



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

## **Estudio funcional de Ric-8A/Gαq en la formación del mesodermo dorsal en *Xenopus tropicalis***

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

MARÍA JOSÉ RUIZ NORAMBUENA  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2024

Profesor guía: Dra Marcela Eliana Torrejón Quezada  
Profesor co-guía: Dr Felipe Eleander Aguilera Muñoz  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

2024, María José Ruiz Norambuena

## TABLA DE CONTENIDOS.

|                                                                                                                                                                                       |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÍNDICE DE TABLAS .....                                                                                                                                                                | v    |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                                                                                                                                | vi   |
| RESUMEN .....                                                                                                                                                                         | viii |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                                                        | x    |
| INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                                                                    | 12   |
| 1.- Cresta neural: .....                                                                                                                                                              | 12   |
| 2.- Inducción de la cresta neural: .....                                                                                                                                              | 14   |
| 3.- Formación del mesodermo: .....                                                                                                                                                    | 17   |
| 4.- Vía de señalización de Wnt: .....                                                                                                                                                 | 20   |
| 5.- Mecanismo de señalización de la proteína G heterotrimérica: .....                                                                                                                 | 23   |
| 6.- Resistencia a inhibidores de la Colinesterasa 8 (Ric-8): .....                                                                                                                    | 25   |
| 7.- Hipótesis: .....                                                                                                                                                                  | 29   |
| MATERIALES Y MÉTODOS: .....                                                                                                                                                           | 33   |
| Materiales: .....                                                                                                                                                                     | 33   |
| Métodos: .....                                                                                                                                                                        | 35   |
| 1.- Fertilización <i>in vitro</i> : .....                                                                                                                                             | 35   |
| 2.- Microinyección de embriones con morfolinós y ARNm: .....                                                                                                                          | 36   |
| 3.- Hibridación <i>in situ</i> : .....                                                                                                                                                | 38   |
| 4.- Transformación de bacterias quimio competentes: .....                                                                                                                             | 39   |
| 5.- Purificación de plásmidos a gran escala: .....                                                                                                                                    | 40   |
| 6.- Preparación sondas de ARN y ARNm: .....                                                                                                                                           | 41   |
| 7.- RT-qPCR: .....                                                                                                                                                                    | 42   |
| 8.- Ensayos de conjugación: .....                                                                                                                                                     | 43   |
| 9.- Obtención y procesamiento de datos públicos de ARN-Seq de cresta neural y zona<br>marginal dorsal de <i>Xenopus laevis</i> : .....                                                | 45   |
| 10.- Identificación de genes ortólogos entre <i>X. laevis</i> y <i>X. tropicalis</i> : .....                                                                                          | 47   |
| 11.- Determinación de vías de señalización asociadas a genes ortólogos en <i>Xenopus<br/>            tropicalis</i> , pero con expresión diferencial en <i>Xenopus laevis</i> : ..... | 48   |
| RESULTADOS .....                                                                                                                                                                      | 50   |

|                                                                                                                                                                                           |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.- Definir la función de Ric-8A/Gαq en la formación del mesodermo dorsal para la inducción de la cresta neural en <i>Xenopus tropicalis</i> :                                            | 50         |
| 1.1.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Ric-8A y rescate en la formación del mesodermo en embriones de <i>Xenopus</i> :                                                      | 50         |
| 1.2.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Gαq y rescate en la formación del mesodermo en embriones de <i>Xenopus</i> :                                                         | 59         |
| 1.3.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Gαi2 en la formación del mesodermo en embriones de <i>Xenopus</i> :                                                                  | 67         |
| 1.4.- Analizar, por medio de ensayos de epistasis, el rescate del fenotipo morfante de Ric-8A con la sobreexpresión de Gαq en la formación del mesodermo en embriones de <i>Xenopus</i> : | 72         |
| 1.5.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Ric-8A y Gαq en la formación de la placa neural en embriones de <i>Xenopus</i> :                                                     | 75         |
| 1.6.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Ric-8A y/o Gαq en la zona marginal dorso-lateral durante la inducción de cresta neural:                                              | 78         |
| 2.- Identificar las vías de señalización asociadas a la vía de proteína G heterotrimérica en tejidos de cresta neural y zona marginal dorsal en <i>Xenopus</i> :                          | 82         |
| 2.1.- Identificar genes con expresión diferencial en tejidos de cresta neural y zona marginal dorsal en <i>Xenopus</i> :                                                                  | 82         |
| 2.2 Determinar los procesos enriquecidos y las vías de señalización asociadas a proteína G entre los genes con expresión diferencial:                                                     | 87         |
| <b>DISCUSIÓN</b>                                                                                                                                                                          | <b>101</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>                                                                                                                                                                       | <b>117</b> |
| <b>GLOSARIO</b>                                                                                                                                                                           | <b>120</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>                                                                                                                                                                       | <b>123</b> |
| <b>ANEXOS</b>                                                                                                                                                                             | <b>134</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabla I: genes diferencialmente expresados y ortólogos en los<br/>distintos tejidos estudiados.....</b> | <b>86</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Formación de la CN en vertebrados.....                                                                                                                                                 | 13 |
| Figura 2. Modelo de inducción de la cresta neural. ....                                                                                                                                          | 16 |
| Figura 3. Modelo de formación del mesodermo.....                                                                                                                                                 | 18 |
| Figura 4: Centro organizador de Spemann-Mangold.....                                                                                                                                             | 19 |
| Figura 5. Vía de señalización de Wnt. ....                                                                                                                                                       | 21 |
| Figura 6. Ric-8A en la vía de señalización de proteína G heterotrimérica. ....                                                                                                                   | 27 |
| Figura 7. Representación gráfica del ensayo de conjugación Zona Marginal Dorso-Lateral/Caperuza Animal.....                                                                                      | 45 |
| Figura 8: Representación gráfica del procesamiento de los datos bioinformáticos utilizados en esta tesis. ....                                                                                   | 49 |
| Figura 9. Efecto del silenciamiento de Ric-8A sobre la inducción de la cresta neural.....                                                                                                        | 56 |
| Figura 10. Análisis cualitativo del efecto de la pérdida de función y rescate de Ric-8A sobre la formación del mesodermo. ....                                                                   | 57 |
| Figura 11. Análisis cuantitativo del efecto de la pérdida de función de Ric-8A en la expresión de <i>chd</i> , <i>gsc</i> , <i>xbra</i> y queratina <i>xk81a1</i> en embriones en gástrula. .... | 58 |
| Figura 12. Efecto del silenciamiento de Gαq sobre la inducción de la cresta neural. ....                                                                                                         | 64 |
| Figura 13. Análisis cualitativo del efecto del silenciamiento y rescate de Gαq sobre la formación del mesodermo. ....                                                                            | 65 |
| Figura 14. Análisis cuantitativo del efecto de la pérdida de función de Gαq en la expresión de <i>chd</i> , <i>gsc</i> , <i>xbra</i> y queratina <i>xk81a1</i> en embriones en gástrula. ....    | 66 |
| Figura 15. Efecto del silenciamiento de Gαi2 sobre la inducción de la cresta neural.....                                                                                                         | 70 |
| Figura 16. Efecto del silenciamiento de Gαi2 sobre la formación del mesodermo.....                                                                                                               | 71 |
| Figura 17. Efecto del rescate de la expresión de <i>chd</i> y <i>gsc</i> con Gαq en embriones morfantes para Ric-8A.....                                                                         | 74 |

|                                                                                                                                                                            |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figura 18. Efecto del silenciamiento de Ric-8A y Gαq en la formación de tejido neural.....</b>                                                                          | <b>77</b>  |
| <b>Figura 19. Efecto del silenciamiento de Ric-8A y su rescate con Gαq en la ZMDL durante la inducción de CN en ensayos de conjugación. ....</b>                           | <b>80</b>  |
| <b>Figura 20. Efecto del silenciamiento de Gαq en la ZMDL durante la inducción de CN en ensayos de conjugación. ....</b>                                                   | <b>81</b>  |
| <b>Figura 21. Expresión diferencial de genes en tejido de zona marginal dorsal (ZMD) y cresta neural (CN) en base a datos de ARN-seq en <i>Xenopus laevis</i>.....</b>     | <b>85</b>  |
| <b>Figura 22. Términos GO enriquecidos de los genes diferencialmente expresados en zona marginal dorsal y ortólogos entre <i>X. laevis</i> y <i>X. tropicalis</i>.....</b> | <b>93</b>  |
| <b>Figura 23. Redes de interacción proteica entre los genes diferencialmente expresados y ortólogos en ZMD.....</b>                                                        | <b>95</b>  |
| <b>Figura 24. Términos GO enriquecidos de los genes diferencialmente expresados en cresta neural y ortólogos entre <i>X. laevis</i> y <i>X. tropicalis</i>....</b>         | <b>97</b>  |
| <b>Figura 25. Redes de interacción proteica entre los genes diferencialmente expresados y ortólogos en cresta neural. ....</b>                                             | <b>99</b>  |
| <b>Figura 26. Modelo Final. ....</b>                                                                                                                                       | <b>119</b> |

## RESUMEN

La cresta neural (CN) es un tejido embrionario pluripotencial, transitorio y característico en vertebrados, que es inducido en el borde de la placa neural y puede diferenciarse a distintos tejidos. Para su inducción y mantención, requiere de señales provenientes del mesodermo dorsal, ectodermo neural y no neural, que permiten su desarrollo y posterior migración a lo largo del embrión. Se ha descrito que tanto la proteína Ric-8A como Gαq se expresan en tejido de CN y mesodermo dorsal. Además, resultados previos evidencian que, tanto Ric-8A como Gαq son necesarios para la correcta inducción de la CN, así como también que Gαq se encuentra regulando a la vía Wnt en el mesodermo dorsal, tejido donde se encuentra el organizador de Spemann-Mangold, lo que nos permitió asociar todas estas proteínas con la formación del mesodermo y con ello presentar nuestra hipótesis de trabajo “La señalización mediada por Ric-8A/Gαq regula la formación del mesodermo dorsal necesaria para la correcta inducción de la cresta neural en conjunto con otras vías de señalización involucradas, en *Xenopus tropicalis*”. Para responder a ésta, se realizaron ensayos de pérdida y ganancia de función, tanto de Ric-8A como Gαq, en los cuales se determinó que el silenciamiento de ambas proteínas inhibe la expresión del marcador de CN *snail2*, por lo que ambas proteínas estarían regulando la inducción de CN. El análisis, por medio de hibridación *in situ*, de la expresión de los marcadores de mesodermo (*chordin*, *goosecoid*, *xbra*) y de ectodermo queratina *xk81a1* al silenciar a Ric-8A, evidencia la inhibición de la expresión de *chordin* y *goosecoid*, sin embargo, al realizar el análisis por medio de RT-qPCR, disminuye la expresión de *goosecoid*, mientras que la expresión de queratina aumenta, sugiriendo que Ric-8A regula la formación del mesodermo y ectodermo no neural. Por otro lado, el silenciamiento de Gαq evidenció la inhibición de la expresión de *goosecoid* y *xbra*, al emplear ambas técnicas, sugiriendo que Gαq regula la formación del mesodermo. Ensayos de epistasis del silenciamiento de Ric-8A con

Gαq, mostraron que Gαq rescata el fenotipo anormal observado, indicando que ambas proteínas estarían en la misma vía de señalización regulando la formación del mesodermo. Ensayos de recombinación de tejidos también respaldan que la vía de señalización Ric-8A/Gαq es necesaria en la inducción de CN, específicamente en la zona marginal dorso-lateral del mesodermo, ya que al silenciar estas proteínas en dicho tejido, se inhibe la inducción de la CN. Además, la expresión del marcador neural *sox2* también se ve afectada al inhibir la expresión de Ric-8A y Gαq, sugiriendo que ambas proteínas, además, estarían regulando la formación del ectodermo neural. Ensayos realizados con el fin de determinar si otra subunidad Gα pudiera estar involucrada en el efecto observado con la disminución de los niveles de Ric-8A, muestran que Gαi2 no estaría involucrada. Finalmente, análisis bioinformáticos de expresión diferencial de genes empleando secuencias de ARN-seq de Zona Marginal Dorsal y CN, en conjunto con análisis de enriquecimiento de términos GO, evidencian la importancia de procesos biológicos asociados al desarrollo de tejidos, migración celular y regulación de vías de señalización como Wnt y BMP en estos tejidos. Además, empleando el programa STRING se comprobó que proteínas pertenecientes a la vía de señalización de proteína G heterotrimérica están presentes en la zona marginal dorsal, región correspondiente al organizador de Spemann-Mangold, y CN, en conjunto con proteínas de la vía Wnt, FGF, BMP, y Hedgehog. Todos estos resultados en conjunto nos permiten sugerir que la señalización de Ric-8A/Gαq regula la correcta formación del mesodermo dorsal, ectodermo neural y no neural, necesarias para la inducción de la CN, en conjunto con otras vías de señalización.

## ABSTRACT

The neural crest (NC) is a pluripotent, transient embryonic tissue unique to vertebrates. It forms at the edge of the neural plate and can differentiate into various cell types and tissues. For its induction and maintenance, the NC requires signals from the dorsal mesoderm, neural and non-neural ectoderm, which support its development and subsequent migration throughout the embryo. Previous studies have shown that both Ric-8A and Gαq proteins are expressed in NC tissue and dorsal mesoderm. Furthermore, prior results show that both Ric-8A and Gαq are necessary for proper NC, with Gαq also regulating the Wnt pathway within the dorsal mesoderm, a region associated with the Spemann-Mangold organizer. Based on this, our hypothesis is: “Ric-8A/Gαq-mediated signaling regulates dorsal mesoderm formation required for proper NC induction in coordination with other signaling pathways in *Xenopus tropicalis*”. To test this hypothesis, we performed gain- and loss-of-function experiments for both Ric-8A and Gαq. Knocking down either protein inhibited the expression of the NC marker *snail2*, suggesting both proteins play a role in NC induction. Additionally, *in situ* hybridization analysis of mesodermal markers (*chordin*, *goosecoid*, *xbra*) and ectodermal marker keratin *xk81a1* upon Ric-8A knockdown revealed inhibited expression of *chordin* and *goosecoid*. Quantitative RT-qPCR analysis further showed decreased *goosecoid* expression and increased keratin expression, suggesting Ric-8A role in regulating dorsal mesoderm and non-neural ectoderm formation. On the other hand, knockdown of Gαq inhibited *goosecoid* and *xbra* expression across both methods, indicating Gαq involvement in mesoderm formation. Epistasis assays of Ric-8A knockdown with Gαq showed that Gαq could rescue the abnormal phenotype observed, indicating both proteins act within the same signaling pathway to regulate mesoderm formation. Tissue recombination assays further confirmed that Ric-8A/Gαq signaling is essential for NC induction, specifically in the dorsolateral marginal zone of the mesoderm, thus

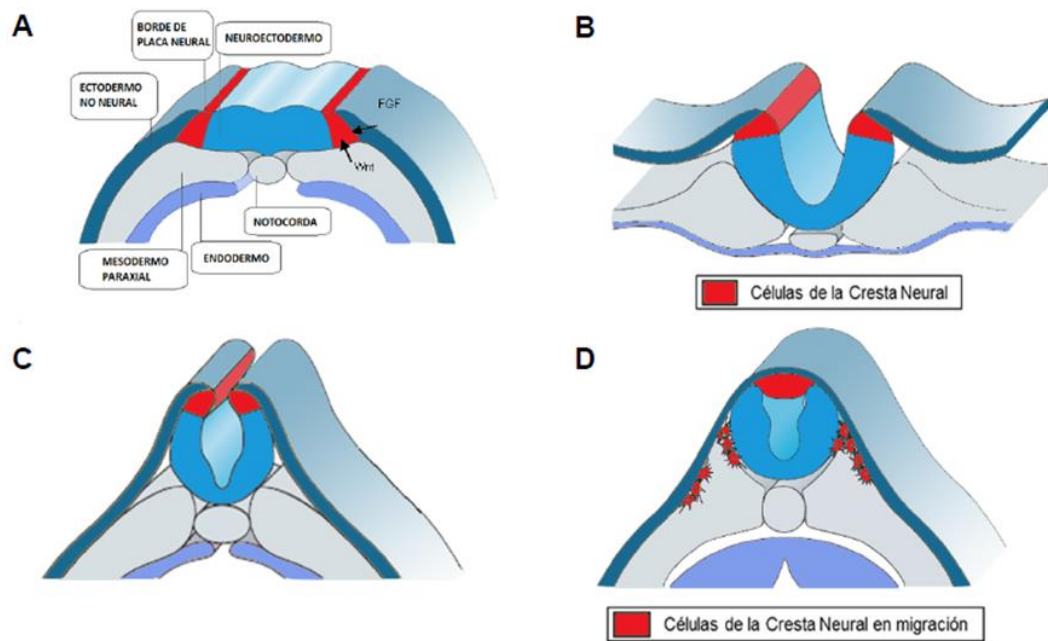
knocking down these proteins in this region inhibited NC induction. Additionally, the expression of the neural marker *sox2* was disrupted by Ric-8A and Gαq knocking down, suggesting these proteins also regulate neural ectoderm formation. Further assays ruled out the involvement of another Gα subunit, Gαi2, in the effect observed with Ric-8A knockdown. Finally, bioinformatics analysis of differential gene expression using RNA-seq data from the dorsal marginal zone and NC, along with GO term enrichment analysis, showed the importance of biological processes associated with tissue development, cell migration and the regulation of Wnt and BMP signaling pathways in these regions. STRING analysis confirmed that proteins belonging to the heterotrimeric G protein signaling pathway are present in the dorsal marginal zone, a region corresponding to the Spemann-Mangold organizer, and NC, along with proteins from the Wnt, FGF, BMP, and Hedgehog pathways. Taken together, these findings suggest that Ric-8A/Gαq signaling regulates proper formation of the dorsal mesoderm, neural and non-neural ectoderm, all of which are essential for NC induction, in coordination with other signaling pathways.

## INTRODUCCIÓN

### 1.- Cresta neural:

La cresta neural (CN) es una población celular embrionaria transitoria, pluripotencial y única en vertebrados, que se caracteriza por su alta capacidad migratoria y su diferenciación en una amplia gama de tejidos como neuronas y glías del sistema nervioso periférico, melanocitos y gran parte del tejido conectivo de la estructura cráneo facial (Stuhlmiller, y García-Castro. 2012).

La CN se origina a partir de la zona dorsal del tubo neural en desarrollo, específicamente en el borde de la placa neural, como consecuencia de una serie de señales moleculares producidas en el límite entre el ectodermo neural y no neural durante la etapa de neurulación (Prasad y col., 2013). Posteriormente, los bordes de la placa neural se fusionan provocando el cierre del tubo neural, conteniendo las células de la CN (Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008). A su vez, las células de la CN sufren el proceso conocido como transición epitelio-mesenquimal para posteriormente migrar a través del embrión y generar los tejidos antes mencionados (Figura 1) (Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008).



**Figura 1. Formación de la CN en vertebrados.** (A) El proceso de inducción de la CN tiene su origen en el borde de la placa neural, el cual recibe señales moleculares provenientes del ectodermo neural, no neural y mesodermo, tales como Wnt, FGF, entre otras. A medida que transcurre la etapa de neurulación, los pliegues laterales de la placa neural se elevan hacia la línea media axial (B y C), y finalmente se fusionan permitiendo el cierre del tubo neural (D), y la migración de las células de la CN (Modificado de Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008).

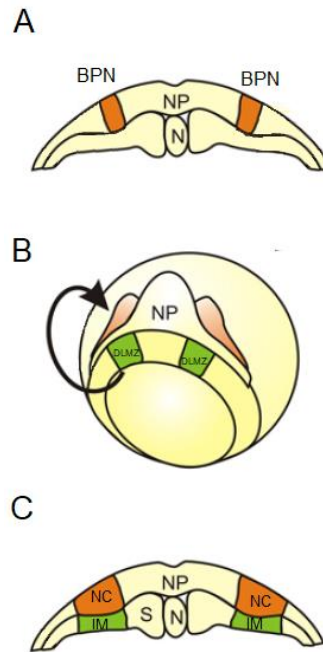
El tejido de CN se divide en 4 subpoblaciones (craneal, cardíaca, vagal, y troncal-sacra), las cuales adquieren diferentes formas de migración y rutas migratorias (Gilbert, 2005). En este proyecto de tesis nos centraremos en el estudio de la CN Craneal.

## **2.- Inducción de la cresta neural:**

La inducción celular es un proceso en el cual un tejido inductor libera una señal capaz de provocar un cambio en la dirección de diferenciación del tejido que la recibe (Gurdon,1987). Un modelo de estudio de este proceso es la inducción de la CN, donde el tejido del ectodermo recibe señales de especificación para su posterior conversión a placa neural; a partir de la cual, el borde de la placa neural será inducido a CN producto de las señales recibidas de los tejidos adyacentes (Prasad y col., 2013). Se ha descrito la inducción de la CN como un modelo de tres pasos: el primero consiste en la especificación de una serie de marcadores de borde de la placa neural (como *Msx1/2*, *Pax3/7*, *Dlx3/5*, *Gbx2*, *Zic1*) en estadíos de gastrulación temprana, permitiendo así la inducción de este tejido (Prasad y col., 2013), en un segundo paso, la zona marginal dorso lateral, una región específica del mesodermo prospectivo, envía señales moleculares necesarias (como *Wnt8*, *Fgf4*, *Fgf8*, *Gdf6*) para la diferenciación del borde de la placa neural a CN y se posiciona bajo este tejido en estadíos de gástrula tardía diferenciándose a mesodermo intermediario (Schille y Schambony, 2017). Finalmente durante el tercer paso, el ectodermo neural y no neural, en conjunto con el mesodermo intermediario se encargan de mantener la identidad de las células de la CN durante las etapas de neurulación, por medio de la activación de diversas vías de señalización (como la mantención de un nivel intermedio de BMP generado por medio de un gradiente entre la liberación de *Bmp4* en el ectodermo no neural y antagonistas de BMP en el ectodermo neural; la

señalización de la vía Wnt proveniente del ectodermo no neural (Wnt7b) y mesodermo intermediario (Wnt8); y la señalización de FGF proveniente del ectodermo no neural y mesodermo intermediario, principalmente FGF8) (Huang y Saint-Jeannet, 2004, Steventon y Mayor, 2012) (Figura 2).

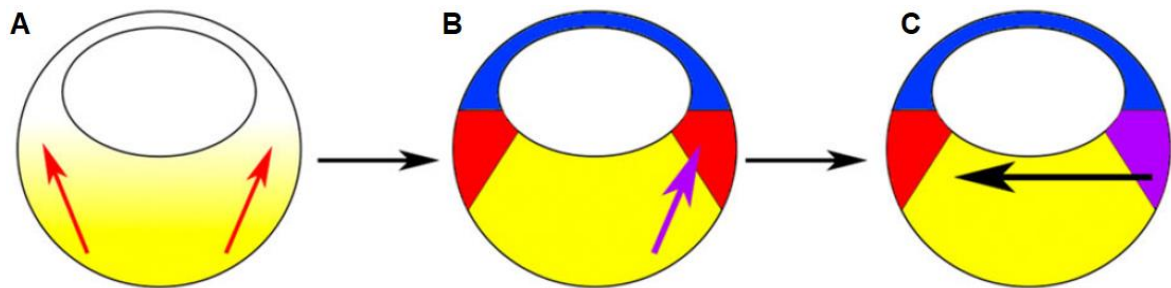
Se han identificado las vías de señalización BMP, Wnt, FGF y Notch como implicadas en las diferentes etapas del desarrollo de la CN, las que estarían actuando en conjunto para la activación de distintos factores de transcripción, entre los que destacan especificadores del borde de la placa neural (tales como Msx1/2, Pax3/7, Dlx3/5, Gbx2, Zic1), especificadores de la CN (como Snail1/2, FoxD3 Sox8/9, Twist) y factores relacionados con la transición epitelio mesenquimal/migración de CN (Snail1/2, Twist, FoxD3, Sip1/Zeb2, Sox9/10) (Prasad y col., 2013).



**Figura 2. Modelo de inducción de la cresta neural.** El proceso de inducción de la CN comienza con la especificación de los marcadores de borde de la placa neural **(A)**. Posteriormente, la zona marginal dorso lateral envía señales necesarias para la inducción del borde de placa neural a CN **(B)**, posicionándose bajo éste y diferenciándose a mesodermo intermediario. Finalmente, el mesodermo intermediario y ectodermo adyacente mantienen al tejido de la CN **(C)**. N: Notocorda, NP: Placa Neural, BPN: Borde de la Placa Neural, DLMZ: Zona Marginal Dorso Lateral, NC: Cresta Neural, IM: Mesodermo Intermediario (Modificado de Steventon y col., 2009).

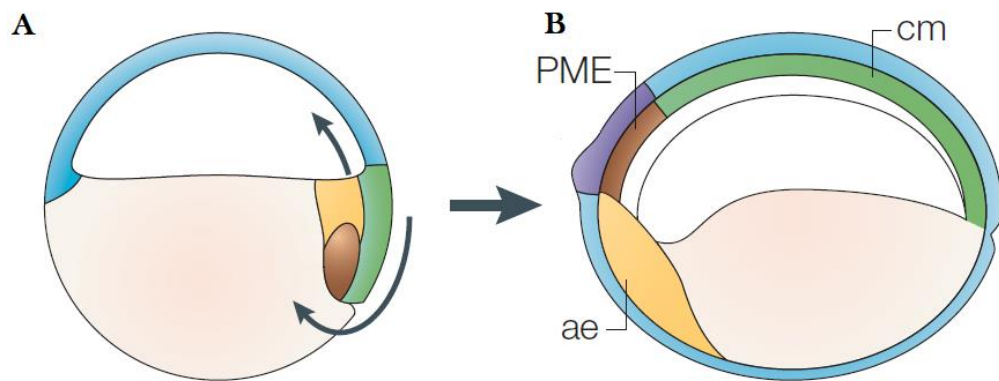
### **3.- Formación del mesodermo:**

El mesodermo es uno de los tres tejidos primordiales en el desarrollo del embrión (Gilbert, 2005). Este tejido se origina en etapas de blástula, mediante señales inductoras provenientes del endodermo, las cuales generan un cambio en la dirección de diferenciación del ectodermo adyacente, dando origen al mesodermo dorsal y ventral (Gilbert, 2005). Esta diferenciación polarizada depende de la polaridad del tejido endodérmico, condicionada por la entrada del espermatozoide durante la fertilización (De Robertis y Kuroda, 2004). Durante la entrada del espermatozoide, se lleva a cabo un proceso denominado rotación cortical, el cual establece la zona dorsal del embrión, ubicándola en el polo opuesto a dicha entrada, dando origen al centro de Nieuwkoop (Gilbert, 2005). El proceso de inducción del mesodermo consiste en un modelo de tres señales: la primera señal inductora del mesodermo general está compuesta por ligandos como Xnr5, Xnr6, Activin, Vg1, y es otorgada por todas las células endodérmicas, provocando la diferenciación de todas las células ectodermales adyacentes a mesodermo (Kiecker y col., 2016). La segunda señal proveniente del centro de Nieuwkoop, compuesta principalmente por Wnt11 y Wnt5a por medio de la vía canónica, da origen al organizador de Spemann-Mangold en el mesodermo dorsal (Vonica y Gumbiner, 2007, Kiecker y col., 2016). La tercera señal, compuesta por Chordin, Goosecoid, Noggin, Frzb-1, Cerberus, se origina en etapas posteriores por el organizador de Spemann-Mangold, generando el modelamiento dorso-ventral del embrión (De Robertis, 2009) (Figura 3).



**Figura 3. Modelo de formación del mesodermo.** El proceso de formación del mesodermo comienza con señales provenientes del endodermo (Flecha roja) que generan la inducción del ectodermo adyacente a mesodermo **(A)**. Posteriormente, el centro de Nieuwkoop envía una señal (Flecha morada) para inducir la generación del organizador de Spemann-Mangold **(B)**, el cual genera un gradiente de señales (Flecha negra) que permiten establecer el eje dorsoventral del embrión **(C)**. En amarillo: Endodermo; en rojo: Mesodermo; en azul: Ectodermo; en violeta: Mesodermo dorsal (Modificado de Kiecker y col., 2016).

El organizador de Spemann-Mangold corresponde a un conjunto de tejidos capaces de enviar señales activadoras y/o inhibitoras de vías de señalización (Wnt, BMP, Nodal), que permiten el modelamiento dorsoventral del embrión. En *Xenopus*, este conjunto de tejidos se encuentra ubicado sobre el labio del blastoporo en etapas de gástrula, y luego de la gastrulación migran a través del embrión, abarcando desde la zona anterior hasta la zona posterior del embrión en etapas de néurula (Niehrs, 2004) (Figura 4).



**Figura 4: Centro organizador de Spemann-Mangold.** El centro organizador de Spemann-Mangold (representado de color amarillo, verde y café) se encuentra ubicado sobre el labio del blastoporo en embriones en etapa de gástrula de *Xenopus* (A). Durante el proceso de gastrulación, los distintos tejidos que lo componen se disponen desde la zona anterior a la zona posterior del embrión, dando origen a distintos tejidos (B). ae: Endodermo anterior; PME: Mesendodermo precordial; cm: Cordamesoderma; en celeste: Ectoderma; en morado: Placa neural anterior. (Modificado de Niehrs, 2004).

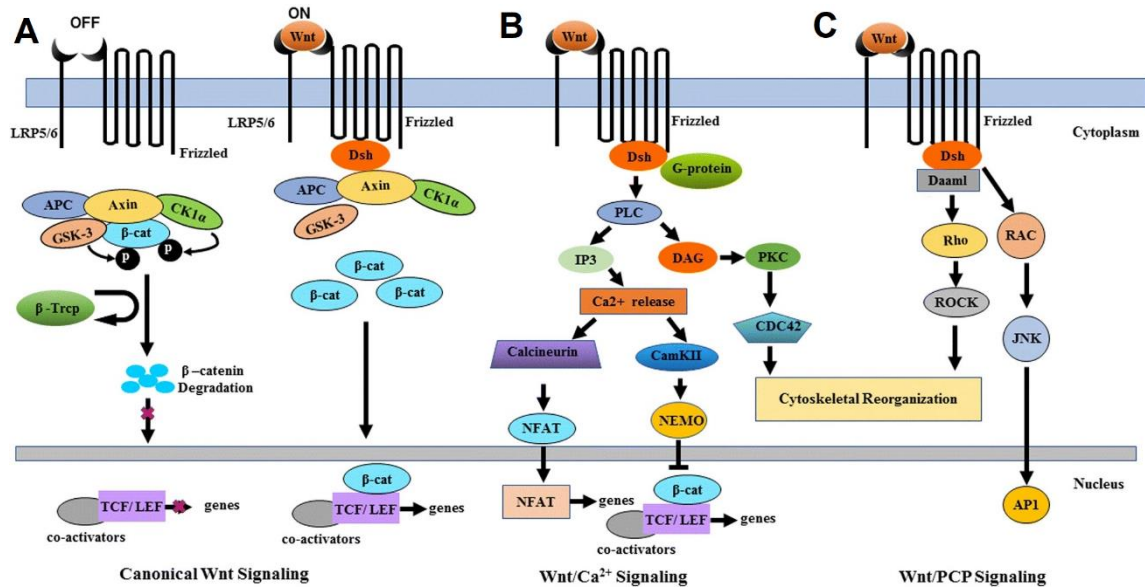
En este contexto, se ha visto implicada a la vía Wnt en procesos de formación, tanto del centro de Nieuwkoop, como del organizador de Spemann-Mangold, por lo cual, esta vía de señalización estaría jugando un rol crucial durante la formación del mesoderma (Vonica y Gumbiner, 2007), motivo por el cual se detallará a continuación, el funcionamiento de dicha vía.

#### **4.- Vía de señalización de Wnt:**

Las moléculas Wnts (wingless-related integration site) son glicoproteínas secretadas por las células las cuales actúan como ligando, uniéndose a receptores de 7 dominios transmembrana denominados Frizzled (receptor acoplado a proteína G atípico), y activando la vía de señalización de Wnt. Se ha descrito que las moléculas Wnt pueden actuar por medio de tres cascadas de señalización distintas: la vía de Wnt/beta-catenina (canónica), la vía de Wnt/PCP y la vía de Wnt/Ca<sup>+2</sup> (estas últimas denominadas no canónicas) (Niehrs, 2012).

En la vía de señalización de Wnt/beta-catenina, la unión de Wnt al receptor Frizzled permite la estabilización de la beta catenina en el citosol, la cual, en ausencia de la señal de Wnt, es degradada por proteosomas (Archbold y col., 2012). La beta catenina estabilizada transloca al núcleo de la célula y se une a los factores de transcripción TCF/LEF para activar la transcripción de genes diana de Wnt (Fig. 5A) (Archbold y col., 2012). Por otro lado, se ha descrito que la vía de Wnt/Ca<sup>+2</sup>, conduce a una liberación de calcio intracelular el cual, vía calmodulina es capaz de activar a la fosfatasa calcineurina, que a su vez defosforila al factor de transcripción NF-AT, permitiéndole translocar al núcleo (Fig. 5B) (Huelsken y Behrens, 2002). Finalmente, la vía de Wnt/PCP regula la organización del citoesqueleto y la polaridad celular, y se ha asociado a la

activación de GTPasas pequeñas como Rho y Rac (Fig. 5C) (Huelsken y Behrens, 2002).



**Figura 5. Vía de señalización de Wnt.** En la vía de señalización canónica de Wnt/beta-catenina (A), en ausencia del ligando, se genera un complejo proteico de destrucción que se une y fosforila a beta-catenina, llevándola a degradación; cuando el ligando se une al receptor Frizzled y LRP5/6, el complejo proteico se une al receptor por medio de disheveled, lo que permite a beta catenina traslocar al núcleo y unirse a los factores de transcripción TCF/LEF. En la vía no canónica de Wnt/Calcio (B), el receptor Frizzled es capaz de señalizar por medio de proteína G heterotrimérica, que activa a su vez a la PLC, IP3 y DAG, conduciendo finalmente a un aumento en los niveles de calcio intracelular. Finalmente, en la vía no canónica de Wnt/PCP (C) la unión del ligando al

receptor conduce a la activación de proteínas G pequeñas como Rho, Rac y Rock, que contribuyen a la reorganización del citoesqueleto (Modificado de Harb y col., 2019).

Aunque las proteínas Wnt no son específicas en la activación de las distintas vías de señalización implicadas a Wnt, se ha observado que las proteínas Wnt1, Wnt3A y Wnt8 activan principalmente a la vía canónica, mientras que las proteínas Wnt5A y Wnt11 se han asociado principalmente a las vías no canónicas (Kikuchi y col. 2011). Por otro lado, se han visto implicadas tanto proteínas Wnt asociadas a la vía canónica (Wnt8), como no canónica (Wnt5, Wnt11), en el proceso de desarrollo de la CN de *Xenopus* (Hong y col., 2008; Ossipova y Sokol, 2011), así como también el factor de transcripción Tcf3 (Heeg-Truesdell y LaBonne, 2006). En *Xenopus* y pez cebra se ha comprobado que la activación de genes *wnt* es de gran importancia para el funcionamiento del centro organizador dorsal en distintos estadios del desarrollo embrionario, y, por consiguiente, para el establecimiento del patrón dorsal-ventral, que contribuye a la posterior formación del mesodermo (Gurdon, 1992; Heasman y col., 1994).

Además, es sabido que los receptores Frizzled que participan en la vía de señalización de Wnt poseen características estructurales similares a los GPCR y se ha determinado que estos pueden transmitir señales a través de proteína G (Slusarski y col., 1997, Liu y col., 2001). Se ha visto también que los mediadores

de la vía no canónica de Wnt (IP3 y  $\text{Ca}^{2+}$ ) son de suma importancia para la formación del patrón dorsoventral en *Xenopus*, además de existir evidencia que respalda que algunas proteínas G estarían involucradas en la vía no canónica de Wnt, principalmente la vía Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  (Soto y col., 2007), por lo cual se profundizará a continuación en el funcionamiento de la vía de señalización de proteína G heterotrimérica.

#### **5.- Mecanismo de señalización de la proteína G heterotrimérica:**

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) responden a señales externas (ligandos) funcionando como un conducto físico para la transmisión de señales químicas por medio de la modulación de la proteína G (Birnbaumer y col., 2007). El mecanismo de señalización de la proteína G heterotrimérica se encuentra constituido por un receptor, una proteína G transductora de la señal y un efector encargado de amplificar la señal (Birnbaumer y col., 2007). Sin embargo, hoy se han descrito también los GPCR como moléculas mecanosensoras, permitiendo de esta forma activar su señalización río abajo frente a señales mecánicas del medio (Makino y col., 2006, Storch y col., 2012, Lin y col., 2022).

La proteína G es una proteína heterotrimérica constituida de tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Goldsmith y col., 2007). Cuando el receptor acoplado a proteína G se une a un ligando, ocurre un cambio conformacional en el receptor, que actuando

como un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF), genera el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$ , generando la disociación del heterotrímero en dos especies activas:  $G\alpha$ -GTP y  $G\beta\gamma$ , capaces de regular a distintos efectores de manera independiente (Goldsmith y col., 2007). La señalización termina cuando la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad  $G\alpha$  hidroliza GTP a GDP, lo que provoca que  $G\alpha$  se vuelva a asociar a  $G\beta\gamma$ , conformándose nuevamente el heterotrímero inactivo (Figura 6) (Sato y col., 2006). En base a su similitud de secuencia, funcionalidad y estructura, las subunidades  $G\alpha$  han sido clasificadas en cinco familias:  $G_s$ ,  $G_i/o$ ,  $G_q/11$ ,  $G_{12/13}$  y  $G_v$ ; (Oka y col., 2009; Simon y col., 1991).

Por otra parte, se ha descrito la participación de la proteína G heterotrimérica durante la embriogénesis de especies como rana, mosca, ratón, humano (Malbon, 2005). En este sentido, se ha observado que dicha vía de señalización podría estar involucrada en la formación y establecimiento de los ejes principales durante la embriogénesis temprana (Wu y col. 2012; Winkler y Prömel, 2016).

Un estudio de sobreexpresión de la vía  $G_{\alpha q}/Ca^{2+}$  en *Xenopus laevis* ha demostrado una fuerte inhibición de genes mesodermales y marcadores del organizador de Spemann-Mangold (*gooseoid (gsc)* y *chordin (chr)*), además de observarse un fenotipo de ventralización, el cual estaría asociado a los defectos

en el desarrollo de dicha capa germinal (Soto y col., 2007). Finalmente, se ha observado en estudios de hibridación *in situ* la expresión de Gαq y Gai2 en la zona marginal dorsal durante los estadios de gástrula (Chen y col., 2005, Fuentealba y col., 2016); por lo tanto, estos últimos antecedentes sugieren que la vía de transducción de la subunidad Gαq podría ser requerida para la correcta expresión de genes dorso-mesodermales necesarios para la formación del mesodermo (Soto y col., 2007). En este sentido, hemos observado que Gαq estaría involucrado en el proceso de inducción de la CN, ya que al silenciar la expresión de esta proteína no hay expresión del marcador de CN *snail2* (Rodríguez, 2016, Tesis de Magister). Esto podría estar directamente relacionado con la ausencia de tejido mesodermal (tejido inductor de la CN) al silenciar Gαq.

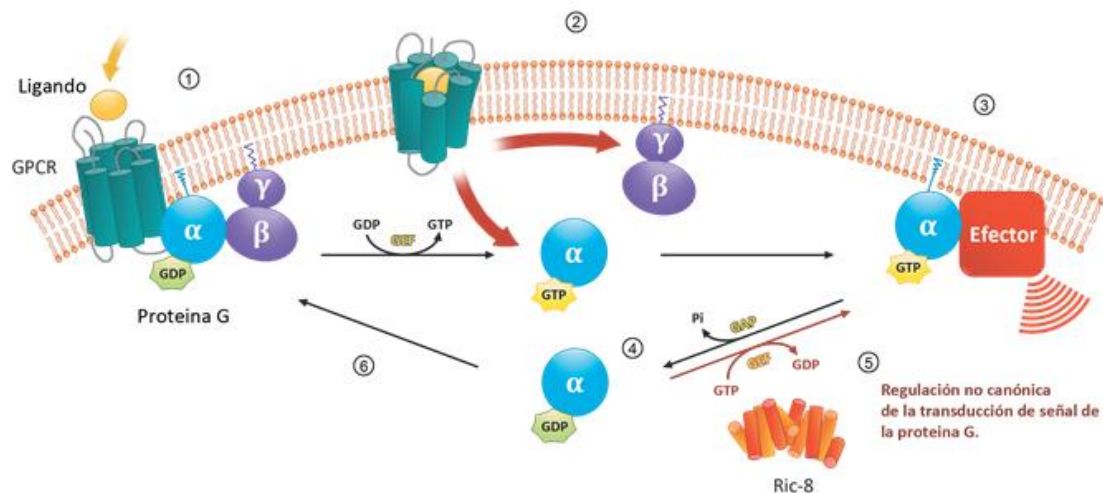
Por otro lado, existen otras vías no canónicas de activación de la señalización de la proteína G heterotrimérica, entre las cuales se ha descrito a Ric-8 como un modulador de tipo GEF para estas (Siderovski y Willard, 2005; Cismowski, 2006; Tall, 2013; Garcia-Marcos, 2024), lo cual se discutirá en la siguiente sección.

## **6.- Resistencia a inhibidores de la Colinesterasa 8 (Ric-8):**

La proteína citosólica Ric-8, actúa como GEF (del inglés: *Guanine nucleotide Exchange Factor*) para la subunidad Gα de proteína G heterotrimérica, además esta proteína es altamente conservada en vertebrados e invertebrados, y

participa en diversas vías dependientes e independientes de GPCR (Tall, 2013). En mamíferos se han descrito dos genes ortólogos para Ric-8, estos son Ric-8A y Ric-8B, donde el primero tiene actividad como GEF *in vitro* para Gai/q/12/13, pero no para Gas (Tall y col. 2003); mientras que el segundo tiene mayor afinidad por Gas/q (Tall y col. 2003; Romo y col. 2008).

El mecanismo elucidado de intercambio de nucleótidos de guanina mediados por Ric-8 consiste en la interacción de Ric-8 con la subunidad  $G\alpha$  unida a GDP y libre de la subunidad  $G\beta\gamma$  que provoca la liberación de GDP y forma un complejo con  $G\alpha$ , el cual es estable y libre de nucleótidos (Tall y col., 2003). Luego GTP se une a  $G\alpha$  interrumpiendo el complejo, liberando a Ric-8 y dejando a la proteína  $G\alpha$  activada (Tall y col., 2003) (Figura 6).



**Figura 6. Ric-8A en la vía de señalización de proteína G heterotrimérica.** La vía de señalización de proteína G heterotrimérica es activada por medio de la unión de un ligando al receptor acoplado a proteína G (GPCR) **(1)**, generando un cambio conformacional en el receptor que permite el intercambio de GDP a GTP en la subunidad Gα y la disociación del heterotrímero en Gα y Gβγ **(2)**. La subunidad Gα-GTP activa se unirá a su efector, activando así cascadas de señalización río abajo **(3)**. Producto de su actividad GTPasa intrínseca, Gα hidrolizará el GTP a GDP, alcanzando así su estado inactivo **(4)**. Ric-8 es capaz de unirse a Gα-GDP y generar el intercambio nuevamente de GDP por GTP, activando nuevamente a la subunidad Gα en ausencia del receptor **(5)**. Finalmente, Gα-GDP se unirá nuevamente a Gβγ y al receptor **(6)**. (Leal, 2018, Tesis de Magister).

Estudios realizados en *Xenopus tropicalis*, en nuestro laboratorio, permitieron demostrar la presencia del parálogo Ric-8A, el cual se expresa durante la

embriogénesis, al igual que las subunidades  $G\alpha$ , principalmente en el tejido neural, la CN y tejido derivado de crestas neurales, así como también en estadíos de gástrula en la zona marginal dorsal, región que cumple un rol clave en la inducción de la CN (Maldonado-Agurto y col., 2011; Fuentealba y col., 2016). Además, hemos demostrado que Ric-8A cumple un importante rol tanto en la inducción de la CN como en la formación de tejidos inductores como el mesodermo, ya que al realizar ensayos de silenciamiento de esta proteína no se observa la expresión de genes mesodermales (*gsc* y *chr*), ni del marcador de CN *snail2* (Rodríguez, 2016, Tesis de Magister). Además, ensayos de epistasis muestran que  $G\alpha_q$  es capaz de rescatar el fenotipo de expresión de *snail2* en embriones silenciados para Ric-8A (Rodríguez, 2016, Tesis de Magister). Por otro lado, hemos observado que tanto Ric-8A como  $G\alpha_q$  están en la misma vía de señalización controlando la migración de las células de la CN craneales a través de la regulación de los niveles de  $Ca^{2+}$  (Romero 2020, tesis de pregrado).

Por lo tanto, considerando estos antecedentes, junto con los anteriormente descritos para la proteína  $G\alpha_q$ , es que en este proyecto de tesis se pretende analizar la función de la vía de señalización Ric-8A/ $G\alpha_q$  durante la formación del mesodermo dorsal y con ello en la formación de la CN.

## 7.- Hipótesis:

Considerando que:

- 1.- Se ha descrito a Ric-8A como un GEF activador de la proteína Gαq (Tall y col. 2003).
- 2.- Ric-8A y Gαq se expresan en tejido de la CN en néurula, y en tejido de la zona marginal dorsal en gástrula de *Xenopus* (Maldonado-Agurto y col., 2011; Fuentealba y col., 2016).
- 3.- El silenciamiento de Ric-8A y de Gαq en embriones de *Xenopus tropicalis* genera la inhibición de la expresión del marcador de CN *snail2* en etapas de néurula, por lo que ambas proteínas podrían estar involucradas en procesos de inducción de la CN (Rodríguez, 2016, Tesis de Magister).
- 4.- El silenciamiento de Ric-8A afecta a la expresión de los marcadores de mesodermo dorsal (*goosecoid* y *chordin*), tejido necesario para la inducción de la CN. Además, estos marcadores son genes expresados en el centro organizador de Spemann-Mangold, el cual se encuentra ubicado en el mesodermo, por lo cual dicho organizador también podría estar siendo afectado por el silenciamiento de Ric-8A (Rodríguez, 2016, Tesis de Magister).
- 5.- Se ha determinado que los receptores tipo Frizzled de la vía de Wnt son capaces de transmitir señales a través de proteína G (Liu y col., 2001)

6.- Se ha descrito a otras vías de señalización, como la vía de Wnt, en procesos de desarrollo de CN y se destaca su importancia en el funcionamiento del centro organizador dorsal durante el desarrollo embrionario, tanto en *Xenopus* como en pez cebra (Gurdon, 1992; Heasman y col., 1994).

Sin embargo, en la actualidad, se desconoce la proteína G que podría estar regulando, en conjunto con Ric-8A, los procesos relacionados con el desarrollo del mesodermo dorsal y el organizador de Spemann-Mangold. Además, se desconoce si existe alguna conexión entre la señalización mediada por Ric-8A/Gαq y otras vías de señalización durante el desarrollo embrionario, a pesar de que se han implicadas en procesos asociados al desarrollo de la CN.

Con estos antecedentes, se plantea la siguiente hipótesis:

**“La señalización mediada por Ric-8A/Gαq regula la formación del mesodermo dorsal necesaria para la correcta inducción de la cresta neural en conjunto con otras vías de señalización involucradas, en *Xenopus tropicalis*”**

Para responder a esta hipótesis se definió como objetivo general del estudio:

“Determinar la función de la señalización mediada por Ric-8A/Gαq en la formación del mesodermo dorsal involucrado en la inducción de la cresta neural y su posible interacción con otras vías de señalización en *Xenopus tropicalis*”

Se proponen los siguientes objetivos específicos:

1.- Definir la función de Ric-8A/Gαq en la formación del mesodermo dorsal para la inducción de la cresta neural en *Xenopus tropicalis*.

1.1.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Ric-8A y rescate en la formación del mesodermo en embriones de *Xenopus*.

1.2.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Gαq y rescate en la formación del mesodermo en embriones de *Xenopus*.

1.3.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Gαi2 en la formación del mesodermo en embriones de *Xenopus*.

1.4.- Analizar, por medio de ensayos de epistasis, el rescate del fenotipo morfante de Ric-8A con la sobreexpresión de Gαq en la formación del mesodermo en embriones de *Xenopus*.

1.5.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Ric-8A y Gαq en la formación de la placa neural en embriones de *Xenopus*.

1.6.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Ric-8A y/o Gαq en la zona marginal dorso-lateral durante la inducción de cresta neural.

2.- Identificar las vías de señalización asociadas a la vía de proteína G heterotrimérica en tejidos de cresta neural y zona marginal dorsal en *Xenopus*.

2.1. Identificar genes con expresión diferencial en tejidos de cresta neural y zona marginal dorsal en *Xenopus*.

2.2. Determinar los procesos enriquecidos y las vías de señalización asociadas a proteína G entre los genes con expresión diferencial.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

### **Materiales:**

#### **Oligonucleótidos morfolino:**

Oligonucleótido morfolino control (MoCtl):

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

Oligonucleótido morfolino contra Ric-8A de *Xenopus* (MoRic-8A):

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

Oligonucleótido morfolino contra Gαq de *Xenopus* (MoGαq):

5'- TCC AGA GTC ATG CCT CCT GAC TGG T -3'

Oligonucleótido morfolino contra Gai2 de *Xenopus* (MoGai2):

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

#### **Vectores plasmidiales:**

Plásmidos para la síntesis de sondas y ARN mensajero mediante transcripción

*in vitro*:

|                            |                     |                         |
|----------------------------|---------------------|-------------------------|
| Para la síntesis de sonda: | <b>Gen</b>          | <b>Vector</b>           |
|                            | Slug (Snail2)       | pSP72/Slug              |
|                            | Queratina epidermal | pGEM1/XK81A1            |
|                            | Chordin             | pBS59-CHD               |
|                            | Goosecoid           | pBluescriptII SK(-)-Gsc |
|                            | Xbrachyury          | pSP73-Xbra              |
|                            | Sox2                | pBluescript SK+/Sox2    |

Para la síntesis de ARN mensajero: pCSC2+/6MycXtRic-8A

pCS2+MT/6MycXtGaa

### **Anticuerpos:**

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

### **Enzimas:**

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

Sp6 ARN polimerasa (Biolabs)

T7 ARN polimerasa (Biolabs)

Proteinasa K (Fermentas)

ADNasa I (Ambion)

Transcriptasa reversa M-MLV (Promega)

Taq ADN polimerasa mutante (Agilent Technologies)

## **Métodos:**

### **1.- Fertilización *in vitro*:**

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

La ovulación de las ranas hembra seleccionadas de *Xenopus tropicalis* se indujo mediante la inyección sub-cutánea de hormona Coriónica Gonadotropina Humana (HCG). La noche anterior a la fertilización, ranas tanto hembras como machos fueron inyectadas con 20 unidades de HCG. Al día siguiente, cuatro horas previas a la obtención de huevos, nuevamente todas las ranas fueron inyectadas con 200 unidades de HCG. Para la extracción de testículos desde el macho, el individuo se anestesió en benzocaína al 0,5% y luego se sacrificó y disectó los testículos a través de una incisión abdominal. Luego, estos últimos fueron macerados en medio L15 suplementado con 10% de FBS. Posteriormente, los huevos fueron extraídos y fertilizados con gotas de macerado de testículo incubando por 20 minutos en 1/9x MR (0.1 M NaCl, 1.8 mM KCl, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.0 mM Hepes-NaOH pH 7.4). A continuación, el

medio de las placas de fertilización se reemplazó con lavados con una solución de cisteína al 3% en 1/9x MR pH 7.9, con el objetivo de disolver la capa gelatinosa que los protege, proceso conocido como “De-Jellying” o desgelatinización. Finalmente, los embriones fueron lavados e incubados en 1/9x MR a 26°C. Dos horas post-fertilización, el medio se reemplazó por 1/20x MR con gentamicina a 100 µg/mL, manteniendo la misma temperatura hasta alcanzar los estadios correspondientes y fueron fijados. Para la fijación, los embriones seleccionados fueron colocados en un tubo eppendorf con solución MEMFA 1X (Formaldehído 3,7% p/v, 100 mM MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.4) y se dejaron rotar durante toda la noche a 4°C. Finalmente los embriones fueron lavados dos veces y conservados en etanol (Modificación de la metodología descrita por Sive y col., 2000).

## **2.- Microinyección de embriones con morfolidos y ARNm:**

Para los análisis de pérdida de función de Ric-8A, Gαq y Gαi2 sobre la inducción de la CN o formación del mesodermo, se emplearon 3 oligonucleótidos morfolidos (Mo) sintetizados por GeneTools®, los cuales tuvieron como objetivo impedir la traducción del ARN mensajero para cada proteína (Anexos I II y III); además se empleó un morfolino control, que no interacciona con ningún mensajero específico en *Xenopus*, que permitió determinar la toxicidad de los morfolidos empleados (morfolino contra Ric-8A (MoRic-8A): 5'-

GAGGGTACCCGGATCCATGGCTGGC-3'; morfolino contra Gαq (MoGαq): 5'-TCCAGAGTCATGCCTCCTGACTGGT-3'; morfolino contra Gai2 (MoGai2): 5'-CGACACAGCCCCAGATAGTGCGT-3'; morfolino control (MoCtl): 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'). La cantidad de morfolino empleada fue: MoRic-8A (20 y 25 ng), MoGαq (15, 20, 25 y 30 ng) MoGai2 (25, 30 y 35 ng) y MoCtl (25 ng). Para los análisis de rescate se inyectó, además de los morfolinos, ARN mensajero para Ric-8A o Gαq. Además, dichas condiciones fueron inyectadas en conjunto con el marcador de linaje Rodamina-Dextrano al 1%.

La microinyección se llevó a cabo en embriones en estadio 2 (2 blastómeros), para lo cual sólo se procedió a inyectar en un blastómero del embrión 2,1 nL de solución utilizando un microinyector Narishige IM300 y capilares de borosilicato como agujas finas para dicho procedimiento. Posteriormente, los embriones fueron traspasados a placas de agarosa al 1% con medio 1/9x MR y 2% Ficoll y se mantuvieron a 26°C por alrededor de 2 a 3 horas. Luego, el medio fue reemplazado por 1/20x MR con gentamicina hasta alcanzar los estadios requeridos (gástrula y néurula) y proceder a fijarlos como se describió anteriormente.

### **3.- Hibridación *in situ*:**

Se empleó la técnica de hibridación *in situ* como un método cualitativo, que permitió determinar la expresión espacial y temporal de marcadores tejido-específicos en embriones de *X. tropicalis* en etapas de gástrula y néurula. Los embriones fijados y guardados en etanol 100% fueron rehidratados con lavados sucesivos en soluciones de concentración decreciente de etanol y posteriormente con PTween (PBS 1X + 0,1% Tween20). Posterior a eso se permeabilizaron con proteinasa K 5mg/mL de PTween durante 3 min para permitir el ingreso de la sonda marcada al embrión. Luego fueron incubados con la sonda marcada de ARN específica durante toda la noche. Para la detección de la sonda se incubaron con anticuerpo anti-digoxigenina durante toda la noche a 4°C, y luego ésta fue revelada con NBT/BCIP (“Nitro-Blue Tetrazolium Chloride /5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt”) en buffer AP (“Alkaline Phosphatase buffer”, 100mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween 20) hasta observación de marca coloreada. La reacción cromogénica fue detenida con lavados con MAB (Maleic Acid Buffer) para luego fijar los embriones con solución de Bouin (70% ácido pícrico saturado/5% ácido acético glacial/25% formaldehído), que estabilizó la tinción de los embriones. Finalmente, los embriones fueron blanqueados con una solución de SSC 0,5X, formamida 5%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% y luz blanca hasta pérdida de pigmentación natural. Los embriones fueron lavados con SSC 1x, medio en el cual se procedió a realizar la fotodocumentación empleando un estereoscopio Olympus SZ61 y una cámara Leica

DFC450. Luego de la foto-documentación, los embriones fueron guardados a -20°C en etanol 100% (Modificación de la metodología descrita por Sive y col., 2000).

#### **4.- Transformación de bacterias quimio competentes:**

La transformación de bacterias *E. coli* DH5α quimio competentes fue necesaria para la obtención a gran escala de los plásmidos utilizados para la síntesis de sondas de ARN para hibridación *in situ* (pBluescriptII SK (-)-Gsc; pSP73-Xbra; pBS59-CHD; pGEM1/XK81A1; pSP72/slug; pBluescript SK+/Sox2) y ARNm a inyectar (pCSC2+/6MycXtRic-8A; pCS2+MT-XtGaq). Se agregó 10 ng de cada plásmido a 50 µL de bacterias químicamente competentes con Ca<sup>+2</sup>, las cuales fueron sometidas a shock térmico (30 minutos en hielo, luego 2 min a 42°C y finalmente 5 minutos en hielo) para el ingreso del plásmido. Posterior a eso se agregaron 500 µL de medio LB y se incubó a 37°C por 1 hora para expresión del plásmido. Se sembró 100µL del cultivo líquido en placas con antibiótico y se dejó incubando a 37°C durante toda la noche. De las colonias aisladas que se obtuvieron, se extrajo una y se depositó en un tubo Falcon con 3 a 5 mL de medio LB con antibiótico y se dejó incubar a 37°C hasta obtener turbidez (8 a 12 horas). 500µL del inóculo obtenido fueron añadidos a un matraz con 100 mL de medio LB con antibiótico y se incubó a 37°C durante toda la noche, bajo agitación. Finalmente se trasvasió el contenido a un frasco plástico de centrifuga y se

centrifugó a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se guardó el pellet a -20°C.

#### **5.- Purificación de plásmidos a gran escala:**

El pellet bacteriano obtenido durante la transformación de bacterias quimio competentes (detallada anteriormente) se resuspendió en 5 mL de solución I (5mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0), se lisó con 10 mL de solución II (1% SDS, 0,2 N NaOH), luego se neutralizó con 5 mL de solución III (3M acetato de sodio pH 5,2), y luego se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C por 15 minutos. El sobrenadante se incubó por 10 minutos con 0,6 volúmenes de isopropanol y se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C por 15 min. El pellet se lavó con etanol 70%, se añadió 3mL buffer TE pH 8 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-NaCl) junto con 3 mL de LiCl 5M para precipitar el ARN y se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Posteriormente se agregó 1 volumen de isopropanol y se centrifugó a 9.000 rpm a 4°C por 15 minutos. El pellet se lavó con etanol 70% y se incubó por 30 minutos en buffer TE con RNAsa A para eliminar el ARN restante. Se incubó con PEG 8.000 13% p/v NaCl 1,6M durante 10 minutos y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer TE pH 8 y se extrajo el ADN con 1 volumen de fenol/cloroformo centrifugando a 15.000 rpm por 5 min, separando la fracción acuosa con el ADN. Finalmente se precipitó el ADN toda la noche con 2 volúmenes de etanol 100% 1/10 volumen

de acetato de sodio 5 M y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos. El ADN plasmidial obtenido se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 200µL de agua libre de nucleasas.

#### **6.- Preparación sondas de ARN y ARNm:**

10 µg de ADN plasmidial obtenido durante la purificación de plásmidos a gran escala (descrito anteriormente) fueron digeridos con 3 µL de la enzima de restricción indicada para cada plásmido (EcoRI para *chordin* (*chr*) y queratina epidermal *xk81a1*, BamHI para *goosecoid* (*gsc*), BglII para *xbrachyury* (*xbra*) y *snail2*, XbaI para *sox2*, y NotI para *ric-8A* y *Gaq*) empleando 0,1 volúmenes del Buffer 10X correspondiente para cada enzima, en un volumen final de 100µL durante 4 horas a 37°C. Luego se purificó por medio de electroforesis en gel de agarosa 1% en tampón TAE 0,5x teñido con bromuro de etidio durante 4 horas a 40 voltios. El ADN fue extraído de la agarosa siguiendo el protocolo del kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel) y eluído con 30µL de agua libre de nucleasas.

Para las sondas de ARN, se realizó la transcripción *in vitro* de 1,5 µg de ADN en una solución que contiene buffer de transcripción 1x, 2µL de mix NTPs 10 mM marcados con digoxigenina, 16 unidades de ARNsin y la ARN polimerasa correspondiente (ARN polimerasa T7 para sondas contra *gsc*, *chr* y *xbra*, ARN

polimerasa Sp6 para sondas contra *snail2* y queratina epidermal *xk81a1*) (New England Biolabs). La reacción de transcripción se llevó a cabo a 37°C durante 2 horas, luego se incubó con ADNasa durante 15 minutos. El ARN se precipitó durante toda la noche con 25µL de solución de precipitación con LiCl (7,5M LiCl, 50mM EDTA) y se centrifugó a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Finalmente las sondas de ARN obtenidas fueron resuspendidas en 10µL de agua libre de nucleasas y se guardaron a -80°C.

Para la síntesis de ARN mensajero, 1.5 µg de ADN plasmidial digerido fue transcrito *in vitro* utilizando el kit mMessage mMachine SP6 (Ambion), generándose un ARN mensajero con un “cap” en el extremo 5'. El ARN mensajero fue purificado por medio de precipitación con solución de precipitación con LiCl (7,5M LiCl, 50mM EDTA; proporcionado por el kit), resuspendido en 10 µL de agua libre de nucleasas y guardado a -80°C.

## **7.- RT-qPCR:**

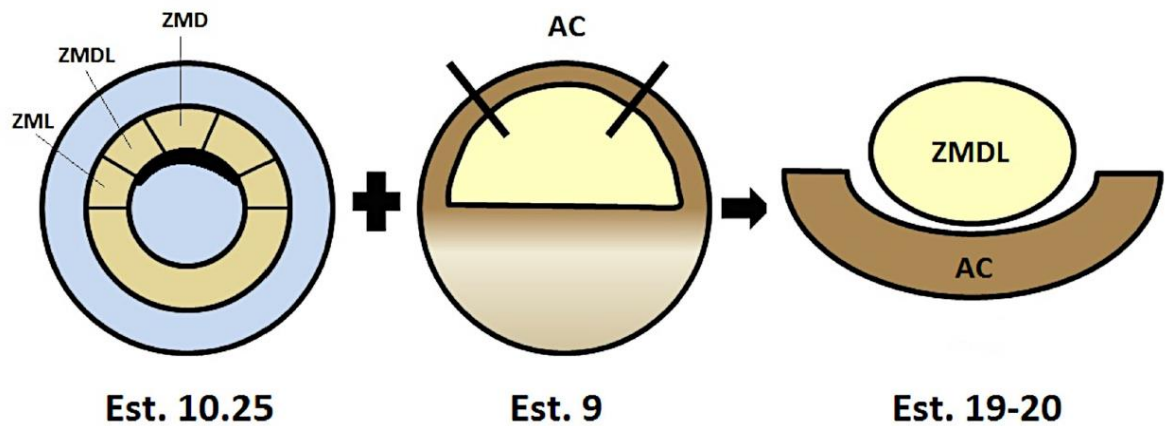
Se empleó la técnica de RT-qPCR como un método para cuantificar la expresión de marcadores tejido-específicos en embriones de *X. tropicalis* en etapas de gástrula. Los marcadores analizados fueron los mismos ya mencionados en las técnicas anteriores, en conjunto con los marcadores *sub-1*, *drosha* y *rpl8*, los cuales fueron empleados como control de la reacción de amplificación (genes

*housekeeping*) (Šindelka y col., 2006; Dhorne-Pollet y col., 2013; Mughal y col., 2018). Los embriones, luego de ser microinyectados y una vez alcanzados los estadios de gástrula (estadio 10), fueron seleccionados y se extrajo la mitad microinyectada del embrión. Luego fueron macerados y posteriormente se extrajo y purificó el ARN total con el Kit NucleoSpin RNA isolation (Macherey-Nagel), como describe el fabricante. La integridad del ARN total se comprobó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificó por absorciometría por medio de la medición con Nanodrop. Se procedió a realizar la transcripción reversa de 2 µg de ARN total por estadio, utilizando el protocolo del kit M-MLV reverse transcription (Promega), en un volumen final de 25 µL y utilizando oligo (dT) como partidor. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se realizó con el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies) utilizando el siguiente programa de 35 ciclos: denaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, denaturalización a 95°C por 30 segundos y alineamiento/extensión a 60°C por 30 segundos.

## **8.- Ensayos de conjugación:**

Para demostrar el efecto de la pérdida y rescate de función sobre la capacidad que posee la zona marginal dorso-lateral (ZMDL) de inducir la CN, se llevaron a cabo los ensayos de conjugación, los cuales tienen como objetivo conjugar un tejido inductor, en este caso la ZMDL, con un tejido pluripotencial con alta

capacidad de respuesta a señales inductoras, en este caso la caperuza animal (AC), y determinar si este último es capaz de diferenciarse a un nuevo tejido, en este caso CN. La metodología empleada se estandarizó en nuestro laboratorio para el modelo *X. tropicalis* a partir de la ya reportada para *X. laevis* (Monsoro-Burq y col., 2003). Para este procedimiento se realizaron dos fertilizaciones continuas con una hora de desfase, con el objetivo de obtener embriones en estadio 10,25 en la primera fertilización y embriones en estadio 9 en la segunda fertilización. Los embriones fueron colocados en placas Petri cubiertas con plastilina hidrofóbica y medio NAM (Normal Amphibium médium, 100mM NaCl, 2mM KCl, 1mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1mM EDTA, 1mM NaHCO<sub>3</sub>, 2mM fosfato de sodio pH 7,4) al 75% durante la disección. Se procedió a diseccionar regiones de AC de embriones en estadio 9 y regiones de la ZMDL de embriones en estadio 10,25. Posteriormente la ZMDL fue montada sobre la AC previamente diseccionada. Las conjugaciones fueron incubadas en NAM al 38% a 26°C. Durante el proceso se conservó una placa de embriones de la segunda fertilización sin diseccionar, con el objetivo de usarlos como control de tiempo. Finalmente, cuando los embriones control alcanzaron los estadios 19-20, las conjugaciones se fijaron en MEMFA para su posterior análisis por medio de hibridación *in situ*, metodología descrita en la sección 3 (Rodríguez, 2016, Tesis de Magister) (Figura 7).



**Figura 7. Representación gráfica del ensayo de conjugación Zona Marginal Dorso-Lateral/Caperuza Animal.** Esquema representativo del ensayo de conjugación de Zona Marginal Dorso-Lateral (ZMDL) y Caperuza Animal (AC). Primero, se extrae el tejido correspondiente a la AC de los embriones en estadio 9, luego se procede a extraer la ZMDL de los embriones en estadio 10,25 y se posiciona sobre la AC previamente extraída, la conjugación de ambos tejidos es fijada cuando alcanza el estadio 19-20.

## 9.- Obtención y procesamiento de datos públicos de ARN-Seq de cresta neural y zona marginal dorsal de *Xenopus laevis*:

Con el objetivo de identificar vías de señalización que se encuentren asociadas a la señalización de las proteínas Ric-8A/Gαq en tejidos de CN y zona marginal dorsal, se procedió a realizar un análisis de expresión diferencial de datos públicos de ARN-Seq de los tejidos ya mencionados en embriones de *X. laevis*. Para esto, las secuencias de CN empleadas fueron descargadas desde la base

de datos *Sequence Read Archives* (SRA) de NCBI, bajo el proyecto de estudio PRJNA400602, correspondiente a un estudio de secuenciación de ARN cuyo objetivo fue caracterizar la expresión génica de distintos tejidos de embriones de *X. laevis* en desarrollo (Plouhinec y col., 2017); mientras que las secuencias de zona marginal dorsal (ZMD) fueron descargadas desde la misma base de datos, pero del proyecto de estudio PRJNA674389, correspondiente a un estudio de secuenciación de ARN cuyo objetivo fue estudiar la transcriptómica de explantes de la ZMD en distintas etapas de desarrollo en *X. laevis* (Kakebeen y col., 2020). Los datos se descargaron usando el conjunto de herramientas otorgadas por el programa SRA Toolkits (Leinonen y col. 2011). Para determinar la calidad de los datos descargados se empleó el programa FastQC, (Andrews, 2010) y en base a este reporte se determinó el procesamiento de los datos para mejorar su calidad, que se llevó a cabo empleando el programa Trimmomatic (Bolger y col., 2014) (Figura 8A). Luego de obtener una buena calidad de las secuencias, se procedió a realizar un alineamiento con el genoma de referencia de *X. laevis*. Para ello se descargó, a partir de la base de datos XenBase (Karimi y col., 2018), el genoma de *X. laevis* en formato fasta y el archivo de anotación del genoma en formato “.gtf”. Luego se realizó el alineamiento de los datos al genoma de referencia empleando el programa TopHat2 (Kim y col. 2013) y se obtuvo un conteo del número de secuencias alineadas para cada gen presente en el genoma de *X. laevis* empleando el programa HTSeq (Anders y col., 2015) (Figura 8B). Finalmente, se realizó un análisis de expresión diferencial empleando el

programa DESeq2 (Love y col., 2014), a partir del cual se determinó los genes que se encuentran mayormente expresados, o inhibidos en el tejido de CN y zona marginal dorsal (Figura 8C).

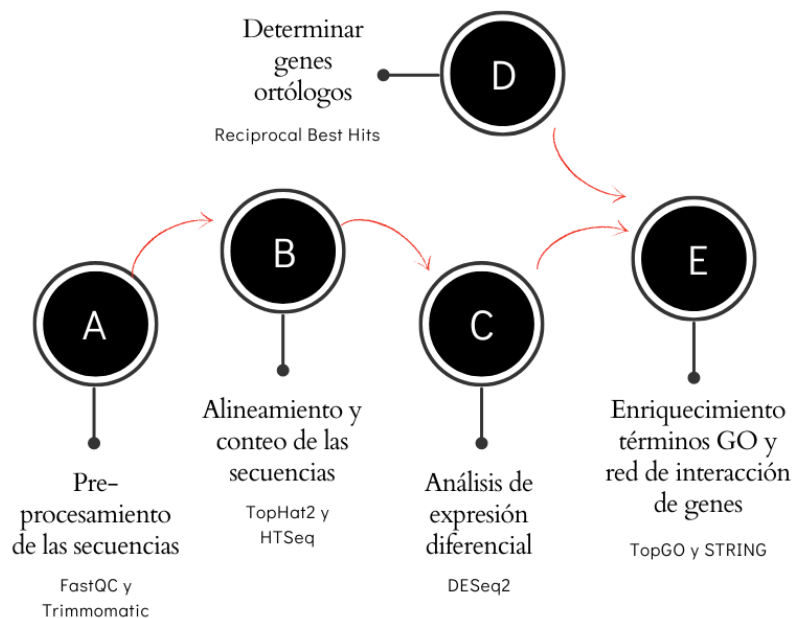
#### **10.- Identificación de genes ortólogos entre *X. laevis* y *X. tropicalis*:**

Considerando que los genes ortólogos son aquellos que divergieron después de un evento de especiación y mantienen su función ancestral (Fitch, 2000), se determinó la presencia de genes ortólogos entre las dos especies de *Xenopus* para poder extrapolar los resultados obtenidos en la sección 9 a la especie *Xenopus tropicalis* (modelo de estudio utilizado en esta tesis). Para ello, se descargó las secuencias de proteínas de *X. tropicalis* desde la base de datos XenBase (Karimi y col., 2018) y se identificaron genes ortólogos entre ambas especies mediante el análisis de Reciprocal Best Hit (Kristensen y col., 2011; Moreno-Hagelsieb y Latimer, 2008) (Figura 8D). Esta aproximación consiste en realizar búsquedas de similitud de secuencias mediante BLAST (Altschul y col., 1997; Camacho y col., 2009) entre dos especies, y si una secuencia codificante (proteína) X de la especie A coincide con la proteína X de la especie B, y viceversa; esas proteínas son consideradas como ortólogas (Kristensen y col., 2011; Moreno-Hagelsieb y Latimer, 2008). Finalmente, se determinaron y seleccionaron aquellos genes expresados de manera diferencial en *Xenopus laevis* que poseían

genes ortólogos en *Xenopus tropicalis*, obteniéndose así una lista de genes candidatos para su evaluación en diferentes vías de señalización.

#### **11.- Determinación de vías de señalización asociadas a genes ortólogos en *Xenopus tropicalis*, pero con expresión diferencial en *Xenopus laevis*:**

A partir del conjunto de genes ortólogos identificados, se determinó si existe enriquecimiento para ciertos procesos biológicos y funciones moleculares con el paquete de R topGO (Alexa y col., 2006) y, por medio de búsqueda bibliográfica, se determinó su relación con la vía de señalización de proteína G heterotrimérica. Finalmente, se buscó determinar si existe interacción entre los genes enriquecidos en los tejidos específicos, las vías de señalización que participan y como estas se asocian a la vía de señalización de proteína G, para esto, se determinaron las secuencias proteicas asociadas a cada gen, y luego, empleando la base de datos STRING (Szklarczyk, y col. 2023), se generó una red de interacción entre los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja, para cada tejido específico, tomando principal énfasis en aquellos asociados a la vía de señalización de proteína G heterotrimérica y otras vía de señalización, y utilizando como control la vía de Wnt y del organizador de Spemann-Mangold que ya han sido identificadas (Figura 8E).



**Figura 8: Representación gráfica del procesamiento de los datos bioinformáticos utilizados en esta tesis.** Diagrama de flujo que representa como se llevó a cabo el análisis bioinformático. Primero se realizó el procesamiento de las secuencias utilizando los programas FastQC y Trimmomatic **(A)**, luego las secuencias fueron alineadas con el genoma de *X. laevis* y contadas las secuencias utilizando los programas TopHat2 y HTSeq **(B)**, con estos datos se realizó el análisis de expresión diferencial empleando el programa DESeq2 **(C)**. En paralelo, con las secuencias de proteínas obtenidas desde la base de datos XenBase, se determinaron los genes ortólogos entre las especies de *X. laevis* y *X. tropicalis* empleando el programa Reciprocal Best Hits **(D)**, y se seleccionaron aquellos genes que fueran ortólogos y estuvieran diferencialmente expresados. Finalmente se determinaron los términos de ontología de genes enriquecidos con el programa TopGO y se identificaron las interacciones gen-gen con la base de datos STRING **(E)**.

## RESULTADOS

### **1.- Definir la función de Ric-8A/Gαq en la formación del mesodermo dorsal para la inducción de la cresta neural en *Xenopus tropicalis*:**

#### **1.1.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Ric-8A y rescate en la formación del mesodermo en embriones de *Xenopus*:**

Para analizar el efecto de la disminución de los niveles de Ric-8A sobre la formación del mesodermo fue necesario primero analizar la participación de Ric-8A en la inducción de la CN, para ello, se realizaron ensayos de pérdida de función, y se analizó el patrón de expresión del marcador de CN *snail2*, a través de la técnica de hibridación *in situ* en embriones en etapa de neurula, específicamente en estadio 16. Aunque en nuestro laboratorio ya se ha reportado el fenotipo morfante para Ric-8A en el proceso de inducción de la CN en *Xenopus* (Rodríguez, 2016, tesis de magíster), se repitió el ensayo para estandarizar la concentración de morfolino a la cual se obtiene el mayor porcentaje de embriones de *Xenopus tropicalis* con fenotipo de inhibición severo. Para esto, se observó el efecto que el morfolino contra Ric-8A (MoRic-8A) tiene sobre la inducción de la CN a través de la expresión de *snail2*. Embriones *Xenopus tropicalis* en estadio 2 (2 células) fueron inyectados con MoRic-8A en un solo blastómero, con el fin

de dejar la mitad del embrión como control sin inyectar, se dejaron crecer hasta estadio 16, se fijaron y finalmente se realizaron ensayos de hibridación *in situ*, por medio de los cuales se determinó la expresión de *snail2* en la mitad inyectada de dichos embriones en comparación con la mitad no inyectada.

Al estudiar el patrón de expresión de *snail2*, se observó una alteración en la inducción del tejido de CN de embriones inyectados con 20 y 25 ng de MoRic-8A, evidenciado por un fenotipo severo de inhibición de la expresión de *snail2* y, por consiguiente, de la inducción de la CN (Figura 9B, C) con respecto a la condición *wild-type* (Figura 9A). Para cuantificar el número de embriones silenciados, se determinó como fenotipo anormal a aquellos embriones donde se observa la inhibición de la inducción de la CN, evidenciado por la disminución o ausencia de la expresión de *snail2* en el lado inyectado del embrión, con respecto al lado no inyectado, mientras que se determinó como fenotipo normal a aquellos embriones que presentaron una expresión normal de *snail2* tanto en el lado inyectado como el no inyectado, y por ende, una correcta inducción de la CN. Usando este criterio, se observó que un 62% y 65% de los embriones inyectados presentaban un fenotipo anormal al silenciar a Ric-8A con 20 y 25 ng de morfolino, respectivamente (Figura 9D). En conclusión, estos resultados demuestran que la disminución de los niveles de la proteína Ric-8A afecta a la inducción de la CN, y, por consiguiente, esta proteína podría estar jugando un importante rol en el proceso de inducción de este tejido.

Luego, con el fin de determinar si este efecto de los niveles de Ric-8A sobre la inducción de la CN es producto de un efecto en estadios más temprano, se procedió a determinar el efecto de la disminución de los niveles de Ric-8A sobre la formación del mesodermo, encargado de regular la inducción de la CN. Para ello, se realizaron ensayos de pérdida de función y rescate, y se analizó el patrón de expresión de los marcadores de mesodermo dorsal, *chd* y *gsc*, el marcador pam-mesodermal *xbra* y el marcador ectodermal queratina *xk81a1*; a través de la técnica de hibridación *in situ* en embriones en etapa de gástrula, específicamente en estadio 10. Aunque en nuestro laboratorio ya se ha reportado el fenotipo morfante para Ric-8A en el proceso de formación de mesodermo en *Xenopus* (Rodríguez, 2016, tesis de magister), se repitió el ensayo para estandarizar la concentración de morfolino a la cual se obtiene el mayor porcentaje de embriones de *Xenopus tropicalis* con fenotipo de inhibición severo. Para esto, embriones *Xenopus tropicalis* en estadio 2 (2 células) fueron inyectados con 20 y 25 ng de MoRic-8A, con 25 ng de morfolino control (MoCtrl) y con 25 ng de MoRic-8A + 200 pg de ARNm de Ric-8A en un solo blastómero como se describió previamente, se dejaron crecer hasta estadio 10, se fijaron y finalmente se realizaron ensayos de hibridación *in situ*, por medio de los cuales se determinó la expresión de los marcadores mencionados.

Al analizar el patrón de expresión de los marcadores de mesodermo, se observó una inhibición en la formación del mesodermo dorsal evidenciado por la ausencia

de la expresión de los marcadores *chd* y *gsc* en el lado inyectado del embrión versus el lado no inyectado (control) al emplear 20 y 25 ng de MoRic-8A (Figura 10B, C, G, H), fenotipo que es rescatado al sobreexpresar a Ric-8A en condiciones morfantes para la misma proteína (Figura 10D, I). Por otro lado, no se observaron efectos en el patrón de expresión de los marcadores *xbra* y queratina *xk81a1* en embriones inyectados con 20 y 25 ng de MoRic-8A (Figura 10L, M, P, Q).

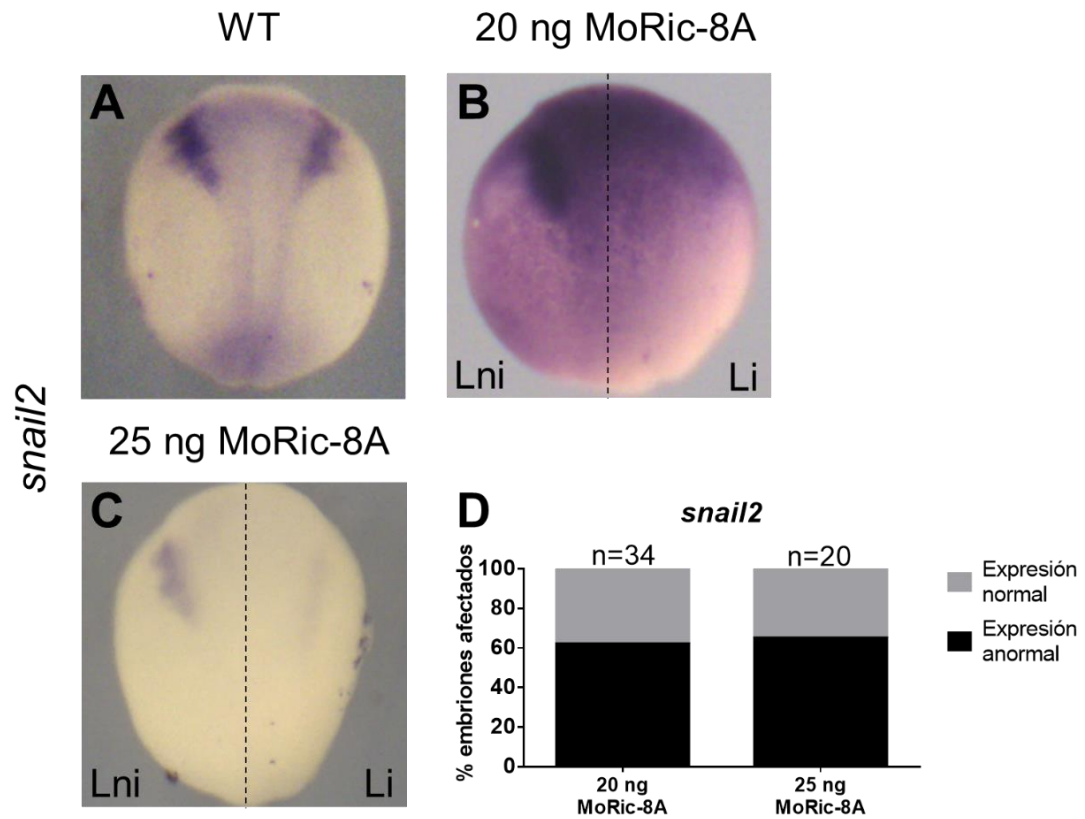
Para cuantificar el patrón de expresión de los marcadores de mesodermo y ectodermo observado, se consideró como fenotipo anormal a aquellos embriones que presentaron disminución o ausencia de la expresión del marcador analizado (en cada caso) en el lado inyectado versus el lado no inyectado (control), por otro lado, se consideró como fenotipo normal a aquellos embriones que presentaron una expresión normal en ambos lados del embrión. Utilizando este criterio, se determinó que un 19% de los embriones presentaban un fenotipo anormal de la expresión de *chd* al ser inyectados con 20 ng de MoRic-8A, mientras que al inyectar 25 ng de MoRic-8A, un 61% de los embriones presentaron un fenotipo anormal de la expresión de *chd*, porcentaje que disminuye a un 22% al rescatar la condición morfante con 200 pg de ARNm de Ric-8A (Figura 10E). Del mismo modo, se determinó que un 21% de los embriones presentaban un fenotipo anormal de expresión de *gsc* al inyectar 20 ng de MoRic-8A, porcentaje que aumenta a un 56% al emplear 25 ng de MoRic-8A, por otro lado, al rescatar la

condición morfante con 200 pg de ARNm de Ric-8A, solo 35% de embriones presenta un fenotipo anormal de *gsc* (Figura 10J). Por otro lado, se determinó que el 0% de los embriones presentó un fenotipo anormal de expresión de *xbra* y queratina *xk81a1* al inyectar 20 o 25 ng de MoRic-8A (Figura 10N, R).

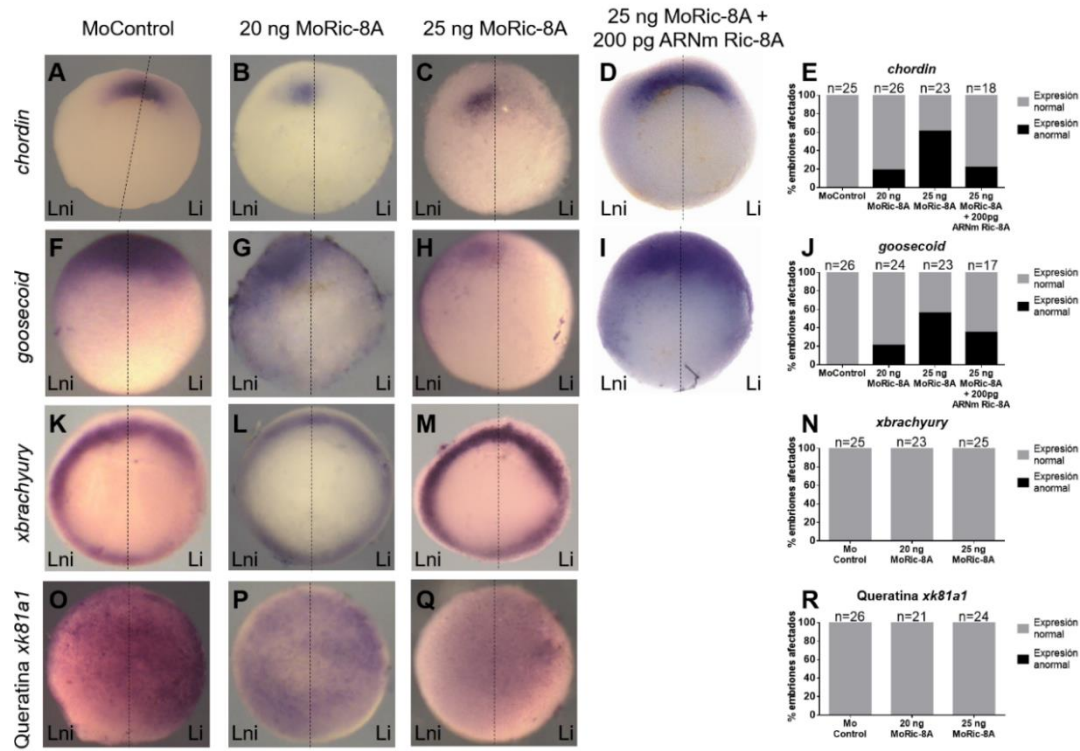
Con el objetivo de respaldar de forma cuantitativa los resultados obtenidos de forma cualitativa, por medio de la técnica de hibridación *in situ*, se procedió a realizar un análisis de la expresión de los genes mesodermales y ectodermes por medio de la técnica de RT-qPCR. Para ello, se observó el efecto que el silenciamiento de Ric-8A tiene sobre la formación del mesodermo y ectodermo, a través de la expresión de los marcadores *chd*, *gsc*, *xbra* y queratina *xk81a1*. Embriones *Xenopus tropicalis* en estadio 2 (2 células) fueron inyectados con 25 ng de MoRic-8A en un solo blastómero, se dejaron crecer hasta estadio 10, se extrajo y lisó el lado inyectado de los embriones para obtener el ARN total (ARNt), a partir del cual se realizó una reacción de transcripción reversa (RT) para finalmente llevar a cabo los ensayos de PCR cuantitativa (qPCR), que permitieron determinar la expresión de *chd*, *gsc*, *xbra* y queratina *xk81a1* en el lado inyectado, utilizando partidores específicos para cada marcador. Como control se utilizó ARNt extraído desde embriones *wild type* del mismo estadio. Al analizar los niveles de expresión de los marcadores *chd* y *xbra*, se observa un aumento estadísticamente no significativo de la expresión de ambos marcadores en los embriones morfantes para Ric-8A en comparación al control (Figura 11A, C), lo

que no se condice con los resultados obtenidos por la *in situ* (Figura 10C, M), donde observamos una disminución clara de la expresión de *chd*, y una expresión normal de *xbra* en los embriones morfantes. Por otro lado, el marcador queratina *xk81a1* presentó un aumento significativo de la expresión en los embriones morfantes, en comparación al control (Figura 11D), claramente diferente a lo observado con los experimentos de hibridación *in situ* (Figura 10Q), que no mostró cambio en el patrón de expresión. Finalmente, el marcador *gsc* presentó un comportamiento similar entre ambas técnicas, mostrando una disminución significativa de su expresión en los embriones morfantes en comparación a los controles (Figura 11B).

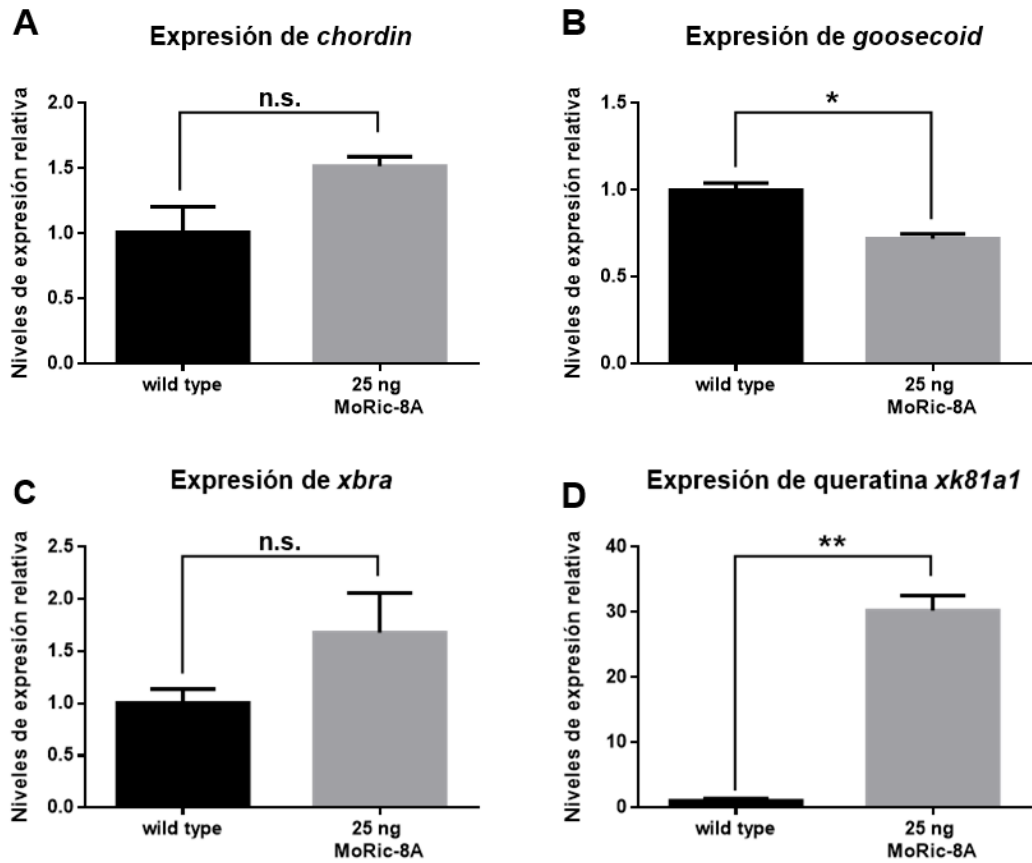
Debido a la alteración del patrón de expresión observado en los marcadores utilizados, en conjunto, estos resultados sugieren que los niveles proteicos de Ric-8A son cruciales en los procesos de formación del mesodermo, y con ello probablemente del ectodermo y crestas neurales.



**Figura 9. Efecto del silenciamiento de Ric-8A sobre la inducción de la cresta neural.** Se muestran el patrón de expresión de *snail2* en embriones en estadio 16, que fueron microinyectados con 20 ng (B) y 25 ng (C) de MoRic-8A, los cuales fueron comparados con el patrón de expresión del lado no inyectado (Lni) y de embriones wt (A). En (D) se grafica el porcentaje de embriones de acuerdo con el fenotipo observado, donde el 62% y el 65% de los embriones presentaron fenotipo severo de inhibición al inyectar 20 y 25 ng de MoRic-8A, respectivamente. Li: Lado inyectado; Lni: Lado no inyectado; wt: *wild type*.



**Figura 10. Análisis cualitativo del efecto de la pérdida de función y rescate de Ric-8A sobre la formación del mesodermo.** Se muestra el patrón de expresión de los marcadores *chd* (A, B, C, D), *gsc* (F, G, H, I), *xbra* (K, L, M) y queratina *xk81a1* (O, P, Q), en embriones estadio 10 que fueron micro-inyectados con 25 ng de MoCtrl, 20, 25 ng de MoRic-8A o 25 ng de MoRic-8A junto a 200 pg de ARNm de Ric-8A, en el caso de los ensayos de rescate. Además, se determinó el porcentaje de embriones que presentaron fenotipo de inhibición para cada marcador con respecto al total de embriones inyectados con 20, 25 ng de MoRic-8A o 25 ng de MoRic-8A junto a 200 pg de ARNm de Ric-8A, siendo para *chd* 19%, 56% y 22%, respectivamente (**E**), para *gsc* 21%, 61% y 35%, respectivamente (**J**), para *xbra* 0% y 0%, respectivamente (**N**), y para queratina 0% y 0%, respectivamente (**R**). Li: Lado inyectado; Lni: Lado no inyectado.



**Figura 11. Análisis cuantitativo del efecto de la pérdida de función de Ric-8A en la expresión de *chd*, *gsc*, *xbra* y queratina *xk81a1* en embriones en gástrula.** Embriones inyectados con 25 ng de MoRic-8A fueron incubados hasta estadio 10 (gástrula) y luego lisados para la extracción de ARN total y generación de ADNc. Se utilizaron 20 embriones por cada condición. Se cuantificaron los niveles de *chordin* (A), *goosecoid* (B), *xbra* (C) y queratina *xk81a1* (D) utilizando partidores específicos para cada uno. Como control interno (*housekeeping*), se amplificaron los genes, *sub-1*, *drosha* y *rpL8*, y se normalizó utilizando la media geométrica de estos genes control. La significancia estadística está indicada por \*( $P < 0.05$ ), \*\*( $P < 0.01$ ).

## **1.2.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Gαq y rescate en la formación del mesodermo en embriones de *Xenopus*:**

Como se describió en la introducción, Gαq se encuentra presente en la ZMD, tejido mesodermal inductor de la CN (Fuentealba y col., 2016), además estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que el bloqueo de la expresión de Gαq inhibe la inducción de la CN (Rodríguez, 2016, tesis de magister). Por lo tanto, nuestra siguiente actividad fue determinar el efecto de la proteína Gαq sobre la formación del mesodermo, para lo cual, primero procedimos a corroborar el efecto de Gαq sobre la inducción de la CN, con el fin de estandarizar la concentración de morfolino a la cual se obtiene el mayor número de embriones con fenotipo de silenciamiento severo. Para ello, se realizaron ensayos de pérdida de función de esta proteína y, por medio de la técnica de hibridación *in situ* en embriones de *Xenopus tropicalis* en estadio de néurula, se determinó el patrón de expresión del marcador de cresta neural *snail2*. Embriones de *Xenopus tropicalis* en estadio 2 (dos células) fueron inyectados con 15, 20 y 25 ng de MoGαq en un sólo blastómero, quedando el otro blastómero sin inyectar como control. Luego, estos embriones fueron incubados hasta estadio 16, fijados, y posteriormente se les realizó ensayos de hibridación *in situ*.

Al analizar el patrón de expresión de *snail2*, en embriones inyectados con 15, 20 y 25 ng de MoGαq se observó una alteración en la inducción de las células de la cresta neural, concentración dependiente (Figura 12A, B, C, D).

Para su cuantificación, se determinó como fenotipo severo de inhibición (expresión anormal) a todos los embriones que presentaron disminución o ausencia de la expresión del marcador de CN *snail2* y que, por consiguiente, no presentaban inducción de CN en el lado inyectado del embrión. Por otro lado, se consideró como fenotipo normal (expresión normal) a todos los embriones que presentaban una expresión normal del marcador de CN *snail2* y, por ende, una inducción normal de la CN en el lado inyectado del embrión. Considerando estos parámetros se determinó que sólo el 22% de los embriones inyectados con 15 ng de MoGαq presentaron un fenotipo severo de inhibición, mientras que el 57% de los embriones inyectados con 20 ng de MoGαq presentaron el mismo fenotipo. Por otro lado, la totalidad de los embriones inyectados con 25 ng de MoGαq presentaron un fenotipo severo de inhibición de la expresión de *snail2* (Figura 12E). Estos resultados nos permiten concluir que la proteína Gαq estaría regulando el proceso de inducción de la CN y que, por ende, podría estar involucrada, al igual que Ric-8A, en el proceso de formación de mesodermo, tejido necesario para dicho proceso de inducción.

Luego, se procedió a determinar el rol de Gαq en la formación del mesodermo, para ello, se realizaron ensayos de pérdida de función y rescate, y se analizó el patrón de expresión de los marcadores de mesodermo dorsal *chd* y *gsc*, el marcador pam-mesodermal *xbra* y el marcador ectodermal queratina *xk81a1* a través de la técnica de hibridación *in situ* en embriones en etapa de gástrula. Para

ello, embriones *Xenopus tropicalis* en estadio 2 (2 células) fueron inyectados en un blastómero con 25, 30 ng de MoGαq y 30 ng de MoGαq con 200 pg de ARNm de Gαq, para los ensayos de rescate, crecidos hasta etapa de gástrula (estadio 10), fijados y, por medio de la técnica de hibridación *in situ*, se determinó la expresión de los marcadores *chd*, *gsc*, *xbra* y queratina *xk81a1* en la mitad inyectada del embrión.

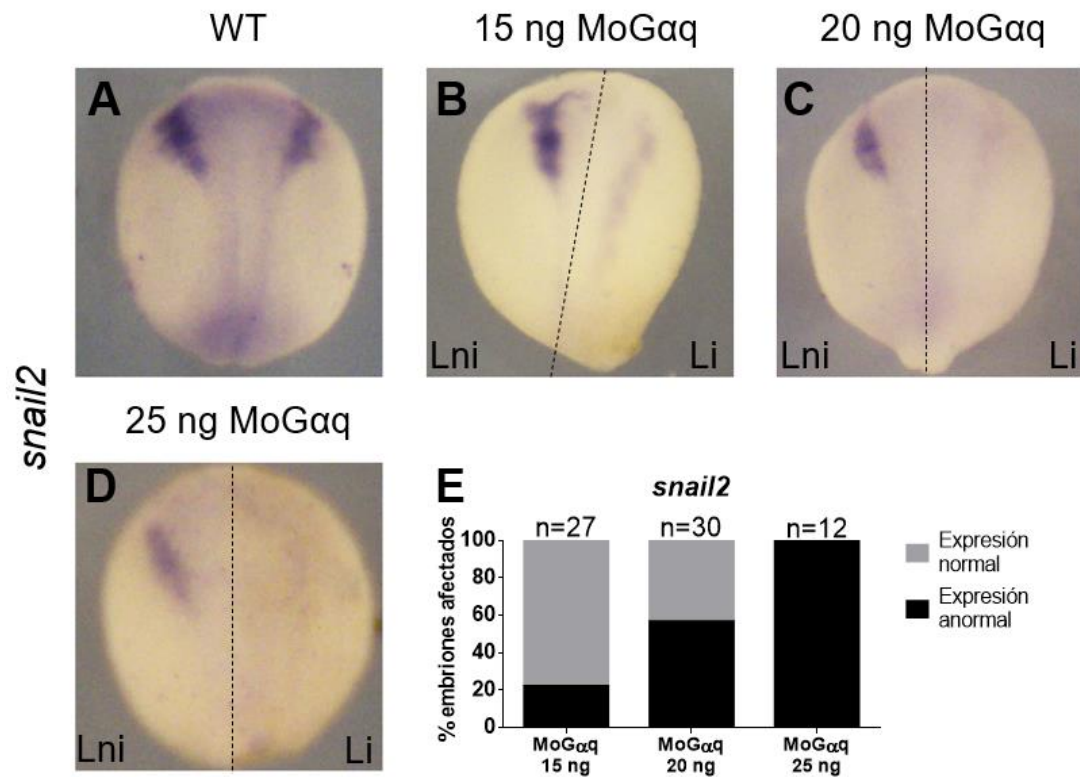
Al analizar el patrón de expresión de *chd*, se observó una disminución o ausencia de la expresión, indicando una alteración en la formación del mesodermo dorsal, en embriones inyectados con 25 ng (correspondiente al 10% de los embriones inyectados) y 30 ng (correspondiente al 45% de los embriones inyectados) de MoGαq. Este efecto se vio rescatado al co-inyectar 30 ng de MoGαq junto a 200 pg de ARNm de Gαq, correspondiente a un 71% de los embriones inyectados. (Figura 13A, B, C, D, E). Por otro lado, al analizar el patrón de expresión de *gsc*, no se vio un efecto en el patrón de expresión en embriones inyectados con 25 ng de MoGαq, mientras que, al inyectar 30 ng de MoGαq, se observó una leve disminución en la expresión de *gsc*, correspondiente al 19% del total de embriones inyectados (Figura 13G, H, I). Al contrario, el patrón de expresión de *xbra* se vio disminuido o ausente en los embriones inyectados con 25 y 30 ng de MoGαq, lo que sugiere una inhibición en la formación del tejido mesodermal, correspondiente a un 25% y 53% del total de embriones inyectados, respectivamente, sin embargo, ese efecto en la expresión fue rescatada al co-

inyectar 30 ng de MoGαq junto a 200 pg de ARNm de Gαq, correspondiente a 31% de los embriones totales inyectados (Figura 13K, L, M, N). Finalmente, el patrón de expresión del marcador queratina *xk81a1* no se vio afectado al silenciar a la proteína Gαq con 25 y 30 ng de MoGαq, por lo que no hay efectos visibles sobre el tejido ectodermal (Figura 13P, Q, R).

Con el objetivo de analizar de forma cuantitativa el efecto que el silenciamiento de Gαq tiene sobre la formación del mesodermo y ectodermo, se procedió a realizar un análisis de la expresión de los genes mesodermes y ectodermes *chd*, *gsc*, *xbra* y queratina *xk81a1* por medio de la técnica de RT-qPCR. Para ello, embriones de *Xenopus tropicalis* en estadio 2 (2 células) fueron inyectados con 30 ng de MoGαq en un solo blastómero, se dejaron crecer hasta estadio 10, se extrajo y lisó el lado inyectado de los embriones para obtener el ARN total (ARNt), y en paralelo se utilizaron embriones *wild type*, a partir de los cuales se realizó una reacción de transcripción reversa (RT) para finalmente llevar a cabo los ensayos de PCR cuantitativa (qPCR), que permitieron determinar la expresión de *chd*, *gsc*, *xbra* y queratina *xk81a1* en el lado inyectado en comparación a embriones controles, utilizando partidores específicos para cada marcador. Al analizar los niveles de expresión del marcador *chd*, se observa una disminución no estadísticamente significativa en los embriones inyectados con 30 ng de MoGαq, con respecto a los embriones *wild type* (Figura 14A), mientras que los niveles de expresión del marcador *xbra*, disminuyen significativamente en los

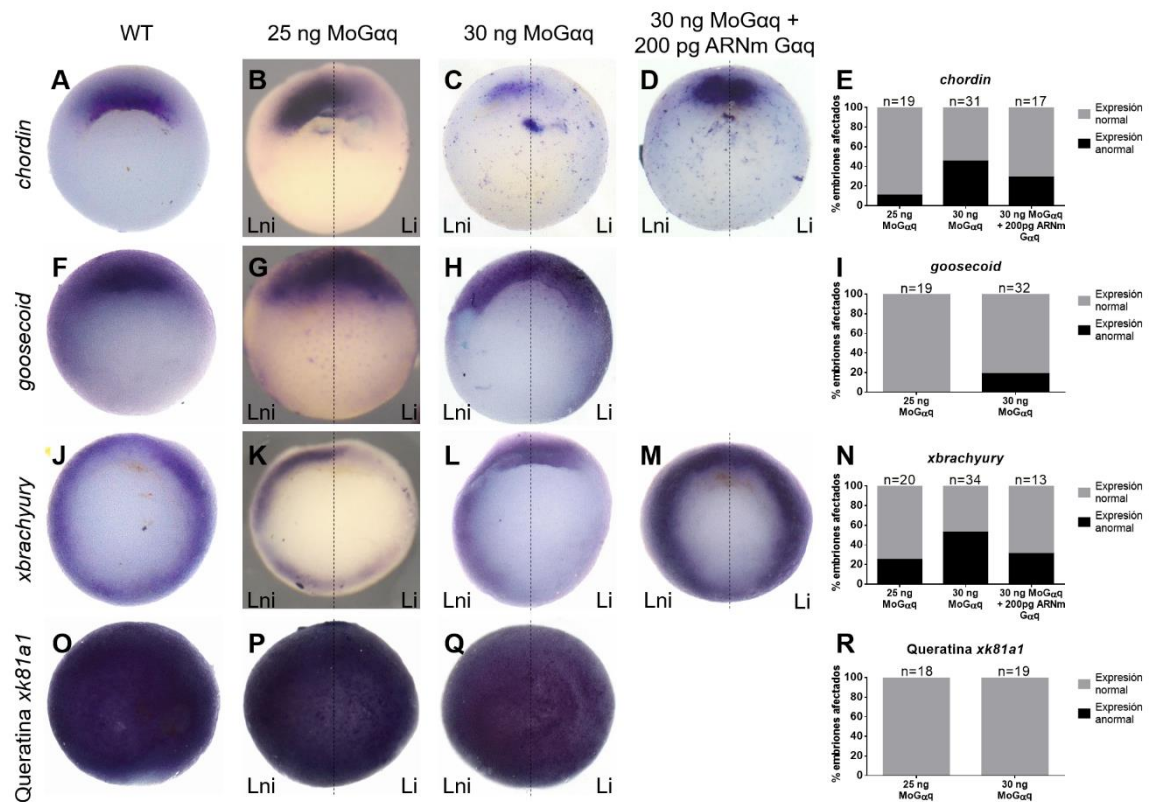
embriones inyectados con 30 ng de MoGαq, con respecto a los embriones *wild type* (Figura 14C) lo que se condice con lo observado en el resultado anterior, a través de hibridación *in situ* (Figura 13L), por otro lado, al analizar el nivel de expresión de *gsc* y queratina *xk81a1*, se puede observar un leve cambio, aunque no significativo en los embriones inyectados con 30 ng de MoGαq, con respecto a los embriones *wild type* (Figura 12B, D).

Evidenciados por la alteración de los niveles y el patrón de expresión de marcadores mesodermales y ectodermales, en su conjunto, estos resultados sugieren que la proteína Gαq, al igual que la proteína Ric-8A, se encontraría regulando los procesos de formación de mesodermo en el embrión.

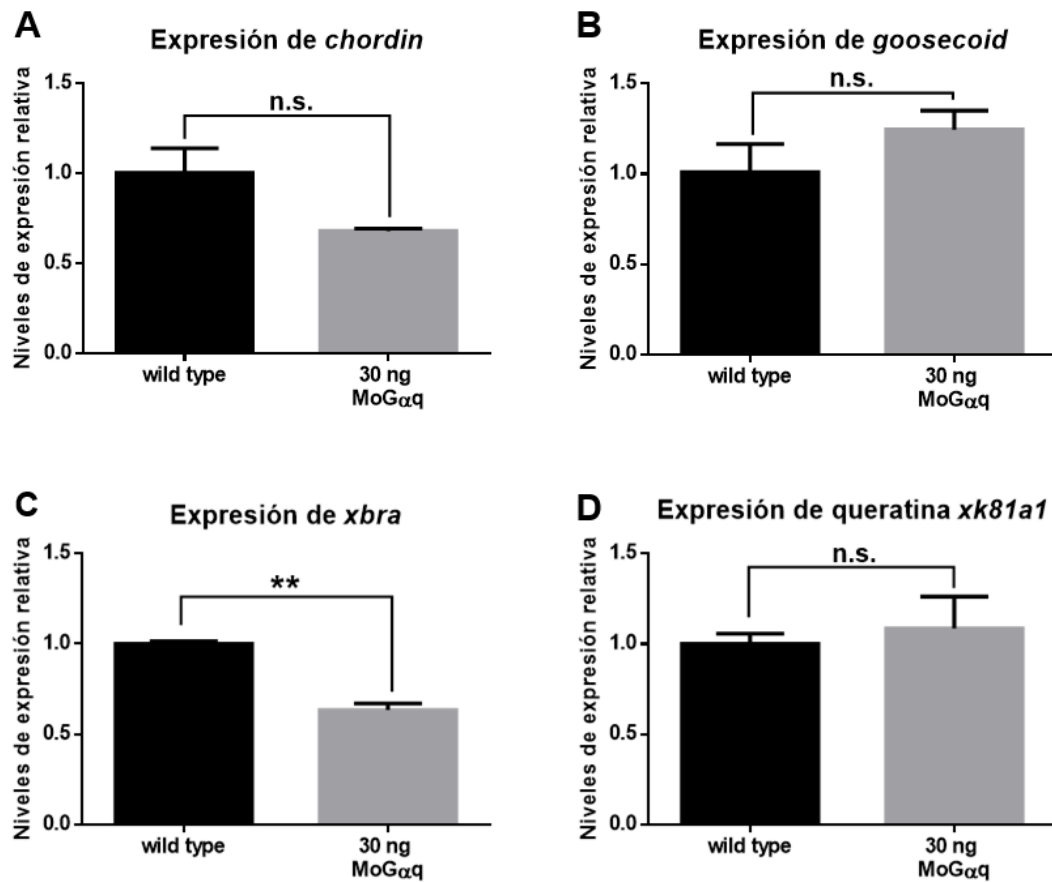


**Figura 12. Efecto del silenciamiento de Gαq sobre la inducción de la cresta neural.**

Se muestra el patrón de expresión del marcador de CN *snail2* en embriones en estadio 16, los cuales fueron inyectados en un blastómero en estadio 2 (2 células) con 15ng (B), 20 ng (C) y 25 ng (D) de MoGαq. En (E) se muestra la cuantificación del porcentaje de embriones que presentaron un fenotipo de inhibición severo de *snail2* con respecto al total de embriones por condición, donde el 22%, 57%, y 100% de los embriones totales presentaron dicho fenotipo, al inyectar 15, 20 o 25 ng de MoGαq, respectivamente. Li: Lado inyectado; Lni: Lado no inyectado.



**Figura 13. Análisis cualitativo del efecto del silenciamiento y rescate de Gαq sobre la formación del mesodermo.** Se muestra el patrón de expresión de los marcadores *chd* (B, C, D), *gsc* (G, H), *xbra* (K, L, M) y queratina *xk81a1* (P, Q), en embriones estadio 10 inyectados en un sólo blastómero durante el estadio 2 (2 células), con 25, 30 ng de MoGαq y 30 ng de MoGαq junto con 200 pg de ARNm de Gαq (rescate). Además, se determinó el porcentaje de embriones que presentaron fenotipo de inhibición para cada marcador con respecto al total de embriones inyectados con 25, 30 ng de MoGαq y 30 ng de MoGαq junto con 200 pg de ARNm de Gαq, siendo para *chd* 10%, 45% y 29% (E), para *gsc* 0% y 19%(I), para *xbra* 25%, 53% y 31% (N), y para queratina 0% y 0% (R), respectivamente. Li: Lado inyectado; Lni: Lado no inyectado.



**Figura 14. Análisis cuantitativo del efecto de la pérdida de función de Gαq en la expresión de *chd*, *gsc*, *xbra* y queratina *xk81a1* en embriones en gástrula.** Embriones controles e inyectados con 30 ng de MoGαq fueron incubados hasta estadio 10 (gástrula) y luego lisados para la extracción de ARN total y generación de ADNc. Se utilizaron 20 embriones por cada condición. Se cuantificaron los niveles de *chordin* (A), *goosecoid* (B), *xbra* (C) y queratina *xk81a1* (D) utilizando partidores específicos para cada uno. Como control interno, se amplificaron los genes, *sub-1*, *drosha* y *rpL8*, y se normalizó utilizando la media geométrica de estos genes control. La significancia estadística está indicada por \*\*( $P < 0.05$ ).

### **1.3.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Gai2 en la formación del mesodermo en embriones de *Xenopus*:**

Debido a las diferencias presentes entre los efectos observados sobre la formación del mesodermo con las proteínas Ric-8A y Gαq, y considerando que Ric-8A es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para distintas subunidades Gα, se quiso analizar el efecto de otra posible subunidad Gα en la formación del mesodermo, en este caso, Gai2. Para determinar el efecto de la proteína Gai2 sobre la formación del mesodermo, primero fue necesario determinar el efecto que Gai2 tiene sobre la inducción de la CN, para ello, se realizaron ensayos de pérdida de función con un morfolino específico para Gai2 (MoGai2) y se determinó el patrón de expresión del marcador de cresta neural, *snail2*, utilizando la técnica de hibridación *in situ* en embriones de *Xenopus tropicalis* en estadio de neurula. Con este objetivo, embriones de *Xenopus tropicalis* en estadio 2 (2 células) fueron inyectados con 25, 30 o 35 ng de morfolino contra Gai2 (MoGai2) en un solo blastómero, crecidos hasta estadio 16, fijados, y posteriormente se les realizó ensayos de hibridación *in situ* por medio de los cuales se determinó el patrón de expresión del marcador *snail2* en la mitad inyectada del embrión. Al estudiar el patrón de expresión de *snail2*, se observó una disminución en la intensidad de la marca en los embriones inyectados con 25, 30, o 35 ng de MoGai2, correspondientes al 14%, 16% y 20%, respectivamente; sin embargo, no se observa una inhibición total de la inducción de la CN, con respecto a la condición *wild type* (Figura 15A, B, C, D, E).

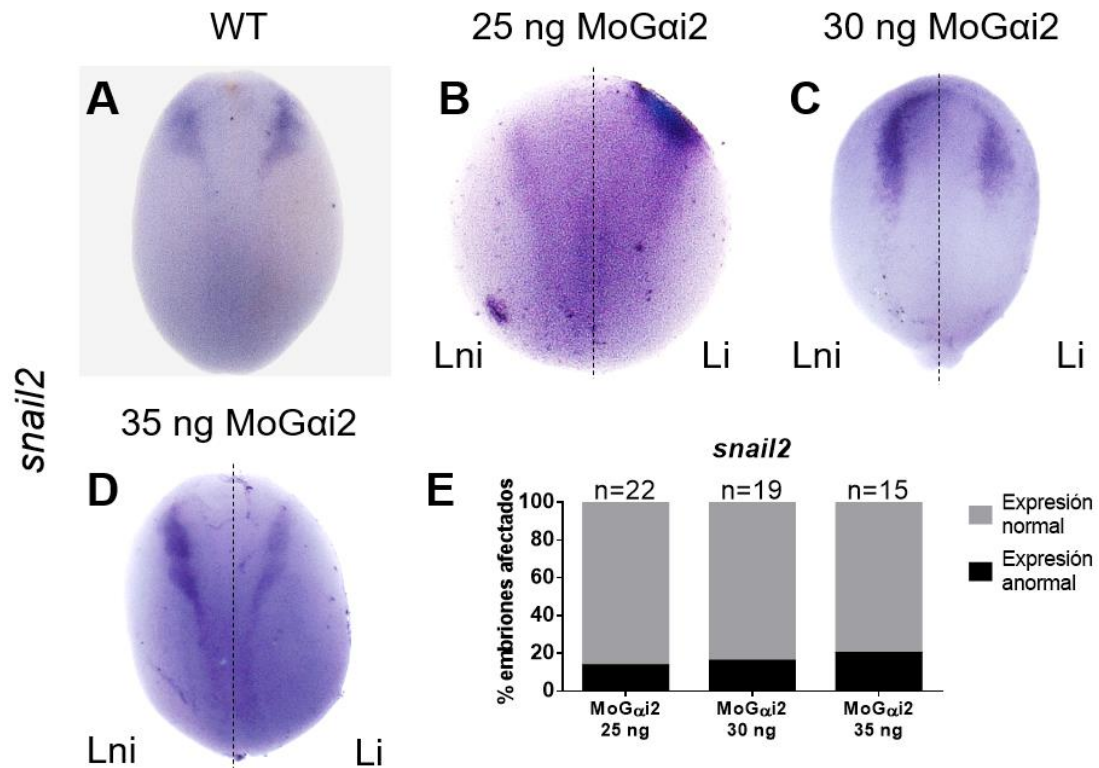
Estos resultados nos permiten sugerir que la proteína Gai2 no cumpliría un rol fundamental ni sería indispensable en el proceso de inducción de la CN a las concentraciones de morfolino utilizadas, ya que, a diferencia de Ric-8A y Gαq, la disminución de la expresión de ella no impediría que la CN sea correctamente inducida.

Considerando que Gai2 no afecta directamente la inducción de la cresta neural, se quiso determinar de todas formas su rol en la formación del mesodermo, para ello, se realizaron ensayos de pérdida de función y se analizó el patrón de expresión de los marcadores de mesodermo dorsal *chd* y *gsc*, el marcador pamesodermal *xbra* y el marcador ectodermal queratina *xk81a1* a través de la técnica de hibridación *in situ* en embriones en etapa de gástrula. Para ello, embriones de *Xenopus tropicalis* en estadio 2 (2 células) fueron inyectados en un blastómero con 25 ng de morfolino contra Gai2 (MoGai2), crecidos hasta etapa de gástrula (estadio 10), fijados y, por medio de la técnica de hibridación *in situ*, se determinó la expresión de los marcadores *chd*, *gsc*, *xbra* y queratina *xk81a1* en la mitad inyectada del embrión.

Al analizar el patrón de expresión de los marcadores *chd*, *gsc*, *xbra* y queratina *xk81a1*, no se observó cambios en la expresión de ninguno de estos marcadores en ninguno de los embriones inyectados, en comparación con la condición *wild*

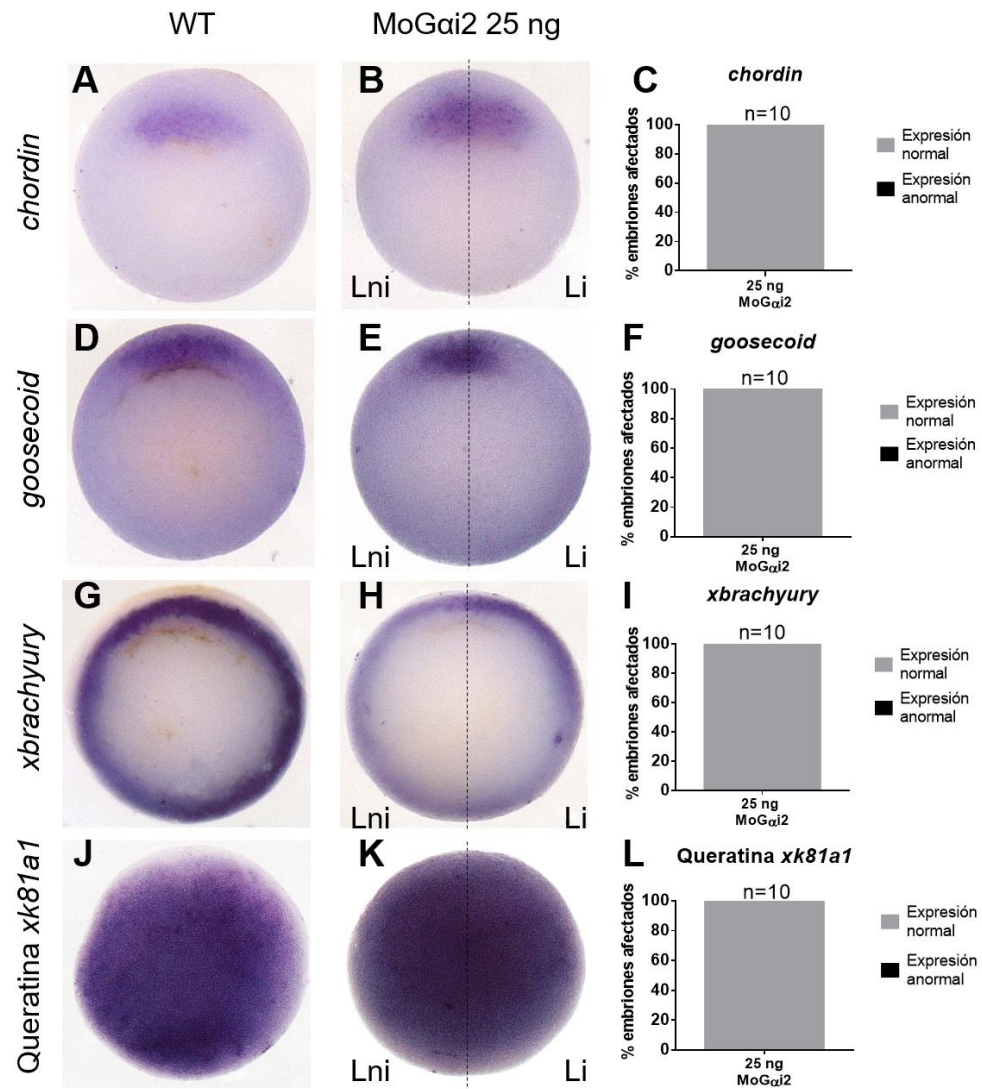
*type*, lo que indica que no habría alteraciones en la formación del mesodermo dorsal, pam-mesodermo o ectodermo al inyectar 25 ng de MoGai2 (Figura 16).

Estos resultados, sugieren que la proteína Gai2, a diferencia de Ric-8A y Gαq, no estaría regulando directamente los procesos de inducción de la CN ni en la formación del mesodermo.



**Figura 15. Efecto del silenciamiento de Gai2 sobre la inducción de la cresta neural.**

Se muestra el patrón de expresión del marcador de CN, *snail2*, en embriones en estadio 16, los cuales fueron inyectados en un blastómero en estadio 2 (2 células) con 25 ng (B), 30 ng (C) y 35 ng (D) de MoGai2. Además, en (E) se muestra la cuantificación en porcentaje de embriones que presentaron un fenotipo de disminución de la expresión de *snail2* (expresión anormal) con respecto al total de embriones por condición, donde el 14%, 16%, y 20% de los embriones totales presentaron dicho fenotipo, al inyectar 25, 30 o 35 ng de MoGai2, respectivamente. Li: Lado inyectado; Lni: Lado no inyectado.



**Figura 16. Efecto del silenciamiento de Gai2 sobre la formación del mesodermo.**

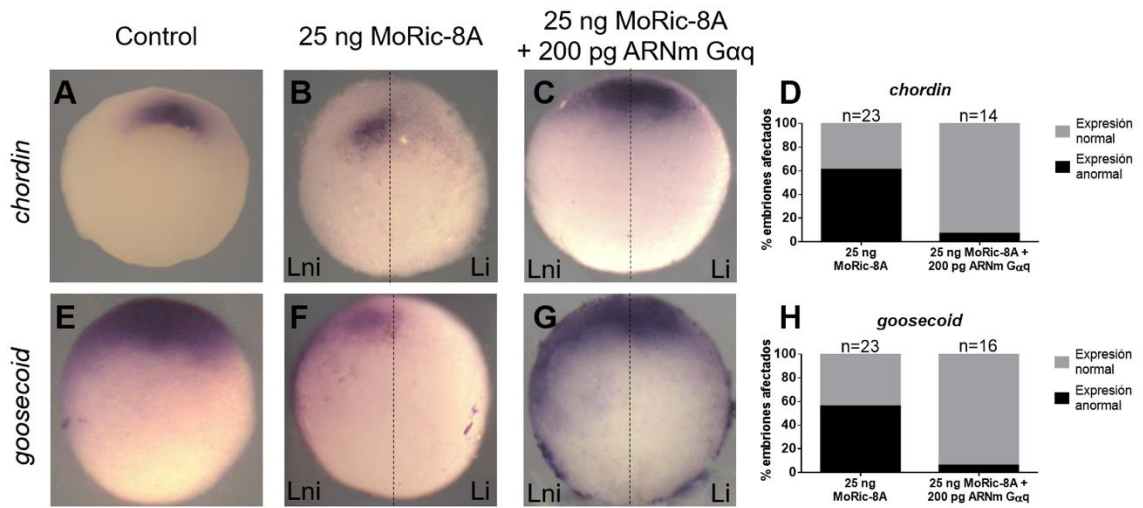
Se muestra el patrón de expresión de los marcadores *chd* (A, B), *gsc* (D, E), *xbra* (G, H) y queratina *xk81a1* (J, K), en embriones estadio 10 inyectados en un sólo blastómero durante el estadio 2 (2 células), con 25 ng de MoGai2. Además, se determinó el porcentaje de embriones que presentaron fenotipo de inhibición para cada marcador con respecto al total de embriones inyectados con 25 de MoGai2, siendo de un 0% para los 4 marcadores (C, F, I, L). Li: Lado inyectado; Lni: Lado no inyectado.

**1.4.- Analizar, por medio de ensayos de epistasis, el rescate del fenotipo morfante de Ric-8A con la sobreexpresión de Gαq en la formación del mesodermo en embriones de *Xenopus*:**

Considerando que Ric-8A actúa como GEF para distintas subunidades Gα, y que hemos observado que tanto Ric-8A como Gαq se encuentran regulando los procesos relacionados con la inducción de la cresta neural y la formación del mesodermo, se decidió estudiar si la vía de señalización de Ric-8A estaría regulando la formación del mesodermo dorsal a través de Gαq. Para ello, se realizó un ensayo de epistasis funcional, el cual plantea una interacción entre dos moléculas dentro de la misma vía de señalización. Con este fin, se realizaron ensayos, en los cuales se buscaba obtener un fenotipo normal de expresión de los marcadores de mesodermo dorsal, *chd* y *gsc*, al sobreexpresar la proteína Gαq en embriones morfantes para Ric-8A. Para ello, embriones *Xenopus tropicalis* en estadio 2 (2 células) fueron inyectados en un blastómero con la concentración de morfolino contra Ric-8A a la cual se observó el mayor número de embriones con fenotipo de inhibición severo de la expresión de *chd* y *gsc*, es decir, con 25 ng de MoRic-8A, y con 200 pg de ARNm de Gαq. Dichos embriones fueron crecidos hasta etapa de gástrula (estadio 10), fijados y posteriormente se realizaron los ensayos de hibridación *in situ* para analizar el patrón de expresión de los marcadores de mesodermo dorsal, *chd* y *gsc* en la mitad inyectada del embrión.

Al estudiar el patrón de expresión de *chd* y *gsc*, bajo las condiciones de epistasis, se observó un aumento en el número de embriones presentando una correcta formación del mesodermo dorsal, evidenciado por la expresión normal de *chd* y *gsc*, esto en comparación con embriones controles y con la inhibición de la formación de mesodermo que presentaron embriones inyectados solo con 25 ng de MoRic-8A (Figura 17A, B, C, E, F, G). Se determinó que el 61% de los embriones inyectados con 25 ng de MoRic-8A presentaron un fenotipo severo de inhibición de la expresión de *chd*, mientras que al inyectar la misma cantidad de morfolino con 200 pg de ARNm de Gαq, el porcentaje de embriones que presentaron un fenotipo severo de inhibición de la expresión de *chd* se redujo al 7% (Figura 17D). Del mismo modo, se determinó que el 56% de los embriones inyectados con MoRic-8A presentaron fenotipo severo de inhibición de la expresión de *gsc*, mientras que al inyectar la misma cantidad de morfolino de Ric-8A con 200 pg de ARNm de Gαq, el porcentaje de embriones con fenotipo severo de inhibición de la expresión de *gsc* se redujo al 6% (Figura 17H).

Finalmente, estos resultados sugieren que tanto la proteína Ric-8A como la proteína Gαq se encontrarían regulando el proceso de formación del mesodermo dorsal del embrión, compartiendo la misma vía de señalización.



**Figura 17. Efecto del rescate de la expresión de *chd* y *gsc* con *Gαq* en embriones morfantes para *Ric-8A*.** Se muestra el patrón de expresión de los marcadores *chd* (A, B, C) y *gsc* (E, F, G), en embriones estadio 10 inyectados en un solo blastómero (estadio 2) con 25 ng de MoRic-8A y 25 ng de MoRic-8A + 200 pg de ARNm de *Gαq*. Además, se determinó el porcentaje de embriones que presentaron fenotipo de inhibición para cada marcador con respecto al total de embriones inyectados con 25 ng de MoRic-8A y 25 ng de MoRic-8A + 200 pg de ARNm de *Gαq*, siendo para *chd* 61% y 7% (D), y para *gsc* 56% y 6% (H), respectivamente. Li: Lado inyectado; Lni: Lado no inyectado.

### **1.5.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Ric-8A y Gαq en la formación de la placa neural en embriones de *Xenopus*:**

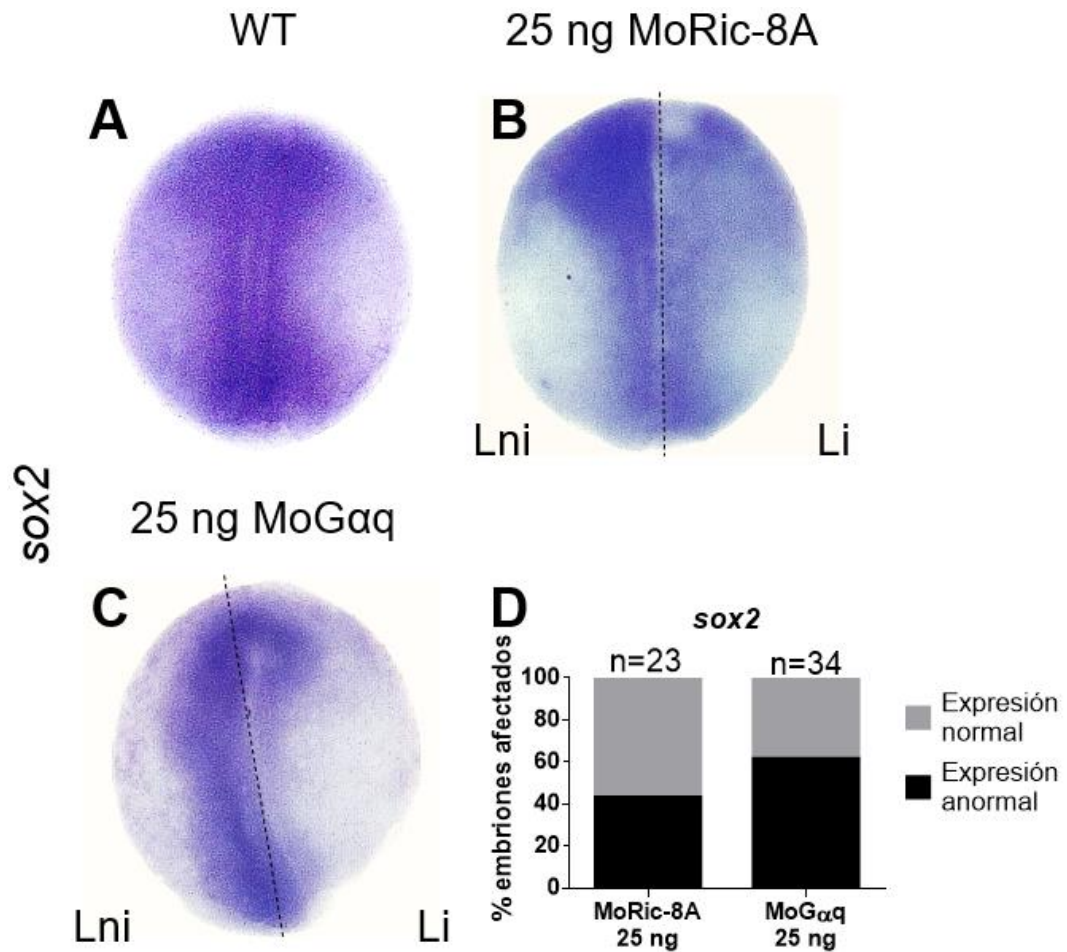
Considerando que el silenciamiento de Ric-8A y Gαq afectan la expresión del marcador de mesodermo dorsal *chd*, el cual es necesario para la correcta inducción del tejido neural (Kuroda y col., 2004), se quiso determinar el efecto que la ausencia de estas proteínas pudiera tener sobre el tejido neural. Para ello se analizó el patrón de expresión del marcador neural *sox2* en embriones morfantes para Ric-8A y Gαq en etapas de neurula. Embriones en estadio 2 fueron inyectados con 25 ng de MoRic-8A y 25 ng de MoGαq en un solo blastómero, crecidos hasta etapas de neurula (estadio 16) y fijados para posteriormente realizar la hibridación *in situ* usando la sonda de *sox2*.

Al analizar el patrón de expresión de *sox2*, se observó una extensión en el área de expresión en embriones inyectados con 25 ng de MoRic-8A, con respecto al lado no inyectado (control) y a la condición *wild type* (Figura 18A, B). Por otro lado, se observó una disminución de la expresión de *sox2* en embriones inyectados con 25 ng de MoGαq con respecto al lado no inyectado (control) y a la condición *wild type* (Figura 18A, C), lo que indicaría un efecto sobre la formación del tejido neural en ambas condiciones.

Para cuantificar el fenotipo observado se consideró como fenotipo anormal a aquellos embriones que presentaron una disminución, ausencia o expansión en

el patrón de expresión del marcador *sox2* en el lado inyectado versus el lado control, por otro lado, se consideró fenotipo normal a aquellos embriones que presentaron una expresión similar en ambos lados del embrión. Considerando estos parámetros, se determinó que el 44% de los embriones presentaron un fenotipo anormal al inyectar 25 ng de MoRic-8A, mientras que al inyectar 25 ng de MoGαq, 62% de los embriones presentaron un fenotipo anormal con respecto al control (Figura 18D).

Estos resultados sugieren que tanto la proteína Ric-8A como Gαq estarían regulando procesos que permiten la correcta formación del tejido neural durante el desarrollo.



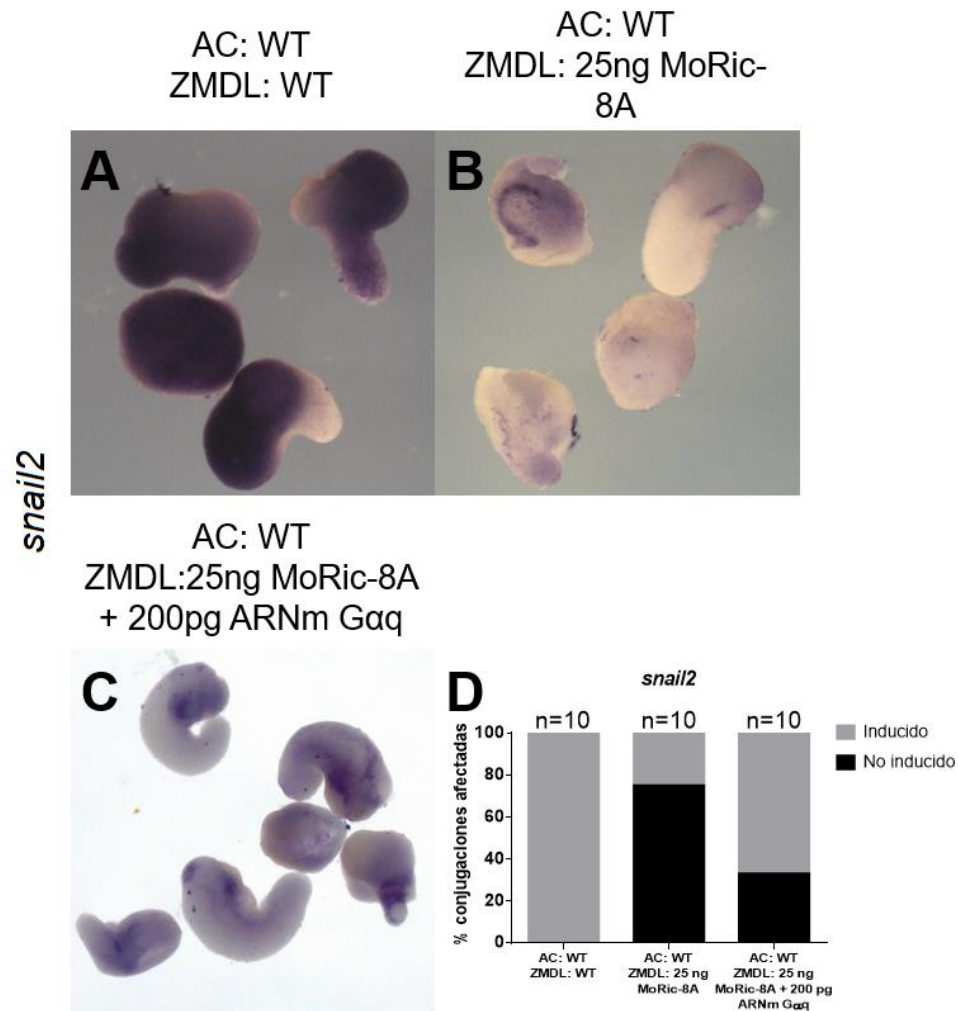
**Figura 18. Efecto del silenciamiento de Ric-8A y Gαq en la formación de tejido neural.** Se muestra el patrón de expresión del marcador *sox2* (A, B, C) de embriones en estadio 16 inyectados en un solo blastómero con 25 ng de MoRic-8A y 25 ng de MoGαq. Además, se determinó el porcentaje de embriones que presentaron fenotipo anormal con respecto al total de embriones inyectados, siendo 44% los inyectados con 25 ng de MoRic-8A, y 62% los inyectados con 25 ng de MoGαq (D). Li: Lado inyectado; Lni: Lado no inyectado.

### **1.6.- Analizar el efecto de la pérdida de función de Ric-8A y/o Gαq en la zona marginal dorso-lateral durante la inducción de cresta neural:**

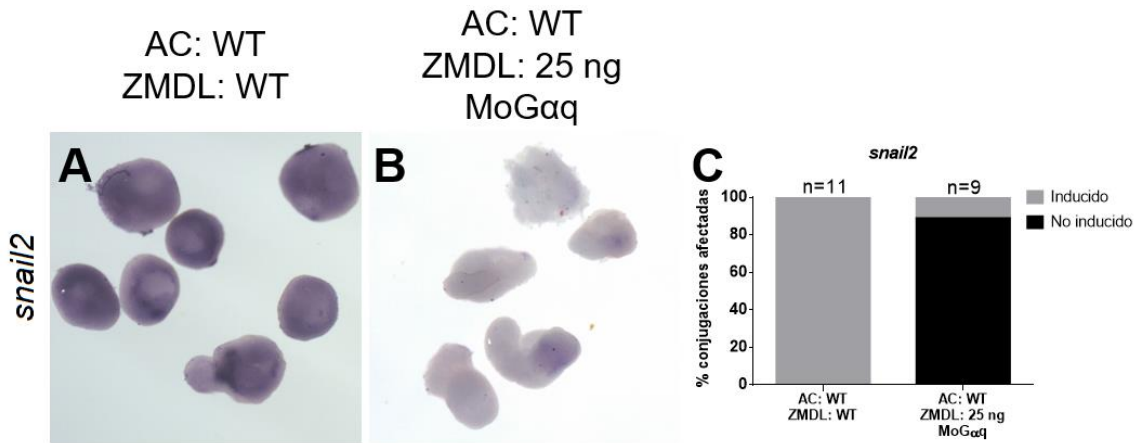
Considerando que la zona marginal dorso-lateral (ZMDL) proveniente del mesodermo dorsal es uno de los tejidos inductores de la formación de CN (Monsoro-Burq y col., 2003), y además que el silenciamiento de Ric-8A y Gαq generan cambios en los marcadores de mesodermo dorsal e inhibición de la inducción de CN, se quiso determinar el efecto que Ric-8A y Gαq tienen sobre el proceso de inducción proveniente de la ZMDL para la correcta formación de la CN. Con este objetivo, se realizaron ensayos de pérdida de función de Ric-8A, Gαq, y ensayos de epistasis de Ric-8A con Gαq en el tejido de ZMDL, el cual fue conjugado e incubado junto a un tejido de respuesta altamente inducible, en este caso, caperuza animal (AC), y se determinó la expresión del marcador de CN *snail2* en las conjugaciones, empleando la técnica de hibridación *in situ*. Para esto, se realizaron dos fertilizaciones de *Xenopus tropicalis* con 1 hora de diferencia, donde los embriones de la primera fertilización en estadio 2 (2 células) fueron inyectados con 25 ng de MoRic-8A, 25 ng de MoGαq, o 25 ng de MoRic-8A junto a 200 pg de ARNm de Gαq (rescate) en un solo blastómero y crecidos hasta estadio 10,25, de los cuales se extrajo la ZMDL del lado inyectado y se incubaron junto con la AC extraída de embriones *wild type* en estadio 9. Las conjugaciones se incubaron hasta estadio 19-20, se fijaron y se les realizó ensayos de hibridación *in situ* por medio del cual se determinó la expresión del marcador *snail2* en la conjugación. Al estudiar el patrón de expresión de *snail2*,

se observó una inhibición de la inducción de la CN en las conjugaciones compuestas de AC *wild type*/ZMDL MoRic-8A (25 ng), en las cuales se observó una ausencia de expresión de *snail2* en un porcentaje de 75% de las conjugaciones, esto en comparación con las conjugaciones ZMDL *wild type*/AC *wild type* (control). Por otro lado, al rescatar la condición morfante en la ZMDL con 200 pg de ARNm de Gαq y conjugarla con AC *wild type*, se obtuvo un rescate de la inducción de la CN evidenciado por la presencia de expresión de *snail2*, disminuyendo el fenotipo anormal de no inducción de CN a un 33% (Figura 19A, B, C, D). En la misma línea, al analizar la expresión de *snail2* en las conjugaciones compuestas por AC *wild type*/ZMDL inyectadas con 25 ng de MoGαq, se observó una inhibición de la inducción de CN, evidenciado por la ausencia de expresión de *snail2* en un 89% de las conjugaciones, en contraste con las conjugaciones ZMDL *wild type*/AC *wild type* (Figura 20A, B, C).

Finalmente, estos resultados sugieren que tanto Ric-8A como Gαq estarían cumpliendo un rol crucial en el proceso de inducción de la CN proveniente de la ZMDL, ya que la disminución de la expresión de estas proteínas en este tejido impide que éste envíe la señal necesaria para que la inducción de CN se lleve a cabo.



**Figura 19. Efecto del silenciamiento de Ric-8A y su rescate con Gαq en la ZMDL durante la inducción de CN en ensayos de conjugación.** Se realizaron conjugaciones de caperuza animal (AC) *wild type* (WT) junto con zona marginal dorso-lateral (ZMDL) en 3 condiciones distintas: control (A), con 25 ng de MoRic-8A (B), y 25 ng de MoRic-8A + 200 pg de ARNm de Gαq (C). Se analizó la inducción de tejido de cresta neural analizando el patrón de expresión del marcador *snail2*. En (D) se muestra la cuantificación de acuerdo con el fenotipo observado. AC: caperuza animal, ZMDL: zona marginal dorso-lateral.



**Figura 20. Efecto del silenciamiento de Gαq en la ZMDL durante la inducción de CN en ensayos de conjugación.** Se realizaron conjugaciones de caperuza animal (AC) *wild type* (WT) junto con zona marginal dorso-lateral (ZMDL) en 2 condiciones distintas: control (A) y con 25 ng de MoGαq (B). Se analizó la inducción de tejido de CN analizando el patrón de expresión del marcador *snail2*. En (C) se muestra la cuantificación de acuerdo con el fenotipo observado. AC: caperuza animal, ZMDL: zona marginal dorso-lateral.

## **2.- Identificar las vías de señalización asociadas a la vía de proteína G heterotrimérica en tejidos de cresta neural y zona marginal dorsal en *Xenopus*.**

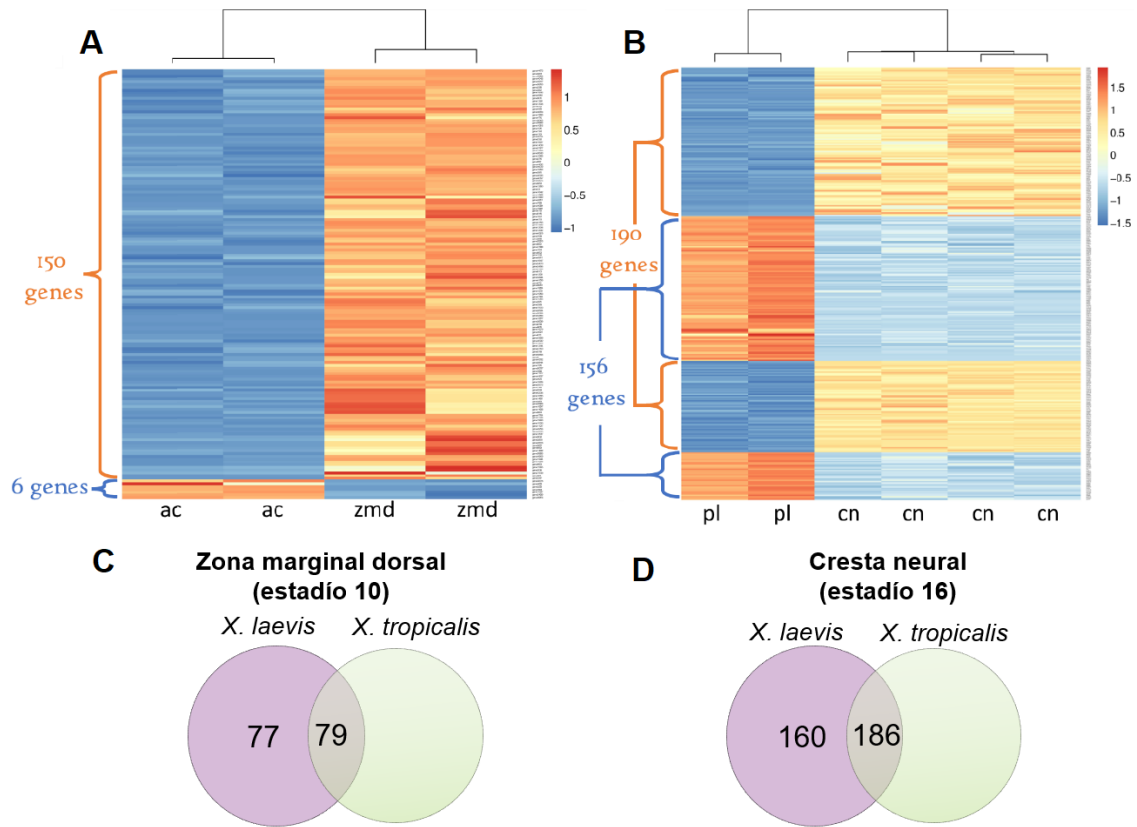
### **2.1.- Identificar genes con expresión diferencial en tejidos de cresta neural y zona marginal dorsal en *Xenopus*:**

Con el objetivo de determinar la participación de genes asociados a la vía de señalización de proteína G en procesos de inducción de cresta neural, se realizó un análisis de expresión diferencial usando datos de ARN-Seq tejido específico. Para esto, se obtuvieron datos de ARN-Seq de zona marginal dorsal (ZMD) y caperuza animal (AC) en etapa de gástrula temprana; y de tejido de CN y placodas en néurula temprana. Las secuencias de zona marginal dorsal y caperuza animal empleadas fueron descargadas desde la base de datos Sequence Read Archives (SRA) de NCBI, bajo el proyecto de estudio PRJNA674389, correspondiente a un estudio de secuenciación de ARN cuyo objetivo fue estudiar la transcriptómica de explantes de ZMD en distintas etapas de desarrollo en *X. laevis* (Kakebeen y col., 2020); mientras que las secuencias de CN fueron descargadas desde la misma base de datos, pero del proyecto de estudio PRJNA400602, correspondiente a un estudio de secuenciación de ARN cuyo objetivo fue caracterizar la expresión génica de distintos tejidos de embriones de *X. laevis* en desarrollo (Plouhinec y col., 2017). Los datos descargados fueron procesados con Trimmomatic, alineados contra el genoma

de *X. laevis* utilizando TopHat2, y se realizó el conteo de las lecturas alineadas por gen con HTSeq. Finalmente, se procedió a hacer el análisis de expresión diferencial del tejido de interés versus el tejido control utilizando DESeq. Para los datos de gástrula temprana, se realizó el análisis de expresión diferencial de ZMD (tejido de interés) versus AC (tejido de referencia), mientras que para los datos de néurula, se realizó el análisis de expresión diferencial de CN (tejido de interés) versus placodas (tejido de referencia). Ambos análisis fueron representados por medio de un mapa de calor (*heat-map*)

Al analizar los resultados, se determinó que, del total de genes analizados en ZMD, 156 genes presentaron expresión diferencial con respecto a la AC, de los cuales, 150 estaban regulados al alza, y sólo 6 estaban regulados a la baja (Figura 21A). Por otro lado, en CN, se determinó que 346 genes presentaron expresión diferencial con respecto a las placodas, de los cuales 190 estaban regulados al alza, mientras que 156 estaban regulados a la baja (Figura 21B). No obstante, los datos analizados corresponden a la especie de *Xenopus laevis*, por lo que extrapolar estos resultados a nuestro modelo de estudio (*Xenopus tropicalis*) no es correcto. Por lo tanto, se procedió a determinar los genes ortólogos entre las especies de *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*, y así poder extrapolar los resultados obtenidos.

Sabiendo que se define como genes ortólogos a aquellos genes que divergieron después de un evento de especiación y mantienen su función ancestral (Fitch, 2000), se seleccionó, a partir de los genes diferencialmente expresados, sólo aquellos que son ortólogos entre ambas especies de *Xenopus*. Para identificar los genes ortólogos entre ambas especies se realizó un análisis de homología de secuencias de proteínas entre ambas especies, empleando Reciprocal Best Hits, y luego esta lista se comparó con los genes diferencialmente expresados para cada tejido, resultado que fue representado por medio de un diagrama de Venn. Como resultado se obtuvo un total de 17.310 genes ortólogos entre ambas especies, de los cuales, 79 genes se encontraban diferencialmente expresados y eran ortólogos en ZMD (76 regulados al alza y 3 regulados a la baja), mientras que 186 genes se encontraban diferencialmente expresados y eran ortólogos en CN (104 regulados al alza y 82 regulados a la baja) (Figura 21C, D). A partir de esta lista, se destacan algunos genes asociados a la vía de señalización de proteína G ("*rgs16.S*", "*cdc42ep3.L*", "*arhgap4.L*", "*LOC108714671*", "*gpcr5b.L*"), y otros que se han descrito que participan en procesos en estos tejidos, como los marcadores empleados en esta tesis (*chordin* y *goosecoid* en ZMD, y *snail2* en CN) los cuales se resumen en la Tabla 1, donde los recuadros de color naranja representan a los genes expresados al alza, mientras que los recuadros de color celeste representan a los genes expresados a la baja. Finalmente, estos resultados respaldan la importancia de la vía de señalización de proteína G en procesos de inducción de CN.



**Figura 21. Expresión diferencial de genes en tejido de zona marginal dorsal (ZMD) y cresta neural (CN) en base a datos de ARN-seq en *Xenopus laevis*.** A partir de datos de ARN-seq extraídos de NCBI, se realizó un análisis de expresión diferencial de genes en ZMD, en comparación con un tejido control (caperuza animal) en estadio 10, determinándose un total de 156 genes, de los cuales 150 se expresaban al alza y 6 a la baja (A). Por otro lado, el mismo análisis fue realizado para tejido de CN, usando placodas como tejido control, obteniéndose un total de 346 genes diferencialmente expresados, 190 de ellos al alza y 156 a la baja (B). En C y D se muestra un diagrama de Venn para cada análisis, donde el círculo purpura representa el número de genes diferencialmente expresados para la especie *X. laevis*, mientras que el valor indicado en la unión de ambos círculos corresponde al número de genes diferencialmente

expresados y ortólogos entre *X. laevis* y *X. tropicalis*. El número total de genes ortólogos entre ambas especies es de 17.310 genes. ac: caperuza animal, zmd: zona marginal dorsal, pl: placodas, cn: cresta neural.

**Tabla I: genes diferencialmente expresados y ortólogos en los distintos tejidos estudiados.**

| Zona Marginal Dorsal                                 | Cresta Neural                                                            |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| <i>chrd.L</i> (Chordin)                              | <i>snai2.L</i> (Zinc finger protein SNAI2)                               |
| <i>gsc.L</i> (Homeobox protein goosecoid)            | <i>LOC108714671</i> (cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3-like) |
| <i>wnt11b.L</i> (Wnt-11b)                            | <i>gprc5b.L</i> (G-protein coupled receptor family C group 5 member B)   |
| <i>rgs16.S</i> (regulator of G-protein signaling 16) | <i>twist1.L</i> (Twist-related protein 1)                                |
| <i>cdc42ep3.L</i> (cdc42 efector protein 3)          | <i>fzd4.S</i> (Frizzled-4)                                               |
| <i>arhgap4.L</i> (Rho GTPase-activating protein 4)   | <i>cxc12.L</i> (Stromal cell-derived factor 1)                           |

La tabla expone una pequeña muestra representativa de genes diferencialmente expresados en tejidos de Zona Marginal Dorsal y Cresta Neural, donde las casillas naranjas corresponden a genes expresados al alza y las casillas azules a genes expresados a la baja.

## **2.2 Determinar los procesos enriquecidos y las vías de señalización asociadas a proteína G entre los genes con expresión diferencial:**

Con el objetivo de determinar la participación de la vía de señalización de proteína G en los procesos de inducción de CN, así como identificar otras vías asociadas involucradas en este proceso, se procedió a hacer un análisis de enriquecimiento de términos GO y asociación/interacción de proteínas, centrándonos en aquellas que se relacionen con señalización de proteína G heterotrimérica. Para esto, se emplearon los genes diferencialmente expresados y ortólogos obtenidos en la actividad 2.1, y se determinaron los términos GO que se encuentran enriquecidos utilizando el programa TopGO. Por otro lado, se empleó el programa STRING para determinar la asociación e interacción entre las proteínas codificadas por dichos genes y, de esta forma, dilucidar si éstas están relacionadas con proteínas de la vía de señalización de proteína G. Para esto, por medio de un análisis en R empleando TopGO, se seleccionó los términos GO asociados al listado de genes diferencialmente expresados y ortólogos entre las distintas especies de *Xenopus* ya mencionadas, y por medio de un análisis estadístico de Fisher, se determinó el nivel de relevancia del proceso biológico. A partir de la lista obtenida con TopGO, se seleccionó aquellos términos GO cuyo valor estadístico fuera  $p < 0,05$ , y se procedió a visualizar los resultados empleando el programa REVIGO, el cual los agrupó en un *tree map*, donde cada color es otorgado arbitrariamente a los términos GO que se asocian entre sí. En paralelo, empleando las secuencias de proteínas codificadas por los

genes diferencialmente expresados y ortólogos para cada tejido, se determinó la asociación e interacción entre ellas empleando el programa STRING, el cual permitió visualizar los resultados por medio de una red de trabajo, donde las proteínas fueron representadas por medio de nodos, y la asociación entre ellas fue representada por medio de puentes o líneas.

Al analizar los resultados obtenidos para los genes diferencialmente expresados y ortólogos para el tejido de ZMD en estadio 10, podemos observar una enorme diferencia entre los términos GO y las asociaciones entre proteínas generadas entre los genes expresados al alza, versus aquellos que se expresan a la baja, esto se debe principalmente al bajo número de estos últimos (solo 3 genes) en comparación con los primeros (76 genes) (Figura 21A, C). En el caso de los genes expresados a la baja, se identificó un total de 6 procesos biológicos principales en base a los términos GO determinados, de los cuales destaca la regulación negativa de la vía canónica de la señalización de Wnt, vía de la cual se sabe, es necesaria para los procesos de inducción de la CN, por lo que no es de extrañar que la regulación negativa de esta vía se encuentre menos expresada en tejidos relacionados al proceso de inducción (como es la ZMD) (Figura 22A). Además, no se encontró ninguna asociación entre las proteínas expresadas a la baja en la ZMD, pero destaca la presencia de “*szl*”, que se ha descrito como un inhibidor de “*wnt8*” (señalización canónica) y estabilizador de *chordin* principalmente en mesodermo y ectodermo ventral; y “*msx1*”, un factor de

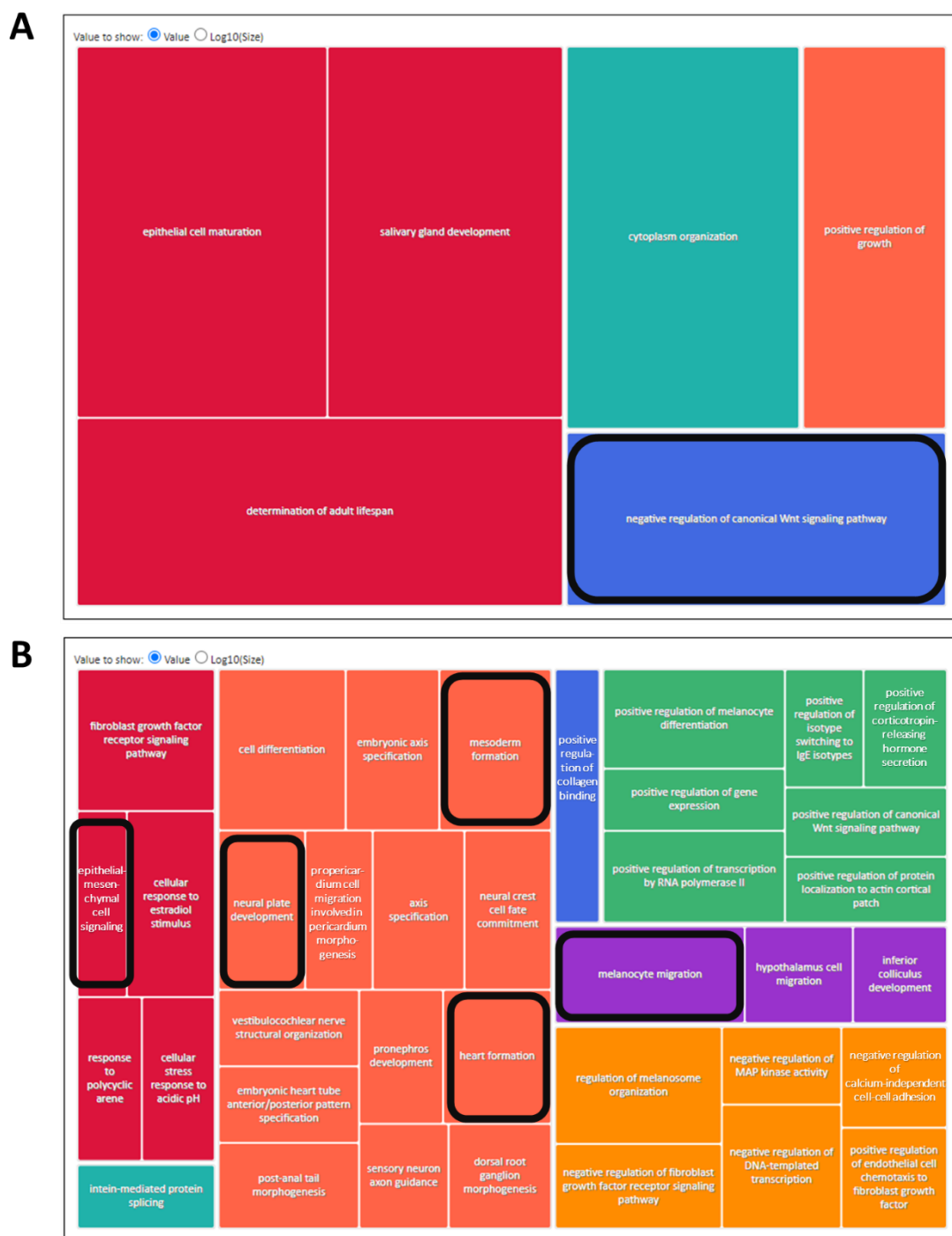
transcripción expresado en el borde de placa neural (Figura 23A). Al contrario, los términos GO de los genes expresados al alza fueron agrupados en 37 procesos biológicos principales, entre los que destacan procesos asociados al desarrollo embrionario, tales como la formación del mesodermo, formación del corazón, desarrollo de la placa neural y a la migración celular, (ales como migración de melanocitos y señalización celular de epitelio-mesénquima (Figura 22B); además, al analizar las proteínas asociadas a los genes expresados al alza en ZMD en STRING, se obtuvo un total de 3 grupos asociados, donde el grupo mayor (ubicado en el centro) comprende las principales proteínas necesarias para la organización y desarrollo del embrión, orquestada por el organizador de Spemann-Mangold ubicado en la ZMD. De los otros 2 conjuntos de proteínas, el que se encuentra en la parte inferior se compone principalmente de moléculas asociadas a la migración celular, y el grupo de proteínas que se encuentra ubicado en la zona superior derecha está asociado a la regulación de la señalización de proteína G (Figura 23B). Cabe destacar la activa participación de proteínas asociadas a la vía de señalización de proteína G como lo son “*ppp1r9b-2*”, “*rgs16*”, “*flrt3*”, “*pdgfra*” y “*cdc42ep3.L*”; además de proteínas asociadas a las vías de hedgehog (“*A0A1L8FQMA*” y “*gli.L*”), Wnt (“*A0A1L8FUV2*” y “*wnt11b*”), FGF (“*fgf16*”, “*fgf20*”, “*fgf8*”, “*spry2-2*” y “*spry4-2*”), e inhibidores de las vías BMP (“*bmp2.L*” y “*chrd.1.S*”), activina (“*fst-2*”) y nodal (“*lefty*”). Adicionalmente, se identificaron proteínas expresadas en el organizador de Spemann-Mangold (“*bmp2.L*”, “*chrd.1.S*”, “*foxa4*”, “*fst-2*” y “*gsc*”) (Figura 23B).

En el caso de los genes diferencialmente expresados y ortólogos para tejido de CN en estadio 16, la cantidad de procesos biológicos y proteínas asociadas fue más equitativa entre los genes expresados a la baja y al alza, en el primer caso, los términos GO seleccionados fueron agrupados en un total de 32 procesos biológicos, donde destacan procesos no asociados a la formación de CN propiamente tal pero si a su migración posterior, como es la formación de placoda ectodermal, y el desarrollo de vasos sanguíneos. Cabe destacar el “proceso de regulación positiva de la fosforilación inhibitoria de receptores acoplados a proteína G”, que tiene como objetivo inhibir la señalización de receptores acoplados a proteína G (Tobin, 2008), proceso que estaría a la baja en CN, lo que indica que dicho proceso de inhibición de receptores acoplados a proteína G estaría disminuido en el tejido de CN, dejando nuevamente en claro la importancia de la señalización de proteína G en este tejido (Figura 24A). Además, al asociar las proteínas originadas a partir de los genes expresados a la baja empleando STRING, se establecen 6 grupos, dentro de los cuales destacan la presencia de factores de transcripción de la familia “t-box” (*tbx20* y *tbx1*), así como “*tcf21*” (Figura 25A), factores de transcripción involucrados en la regulación de expresión de genes asociados a procesos de migración (Calmont y col., 2009; Song y col., 2006; Varankar y col., 2020). Además, destaca la presencia de proteínas de las vías de señalización de Wnt (“*tcf21*”), ácido retinoico (“*aldh1a2*”), Nodal (“*tdgf1.2*”) y proteína G heterotrimérica (“*aplnr.S*”, “*cav2*”, “*cxcl12*” y “*serpinc1.L*”) Por otro lado, los términos GO asociados a los genes expresados

al alza en CN fueron agrupados en 46 procesos biológicos, entre los que destacan la formación de la CN, vías de señalización necesarias para la correcta formación de la CN como Wnt y BMP, procesos relacionados a desarrollo de tejido óseo (regulación positiva de mineralización ósea y diferenciación de osteoblastos), y desarrollo del sistema nervioso (establecimiento de polaridad planar involucrada en el cierre del tubo neural) (Figura 24B). Además, al realizar la asociación de proteínas por medio de STRING, se obtuvieron 4 grupos de interacción, dentro de los cuales destaca la presencia de proteínas de la vía de señalización de Wnt como son *A0A1L8FG79* (“*dishevelled1*”), *apc2.L*, *wnt4*, *wnt1* y *wnt10b*; de los cuales se ha asociado a *wnt4* con la vía no canónica de wnt/Ca<sup>2+</sup>, a *wnt1* con la vía de canónica de wnt/β-catenina, y a *wnt10b* tanto con la vía canónica como la no canónica. Adicionalmente, destaca la presencia de otras vías de señalización como BMP (“*A0A1L8FZP6*”, “*A0A1L8HME1*”, “*A0A1L8HV56*”, “*bmp5*” y “*gdf10*”), ácido retinoico (“*cyp26c1-2*”) y *hedgehog* (“*lrp2.L*”) (Figura 25B). Como información adicional, cabe destacar la presencia de genes cuya expresión espaciotemporal no ha sido publicada en los tejidos/estadios estudiados en la especie *Xenopus*, como son: “*ppp1r9b-2*”, “*rgs16*”, “*spry4-2*”, “*A0A1L8ESE2 (cdk5r1.L)*”, “*Apc2.L*”, “*A0A1L8FID5*”;

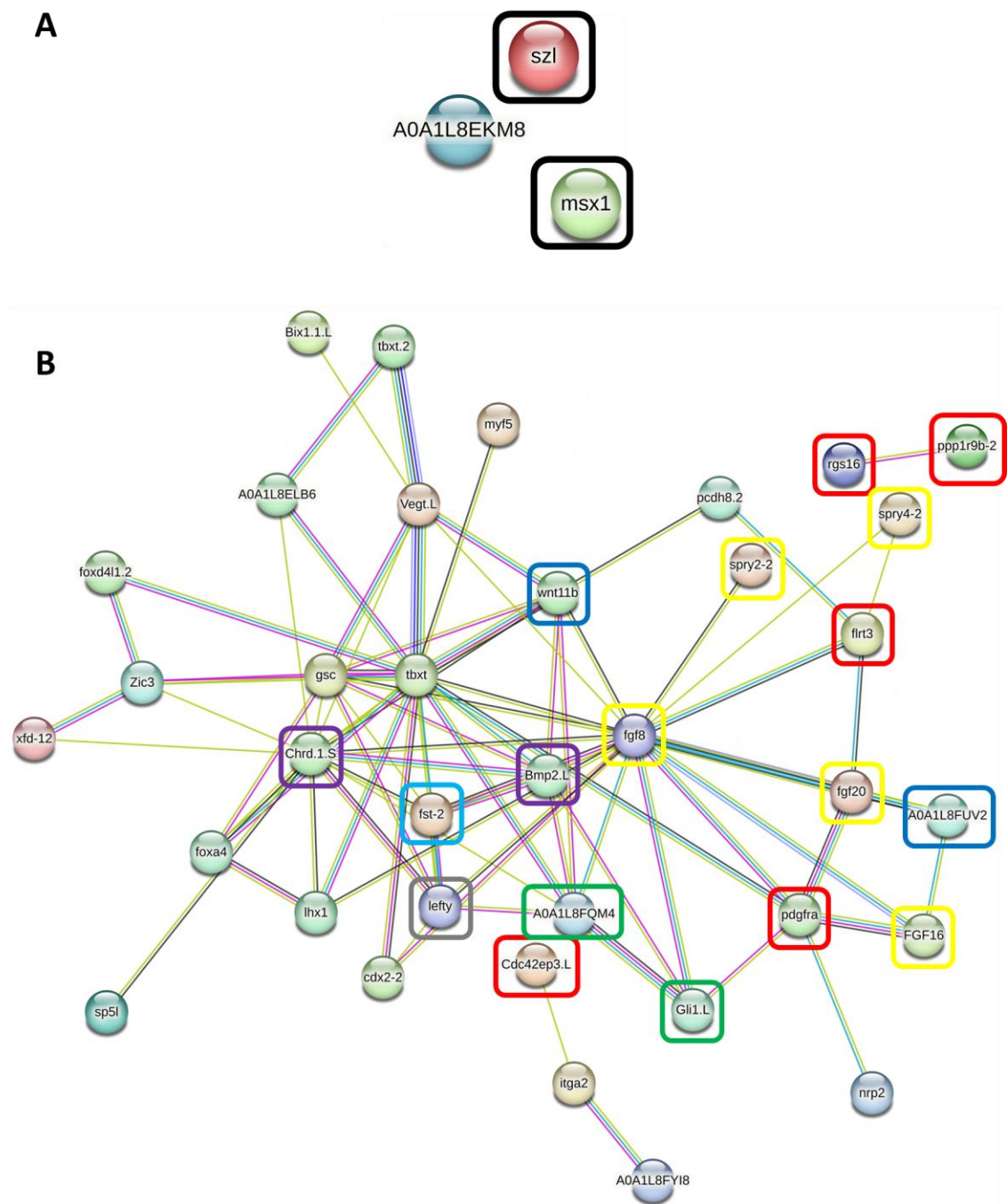
Finalmente, estos resultados reafirman la importancia de la señalización de proteína G en la ZMD, tejido encargado de la inducción de la CN, que además comprende al organizador de Spemann-Mangold; así como en la mantención de

la identidad de CN en etapas de néurula, en conjunto con otras vías de señalización como Wnt, BMP y FGF. No obstante, más estudios son necesarios para definir si existe una interacción directa entre estas vías de señalización.



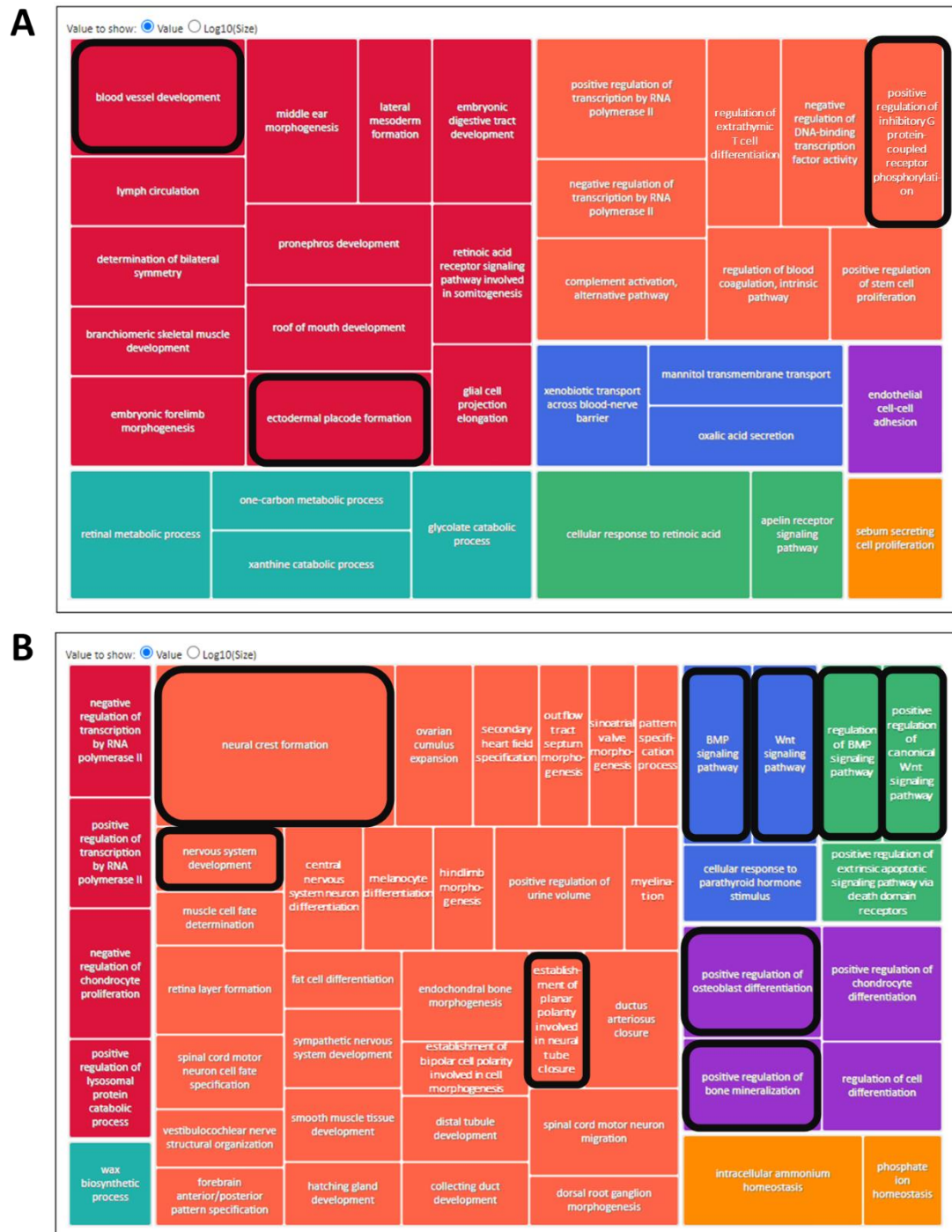
**Figura 22. Términos GO enriquecidos de los genes diferencialmente expresados en zona marginal dorsal y ortólogos entre *X. laevis* y *X. tropicalis*. A través del**

programa topGO, se obtuvo un conjunto de procesos biológicos para los genes que eran ortólogos entre ambas especies de *Xenopus*, y que se encontraban diferencialmente expresados a la baja (A), y al alza (B) en tejido de ZMD, en comparación con caperuza animal en tejido específico de embriones en estadio 10. Los resultados son representados por medio de un *tree map*, donde cada conjunto de procesos relacionados entre sí se les otorga un color de forma arbitraria, los procesos de interés se destacan con un recuadro negro.  $p < 0,05$ .



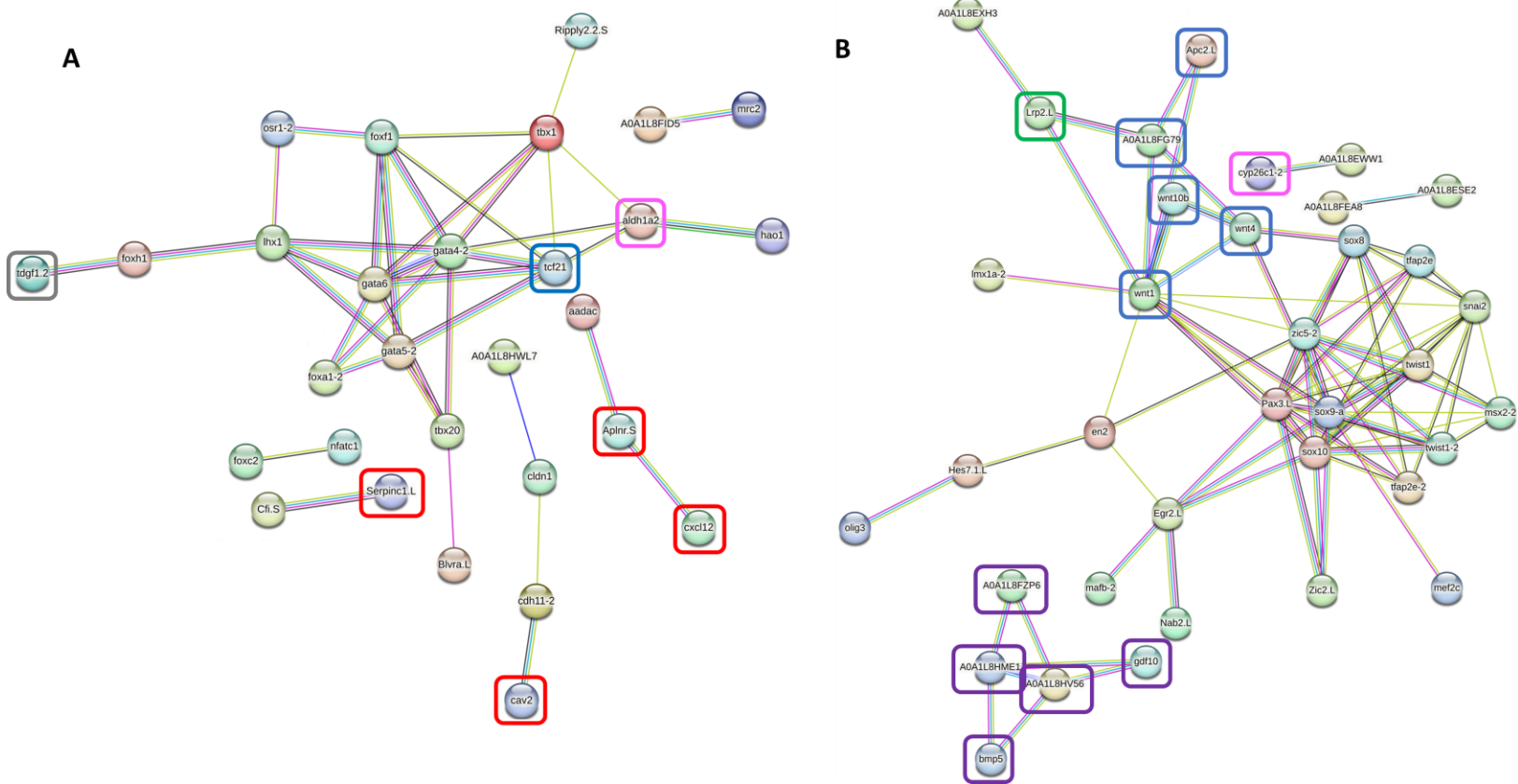
**Figura 23. Redes de interacción proteica entre los genes diferencialmente expresados y ortólogos en ZMD.** Empleando el programa STRING, se obtuvo un conjunto de interacciones entre las proteínas codificadas por los genes diferencialmente

expresados en ZMD, en comparación con caperuza animal, y ortólogos entre ambas especies de *Xenopus*. En A se observa las interacciones obtenidas con los genes expresados a la baja (0 grupos asociados), mientras que en B se observan las interacciones obtenidas con los genes expresados al alza (3 grupos asociados). Se destacan en recuadros de colores aquellas proteínas asociadas a vías de señalización como se indica a continuación: en rojo: Proteína G heterotrimérica; en azul: Wnt; en morado: BMP; en verde: Hedgehog; en amarillo: FGF; en gris: Nodal; en celeste: Activin.



**Figura 24. Términos GO enriquecidos de los genes diferencialmente expresados en cresta neural y ortólogos entre *X. laevis* y *X. tropicalis*. A través del programa**

topGO, se obtuvo un conjunto de procesos biológicos para los genes que eran ortólogos entre ambas especies de *Xenopus*, y que se encontraban diferencialmente expresados a la baja (A), y al alza (B) en tejido de cresta neural, en comparación con placodas, en datos de tejido específico de embriones en estadio 16. Los resultados son representados por medio de un *tree map*, donde cada conjunto de procesos relacionados entre sí se les otorga un color de forma arbitraria, los procesos de interés se encuentran marcados por un recuadro negro.  $p < 0,05$ .



**Figura 25. Redes de interacción proteica entre los genes diferencialmente expresados y ortólogos en cresta neural.** Empleando el programa STRING, se obtuvo un conjunto de interacciones entre las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados en cresta neural, en comparación con placodas, y ortólogos entre ambas especies de *Xenopus*.

En A se observa las interacciones obtenidas con los genes expresados a la baja (6 grupos asociados), mientras que en B se observan las interacciones obtenidas con los genes expresados al alza (4 grupos asociados). Se destacan en recuadros de colores aquellas proteínas asociadas a vías de señalización como se indica a continuación: en rojo: Proteína G heterotrimérica; en azul: Wnt; en morado: BMP; en rosado: Ácido retinoico; en verde: Hedgehog; en gris: Nodal.

## DISCUSIÓN

El desarrollo embrionario ha interesado durante décadas a un gran número de científicos debido a su alta heterogeneidad y complejidad dadas las variables presentes entre las distintas especies en las que se ha estudiado. Dentro de estas, la especie *Xenopus* ha sido una de las empleadas para el estudio de la embriogénesis, debido a su desarrollo embrionario externo y su ciclo de desarrollo de corta duración (Gilbert, 2005). En la actualidad, se ha descrito que en *Xenopus*, el establecimiento del eje dorsal-ventral del embrión está dado por la entrada del espermatozoide (De Robertis y Kuroda, 2004, Gilbert, 2005), desarrollándose el tejido dorsal en el extremo opuesto a la entrada de este, lugar donde se origina el centro de Nieuwkoop (Gilbert, 2005). Durante las etapas de blástula, el tejido endodermal induce la formación del mesodermo en el tejido ectodermal adyacente, mientras que el centro de Nieuwkoop induce la formación del centro organizador de Spemann-Mangold en el mesodermo dorsal (Kiecker y col., 2016). Este organizador es el encargado de modelar los tres ejes principales del embrión (antero-posterior, dorsal-ventral, derecho-izquierdo), enviando señales que influyen en el desarrollo de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo, endodermo) (Niehrs, 2004). A su vez, el mesodermo dorsal puede ser subdividido en tres zonas: la zona marginal dorsal, la zona marginal dorso-

lateral y la zona marginal lateral, de estas tres, la zona marginal dorso-lateral es capaz de inducir la formación de la CN (modelo celular de interés en esta tesis), a partir del borde de placa neural en estadíos de gástrula tardía (Steventon y Mayor, 2012). Para que los procesos de inducción de CN se lleven a cabo es necesario la constante regulación de distintas vías de señalización, algunas de las más estudiadas son las vías de Wnt, BMP, FGF y Notch, pero no son las únicas involucradas (Prasad y col., 2013).

Una de las vías de señalización ampliamente estudiada es la señalización de proteína G heterotrimérica, la cual se ha visto implicada en procesos de desarrollo en distintas especies, como rana, mosca, ratón (Malbon, 2005). Esta vía de señalización puede ser activada por medio de su GPCR, y además regulada por otras proteínas accesorias, tales como GDI (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*), GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) y GAP (*GTPase-accelerating protein*), de las cuales, en esta tesis nos centramos en el estudio de la proteína Ric-8A, la cual es un GEF para las distintas subunidades G $\alpha$ , capaz de activar su cascada de señalización en ausencia del receptor. Se ha visto a la proteína Ric-8 cumpliendo un rol crucial en desarrollo embrionario en distintas especies, en procesos como división asimétrica en *C. elegans*, gastrulación en *Drosophila*, u ovogénesis en embriones de ratón (Afshar y col., 2004; Hampoelz y col., 2005; Saare y col., 2015). Además, en nuestro laboratorio se ha descrito la expresión de Ric-8A en tejidos de cresta neural y derivados de esta, en

embriones de *Xenopus* (Maldonado-Agurto y col., 2011), y se ha visto implicada en procesos de inducción y migración de células de la CN, donde se determinó que la pérdida de función de Ric-8A afecta la migración y polaridad de las células de CN craneal (Fuentealba y col., 2013; Leal y col., 2018) y la formación del tejido de CN (Rodríguez 2016, Tesis de Magíster), por lo que en esta tesis uno de los objetivos que se propusieron fue dilucidar el rol que Ric-8A está cumpliendo en la inducción de la CN y formación del mesodermo (tejido inductor de la CN) empleando técnicas de hibridación *in situ* y RT-qPCR. Se determinó que el silenciamiento de Ric-8A afecta la formación del mesodermo dorsal, ya que se observó la ausencia de la expresión de los marcadores *chd* y *gsc* en los embriones inyectados. Sin embargo, los resultados obtenidos por RT-qPCR evidenciaron niveles de expresión diferentes de los marcadores en condiciones de pérdida de función de Ric-8A, donde solo la expresión de *gsc* disminuyó, mientras que la expresión de *chd* se mantuvo y queratina *xk81a1* presentó un alza con respecto a los embriones controles. La diferencia en los resultados entre ambas técnicas es interesante, ya que ambas se basan en la detección del ARNm del marcador expresado, por lo que se esperaba una correlación entre los resultados obtenidos. Sin embargo, la forma de visualización del resultado final de cada técnica es lo que podría provocar estas variaciones. En el caso de la técnica de hibridación *in situ*, el resultado es la visualización tridimensional superficial del embrión completo, que sesga la evaluación a un análisis externo de la expresión, por lo que factores como el engrosamiento de tejidos o

expresiones internalizadas (ectópicas) serían ignoradas, y solo podrían dilucidarse por medio de técnicas de aclaramiento de tejido o cortes. Por otro lado, en la técnica de RT-qPCR, el resultado se determina empleando el total de copias de ARNm del marcador que están siendo expresadas en el lado inyectado del embrión completo, por lo que adiciona tanto la expresión externa visible como interna que el individuo presenta (Villanueva y col., 2002; Nolan y col., 2006; Hassler y col., 2007; Jensen, 2014; Saint-Jeannet, 2017). Adicionalmente, en nuestro laboratorio se ha observado que al silenciar a Ric-8A empleando un ARNsh específico, no se observan cambios en el ectodermo no neural al analizar la expresión de un marcador de queratina en embrión completo de *Xenopus* por hibridación *in situ*, sin embargo, al realizar el mismo análisis en cortes de tejido, se pudo determinar la presencia de células que expresaban el marcador de ectodermo no neural entre el tejido neural en néurulas de *Xenopus* (Toro-Tapia, 2012, Unidad de Investigación, Anexo IV), lo que respalda la posibilidad de una expresión ectópica de los marcadores o, en el caso de queratina, un engrosamiento de tejido, no perceptible por medio de hibridación *in situ*. Considerando estos antecedentes, sería necesario realizar un estudio más acabado de la expresión cualitativa de los marcadores antes mencionados, empleando técnicas de aclaramiento de tejidos o ensayos de hibridación *in situ* en cortes de tejido, para determinar realmente cual es el efecto que Ric-8A está ejerciendo sobre el tejido mesodermal y ectodermal. Para profundizar aún más en el efecto que el silenciamiento de Ric-8A está ejerciendo sobre el mesodermo

dorsal, y considerando que la expresión de *chd* es estrictamente necesaria para la inducción neural (Kuroda y col., 2004), se comprobó el patrón de expresión del marcador neural *sox2* bajo condiciones de silenciamiento de Ric-8A, observándose un patrón de expresión ectópica y menos restringida con respecto a la condición *wild type*, lo que apoyaría que Ric-8A está generando una expresión ectópica y no un silenciamiento de *chd*. Con estos resultados, es posible sugerir que Ric-8A es necesario para la correcta formación del mesodermo, ya que la pérdida de función de este altera los niveles y patrones de expresión normales de los marcadores mesodermales y ectodermales estudiados, afectando en consecuencia a los tejidos inducidos por estos.

Considerando que Ric-8A es un GEF para las distintas familias de las subunidades G $\alpha$  (Tall y col. 2003), que es necesario para la correcta expresión de los marcadores mesodermales, y que se ha descrito la expresión de las proteínas G $\alpha$ s, G $\alpha$ 13, G $\alpha$ q y G $\alpha$ i2 en tejido de mesodermo dorsal en embriones de *Xenopus* (Fuentealba y col., 2016), el siguiente objetivo en que nos enfocamos durante este trabajo de tesis, fue determinar si las proteínas G $\alpha$  están cumpliendo un rol en la formación de este tejido, específicamente G $\alpha$ q y G $\alpha$ i2. Curiosamente, el silenciamiento de G $\alpha$ q afectó la inducción de la CN, mientras que el silenciamiento de G $\alpha$ i2 no generó un efecto considerable sobre el tejido de CN. En concordancia con estos resultados, se observó que el silenciamiento de G $\alpha$ q afectó la expresión de los marcadores *chd* y *xbra*, presentando una reducción de

los niveles de expresión de estos marcadores, mientras que el silenciamiento de Gai2 no presentó un efecto sobre los marcadores, tanto de mesodermo como ectodermo. En literatura, se ha descrito la participación de ambas proteínas en procesos asociados a la gastrulación, donde se observó a Gai2 en conjunto con Ric-8A en procesos asociados al establecimiento de la polaridad celular en embriones de *Xenopus* (Arriagada, 2012, Tesis de Magister), mientras que la sobreexpresión de Gαq afecta la formación del mesodermo dorsal, a través de la vía no canónica de Wnt-Calcio, antagonizando a su vez a la vía canónica de Wnt-β-catenina (Soto y col. 2007). Además, se ha descrito que la inhibición de Calcineurina, una proteína sensible a las alzas en los niveles de calcio intracelular y que puede ser activada por la señalización de Gαq, provoca una reducción de la expresión del marcador *chd* en células madre embrionarias de murino (Cho y col., 2014). También se ha descrito la presencia de niveles altos de calcio intracelular en la zona marginal dorsal, específicamente en el borde director mesodermal de gástrulas de *Xenopus* (Hayashi y Ueno, 2018), y tanto la inhibición como la sobreexpresión de Gαq provoca fenotipos de embriones ventralizados en etapas de neurula tardía en embriones de *Xenopus laevis*, sumado a la ausencia de la expresión de los marcadores *chd* y *gsc* al sobreexpresar Gαq (Soto, 2006, Tesis de Doctorado). Todos estos antecedentes parecen indicar que la correcta formación y desarrollo del tejido mesodermal en etapas de gástrula requieren una alta regulación de los niveles de Gαq en el tejido dorsal del embrión, ya que tanto la sobreexpresión como la inhibición de esta

proteína afecta la correcta formación de este tejido. Cabe señalar que durante esta tesis se observó la presencia de exogástrulas en embriones en etapa de néurula morfantes para Gαq (~30% del total, data no mostrada), y considerando que se ha descrito que niveles altos de calcio en el frente migratorio mesodermal en etapas de gástrula, en conjunto con la actividad de la GTPasa pequeña Rac1, son requeridos para la correcta migración del mesodermo durante la gastrulación en embriones de *Xenopus* (Hayashi y Ueno, 2018), sería interesante determinar si Gαq, además de ser requerida para la formación del mesodermo, está cumpliendo un rol en los procesos de migración durante las etapas de gástrula.

De igual forma como fue realizado con Ric-8A, se estudió el efecto del silenciamiento de Gαq sobre la formación del tejido neural por medio del análisis de la expresión de *sox2*, observándose la reducción de su expresión en el lado inyectado del embrión versus el lado control. Aunque Gαq, al igual que Ric-8A provoca un efecto sobre el tejido mesodermal y la formación del tubo neural, los resultados son diferentes. Si consideramos que el objetivo era determinar, qué proteína Gα se encuentra regulando estos procesos, en conjunto con Ric-8A, los resultados obtenidos con Gαq no son comparables a los obtenidos con Ric-8A, sin embargo, se debe considerar que Ric-8A no solo modula a Gαq, y que el efecto observado al silenciar esta proteína podría deberse a una sinergia de efectos sobre distintas cascadas de señalización. Este fue el motivo que llevó a analizar la función de otra Gα, siendo Gαi2 seleccionada, por su importancia en

etapas tempranas de desarrollo, en polaridad celular, división asimétrica, así como también antecedentes que reportan su importante rol en la migración de la CN craneales (Arriagada, 2012, Tesis de Magister; Villaseca y col., en revisión). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis, en conjunto con estudios que indicaron que la sobreexpresión de *Gai2* no afecta al mesodermo dorsal (Soto y col. 2007) parecen indicar que *Gai2* no participa en procesos asociados a la formación de mesodermo. Sin embargo, se debe considerar que las concentraciones de morfolino contra *Gai2* empleadas en esta tesis buscaban ser comparables con las empleadas para *Ric-8A* y *Gαq*, por lo que no se empleó concentraciones que sobrepasaran los 35 ng por blastómero en embriones de 2 células, aun cuando en bibliografía, para estudios de migración de CN se emplearon concentraciones de 35 ng en 2 blastómeros de embriones de 8 células (Villaseca y col., en revisión), por lo que no se descarta que la concentración de morfolino empleada durante esta tesis no fuera suficiente para provocar un fenotipo visible. Siguiendo esta línea, el siguiente punto a determinar fue si *Gαq* se encuentra siendo modulado por *Ric-8A* durante la formación del mesodermo dorsal, pese a que los efectos de sus silenciamientos difieren entre sí. Para esto, se realizaron ensayos de epistasis donde se comprobó que la sobreexpresión de *Gαq* era capaz de recuperar la condición morfante de *Ric-8A*. Todo esto en conjunto nos permite sugerir que *Gαq* se encuentra río abajo en la misma vía de señalización, junto a *Ric-8A*, regulando los procesos de formación del mesodermo dorsal, y por consecuencia, inducción de la CN, sin descartar la

regulación por parte de Ric-8A sobre otras vías de señalización, lo que podría justificar la diferencia de los resultados entre Ric-8A y Gαq.

Para que el proceso de inducción de un tejido se lleve a cabo, se requiere de un tejido que envíe la señal inductora, así como un tejido que responda a esta señal (Gurdon,1987), en el caso de la CN, se sabe que la zona marginal dorso-lateral (ZMDL) proveniente del mesodermo dorsal es aquella que envía la señal, mientras que el borde de placa neural es quien la recibe (Steventon y Mayor, 2012). En literatura se ha descrito que, si se conjuga tejido de la ZMDL con caperuza animal, es posible inducir la formación de CN en esta última (Monsoro-Burq y col., 2003). Ya que en esta tesis se observó que tanto Ric-8A como Gαq regulan la inducción de CN, así como también la expresión de marcadores del mesodermo dorsal, estudiamos si el efecto visto sobre el tejido inductor, es decir, sobre el mesodermo dorsal está relacionado con el efecto sobre la inducción de CN. Como era de esperar, al conjugar ZMDL morfante para Ric-8A con caperuza animal *wild type*, no se observó inducción de la CN, mientras que al realizar el ensayo de epistasis con una sobreexpresión de Gαq, se rescató la inducción, lo mismo sucedió al conjugar ZMDL morfante para Gαq con caperuza animal *wild type*, lo que indica que el rol de Ric-8A y Gαq en el proceso de inducción de la CN estaría asociado al tejido inductor, y ambas proteínas se encuentran en la misma vía de señalización. Por otro lado, en nuestro laboratorio ya se había comprobado que no hay efectos sobre la inducción de CN al conjugar ZMDL *wild*

*type* con caperuza animal morfante para Ric-8A (Rodríguez, 2016, tesis de magister) observándose una inducción normal de la CN, mientras que durante la realización de esta tesis, se comprobó que al conjugar ZMDL *wild type* con caperuza animal morfante para Gαq, aproximadamente el 50% de las conjugaciones no se formaban, mientras que el otro 50% presentaban un tamaño más pequeño y mayor disgregación celular que las otras condiciones inyectadas, pero si eran capaces de inducir tejido de CN (data no mostrada). Estos resultados en conjunto respaldan que dichas proteínas estarían siendo cruciales para la inducción de CN, específicamente en el tejido inductor, y no en el tejido de respuesta. Por los efectos observados en el mesodermo dorsal, así como en el ectodermo neural y no neural bajo la condición de disminución de la concentración de Ric-8A o Gαq, podríamos sugerir que estas proteínas son necesarias para la correcta formación de los tejidos inductores de la CN, y al no presentar una correcta formación estos tejidos inductores, serían incapaz de conducir a la formación de la CN.

Aunque hasta el momento hemos demostrado que existen proteínas asociadas a la vía de señalización de proteína G heterotrimérica como Gαq y Ric-8A que están relacionadas con procesos de inducción de CN, aún existen muchas proteínas de esta vía de señalización que podrían estar asociadas a este proceso y cuyo rol es aún desconocido. Por esto, se decidió determinar, por medio de un análisis de expresión diferencial usando datos públicos de secuenciación de ARN

tejido específico, qué vías de señalización y procesos biológicos se encuentran activados o inhibidos, ya sea en el tejido inductor de CN (ZMD) o en la CN propiamente tal, centrándonos en aquellas asociadas a la vía de señalización de la proteína G heterotrimérica. Uno de los problemas que se presentó durante este análisis fue que no existía data pública de estos tejidos específicos para la especie *Xenopus tropicalis*, que fue la especie empleada durante este trabajo de tesis, en cambio, existían datos de secuenciación de ARN de tejido específico para la especie *Xenopus laevis*. Sin embargo, a diferencia de la especie *X. tropicalis*, *X. laevis* sufrió una duplicación de su genoma durante la evolución, por lo cual un gran número de genes presenta 2 isoformas en el genoma, L y S (Session y col., 2016). Durante el análisis de expresión diferencial, para identificar a qué gen pertenecen las secuencias de ARN analizadas, las comparamos con el genoma de la especie utilizada. Si una secuencia de ARN se alineaba con más de un gen durante el análisis, la eliminamos debido a un “alineamiento ambiguo”. Como resultado, solo pudimos conservar aproximadamente el 60% de las secuencias de ARN obtenidas en esta etapa perdiendo alrededor del 40%, incluyendo los transcritos de  $G\alpha$  y Ric-8A. Cabe destacar que, para poder extrapolar la data obtenida de una especie (*X. laevis*) a otra (*X. tropicalis*), fue necesario determinar y seleccionar solo los genes ortólogos entre ambas especies, lo que redujo aún más la data empleada. Aun así, fue posible encontrar, entre los genes diferencialmente expresados, los marcadores tejido-específicos analizados durante este trabajo de tesis (*chd*, *gsc*, *snail2*), lo que respalda que el

análisis bioinformático realizado fue correcto, además de genes asociados a la señalización de proteína G, como receptores y proteínas G pequeñas, que apoyan la hipótesis de que esta vía está cumpliendo un rol importante en los tejidos de ZMD y CN.

Una vez seleccionados los genes diferencialmente expresados, se procedió a determinar las vías de señalización que se encontraban enriquecidas en estos tejidos específicos, con el objetivo de encontrar a la vía de señalización de proteína G heterotrimérica o vías asociadas a esta. Para esto, se empleó BlastKoala, y los resultados se extrapolaron a la base de datos KEGG, sin embargo, se presentaron una serie de problemas durante el análisis, uno de ellos es que en la base de datos KEGG no existe la vía de señalización de proteína G por si sola, sino como un complemento de otras vías de señalización, segundo, que gran parte de las proteínas pertenecientes a la familia de proteínas G no podían ser clasificadas en ninguna vía de señalización por falta de información, por lo que, a pesar de determinar las vías enriquecidas de los genes diferencialmente expresados en estos tejidos, no fue posible asociar esta información a la señalización de proteína G, por lo que estos resultados fueron descartados (Resultados no mostrados). Empleando otro enfoque, se seleccionó la base de datos STRING para determinar interacción entre proteínas que se hayan visto asociadas en bibliografía, y de esta manera extrapolar esta información a posibles vías de señalización asociadas a la proteína G

heterotrimérica, esto se realizó en paralelo con un análisis de enriquecimiento de términos GO. Los procesos enriquecidos que arrojó este análisis coinciden con los esperados para los tejidos específicos empleados, en el caso de la ZMD, se encontraron al alza procesos asociados a la especificación del eje embrionario, migración y diferenciación celular, principalmente. Mientras que en la CN encontramos procesos como formación de CN, desarrollo de tejido óseo, sistema nervioso y tejido cardíaco, correspondientes a tejidos derivados de la CN. De la misma forma, se identificaron proteínas que han sido reportadas, pertenecientes a vías de señalización que participan en dichos procesos, como son las vías de Wnt, BMP y FGF. Si nos centramos en las proteínas, es posible identificar un conjunto de ellas que, se han descrito, pertenecen o interaccionan con proteínas de la vía de señalización de proteína G. En los resultados obtenidos para ZMD, se pudo identificar a la proteína “*rgs16*” (*regulator of G-protein signaling 16*), la cual se asocia con la proteína “*ppp1r9b-2*” (*spinophilin*), que se ha descrito que en células HEK293 es capaz de interaccionar con distintos tipos de proteínas rgs (entre estas *rgs16*) y unir las a los receptores GPCR, permitiendo que esta proteína regule la actividad de la vía (Wang y col., 2005). Por otro lado, es posible identificar a la proteína “*cdc42ep3.L*” (*cdc42 effector protein 3*), la cual se sabe, es un efector de la proteína “*cdc42*”, (una proteína de la familia Rho de proteínas G pequeñas). Se ha descrito que “*cdc42ep3.L*” co-localiza con filamentos de septina y es capaz de reforzar tanto las redes de septina como de actina, por lo que se le ha asociado con la morfología celular y migración de tejidos en

fibroblastos (Farrugia y Calvo, 2016); de acuerdo con el análisis bioinformático en este trabajo de tesis, se encontró asociada con “*itga2*” (*integrin alpha 2*), una integrina, sin embargo, no existe información aun en bibliografía que respalde esa interacción. Considerando que ambas proteínas participan en procesos de morfología y migración celular, sería interesante determinar si realmente pueden estar funcionando en conjunto. Otra proteína que llamó la atención en nuestro análisis fue “*flrt3*” (*fibronectin leucine-rich repeat transmembrane 3*), la cual se ha descrito siendo parte de un conjunto de vías de señalización y cumpliendo diversas funciones. Entre ellas, se ha visto que interacciona en *cis* con receptores de FGF (FGFR), regulando de esa forma la vía de señalización de FGF, por otro lado, se ha visto a la proteína “*flrt3*” modulando la adhesión celular por medio de su interacción con cadherinas y protocadherinas, que en el caso de este análisis bioinformático, se le puede ver asociada con la proteína “*pcdh8.2*” (*protocadherin 8, gene 2*), una protocadherina, a través de la Gtpasa pequeña “Rnd1”, por medio de la señalización Activin/Nodal → Flrt3 → Rnd1 → cadherinas. Finalmente, se ha descrito que “*flrt3*” interacciona en *trans* con la proteína latrofilina-1 (Lphn1), la cual es un GPCR que regula el desarrollo de sinapsis excitatorias, y cuya interacción genera la liberación de calcio proveniente del retículo endoplasmático, probablemente asociado a Gαq (Ogata y col., 2007; O’Sullivan y col., 2012, Krishnan y Schiöth, 2015). Por ultimo tenemos a las proteínas “*wnt11b*” y “*pdgfra*” (*platelet-derived growth factor receptor alpha*), de las cuales, en el caso de “*wnt11b*” se ha descrito que, en conjunto con *wnt5*, son capaces

de señalizar a través de la vía no canónica de Wnt/Calcio, en estadios de gástrula de pez cebra (Westfall y col., 2003), mientras que “*pdgfra*”, se ha descrito asociada a receptores *pdgfr* en conjunto con  $G\alpha 13$  en procesos de migración celular en gástrulas de *Drosophila*, por lo que sería interesante determinar que rol podría estar cumpliendo en el tejido de ZMD de *Xenopus* (Wang y col., 2011). Por otro lado, en los resultados obtenidos en CN, se pudo identificar la presencia de las proteínas Wnt “*wnt4*” (vía no canónica) y “*wnt10b*” (vía canónica y no canónica) que, aunque no se les ve interaccionando con proteínas de la vía de señalización de proteína G, se ha descrito en bibliografía que la proteína “*wnt10b*” activa a la proteína G pequeña *Rac1* por medio de la vía canónica y no canónica de wnt, permitiendo así que *Rac1* transporte a  $\beta$ -catenina al núcleo, durante la proliferación de células endoteliales corneales humanas (Lee y Heur, 2015). Además, se ha descrito a la proteína “*wnt4*” cumpliendo un importante rol en la transición epitelio-mesénquima sufrida por el mesénquima metanéfrico necesaria para la formación de nefronas durante el desarrollo renal, por medio de la activación de la vía no canónica de Wnt/Calcio (Tanigawa y col., 2011). Además, se encontró al gen “*serpinc1.L*” expresado a la baja en CN que, aunque existe escasa información al respecto de sus funciones en este tejido, se sabe que cumple un importante rol en la inhibición de la migración en neutrófilos, bloqueando la señalización mediada por el receptor IL-8 (CXCR1), vía proteína G heterotrimérica (Roemisch y col., 2002). Finalmente, se destaca la presencia del gen “*cxc12*”, el cual se sabe, es un quimioattractante secretado por las

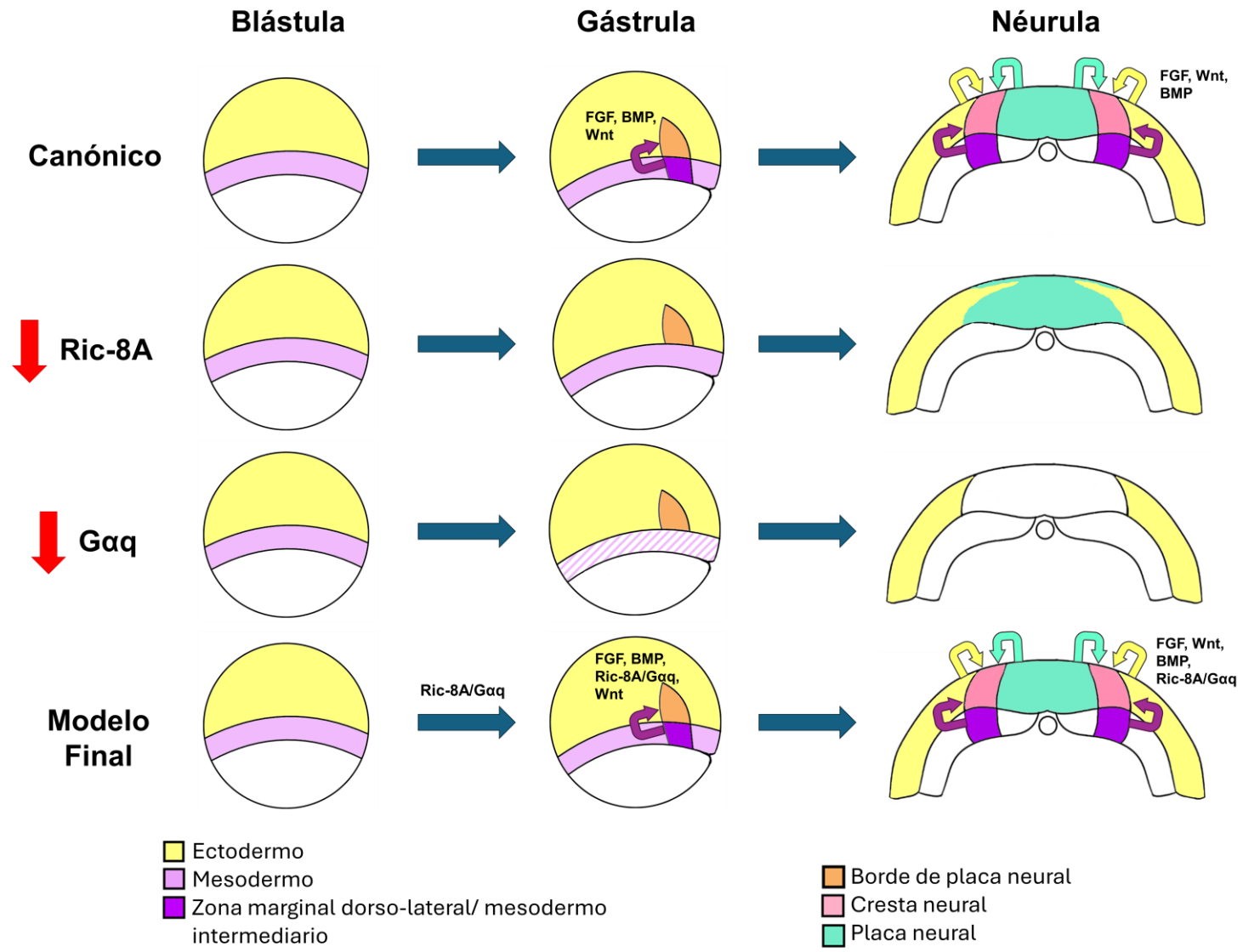
placodas para guiar la migración celular de las CN, activando la vía señalización de proteína G heterotrimérica por medio de su unión al receptor Cxcr4 (Szabó y Mayor, 2018). Todos estos resultados en conjunto apoyan la hipótesis de que la vía de señalización de proteína G heterotrimérica está cumpliendo un importante rol en los tejidos de CN y zona marginal dorsal (junto con el organizador de Spemann-Mangold), no solo en su formación, sino también en el desarrollo de los tejidos que están relacionados con estos, en conjunto con otras vías de señalización que se han visto asociadas. Todo esto permite sugerir la posible conexión entre estas vías y la señalización Ric-8A/Gαq en dichos tejidos.

Finalmente, todos los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis nos permiten concluir que las vías de señalización de la proteína G heterotrimérica, principalmente aquellas reguladas por Ric-8A y Gαq son necesarias para la correcta formación del mesodermo dorsal, ectodermo neural y no neural y, en consecuencia, necesarias para la correcta inducción de la CN (Figura 26). Por otro lado, nuestros resultados bioinformáticos confirman la participación de otras vías de señalización tales como Wnt, BMP, FGF, las cuales estarían actuando en conjunto con la vía de la proteína G heterotrimérica durante la inducción y mantención de la CN, y en tejidos cruciales para la inducción de la CN, como el organizador de Spemann-Mangold en la ZMD. Sin embargo, más estudios son necesarios para poder definir los mecanismos de interacción directa entre estas vías de señalización.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, es posible concluir que:

- Ric-8A se requiere para la correcta formación del mesodermo dorsal, ectodermo no neural y la inducción de cresta neural.
- Gαq se requiere para la correcta formación del mesodermo dorsal y la inducción de cresta neural.
- Gαi2 no sería requerido en procesos de formación del mesodermo dorsal y a través de este de la inducción de la cresta neural.
- Ric-8A y Gαq estarían siendo parte de la misma vía de señalización durante la formación del mesodermo dorsal.
- Ric-8A y Gαq son requeridos para la correcta formación del ectodermo neural.
- Ric-8A y Gαq son requeridos en el tejido inductor de la cresta neural, es decir, en la zona marginal dorso-lateral del mesodermo dorsal, durante el proceso de inducción de la cresta neural.
- Las vías de señalización de proteína G heterotrimérica se encuentran activas en los tejidos de la zona marginal dorsal (organizador de Spemann-Mangold) durante la gástrula, y cresta neural/placodas en néurula, en conjunto con otras vías de señalización como Wnt, BMP y FGF.



**Figura 26. Modelo Final.** En el modelo canónico (primera fila), la zona marginal dorso-lateral induce la formación de cresta neural en el borde de placa neural en etapas de gástrula. Luego el mesodermo intermediario, ectodermo neural y no neural inducen y mantienen al tejido de cresta neural en etapas de néurula. En la condición morfante para Ric-8A (segunda fila), la formación del mesodermo dorsal y la señal inductora proveniente de la zona marginal dorso-lateral se ven afectadas, por lo que no se induce la formación de la cresta neural, y se genera la expresión ectópica de los tejidos de ectodermo neural y no neural en etapa de néurula. En la condición morfante para Gαq (tercera fila), la formación del mesodermo dorsal y el tejido pam-mesodermal se ven afectados en etapas de gástrula, así como la señalización inductora de cresta neural proveniente de la zona marginal dorso-lateral, lo que lleva a la ausencia de cresta neural y placa neural en las etapas de néurula. Finalmente, se plantea como modelo final (cuarta fila) que la señalización de Ric-8A/Gαq es necesaria para el proceso de inducción de cresta neural, en conjunto con las vías de señalización ya descritas en etapas de gástrula y néurula (BMP, Wnt, FGF).

## GLOSARIO

|                   |   |                                                                                                 |
|-------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AC</b>         | : | caperuza animal                                                                                 |
| <b>ADN</b>        | : | Ácido desoxirribonucleico                                                                       |
| <b>AP</b>         | : | “Alkaline Phosphatase”, Fosfatasa alcalina                                                      |
| <b>ARN</b>        | : | Ácido Ribonucleico                                                                              |
| <b>ARNm</b>       | : | ARN mensajero                                                                                   |
| <b>Benzocaína</b> | : | p-aminobenzoato de etilo                                                                        |
| <b>BMP</b>        | : | “Bone Morphogenetic Protein”, Proteína morfogenética del hueso                                  |
| <b>BPN</b>        | : | Borde de placa neural                                                                           |
| <b>CN</b>         | : | Cresta neural                                                                                   |
| <b>EDTA</b>       | : | Ácido Etileno Diámino Tetra-acético                                                             |
| <b>FBS</b>        | : | “Fetal Bovine Serum”, Suero Fetal Bovino                                                        |
| <b>FGF</b>        | : | “Fibroblast Growth Factor”, Factor de crecimiento de Fibroblastos                               |
| <b>GAP</b>        | : | “GTPase-accelerating protein”, Proteína Activadora de GTPasa                                    |
| <b>GDI</b>        | : | “guanine nucleotide dissociation inhibitor”, inhibidor de disociación del nucleótido de guanina |
| <b>GDP</b>        | : | Guanosina 5'-difosfato                                                                          |
| <b>GEF</b>        | : | “ <i>guanine nucleotide exchange factor</i> ”, Factor Intercambiador de Nucleótidos de Guanina  |
| <b>GO</b>         | : | Gene Ontology                                                                                   |
| <b>GPCR</b>       | : | Receptor acoplado a proteína G                                                                  |
| <b>GTP</b>        | : | Guanosina 5'-trifosfato                                                                         |

|                 |   |                                                          |
|-----------------|---|----------------------------------------------------------|
| <b>HCG</b>      | : | Hormona Coriónica Gonadotropina Humana                   |
| <b>IP3</b>      | : | Inositol trifosfato                                      |
| <b>L15</b>      | : | Medio Leibovitz 15                                       |
| <b>LB</b>       | : | Medio Luria Bertani                                      |
| <b>M</b>        | : | Molar                                                    |
| <b>MAB</b>      | : | “Maleic Acid Buffer”, tampón ácido maleico               |
| <b>MEMFA</b>    | : | Minimum Essential Medium-Formaldehyde                    |
| <b>mL</b>       | : | Mililitros                                               |
| <b>mM</b>       | : | Milimolar                                                |
| <b>MoCtl</b>    | : | Oligonucleótido morfolino control                        |
| <b>MoGai2</b>   | : | Oligonucleótido morfolino contra Gai2                    |
| <b>MoGaq</b>    | : | Oligonucleótido morfolino contra Gaq                     |
| <b>MoRic-8A</b> | : | Oligonucleótido morfolino contra Ric-8A                  |
| <b>MR</b>       | : | “Modified Ringer”                                        |
| <b>NAM</b>      | : | “Normal Amphibian Medium”                                |
| <b>NBT/BCIP</b> | : | Nitro Blue Tetrazolium/ 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato |
| <b>ng</b>       | : | Nanogramos                                               |
| <b>nM</b>       | : | Nanomolar                                                |
| <b>PBS</b>      | : | “Phosphate Buffered Saline”, Tampón Fosfato Salino       |
| <b>PCP</b>      | : | Planar cell polarity                                     |
| <b>PEG</b>      | : | Polietilenglicol                                         |
| <b>pg</b>       | : | Picogramos                                               |
| <b>pl</b>       | : | Placodas                                                 |
| <b>qPCR</b>     | : | reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa         |
| <b>RGS</b>      | : | Regulador de la Señalización de proteínas G              |
| <b>Ric-8</b>    | : | Resistencia a inhibidores de la Colinesterasa 8          |
| <b>ARN-Seq</b>  | : | Secuenciación de ARN                                     |
| <b>Rpm</b>      | : | revoluciones por minuto                                  |
| <b>RT</b>       | : | transcripción reversa                                    |

|                            |   |                                            |
|----------------------------|---|--------------------------------------------|
| <b>SRA</b>                 | : | Sequence Read Archives                     |
| <b>SSC</b>                 | : | “Saline-Sodium Citrate”                    |
| <b>TE</b>                  | : | Tampón Tris-HCl – EDTA                     |
| <b>Wnt/Ca<sup>+2</sup></b> | : | Vía no canónica de Wnt, mediada por calcio |
| <b>Wnt</b>                 | : | “wingless-type”                            |
| <b>ZMD</b>                 | : | Zona marginal dorsal                       |
| <b>ZMDL</b>                | : | Zona marginal dorso-lateral                |
| <b>µg</b>                  | : | Microgramos                                |
| <b>µL</b>                  | : | Microlitros                                |
| <b>°C</b>                  | : | Grados Celsius                             |

## BIBLIOGRAFÍA

Afshar, K., Willard, F. S., Colombo, K., Johnston, C. A., McCudden, C. R., Siderovski, D. P., & Gönczy, P. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent G $\alpha$  function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell*, 119(2), 219-230.

Alexa, A., Rahnenführer, J., & Lengauer, T. (2006). Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics*, 22(13), 1600-1607.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.

Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166-169.

Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Archbold, H. C., Yang, Y. X., Chen, L., & Cadigan, K. M. (2012). How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Acta physiologica*, 204(1), 74-109.

Arriagada C. (2012). Análisis de la localización subcelular de XtRic-8A y de su participación en la polarización celular en embriones de *X. tropicalis*. Tesis para obtener el grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática, Universidad de Concepción.

Birnbaumer L. (2007). Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: From 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *BiochimBiophysActa* 1768:772–793.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Calmont, A., Ivins, S., Van Bueren, K. L., Papangelis, I., Kyriakopoulou, V., Andrews, W. D., Martin, J. F., Moon, A. M., Illingworth, E. A., Basson, M. A., & Scambler, P. J. (2009). Tbx1 controls cardiac neural crest cell migration during arch artery development by regulating Gbx2 expression in the pharyngeal ectoderm. *Development*, 136(18), 3173-3183.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 1-9.

Chen, J. A., Voigt, J., Gilchrist, M., Papalopulu, N., & Amaya, E. (2005). Identification of novel genes affecting mesoderm formation and morphogenesis through an enhanced large scale functional screen in *Xenopus*. *Mechanisms of development*, 122(3), 307-331.

Cho, A., Tang, Y., Davila, J., Deng, S., Chen, L., Miller, E., Wernig, M., & Graef, I. A. (2014). Calcineurin signaling regulates neural induction through antagonizing the BMP pathway. *Neuron*, 82(1), 109-124.

Cismowski, M. J. (2006, June). Non-receptor activators of heterotrimeric G-protein signaling (AGS proteins). In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 17, No. 3, pp. 334-344). Academic Press.

Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Lab Anim.* 1996 Oct;30(4):293-316. doi: 10.1258/002367796780739871. PMID: 8938617.

De Robertis, E. M. (2009). Spemann's organizer and the self-regulation of embryonic fields. *Mechanisms of development*, 126(11-12), 925-941.

De Robertis, E. M., & Kuroda, H. (2004). Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20, 285-308.

Dhorne-Pollet, S., Th  lie, A., & Pollet, N. (2013). Validation of novel reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in *Xenopus tropicalis* during embryonic and post-embryonic development. *Developmental Dynamics*, 242(6), 709-717.

Farrugia, A. J., & Calvo, F. (2016). The Borg family of Cdc42 effector proteins Cdc42EP1–5. *Biochemical Society Transactions*, 44(6), 1709-1716.

Fitch, W. M. (2000). Homology: a personal view on some of the problems. *Trends in genetics*, 16(5), 227-231.

Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, L., Beyer, A., Henriquez, J. P., Caprile, T., Mayor, R., Marcellini, S., Hinrichs, M. V., Olate, J. & Torrejón, M. (2013). Ric-8A, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, is critical for cranial neural crest cell migration. *Developmental biology*, 378(2), 74-82.

Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Rodríguez, M., Arriagada, C., Maureira, A., Beyer, A., Villaseca, S., Leal, J. I., Hinrichs, M. V., Olate, J., Caprile, T. and Torrejón, M. (2016). Expression profiles of G $\alpha$  subunits during *Xenopus tropicalis* embryonic development. *Gen Exp Patt* 22, 15-25.

Garcia-Marcos, M. (2024). Heterotrimeric G protein signaling without GPCRs: The G $\alpha$ -binding-and-activating motif. *Journal of Biological Chemistry*, 300(3).

Gilbert S. (2005). *Developmental Biology*. 6th edition. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachussets.

Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26:3122–3142.

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

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

Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S. K., Dunican, D., & Knoblich, J. A. (2005). *Drosophila* Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nature cell biology*, 7(11), 1099-1105.

Harb, J., Lin, P. J., & Hao, J. (2019). Recent development of Wnt signaling pathway inhibitors for cancer therapeutics. *Current oncology reports*, 21, 1-9.

Hassler, C., Cruciat, C. M., Huang, Y. L., Kuriyama, S., Mayor, R., & Niehrs, C. (2007). Kremen is required for neural crest induction in *Xenopus* and promotes LRP6-mediated Wnt signaling.

Hayashi, K., Yamamoto, T. S., & Ueno, N. (2018). Intracellular calcium signal at the leading edge regulates mesodermal sheet migration during *Xenopus* gastrulation. *Scientific reports*, 8(1), 2433.

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

Heeg-Truesdell, E., & LaBonne, C. (2006). Neural induction in *Xenopus* requires inhibition of Wnt- $\beta$ -catenin signaling. *Developmental biology*, 298(1), 71-86.

Hong, C. S., Park, B. Y., & Saint-Jeannet, J. P. (2008). Fgf8a induces neural crest indirectly through the activation of Wnt8 in the paraxial mesoderm. *Development*, 135(23), 3903-3910.

Huang, X., & Saint-Jeannet, J. P. (2004). Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Developmental biology*, 275(1), 1-11.

Huelsken, J., & Behrens, J. (2002). The Wnt signalling pathway. *Journal of cell science*, 115(21), 3977-3978.

Jensen, E. (2014). Technical review: In situ hybridization. *The Anatomical Record*, 297(8), 1349-1353.

Takebe, A. D., Huebner, R., Shindo, A., Kwon, K., Kwon, T., Wills, A. E., & Wallingford, J. B. (2020). A temporally resolved transcriptome for developing "Keller" explants of the *Xenopus laevis* dorsal marginal zone. *Developmental Dynamics*.

Karimi, K., Fortriede, J. D., Lotay, V. S., Burns, K. A., Wang, D. Z., Fisher, M. E., Pells, T. J., James-Zorn, C., Wang, Y., Ponferrada V. G., Chu, S., Chaturvedi, P., Zorn, A. M., & Vize, P. D. (2018). Xenbase: a genomic, epigenomic and

transcriptomic model organism database. Nucleic acids research, 46(D1), D861-D868.

Kiecker, C., Bates, T., & Bell, E. (2016). Molecular specification of germ layers in vertebrate embryos. Cellular and Molecular Life Sciences, 73(5), 923-947.

Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., & Matsumoto, S. (2011). New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. International review of cell and molecular biology, 291, 21-71.

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., & Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. Genome biology, 14(4), R36.

Krishnan, A., & Schiöth, H. B. (2015). The role of G protein-coupled receptors in the early evolution of neurotransmission and the nervous system. Journal of Experimental Biology, 218(4), 562-571.

Kristensen, D. M., Wolf, Y. I., Mushegian, A. R., & Koonin, E. V. (2011). Computational methods for Gene Orthology inference. Briefings in bioinformatics, 12(5), 379-391.

Kuroda, H., Wessely, O., & Robertis, E. D. (2004). Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin,  $\beta$ -Catenin, and Cerberus. PLoS biology, 2(5), e92.

Leal, J. I., Villaseca, S., Beyer, A., Toro-Tapia, G., & Torrejón, M. (2018). Ric-8A, a GEF for heterotrimeric G-proteins, controls cranial neural crest cell polarity during migration. Mechanisms of Development, 154, 170-178.

Leal, J.I. (2018). Análisis funcional de Ric-8A en la polaridad celular durante la migración de la cresta neural en *Xenopus tropicalis*. Tesis de Magíster en Bioquímica y Bioinformática, Universidad de Concepción.

Lee, J. G., & Heur, M. (2015). WNT10B enhances proliferation through  $\beta$ -catenin and RAC1 GTPase in human corneal endothelial cells. Journal of Biological Chemistry, 290(44), 26752-26764.

- Leinonen, R., Sugawara, H., Shumway, M., & International Nucleotide Sequence Database Collaboration (2011). The sequence read archive. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), D19–D21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1019>
- Lin, H. H., Ng, K. F., Chen, T. C., & Tseng, W. Y. (2022). Ligands and beyond: Mechanosensitive adhesion GPCRs. *Pharmaceuticals*, 15(2), 219.
- Liu, T., DeCostanzo, A., Liu X, Wang, H., Hallagan, S., Moon, R., Malbon, C. (2001) G Protein Signaling from Activated Rat Frizzled-1 to the  $\beta$ -Catenin-Lef-Tcf Pathway. *Science* 292: 1718.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550.
- Makino, A., Prossnitz, E. R., Bunemann, M., Wang, J. M., Yao, W., & Schmid-Schönbein, G. W. (2006). G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 290(6), C1633-C1639.
- Malbon, C. (2005) G proteins in development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 689-701
- Maldonado-Agurto, R., Toro, G., Fuentealba, J., Arriagada, C., Campos, T., Albistur, M., Henriquez, J.P., Olate, J. Hinrichs, M.V. y Torrejón, M. (2011). Cloning and Spatiotemporal expression of RIC-8 in *Xenopus* embryogenesis. *Gene Expr Patterns*, 11(7):401-8
- Monsoro-Burq, A. H., Fletcher, R. B., & Harland, R. M. (2003). Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals.
- Monsoro-Burq, A.H., Fletcher, R.B. and Harland, R.M. (2003). Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals. *Development* 130: 3111-3124.
- Moreno-Hagelsieb, G., & Latimer, K. (2008). Choosing BLAST options for better detection of orthologs as reciprocal best hits. *Bioinformatics*, 24(3), 319-324.
- 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), 496.

Niehrs, C. (2004). Regionally specific induction by the Spemann–Mangold organizer. *Nature Reviews Genetics*, 5(6), 425-434.

Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(12), 767-779.

Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3), 1559-1582.

Ogata, S., Morokuma, J., Hayata, T., Kolle, G., Niehrs, C., Ueno, N., & Cho, K. W. (2007). TGF- $\beta$  signaling-mediated morphogenesis: modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis. *Genes & development*, 21(14), 1817-1831.

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

Ossipova, O., & Sokol, S. Y. (2011). Neural crest specification by noncanonical Wnt signaling and PAR-1. *Development*, 138(24), 5441-5450.

O'Sullivan, M. L., de Wit, J., Savas, J. N., Comoletti, D., Otto-Hitt, S., Yates, J. R., & Ghosh, A. (2012). FLRT proteins are endogenous latrophilin ligands and regulate excitatory synapse development. *Neuron*, 73(5), 903-910.

Plouhinec JL, Medina-Ruiz S, Borday C, Bernard E, Vert JP, Eisen MB, Harland RM, Monsoro-Burq AH. A molecular atlas of the developing ectoderm defines neural, neural crest, placode, and nonneural progenitor identity in vertebrates. *PLoS Biol*. 2017 Oct 19;15(10):e2004045. doi: 10.1371/journal.pbio.2004045. PMID: 29049289; PMCID: PMC5663519.

Prasad, M. S., Sauka-Spengler, T., & LaBonne, C. (2013). Induction of the neural crest state: control of stem cell attributes by gene regulatory, post-transcriptional and epigenetic interactions. *Developmental biology*, 366(1), 10-21.

Rodríguez, M. (2016). Estudio funcional de Ric-8A durante la inducción de las Crestas Neurales en *Xenopus tropicalis*. Tesis para obtener el grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática, Universidad de Concepción.

Roemisch, J., Gray, E., Hoffmann, J. N., & Wiedermann, C. J. (2002). Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood coagulation & fibrinolysis*, 13(8), 657-670.

Romero, G. (2020). Estudio de la función de Ric-8A/Gαq durante la migración de las crestas neurales craneales de *Xenopus tropicalis*. Tesis para obtener el grado de Bioquímico, Universidad de Concepción.

Romo, X., Pastén, P., Martínez, S., Soto, X., Lara, P., Ramírez de Arellano, A., Torrejón, M., Montecino, M., Hinrichs, M., Olate, J. (2008). XRic-8 is a GEF for Gα and participates in maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 214:673-680.

Saare M, Lulla S, Tõnissoo T, Meier R, Kask K, et al. (2015) Expression Pattern and Localization Dynamics of Guanine Nucleotide Exchange Factor RIC8 during Mouse Oogenesis. *PLOS ONE* 10(6): e0129131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129131>

Saint-Jeannet, J. P. (2017). Whole-mount in situ hybridization of *Xenopus* embryos. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(12), pdb-prot097287.

Sato M, Blumer JB, Simon V, Lanier SM. (2006). Accessory proteins for G proteins: Partners in signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:151–187.

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

Schille, C., & Schambony, A. (2017). Signaling pathways and tissue interactions in neural plate border formation. *Neurogenesis*, 4(1), e1292783.

Session, A. M., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J. A., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A., Suzuki, A., Kondo, M., van Heeringen, S. J., Quigley, I., Heinz, S., Ogino, H., Ochi, H., Hellsten, U., Lyons, J. B., Simakov, O., Putnam, N., Stites, J., ... Rokhsar, D. S. (2016). Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538(7625), 336–343. <https://doi.org/10.1038/nature19840>

Siderovski, D. P., & Willard, F. S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *International journal of biological sciences*, 1(2), 51.

Simon, M., Strathmann, M., Gautam N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252:802-808. Sive, H. L., Grainger, R. M., & Harland, R.

M. (2000). Early development of *Xenopus laevis*: a laboratory manual. CSHL Press.

Šindelka, R., Ferjentsik, Z., & Jonák, J. (2006). Developmental expression profiles of *Xenopus laevis* reference genes. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(3), 754-758.

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

Song, M. R., Shirasaki, R., Cai, C. L., Ruiz, E. C., Evans, S. M., Lee, S. K., & Pfaff, S. L. (2006). T-Box transcription factor Tbx20 regulates a genetic program for cranial motor neuron cell body migration.

Soto, X. (2006). Participación de Gaq en el desarrollo embrionario temprano de *Xenopus laevis*. Tesis para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Biológicas, Área Biología Celular y Molecular, Universidad de Concepción.

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

Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuriyama, S., & Mayor, R. (2009). Differential requirements of BMP and Wnt signalling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development*, 136(5), 771-779.

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

Storch, U., Schnitzler, M. M. Y., & Gudermann, T. (2012). G protein-mediated stretch reception. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 302(6), H1241-H1249.

Stuhlmiller, T. J., & García-Castro, M. I. (2012). Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(22), 3715-3737.

Szabó, A., & Mayor, R. (2018). Mechanisms of neural crest migration. *Annual Review of Genetics*, 52(1), 43-63.

Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., ... & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*, 51(D1), D638-D646.

Tall G.G. (2013). Ric-8 regulation of heterotrimeric G proteins. *Journal of receptor and signal transduction research*, 33(3), 139–143. <https://doi.org/10.3109/10799893.2013.763828>

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

Tanigawa, S., Wang, H., Yang, Y., Sharma, N., Tarasova, N., Ajima, R., ... & Perantoni, A. O. (2011). Wnt4 induces nephronic tubules in metanephric mesenchyme by a non-canonical mechanism. *Developmental biology*, 352(1), 58-69.

Tobin, A. B. (2008). G-protein-coupled receptor phosphorylation: Where, when and by whom. *British journal of pharmacology*, 153(S1), S167-S176.

Toro-Tapia, G. (2012). Estudio del silenciamiento de XtRic-8 durante el desarrollo neural de *Xenopus tropicalis*. Unidad de Investigación, Universidad de Concepción.

Varankar, S. S., More, M., Abraham, A., Pansare, K., Kumar, B., Narayanan, N. J., ... & Bapat, S. A. (2020). Functional balance between Tcf21–Slug defines cellular plasticity and migratory modalities in high grade serous ovarian cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 41(4), 515-526.

Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P., & Mayor, R. (2002). Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Developmental biology*, 241(2), 289-301.

Villaseca, S., Leal, J. I., Guajardo, J., Morales-Navarrete, H., Mayor, R., & Torrejón, M. (2024). Gai2-Mediated Regulation of Microtubules Dynamics and Rac1 Activity Orchestrates Cranial Neural Crest Cell Migration in *Xenopus*. *bioRxiv*, 2023-09.

Villaseca, S. (2023). Estudio de la Función de Gai2 sobre la Polaridad Celular y Dinámica de los Microtúbulos Durante la Migración Colectiva en Células de la Cresta Neural Craneal de *Xenopus*. Tesis para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Biológicas, Área Biología Celular y Molecular, Universidad de Concepción.

Vonica, A., & Gumbiner, B. M. (2007). The *Xenopus* Nieuwkoop center and Spemann–Mangold organizer share molecular components and a requirement for maternal Wnt activity. *Developmental biology*, 312(1), 90-102.

Wang, L., Guo, D., Xing, B., Zhang, J. J., Shu, H. B., Guo, L., & Huang, X. Y. (2011). Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A (Ric-8A) is critical for growth factor receptor-induced actin cytoskeletal reorganization. *Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 31055-31061.

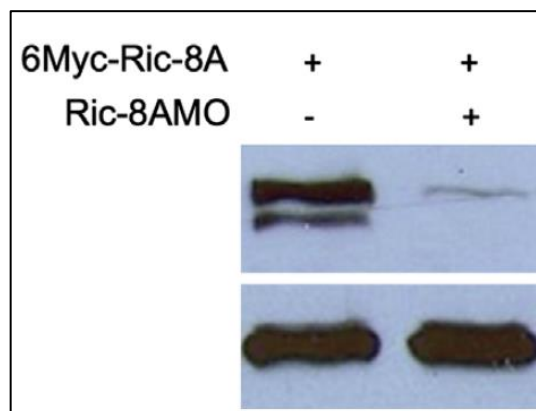
Wang, X., Zeng, W., Soyombo, A. A., Tang, W., Ross, E. M., Barnes, A. P., Milgram, S. L., Penninger, J. M., Allen, P. B., Greengard, P., & Muallem, S. (2005). Spinophilin regulates Ca<sup>2+</sup> signalling by binding the N-terminal domain of RGS2 and the third intracellular loop of G-protein-coupled receptors. *Nature cell biology*, 7(4), 405-411.

Westfall, T. A., Brimeyer, R., Twedt, J., Gladon, J., Olberding, A., Furutani-Seiki, M., & Slusarski, D. C. (2003). Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/ $\beta$ -catenin activity. *The Journal of cell biology*, 162(5), 889-898.

Winkler, J., & Prömel, S. (2016). The adhesion GPCR latrophilin—a novel signaling cascade in oriented cell division and anterior-posterior polarity. In *Worm* (Vol. 5, No. 2, p. e1005624). Taylor & Francis.

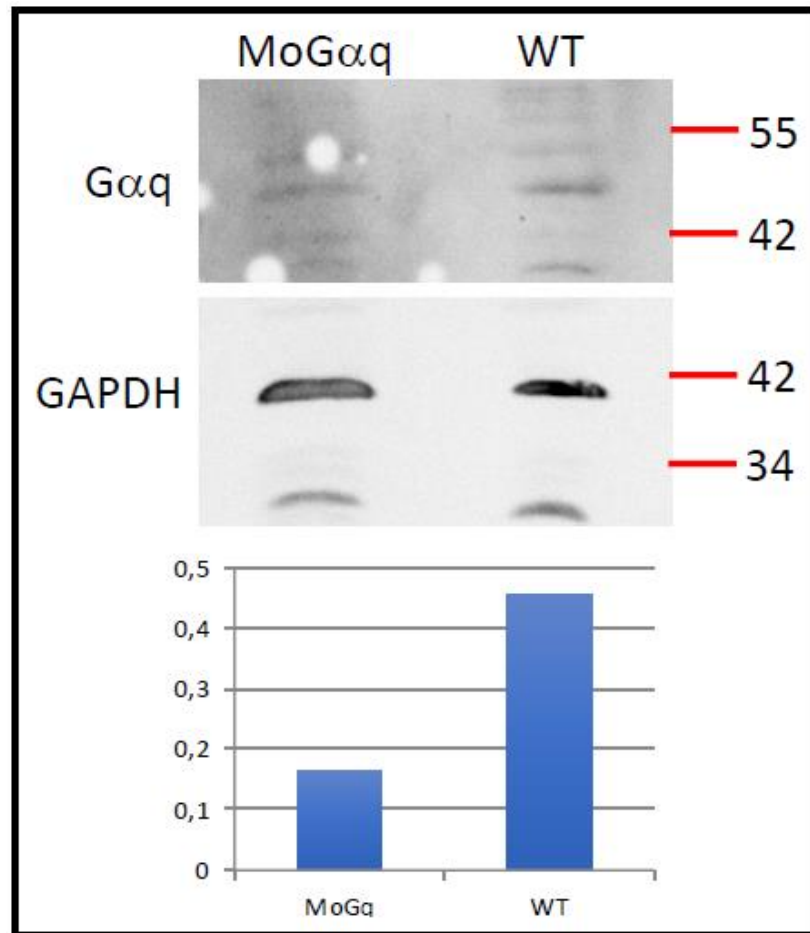
Wu, S. Y., Shin, J., Sepich, D. S., & Solnica-Krezel, L. (2012). Chemokine GPCR signaling inhibits  $\beta$ -catenin during zebrafish axis formation. *PLoS Biol*, 10(10), e1001403.

## ANEXOS



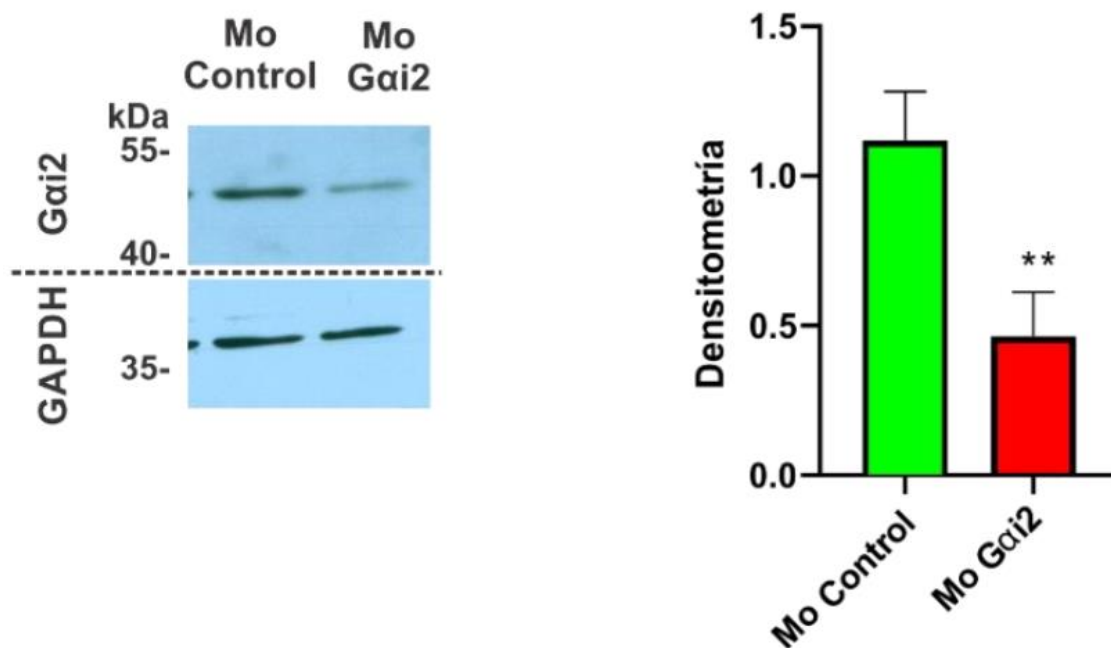
### Anexo I.

Ensayo de Western blot empleando un anticuerpo anti-myc para la detección de la proteína 6myc-Ric-8A. Se observa que, en presencia de MoRic-8A, se bloquea eficientemente la traducción del ARNm de Ric-8A, en comparación con la condición control, lo que respalda la eficiencia del silenciamiento del morfolino empleado (Fuentealba y col., 2013)



## Anexo II.

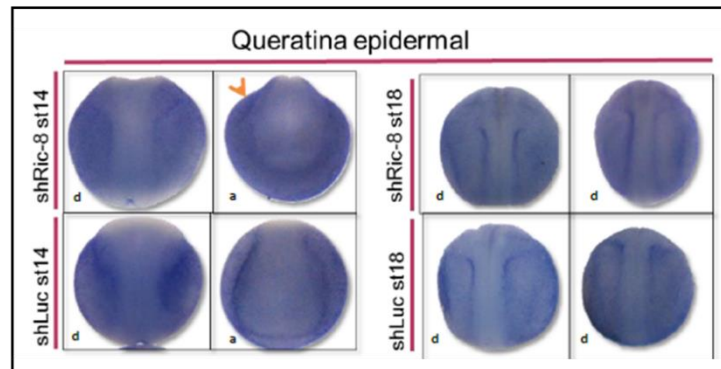
Ensayo de Western blot para la detección de la proteína Gαq. Se observa que, en comparación con la condición *wild type* (WT), hay una disminución de la proteína Gαq en la condición MoGαq, lo que respalda la eficiencia del silenciamiento del morfolino MoGαq empleado en esta tesis, ya que es capaz de bloquear eficientemente la traducción del ARNm de Gαq (Rodríguez, 2016, Tesis de Magister)



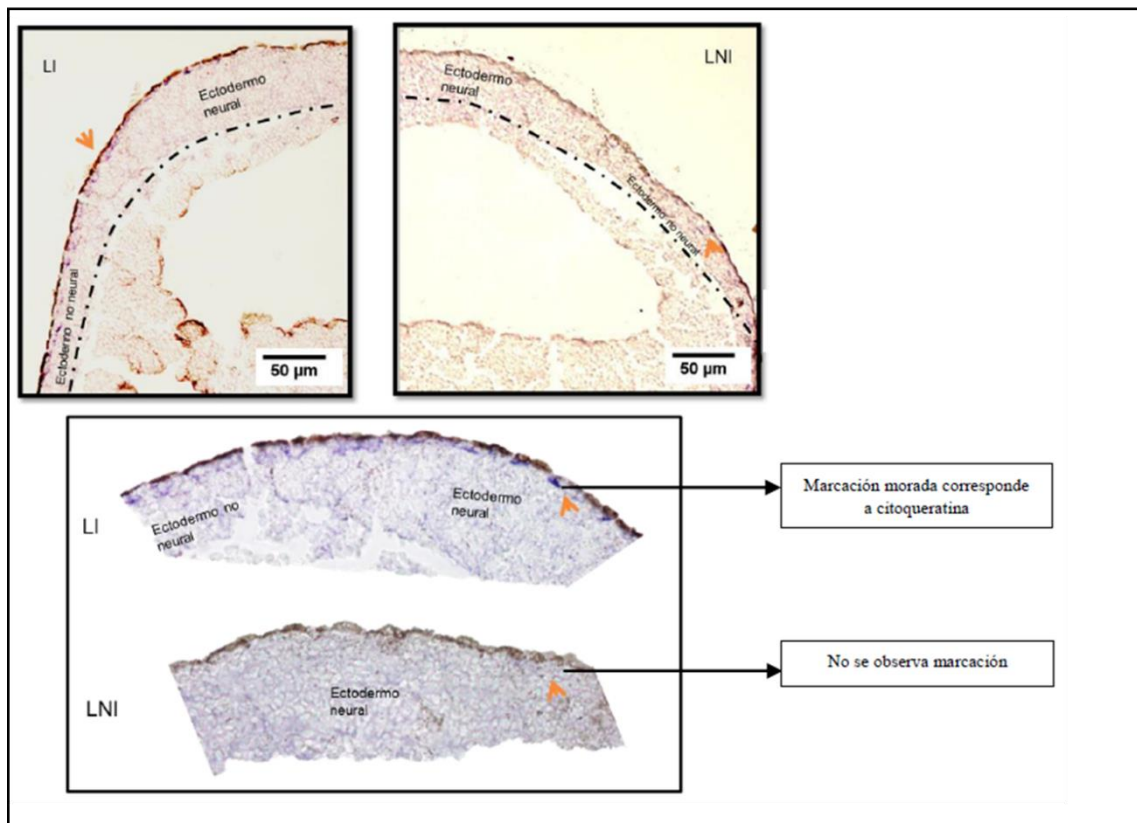
### Anexo III.

Ensayo de Western blot para la detección de la proteína Gai2. Se observa que, en comparación con la condición *wild type* (WT), hay una disminución de la proteína Gai2 en la condición MoGai2, lo que respalda la eficiencia del silenciamiento del morfolino MoGai2 empleado en esta tesis, ya que es capaz de bloquear eficientemente la traducción del ARNm de Gai2 (Villaseca, 2023, Tesis de Doctorado)

## Anexo IVA



## Anexo IVB



## Anexo IV.

(IVA) Hibridación *in situ* contra citoqueratina epidermal en embriones de *X. tropicalis* en estadio 14 y 18 inyectados con ARN de horquilla corta (*shRNA*) contra Ric-8A y *shRNA*

contra luciferasa como control, donde no se observa alteración del marcador en ambas condiciones. **(IVB)** Hibridación *in situ* en cortes transversales contra marcador citoqueratina epidermal en embriones estadio 14 inyectados con *shRNA* contra Ric-8A, donde se observa expresión del marcador en ectodermo neural en lado inyectado (Li) versus lado no inyectado (Lni). La flecha naranja indica la presencia o ausencia del marcador en cada lado. (Toro-Tapia, 2012, Unidad de Investigación)