulation of glutamatergic neuronal activity in the striatum enhances neurogenesis in the subventricular zone of normal and stroke mice. *Neurobiology of disease*, 98, 9-24.
- Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, 444(7120), 707-712.
- Stottmann, R. W., Berrong, M., Matta, K., Choi, M., & Klingensmith, J. (2006). The BMP antagonist Noggin promotes cranial and spinal neurulation by distinct mechanisms. *Developmental biology*, 295(2), 647-663.
- Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C., & Charles, A. C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10482-10488.
- Suzuki, M., Sato, M., Koyama, H., Hara, Y., Hayashi, K., Yasue, N., . . . Campbell, R. E. (2017). Distinct intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics regulate apical constriction and differentially contribute to neural tube closure. *Development*, 144(7), 1307-1316.
- Swayne, L. A., & Bennett, S. A. (2016). Connexins and pannexins in neuronal development and adult neurogenesis. *BMC cell biology*, 17(1), 39-49.
- Sáez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F., & Bennett, M. V. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1711(2), 215-224.
- Sáez, J. C., Schalper, K. A., Retamal, M. A., Orellana, J. A., Shoji, K. F., & Bennett, M. V. (2010). Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Experimental cell research*, 316(15), 2377-2389.
- Søndergaard, C. R., Olsson, M. H., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and

- rationalization of p K a values. *Journal of chemical theory and computation*, 7(7), 2284-2295.
- Südhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 509-547.
- Thisse, B., & Thisse, C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental biology*, 287(2), 390-402.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Vinken, M., Decrock, E., De Vuyst, E., Ponsaerts, R., D'hondt, C., Bultynck, G., . . . Rogiers, V. (2011). Connexins: sensors and regulators of cell cycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1815(1), 13-25.
- Wallingford, J. B., Niswander, L. A., Shaw, G. M., & Finnell, R. H. (2013). The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects. *Science*, 339(6123), 1222002.
- Webb, S. E., & Miller, A. L. (2003). Calcium signalling during embryonic development. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(7), 539-551.
- Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C., & Kriegstein, A. R. (2004). Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, 43(5), 647-661.
- Wilde, J. J., Petersen, J. R., & Niswander, L. (2014). Genetic, epigenetic, and environmental contributions to neural tube closure. *Annual review of genetics*, 48, 583-611.
- Willebrords, J., Maes, M., Yanguas, S. C., & Vinken, M. (2017). Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, 180, 144-160.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., . . . Söhl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological chemistry*, 383(5), 725-737.
- Yamaguchi, Y., & Miura, M. (2013). How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. *Cellular and molecular life sciences*, 70(17), 3171-3186.

- Ye, Z.-C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S., & Ransom, B. R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *Journal of Neuroscience*, 23(9), 3588-3596.
- Yuriev, E., Agostino, M., & Ramsland, P. A. (2011). Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *Journal of Molecular Recognition*, 24(2), 149-164.
- Zimmermann, H. (2006). Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflügers Archiv*, 452(5), 573-588.

